

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DESCRITIVO E COMPARATIVO DA ARQUITETURA DE CÓRNEAS  
HUMANAS NORMAIS NO ENVELHECIMENTO**

MERRY ELIZABETH GOEDERT

Brasília, Distrito Federal

2019

MERRY ELIZABETH GOEDERT

**ESTUDO DESCRITIVO E COMPARATIVO DA ARQUITETURA DE CÓRNEAS  
HUMANAS NORMAIS NO ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Médicas da Faculdade de  
Medicina da Universidade de  
Brasília, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus

Brasília, Distrito Federal

2019

Dedico este trabalho primeiramente a DEUS meu alicerce.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos doadores de órgãos, assim como as famílias que na perda do ente querido são capazes de transformar a “dor” em “doação”.

À toda equipe do Banco de Olhos do Distrito Federal, por sua ética e empenho aos pacientes e pelo apoio incondicional na coleta dos dados.

À Professora Dra. Selma Aparecida de Souza Kückelhaus, orientadora deste trabalho, agradeço imensamente a sua orientação, a sua paciência e todo seu carinho.

À Mestre Maria da Glória da Silva que tão brilhantemente participou ativamente na execução do trabalho.

Ao estagiário Maycon Derberson Maciel Carvalho, pelo imenso apoio no preparo das amostras.

Ao colega Felipe Beltrão de Medeiros, ao apoio nas coletas das imagens.

Aos funcionários da Área de Microscopia eletrônica/IB Ingrid, Diogo, em especial a Dra Sônia Nair Bão.

Aos colegas e técnicos da Área de Morfologia/FM Andreanne, Anderson, Daniel e Giulliano grata pelo apoio.

Aos funcionários da Pós-Graduação/FM, grata pela atenção e carinho dispensado a mim.

Aos oftalmologistas Dr Canrobert Oliveira, Dra Maria Regina Catai Chalita, Dra Micheline Borges Lucas e Dr Tulio Frade Reis que direta e indiretamente me ajudaram com seus conhecimentos.

Ao Exército Brasileiro, em especial a equipe do serviço de oftalmologia do Hospital Militar de Área de Brasília, por ser a mão amiga e estar ao meu lado nessa caminhada.

Aos meus pais, Mario Goedert e Judésia Mendes, pelos ensinamentos e pelo muito que me proporcionaram, que Deus abençoe!

A todos que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

## PREFÁCIO

Ao observar as cirurgias refrativas e os esforços dos cirurgiões oftalmologistas para obterem os melhores resultados aos seus pacientes, compreendi a importância do tema, sobretudo, pelo grande aumento do número de cirurgias refrativas; além das características peculiares da córnea por ser avascular, a extrema exposição a agressores externos e o envelhecimento durante a vida, fatores esses que resultam em alterações morfofuncionais, por conseguinte implicam muito na qualidade de vida dos pacientes e nos resultados cirúrgicos.

A curiosidade de desvendar essa estrutura tão peculiar e tão importante à visão, levou-me a procurar a equipe de pesquisa em Morfologia e Imunologia aplicada coordenada pela Profa. Selma A. S. Kückelhaus na Área de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, desenvolvendo um projeto de grande relevância científica e, aliar a isso, meus conhecimentos técnicos.

Acredito que o avanço de novas tecnologias pode permitir intervenções e propostas terapêuticas, assim como propagar os conhecimentos aqui gerados pode contribuir no futuro para maior segurança nas cirurgias refrativas.

## RESUMO

**Introdução:** A córnea é uma estrutura complexa responsável por quase três quartos do poder óptico o que torna a córnea a principal lente do olho humano, além de conferir uma barreira de proteção a agentes externos, permite a transmissão e a refração da luz. Tem sido reportado que o processo normal de envelhecimento pode afetar a integridade da córnea. Assim, esse estudo teve como objetivo comparar e descrever a arquitetura e as alterações estruturais, vasculares e imunitárias da córnea decorrentes do envelhecimento para auxiliar condutas terapêuticas em benefício da qualidade visual dos indivíduos.

**Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo transversal descritivo e comparativo da arquitetura estrutural de córneas humanas normais (n = 15) sem histórico de doenças oculares, descartadas pelo Banco de Olhos. As córneas foram coletadas em solução de preservação, fixadas com paraformaldeído a 10%, lavadas e seccionadas. Um quadrante de cada espécime (n=15) foram re-fixados (glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2%, lavados, pós-fixados (tetróxido de ósmio a 1%), desidratados em soluções de acetona (30% a 100%), secos até o ponto crítico com CO<sub>2</sub> e metalizados com ouro. As imagens das faces anterior, perfil e posterior foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (JSM- 7000F, JEOL, Tokyo, Japan). Três quadrantes de cada espécime (n=9) foram fixados, desidratados em álcool, diafanizados em xilol, embebidos e emblocados em parafina, seccionados em cortes frontais e sequenciados (6 µm), após corados com hematoxilina e eosina, Tricromio de Gomori, Gomori para reticulina e Weigert.

**Resultados:** O perfil dos doadores mostrou predomínio sexo masculino (80%), sorologias negativas em cerca de 73,3% e doenças cardiovasculares sendo a causa *mortis* mais prevalente. Os resultados mostraram em relação a idade: 1) a espessura total da córnea na córnea central (CC) é menor que na córnea periférica (CP) para G1 (<40anos) (Teste t, p=0,049), não houve diferença para G2 (≥ 40 anos). 2) Camada de Bowman, membrana de Descemet e endotélio mostraram maior espessura CP para G1 (p<0,01); para G2 foi mais espessa na CP apenas na Camada de Bowman (Test t, p=0,049). 3) A espessura do endotélio na CP foi menor no G2 do que no G1 (Test t, p=0,015). 4) O percentual de desepitelização, assim como o total de lamelas desagregadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupo ou/e regiões. 5) O número de lesões endoteliais foi maior no G2 em comparação ao G1 (Test t, p<0,05). 7) O número de leucócitos segmentados foi maior no G1 em relação ao G2 (Test t, p=0,023). 8) Fenestrações pericorneais margeadas por fibras colágenas e por fibras elásticas internamente foram identificadas em maior quantia na região posterior da córnea próximo ao ângulo iridocorneano aonde se integram com a rede trabecular, **Discussão e Conclusão:** O presente estudo mostrou alterações estruturais nos constituintes da córnea com o envelhecimento. Essas alterações podem refletir na perda da transparência da córnea observada nos idosos, sobretudo pela diminuição funcional do seu endotélio. Diferentemente de outros estudos, os cortes frontais e sequenciados permitiram avaliar as fibras elásticas no perímetro corneano que são de suma importância para num futuro próximo identificar a interrelação córnea – limbo – malha trabecular e prováveis avanços nas áreas do glaucoma e no estudo da córnea humana e assim contribuir para melhorar as condutas terapêuticas em benefício da qualidade visual dos indivíduos ao longo do processo de envelhecimento.

**Palavras chave:** Córnea humana; Envelhecimento; Estrutura corneal; Córnea central; Córnea periférica; Fibras elásticas.

## ABSTRACT

**Introduction:** The cornea is a complex structure responsible for nearly three-quarters of optical power making the cornea the main refracting lens in the human eye, as well as providing a protective barrier for external agents it allows the transmission and refraction of light. It has been reported that the normal aging process can affect the integrity of the cornea. Thus, this study aimed at comparing and describing the architecture and structural, vascular and immune changes of the cornea resulting from aging to assist therapeutic behaviors in benefit of the visual quality of the individuals. **Materials and Methods:** This is a cross-sectional descriptive and comparative study of the structural architecture of normal human corneas (n = 15), with no history of ocular diseases, discarded by Eye Bank. The corneas were collected in preservation solution, fixed with 10% paraformaldehyde, washed and sectioned. One quadrant of each specimen were then re-fixed (2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde), washed, post-fixed (1% osmium tetroxide), dehydrated in acetone solutions (30% to 100%), dried to critical point with CO<sub>2</sub> and metalized with gold. Images of the anterior, transversal and posterior faces were obtained by scanning electron microscopy (JSM-7000F, JEOL, Tokyo, Japan). Three quadrants of each specimen (n = 9) were fixed, dehydrated in alcohol, diaphanized in xylol, embedded and blocked in paraffin, sectioned in frontal cuts and sequenced (6 µm) after staining with hematoxylin and eosin, Gomori trichrome, Gomori for reticulin and Weigert. **Results:** The profile of the donors showed a predominance of masculine sex (80%), negative serologies in 73.3% and cardiovascular diseases being the most prevalent cause. The results showed: 1) total cornea thickness in the central cornea (CC) is smaller than in the peripheral cornea (CP) for G1 (<40 years) (Test t, p = 0.049), there was no difference for G2 (≥ 40 years). 2) Bowman's layer, Descemet's membrane and endothelium showed higher CP thickness for G1 (p <0.01); for G2 was thicker in CP only in the Bowman's Layer (Test t, p = 0.049). 3) The endothelium thickness at CP was lower in G2 than in G1 (Test t, p = 0.015). 4) The percentage of de-epithelialization, as well as the total of disaggregated lamellae did not present significant differences between the groups or / and regions. 5) The number of endothelial lesions was higher in G2 than in G1 (Test t, p <0.05). 7) The number of segmented leukocytes was higher in G1 than in G2 (Test t, p = 0.023). 8) Pericorneal fissures marred by collagen fibers and elastic fibers internally were identified in greater amount in the posterior region of the cornea near the irido-corneal angle where they integrate with the trabecular meshwork. **Discussion and Conclusion:** The present study showed structural alterations in the constituents of the cornea with aging. These changes may reflect the loss of corneal transparency observed in the elderly, mainly due to the functional decrease of their endothelium. Differently from other studies, the frontal and sequenced cuts allowed to evaluate the elastic fibers in the corneal perimeter which are of great importance in the near future to identify the cornea - limbal - trabecular meshwork interlocking and probable advances in the areas of glaucoma and in the study of the human cornea and thus contribute to improve the therapeutic behaviors in benefit of the visual quality of the individuals throughout the process aging.

• **Key words:** Human cornea; Aging; Corneal structure; Central cornea; Peripheral cornea; Elastic fibers.

**SUMÁRIO**

Prefácio	IV
Resumo	V
Abstract	VI
1. Introdução	01
1.1 Desenvolvimento e morfologia da córnea	03
1.2 Metabolismo e nutrição	13
1.3 Inervação da córnea	13
1.4 Reparação tecidual na córnea	14
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Materiais e métodos	18
3.1 Delineamento experimental	19
3.2 Tipo de estudo e critérios éticos	20
3.3 Indivíduos	20
3.4 Critérios de inclusão e exclusão	20
3.5 Obtenção das amostras e local do estudo	21
3.6 Procedimentos experimentais	21

3.7	Obtenção dos dados morfométricos	24
3.8	Análise estatística	25
4.	Resultados	26
4.1	Perfil dos indivíduos	27
4.2	Espessura das camadas da córnea	27
4.3	Arquitetura e qualidade das camadas da córnea	30
4.4	Caracterização das fibras elásticas e do perímetro corneano	37
4.5	Sumário dos resultados	41
5.	Discussão	42
6.	Conclusão	50
7.	Limitações e perspectivas	52
8.	Referências bibliográficas	54
9.	Anexos	61

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.	Desenvolvimento embrionário da córnea	03
Figura 2.	Resumo do desenvolvimento dependente de TGF $\beta$ da córnea	04
Figura 3.	Esquema das diferentes camadas da córnea	05
Figura 4.	Esquema representativo dos complexos juncionais do epitélio da córnea	06
Figura 5.	Esquema ilustrativo da interação entre as fibrilas de colágeno e os proteoglicanos	09
Figura 6.	Organização esquemática de fibras elásticas na região limbal	10
Figura 7.	Esquema da teoria do X, Y e Z para o processo de regeneração epitelial da córnea	14
Figura 8.	Organograma do estudo	19
Figura 9.	Fotografia ilustrativa do meio de preservação das córneas	21
Figura 10.	Esquema demonstrativo da obtenção de amostras para a coleta dos dados morfológicos	22
Figura 11.	Procedimentos de transporte e controle das amostras	22
Figura 12.	Córnea humana após processamento para microscopia eletrônica da varredura	23
Figura 13.	Medida da Espessura total da córnea em milímetros	24
Figura 14.	Avaliação da Integridade estromal	24
Figura 15.	Identificação de fibras da matriz extracelular.	25
Figura 16.	Espessura total das córneas dos indivíduos	28
Figura 17.	Espessura das camadas da córnea dos indivíduos	29
Figura 18.	Fotomicrografias e Eletromicrografias de varredura da córnea de indivíduos adultos.	30

Figura 19.	Percentual de perda do epitélio anterior nas regiões periféricas e central das córneas	31
Figura 20.	Eletromicrografias de varredura da córnea evidenciando o epitélio anterior íntegro, perda parcial e perda total do epitélio	31
Figura 21.	Fotomicrografias e eletromicrografias de córneas humanas evidenciando a camada de Bowman e estruturas adjacentes	32
Figura 22.	Eletromicrografias de varredura de córneas humanas evidenciando estroma e estruturas adjacentes	33
Figura 23.	Eletromicrografias de varredura da córnea evidenciando a clivagem espontânea entre membrana de Descemet e o estroma	34
Figura 24.	Total de lesões no endotélio (3 x 500 $\mu\text{m}^2$ )	35
Figura 25.	Eletromicrografias de varredura da região posterior de diferentes córneas	35
Figura 26.	Fotomicrografias da região estromal de córneas exibindo capilares intraestromais	36
Figura 27.	Total de leucócitos intraestromais (10 $\text{mm}^2$ )	37
Figura 28.	Eletromicrografias da face posterior de uma córnea exibindo as fenestrações pericorneais, o limbo e a esclera	37
Figura 29.	Eletromicrografias de uma córnea (secção transversal) exibindo as fenestrações pericorneais, o limbo e a esclera	38
Figura 30.	Fotomicrografias de três secções histológicas de córnea exibindo as fibras elásticas espessas	39
Figura 31.	Fotomicrografias de uma secção histológica em vista panorâmica	39
Figura 32.	Organização esquemática de fibras elásticas na região limbal	40

**LISTA DE SIGLA**

**°C** – Graus Celsius

**Å** – ångström

**AAO** – American Academy of Ophthalmology

**Anti-HBc** – anticorpos contra o antígeno core do vírus da hepatite B

**ATPase** – adenosinatrifosfatase (enzimas catalizadoras)

**BB** – Técnica de Big Bubble (injeção de ar na estrutura da córnea)

**BODF** – Banco de olhos do Distrito Federal

**CAAE** – Certificado de apresentação para apreciação ética

**Causa *mortis*** – causa do óbito

**CBO** – Conselho Brasileiro de Oftalmologia

**CC** – córnea central

**CK** – citoqueratina

**CO<sub>2</sub>** – dióxido de carbono

**CP** – córnea periférica

**D** – Dioptrias

**DALK** – Transplante Lamelar Anterior Profundo (Deep Anterior Lamelar Keratoplasty)

**DF** – Distrito Federal

**DP** – Desvio padrão

**et al** – e outros

**Eusol®** – Meio de preservação oftalmológico comercial

**FGF** – Fator de crescimento fibroblástico

**GIMP 2.8** – software de editar imagens

**h** – Hora

**HBsAg** – antígeno de superfície da Hepatite B

**HE** – Coloração com corantes Hematoxilina e Eosina

**HIV** – Human Immunodeficiency Virus ( vírus da imunodeficiência humana)

**IAM** – Infarto agudo do miocárdio

**ICC** – Insuficiência cardíaca congestiva

**IR** – índice de refração

**K** – Potássio (Elemento Químico)

**LASIK** – Laser in situ keratomileusis

**MEV** – Microscopia eletrônica de varredura

**MMPs** – Metaloproteinases

**MO** – Microscopia óptica

**MOR/FM** – Morfologia/ Faculdade de Medicina

**MUC** – mucina

**N-CAM** – Moléculas de adesão celular

**Na** – Sódio (Elemento Químico)

**NaCl** – Cloreto de sódio

**p** – probabilidade de significância

**PAS** – Ácido periódico-Schiff

**PG** – Proteoglicanos

**pH** – Potencial de Hidrogênio

**PRISM®** – software de estatística

**SEM** – Scannig electronic microscopy

**SES-DF** – Secretaria de Saúde de Estado do Distrito Federal

**SUS** – Sistema Único de Saúde

**TCE** – Trauma crânio-encefálico

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TGF** – Fator de transformação do crescimento

**USA** – Estados Unidos

**WHO** – World Health Organization (organização mundial de saúde)

**µm** – Micrometros



A córnea é responsável por quase três quartos do poder óptico (43,25 D), o que torna a córnea a principal lente do olho humano e, além de conferir uma barreira de proteção a agentes externos, permite a transmissão e a refração da luz ( $n=1,376$ ) (Kanski 2012; Rodrigues 2011).

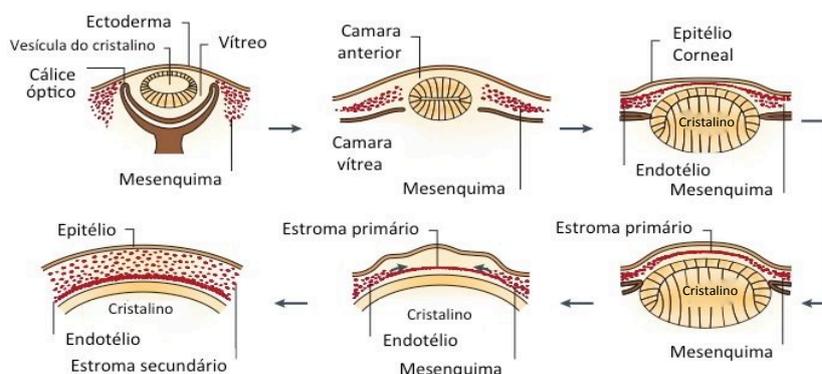
Algumas patologias que acometem a córnea podem alterar a sua forma normal. O ceratocone e a distrofia corneal endotelial de Fuchs são doenças multifatoriais da córnea, nas quais a patogênese não é totalmente compreendida. Contudo, níveis aumentados de marcadores de stress oxidativo detectados nestas perturbações indicam que o stress oxidativo pode desempenhar um papel importante no seu desenvolvimento e progressão. Sabe-se que pela sua localização e função, a córnea é regularmente exposta à luz solar e oxigênio atmosférico, principalmente dióxido de carbono, sendo, portanto, susceptíveis ao estresse oxidativo. O acúmulo de radicais livres nas células da córnea pode afetar a transdução do sinal, a proliferação e pode promover a morte celular, quando falham os mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não-enzimáticos (Wojcik et al. 2013).

O Ceratocone que acomete 1 por 2000 na população geral, é uma ectasia corneana progressiva que ocorre durante a adolescência e progride até a quarta década de vida, quando se estabiliza (Rabinowitz & Keratoconus, 1998; De Bonis et al. 2011). A diminuição das defesas antioxidantes nas córneas com ceratocone e o aumento dos níveis de radicais livre podem levar à degradação da matriz extracelular do estroma e à modificação de compostos celulares, tornando-os mais suscetíveis à degradação e resultar em estroma mais fino (Arnal et al. 2011).

Na Distrofia de Fuchs, que afeta cerca de 4% da população com mais de 40 anos de idade, reporta-se maior dano oxidativo no DNA associado à gutta corneana (proeminências irregulares da membrana de Descemet, resultado da produção anormal de colágeno pelas células endoteliais)(CBO 2013b), indicando uma associação entre o dano macromolecular desencadeado pelo estresse oxidativo e a apoptose das células endoteliais (Jurkunas et al. 2010). Tem sido reportado que o processo normal de envelhecimento pode afetar a integridade da córnea pela diminuição do número de células endoteliais e pelo aumento na espessura da membrana de Descemet. Também, a espessura do estroma central corneano diminui, sobretudo, nos homens (Galgauskas et al. 2014) indicando que os idosos apresentam córneas delgadas, além disso, as microestruturas do limbo também se tornam mais suaves com a idade (Notara et al. 2013).

## 1.1. DESENVOLVIMENTO E MORFOLOGIA DA CÓRNEA

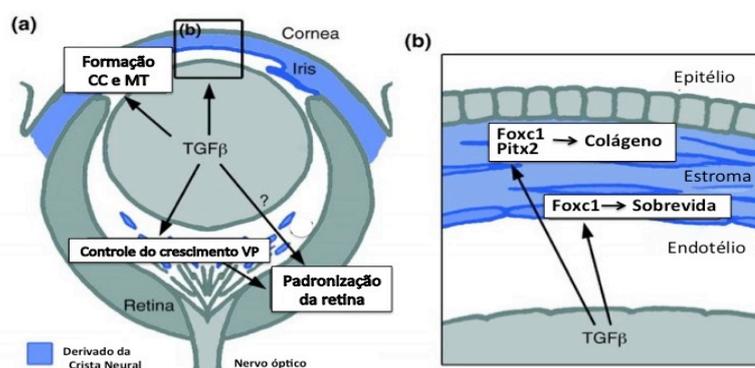
A córnea se origina de dois tecidos a partir da quinta semana do desenvolvimento, o ectoderma que dá origem ao epitélio e a crista neural que desenvolve o endotélio da córnea e mesênquima que forma o tecido conjuntivo relacionado (Rodrigues 2011). O início do desenvolvimento corneal ocorre quando a vesícula cristaliniana se separa do ectoderma e induz a camada basal de células epiteliais a secretar fibrilas de colágeno e glicosaminoglicanos que ocupam o espaço entre o cristalino e o epitélio corneano, constituindo assim o estroma primário. A partir desse momento, três ondas de migração de células mesenquimais originárias da crista neural ocupam o espaço entre o estroma primário. A primeira onda que ocorre até a sexta semana forma o endotélio corneano. A segunda onda que se direciona para o cálice óptico assume a região entre o endotélio e o cristalino para formar uma matriz frouxa fibrilar que dará origem ao estroma da íris e a membrana pupilar; a matriz frouxa restante desaparece, dando lugar para novas células migratórias. A terceira onda migratória durante a sétima semana ocupa a região entre o epitélio anterior primitivo e o endotélio para dar origem aos fibroblastos corneanos (ceratócitos ativados originários de células basais do epitélio anterior) (Figura 1) (Ambrósio & Crema 2014; Fukuda et al. 2017).



**Figura 1.** Desenvolvimento embrionário da córnea (Adaptado a partir de Zavala et al. 2013)

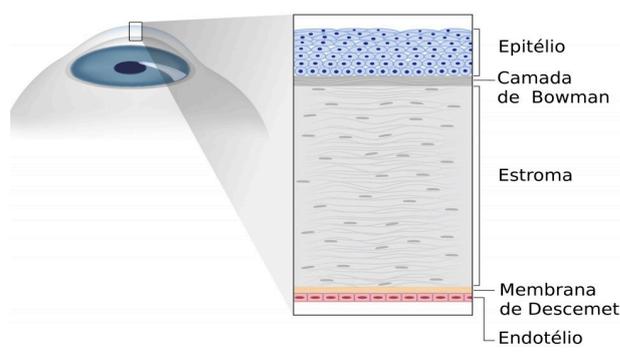
Por volta do quarto mês, o endotélio secreta a membrana de Descemet e entre o quarto e quinto mês observa-se a formação da membrana de Bowman (Gomes et al. 2002; Rodrigues 2011), ambas a partir dos seus respectivos epitélios. No sexto mês se forma a rede trabecular póstero-lateral e o canal de Schlemm e no oitavo mês o seio venoso da esclera se conecta com esse canal; o desaparecimento das células entre a rede trabecular e o estroma iriano é a responsável pela formação do ângulo iridocorneano da câmara anterior, que durante o primeiro ano de vida adquire a sua configuração normal.

No limite da córnea encontra-se o limbo e a esclera. A porção anterior da esclera se desenvolve a partir do mesênquima da crista neural, enquanto que a porção posterior se forma do mesoderma (Rodrigues 2011). Apesar de não totalmente esclarecido, sabe-se que os fatores de transcrição como *Foxc1*, *Foxc2*, *Lmx1b*, *Pax6*, *Pitx2*, *RARb*, *RARg*, *RXRa*, *Six3*, and *Smad2* estão envolvidos na migração das células da crista neural (Bennett et al. 1999; Lee & Kay 2012; Zavala et al. 2013). O fator transcricional *Pax6* é requerido no desenvolvimento de todas as camadas da córnea (Collinson et al. 2003) e que moléculas como *FGF2*, *TGFb1*, *TGFb2*, e *Bmp7* estão envolvidas na regulação da expressão do *Pax6* (Grocott 2011). Tem sido proposto também que os membros da subfamília TGF- $\beta$  iniciam um mecanismo de suporte para regular a função e a transcrição do *Pax6* e que a *TGFb1* e *TGFb2* também modulam a expressão do colágeno, bem como a proliferação e a morfologia celular no endotélio; tanto o *Pax6*, quanto o *Lmx1b* e o *Pitx2* são importantes na manutenção da integridade endotelial (Lang 2004; Hassell & Birk 2010; Whikehart 2010; Grocott et al. 2011; Zavala et al. 2013).



**Figura 2.** Resumo do desenvolvimento dependente de TGF $\beta$  da córnea. Em **a**, células derivadas da crista neural e em **b**, a sinalização de TGF $\beta$  na córnea necessária para a expressão dos fatores de transcrição (Adaptado a partir de Ittner et al. 2005).

A córnea é um tecido avascular pertencente à túnica fibrosa do olho localizada na região anterior do globo ocular, transparente, esférica, convexa (Ambrósio & Crema 2014) com o raio de curvatura anterior em torno de 7,7 mm e o posterior de 6,5 mm para o meridiano vertical. Em condições normais, a córnea se assemelha a um menisco elíptico com diâmetro de 11 mm verticalmente e 12 mm horizontalmente; sua espessura aumenta do centro (~ 540  $\mu\text{m}$ ) para a periferia atingindo ~ 700  $\mu\text{m}$  no limite com o limbo (CBO 2013a). Anteriormente, ela é delimitada por um epitélio estratificado que se apoia sobre a membrana de Bowman e posteriormente, sua delimitação é feita pelo epitélio pavimentoso simples, conhecido como o endotélio corneano; este se apoia numa membrana basal espessa (membrana de Descemet). Funcionalmente, a camada de Bowman e a Descemet respondem por 20% da rigidez de flexão da córnea (Shih et al. 2017; Ma et al. 2018).



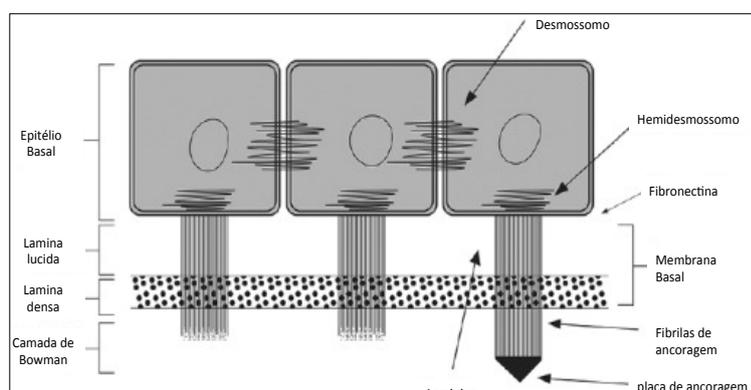
**Figura 3.** Esquema das diferentes camadas da córnea (Alila Medical Media / Shutterstock.com)

### Epitélio anterior

O epitélio anterior da córnea possui espessura de 50  $\mu\text{m}$  e representa 10 a 12% da espessura total da córnea. É constituído por cinco ou seis camadas celulares no centro da córnea, e oito a dez camadas na periferia (Rodrigues 2011), sendo de 2 a 4 camadas de células superficiais escamosas não queratinizadas, de 2 a 3 camadas de células aladas e uma camada de células colunares basais aderidas à membrana basal (Kanski 1994; Ambrósio & Crema 2014; Sridhar 2018). Superficialmente, as células apresentam um diâmetro de 40  $\mu\text{m}$  a 60  $\mu\text{m}$  e de 2  $\mu\text{m}$  a 6  $\mu\text{m}$  de espessura, armazenam grânulos de glicogênio e abrigam o glicocálix composto de mucinas transmembrana (MUC1, MUC 16), além disso, essas células são cobertas por microvilos e microplacas, interconectados com ondulações com cerca de 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura e de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de altura, sendo componente essencial nas trocas metabólicas, na posição e estabilidade do filme lacrimal (Ambrósio & Crema 2014). As células maduras presentes nas camadas mais superficiais do epitélio corneano anterior expressam citoqueratina 3 (CK3) e citoqueratina 12 (CK12), que são consideradas marcadores específicos de células epiteliais corneanas terminalmente diferenciadas (Shiraishi et al. 1998; Tanifuji-Terai et al. 2006; Martins 2017). As células aladas intermediárias são parcialmente diferenciadas e são ricas em filamentos intracelulares de queratina (Ambrósio & Crema 2014). As células basais ou germinativas têm densidade celular de 6000 células/ $\text{mm}^2$ , são arranjadas em uma fileira única com formato cuboide-colunar, medindo cerca de 20  $\mu\text{m}$  de espessura por 10  $\mu\text{m}$  diâmetro e são particularmente ricas em tonofibrilas e filamentos de actina. Essas tonofibrilas são responsáveis pela manutenção da arquitetura celular, enquanto os filamentos de actina tem papel relevante na migração celular durante o processo de reparação celular (Ambrósio & Crema 2014; Alkatan & Alzahem 2018). Na periferia do epitélio corneano encontram-se as células de Langerhans que são capazes também de migrar para o centro da córnea em caso de lesão tecidual (Ambrósio & Crema 2014).

As células epiteliais corneais possuem dois mecanismos principais para a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, sendo o primeiro relacionado à moléculas de adesão (N-CAM e caderinas - cálcio independente e as integrinas) e o segundo representado por desmossomas célula-célula e hemidesmossomas célula-membrana basal/camada de Bowman/estroma (Gomes & Alves 2011; Tanifuji-Terai et al. 2006).

A córnea é ricamente innervada por ramos do nervo trigêmeo que formam o plexo intraepitelial com aparentemente efeito trófico no epitélio; estima-se cerca de 7000 nociceptores/mm<sup>2</sup> no epitélio corneano humano (Ambrósio & Crema 2014).



**Figura 4.** Esquema representativo dos complexos juncionais do epitélio da córnea (Adaptado a partir de Sridhar 2018).

### Camada de Bowman

A camada de Bowman não é de fato membrana basal verdadeira, uma vez que as glicoproteínas são ausentes como mostra a histoquímica com o ácido periódico de Schiff (PAS) (Alkatan & Alzahem 2018). Essa camada é resistente, densa e acelular com espessura de 7 a 12  $\mu\text{m}$  e constituída pela condensação de proteoglicanos e colágeno tipo I e V. Ela se localiza entre o epitélio e o estroma, mas em contraste com o estroma a razão do colágeno tipo V para o tipo I é maior, além disso, diferentemente do estroma, as lamelas são menores e mais desorganizadas (Gomes & Alves 2011; Alkatan & Alzahem 2018).

As fibrilas de colágeno que constituem a membrana de Bowman são delgadas e uniformes, com periodicidade entre 240 a 270 Å (ångström) de diâmetro, interligadas ao acaso e circundadas por substância fundamental amorfa; à medida em que se aprofundam, estas fibrilas vão se organizando em lamelas semelhantes às estromais até se fundirem com as mesmas (Gomes & Pires 2002). Essa disposição das fibras tem a função estrutural, a resistência ao trauma (protegendo o estroma e nervos associados), e a proteção contra a radiação ultravioleta (Guimarães et al. 1987; Victor 2018), além de dificultar a exposição dos fibroblastos a citocinas (Ex.

TGF) secretadas pelas células epiteliais, como observado em cirurgias como LASIK (*Laser in situ keratomileusis*), na qual a camada de Bowman é transeccionada mas não retirada; nesses casos a complicação de haze (opacificação corneana) em córnea central é extremamente rara (American Academy of Ophthalmology - AAO 2012).

## **Estroma**

O estroma corneano mede cerca de 500 µm no centro da córnea, sendo mais espesso na periferia, isso corresponde a 90% da espessura corneal (Alkatan & Alzahem 2018). Essa camada é composta por fibroblastos, fibras nervosas, uma matriz extracelular densa e uma matriz amorfa (Rodrigues 2011; Gomes & Alves 2011). A quantidade relativa das fibras colágenas e sua organização estão fortemente relacionadas a propriedades biomecânicas, incluindo a resistência, a forma e a transparência (Bourne 1997; Boote 2003; Schlötzer-Schrehardt & Kruse 2016; Ma et al. 2018).

O estroma contém aproximadamente 78% de água (Maurice 1970; Zavala et al. 2013), sendo a porção posterior tipicamente mais úmida que a anterior. Isto ocorre por causa da proximidade dessa região com o humor aquoso presente na câmara anterior do olho, bem como pela maior distância da superfície epitelial anterior; sabe-se que falhas da camada endotelial acarretam edema da córnea pelo excesso de água no estromal (Alkatan & Alzahem 2018).

As fibras colágenas (colágeno do tipo I) são responsáveis por mais de 70% da massa seca da córnea (Rodrigues 2011), mas também são encontrados os colágenos V, VI, VII, XII e XIV (AAO 2012). O arranjo regular das fibrilas de colágeno tipo I (50%-55% do colágeno do estroma) é um fator importante para a transparência da córnea. Ao todo, o estroma é composto por cerca de 200 a 250 lamelas de fibrilas paralelas que se estendem de uma região límbica a outra, sendo superpostas de tal maneira que elas se dispõem num ângulo de 90° entre si, excetuando-se as lamelas mais anteriores que se fundem com a camada de Bowman (Gomes & Pires 2002), entrelaçam-se com fibras profundas do estroma e novamente se inserem na Camada de Bowman para formar estruturas em forma de mola (Geroski et al. 1985; Schlötzer-Schrehardt & Kruse 2016); essa arquitetura da parte mais anterior (100-120 µm) do estroma previne mudanças na morfologia da região estromal mesmo após edema extremo, com isso a curvatura suave no lado anterior não é afetada em condições de hidratação excessiva.

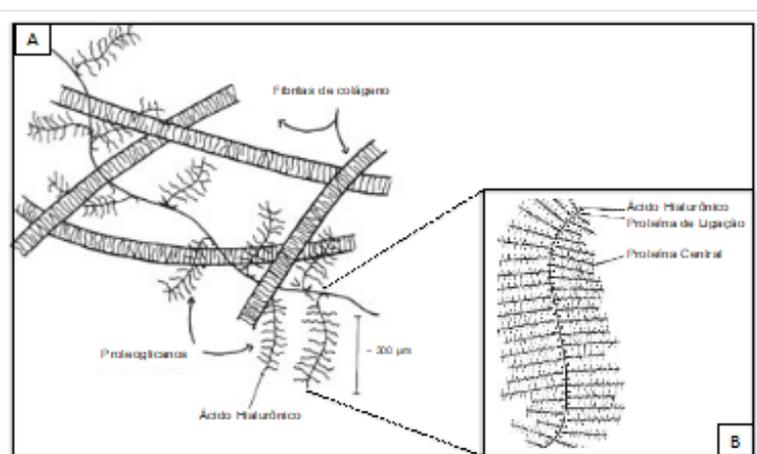
A ultraestrutura organizacional das lamelas parece variar com a profundidade estromal (anteroposterior), mas também em relação a região periférica e central da córnea. A densidade das lamelas de colágeno é maior no estroma anterior, no entanto, a sua largura, homogeneidade e regularidade aumentam gradualmente com a profundidade do estroma (Kamma-Lorger et al. 2010; Winkler et al. 2011; Bueno et al. 2011; Morishige et al. 2014; Schlötzer-Schrehardt & Kruse 2016). As fibrilas de colágeno na região pré-pupilar parecem estar mais compactadas que na córnea periférica; a alta densidade de empacotamento de fibrilas de colágeno parece ser necessária para manter a força da córnea e, portanto, a curvatura em uma região de espessura reduzida da córnea, pois contém a tensão na córnea pré-pupilar (Kanski 1994; Ma et al. 2018).

O estroma corneano pode ser comparado a um cristal líquido que possibilita a passagem da luz de uma lamela para a outra, em que a orientação das moléculas de colágeno sofre uma rotação no sentido horário — esta disposição é semelhante à organização de moléculas no estado colestérico (no qual a direção segue uma estrutura helicoidal) dos cristais líquidos (Gomes & Pires 2002; Bechtold 2005). A distância entre as fibras de colágeno é extremamente uniforme e constante (~41,4 nm), sendo o diâmetro/fibra variando de 22 e 32 nm (Gomes & Alves 2011) e cada fibrila de colágeno apresenta cerca de 300-400 moléculas de helicoidais triplas com lacunas entre os terminais N e C de moléculas consecutivas (Meek & Leonard 1993; Holmes & Kadler 2005; Meek & Knupp 2015; Park et al. 2015).

Depois do colágeno, os proteoglicanos (PG) são o segundo componente mais abundante da córnea, constituindo aproximadamente 10% do peso seco da matriz amorfa da córnea. Esses são proteínas glicosiladas com glicosaminoglicanos de cadeia covalente ligados a proteína central (AAO 2012), são na verdade polieletrólitos, cuja disposição externa de suas cargas negativas autorepentes possibilitam a expansão de seu volume molecular, ocupando assim uma área muito maior que permite maior adsorção de água nos espaços estromais (Gomes & Pires 2002). Os glicosaminoglicanos estão presentes entre as fibras colágenas, sendo predominantemente o sulfato de queratana, o sulfato de condroitina (proporção 3:1) e em menor proporção o sulfato de dermatana; o hialuronan está presente na córnea em crianças (Meek & Holmes 1983; Kanski 1994; Ambrósio & Crema 2014; Gomes & Alves 2011).

Os PG do tipo queratan sulfato são responsáveis pela alta organização estrutural das fibrilas de colágeno e encontram-se em maior concentração no estroma

anterior; à medida em que se aproxima do limbo aparecem teores mais altos de condroitin sulfato coincidindo com o decréscimo na organização lamelar e redução na transparência até a fusão completa com as lamelas da esclera (Gomes & Pires 2002; Quantock et al. 2010). Na parte posterior do estroma prevalece o queratan sulfato, que é mais hidrofílico, enquanto na parte anterior encontra-se mais o dermatan sulfato, que é menos hidrofílico (Kanski 1994). Esse último, determina o espaço interfibrilar e confere a propriedade de adesão lamelar do colágeno corneal. A redução do sulfato de condroitina enfraquece a córnea e facilita o desenvolvimento de ectasias corneanas (Borcherding et al. 1975; Quantock et al. 2010; Schlötzer-Schrehardt & Kruse 2016); quando a interação entre os proteoglicanos e as fibras de colágenos é alterada a capacidade da córnea em manter-se transparente é profundamente afetada (AAO 2012).

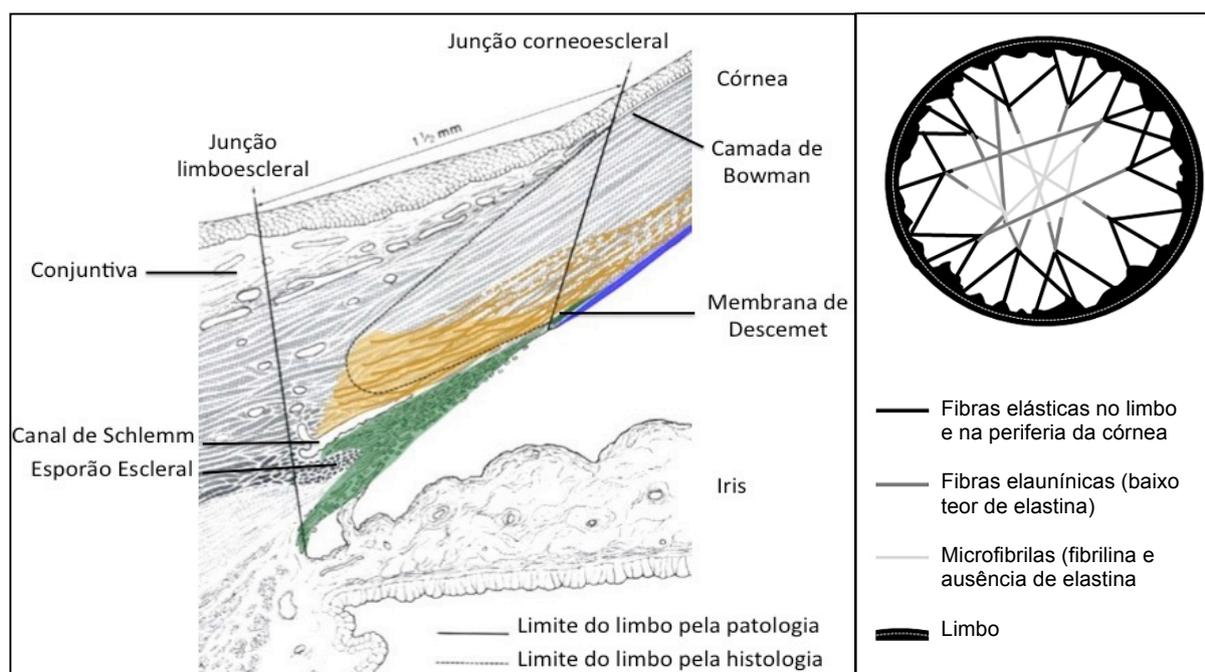


**Figura 5.** Esquema ilustrativo da interação entre as fibrilas de colágeno e os proteoglicanos. (Adaptado a partir de Guimarães, 1987 e Gomes & Pires 2002).

Um aspecto do estroma que é fundamental na biomecânica da córnea é a presença das fibras do sistema elástico. Estudos antigos relataram a presença de fibras elásticas no estroma posterior perto da membrana de Descemet e em menor quantidade dentro do estroma central (Praus & Goldman 1971; Kanski 1994). Quase um século após mostrou-se que estas fibras corriam aproximadamente paralelas às lamelas de colágeno no anel circumcorneal que é uma estrutura profunda do limbo que supostamente ajuda a manter a mudança na curvatura entre a córnea e a esclera (M'Ilroy 1906; Newton & Meek 1998; Abahussin et al. 2009). Assim, durante o pulso intraocular, a córnea sofre deformação periférica em função do componente elástico, enquanto que a região central opticamente importante mantém sua forma (White et al. 2017).

O estudo de Lewis et al. (2016) mostrou a presença de fibras elásticas originárias do limbo posterior e outras de origem da esclera adjacente que parecem

continuar na córnea como fibras elaunínicas (menor concentração de elastina) e como fibras oxitalânicas (microfibrilas e ausência de elastina), exceto no estroma mais anterior; aparentemente as fibras elásticas são mais abundantes nos 200  $\mu\text{m}$  posteriores e estão concentradas próximas ( $\sim 8 \mu\text{m}$ ) da rede trabecular que se projeta cerca de 250  $\mu\text{m}$  na córnea periférica entre a membrana de Descemet e o estroma posterior (Boote et al. 2009; Lewis et al 2016) (Figura 6).



**Figura 6.** Organização esquemática de fibras elásticas na região limbal. Observar à esquerda a malha trabecular (verde), a região límbica elástica com folhas de fibras elásticas concentradas (amarelo) e a membrana de Descemet (azul) (Adaptado a partir de Lewis, 2016). Observar também à direita o esquema das fibras do sistema elástico, sendo as fibras elásticas pseudocircunferencialmente predominantes no limbo que se espalham em direção à córnea como fibras elaunínicas e mais internamente como fibras oxitalânicas (Adaptado a partir White et al. 2017).

O estroma é produzido, mantido e reabsorvido por atuação dos fibroblastos que como dito, tem origem no epitélio anterior. Essas células ocupam apenas 2 a 3% do volume total do estroma corneano e são abundantes na região anterior; ao todo há cerca de 2,4 milhões de fibroblastos espalhados no estroma (Rodrigues 2011; Gomes & Alves 2011; Alkatan & Alzahem 2018; Sridhar 2018). Esses fibroblastos possuem forma fusiforme, núcleo largo, citoplasma pouco extenso com ribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi proeminentes e funcionalmente também são contráteis (Ambrósio & Crema 2014; Gomes & Alves 2011). A degradação dos componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento normal, mas também nos processos patológicos ocorre via metaloproteinases (MMPs) que são uma família de enzimas dependentes do zinco (Zn).

### **Camada de Dua**

Em 2013, Dua et al. sugeriram a redefinição da estrutura morfológica da córnea ao propor a existência de uma sexta camada, chamada de Dua (*Dua's Layer*), que é uma estrutura acelular bem definida e localizada na parte posterior da córnea (entre o estroma e a membrana de Descemet), medindo  $10,15 \pm 3,6 \mu\text{m}$  e composta de 5 a 8 lamelas de feixes de fibras de colágeno tipo 1 dispostas em direções transversais, longitudinais e oblíquas (Dua & Said 2016; Dua et al. 2013; Ma et al. 2018). Para possibilitar a visualização desta nova camada, foi utilizada a técnica de *Big Bubble* (BB) que consiste em injeção de ar no estroma para estimular a separação entre as camadas citadas. Desde então, outros estudos atuam na caracterização morfológica desta nova camada. Funcionalmente, foi sugerido que essa camada teria um papel na hidropisia corneana aguda e evidências clínicas, observadas durante o Transplante Lamelar Anterior Profundo (DALK) sinalizaram a formação dessa nova camada (Agarwal et al. 2014; Yahia et al. 2015; Koçluk et al. 2016; Victor 2018).

### **Membrana de Descemet**

A membrana de Descemet secretada pelo endotélio é homogênea, altamente refrátil, flexível e elástica. Essa membrana basal é a mais espessa do corpo humano, variando entre 8 a  $12 \mu\text{m}$  de espessura, sendo maior no envelhecimento (Delmonte & Kim 2011; Victor 2018). Essa membrana é composta por vários tipos de colágeno (IV, VIII, XVIII), laminina, fibronectina e outros componentes não-colagenosos; sugere-se que o colágeno VIII seja em parte responsável pela montagem correta da membrana de Descemet para estabilidade da córnea (Puk et al. 2009; Zavala et al. 2013).

As fibras colágenas estromais não são contínuas com as da membrana de Descemet, mas aderem-se firmemente à superfície anterior dessa membrana e refletem qualquer alteração na forma do estroma (Fitch et al. 1990; Gomes & Pires 2002). Considerando que o diâmetro da córnea dificilmente muda, o edema corneano é compensado por grandes ondulações na membrana de Descemet na sua face posterior; isto parece estar relacionado com a organização das lamelas de colágeno, pela presença de diferentes tipos de proteoglicanos, além da característica elástica dessa membrana (Sridhar 2018).

### **Endotélio**

O endotélio é composto por uma camada única de células dispostas em

forma de mosaico poligonal que cobre a superfície posterior da membrana de Descemet e espessura de 5  $\mu\text{m}$  (20  $\mu\text{m}$  de diâmetro ao nascimento); a densidade celular é de aproximadamente 3500 a 4000 céls/ $\text{mm}^2$  ao nascimento (Rodrigues 2011; Ambrósio & Crema 2014; Gomes & Alves 2011). Embora não apresentem desmossomos, as células endoteliais se interdigitam e possuem zônulas de oclusão e junções comunicantes (zônula ocludens, mácula ocluden, mácula aderens e gap junctions) que conferem uma barreira que dificulta a infiltração da substância própria pelo humor aquoso (Klyce & Beuerman 1998; Rodrigues 2011). As células endoteliais contêm numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático bem desenvolvido e o complexo de Golgi, indicando que são metabolicamente ativas e secretoras (Zavala et al. 2013). Na região em contato com o humor aquoso observam-se microvilosidades medindo 0.5  $\mu\text{m}$  de altura e microcílios que tendem a desaparecer na presença de lesão endotelial (Guimarães et al. 1987).

## **Limbo**

O limbo é a região de transição entre a esclera e a córnea. A grosso modo a diferença mais marcante entre os epitélios conjuntival e límbico é a ausência de células caliciformes no limbo e entre esse e a córnea é marcante a ausência de suprimento vascular corneano. Também, foi descrito a existência de cordões de células epiteliais que se estendem da periferia do limbo em direção ao estroma subjacente, estes cordões denominados criptas epiteliais límbicas expressam anticitoqueratina 14, assim como as células superficiais do limbo (Gomes & Alves 2011).

A largura da superfície do limbo é de 2 mm no meridiano vertical e de 1,5 mm no horizontal. Seu limite corneal anterior é a camada de Bowman, o posterior é a borda da camada de Descemet e seu limite escleral é uma linha vertical imaginária que passa pelo ápice do esporão escleral como mostrado na figura 6 (Gomes & Alves 2011; AAO 2012; Alkatan & Alzahem 2018).

## **1.2 METABOLISMO E NUTRIÇÃO**

Os nutrientes para a córnea provêm do filme lacrimal, dos vasos sanguíneos límbicos e do humor aquoso. O epitélio recebe oxigênio diretamente do meio externo. As células epiteliais regulam o pH intracelular pela retirada de lactato e íons H e cotransporte de lactato- $\text{H}^+$ ; a acidificação do pH intracelular interfere no metabolismo

e proliferação celular acarretando erosões epiteliais e diminuição da espessura corneal (Gomes & Alves 2011).

A propriedade mais importante da córnea é a sua transparência, que é dependente do estado de hidratação, metabolismo e nutrição de seus componentes, o endotélio possui função primordial. O excesso de líquido estromal é removido por intermédio de um sistema de bombas iônicas localizadas na membrana plasmática lateral das células endoteliais. Um dos sistemas de bomba tem seu controle baseado no equilíbrio iônico entre  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pela enzima adenosina-trifosfatase (ATPase) (Gomes & Alves 2011). Essa bomba metabólica estabelece um contrafluxo ativo de sódio para fora da célula endotelial. Nesse mesmo local, ocorre a troca entre sódio e hidrogênio e a difusão de dióxido de carbono para o citoplasma das células aonde se liga à água para formar íons de bicarbonato, que é catalizado pela enzima anidrase carbônica; os íons bicarbonatos difundidos para o humor aquoso (Gomes & Alves 2011).

### **1.3 INERVAÇÃO DA CÓRNEA**

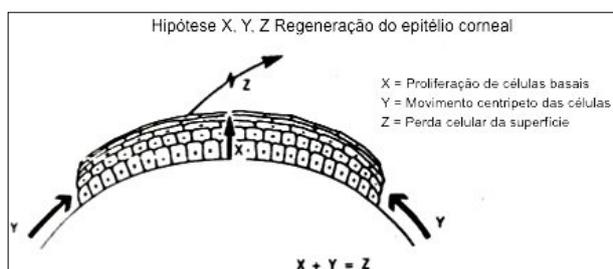
A inervação da córnea é uma das mais densas do nosso organismo, sobretudo na região periférica e sua sensibilidade é até 100 vezes maior que a da conjuntiva (Rodrigues 2011; Meek & Knupp 2015). A rede de fibras sensoriais deriva da divisão oftálmica do nervo trigêmeo, principalmente pelos nervos ciliares longos. Os feixes nervosos entram na periferia da córnea de forma radial e caminham centralmente para abaixo do terço anterior do estroma; a 1 mm distante do limbo, novas ramificações nervosas se projetam em direção ascendente para o epitélio corneano, formando plexos subepitelial e sub-basal do epitélio corneano. A substância própria posterior e a lâmina limitante posterior não são inervadas.

### **1.4 REPARAÇÃO TECIDUAL NA CÓRNEA**

Similar ao que ocorre na epiderme, as células epiteliais da córnea estão em constante processo de renovação pelo potencial mitogênico das células tronco presentes na região límbica (Rodrigues 2011). Sabe-se que o fator de transcrição  $\Delta\text{N-p63}$  expresso por essas células, tem papel essencial no desenvolvimento e proliferação das células epiteliais (Pellegrini et al. 2001; Martins 2017). A hipótese mais aceita para explicar o mecanismo de regeneração epitelial é a proposta por Thoft e Friend (1983) e conhecida como XYZ (Figura 7), em que as células epiteliais superficiais são constantemente liberadas no filme lacrimal (Z), sendo substituídas

por células que se movem anteriormente a partir da camada basal do epitélio anterior (X), que, por sua vez, são repostas por células basais do limbo que se movimentam centripetamente (Y). Estima-se que o epitélio corneano seja totalmente renovado a cada 7 dias, ao passo que o “turn-over” estromal em córneas sadias é mais lento e de baixa intensidade com intervalos de 6 a 12 meses (Guimarães et al. 1987).

A membrana basal além de atuar como rota de migração, também regula os processos de proliferação e diferenciação celular (Arpitha et al. 2005), mas também, os neurônios do gânglio trigêmeo liberam fatores que estimulam as células epiteliais da córnea a crescer, proliferar e diferenciar, e estas em contrapartida, liberam fatores de crescimento neuronal e o fator neutrófico derivado das células gliais que estimulam o crescimento e a sobrevivência dos neurônios (Rodrigues 2011). Ao contrário do epitélio anterior, a camada de Bowman e a membrana de Descemet (Alkatan & Alzahem 2018; Gomes & Alves 2011) não se regeneram, assim como o endotélio, cujas células permanecem na fase G1 do ciclo celular (Bourne 2003; Patel & Bourne 2009; Igarashi et al. 2016; Victor 2018)



**Figura 7.** Esquema da teoria do X, Y e Z para o processo de regeneração epitelial da córnea, proposta por Thoft & Friend (1983) (Adaptado a partir de Gomes & Alves 2011).

Como dito, um dos fatores relacionados a qualidade da visão é a transparência da córnea. Esta característica, depende diretamente do grau de hidratação do estroma corneano, que por sua vez depende do bom funcionamento do epitélio posterior. Sabe-se que funcionalmente, o endotélio da córnea atua no bombeamento ativo e controlado de água e nutrientes do humor aquoso para a matriz da córnea permitindo a nutrição das células epiteliais e estromais, mas também a hidratação adequada. No entanto, na ausência ou na presença de defeitos estruturais desse endotélio, podem ser observados edema, opacidade e até mesmo a cegueira com implicações na transparência da córnea (Ruberti & Klyce 2002). Este mecanismo de desidratação faz parte de um sofisticado sistema de transporte da córnea que inclui ambas as camadas limitadoras (Ruberti & Klyce 2002). A manutenção da transparência corneana faz parte de um sofisticado sistema de transporte da córnea que inclui ambos os tecidos epiteliais, implicando que o estroma seja mantida em um estado de desidratação relativo (Ruberti & Klyce 2002; CBO 2013c).

Tão importante quanto o conhecimento dos componentes da córnea, é desvendar a arquitetura formada por esses e suas mudanças conforme o envelhecimento e na presença ou não de afecções, uma vez que, alterações estruturais respondem pela redução na qualidade da visão observada nos idosos. É comum na prática clínica encontrar indivíduos jovens com patologias que refletem alterações estruturais semelhantes às encontradas nos idosos. Logo, para compreender como as patologias resultam de alterações estruturais nos componentes da córnea, é fundamental o desenvolvimento de estudos morfológicos e morfofuncionais aplicados à elucidação da biomecânica do estroma corneano em todos os planos e profundidades e a descrição estrutural do sistema de fibras elásticas e das lamelas de colágeno, bem como na identificação dos canais de drenagem envolvidos na reversão de edemas funcionais e no equilíbrio da pressão dos fluidos e a descrição do ângulo central da córnea normal em diferentes idades. Considera-se que esses aspectos são fundamentais para subsidiar o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas aplicadas ao tratamento das afecções que acometem a córnea.

Considerando que são poucos os estudos morfológicos aplicados à córnea, que o estroma da córnea fornece a maioria das principais funções do tecido corneano, que este é extremamente organizado estrutural e ultraestruturalmente (Ruberti & Zieske 2008), cujos mecanismos de fluidos influencia os métodos de aferição da pressão intraocular, o conhecimento detalhado da arquitetura estromal corneana poderá conduzir futuros avanços na compreensão dos mecanismos que controlam a forma, a transparência e função da córnea. Também, a descoberta de mecanismos patogênicos relacionados ao envelhecimento e dos distúrbios ectáticos que afetam a refração, podem ajudar na obtenção de maior segurança nas cirurgias refrativas.

## **2. OBJETIVO**

## **2.1. Objetivo Geral**

Descrever e comparar a arquitetura estrutural de córneas humanas no envelhecimento.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Identificar o perfil epidemiológico ( idade, sexo, doenças sistêmicas e/ou oculares associadas e causas de morte).
- Descrever a arquitetura dos tecidos que compõem a córnea, do epitélio anterior ao endotélio da córnea;
- Identificar e descrever as fibras elásticas;
- Avaliar a vascularização e quantificar as células do sistema imunitário;
- Descrever a morfologia do perímetro corneano.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. Delineamento experimental

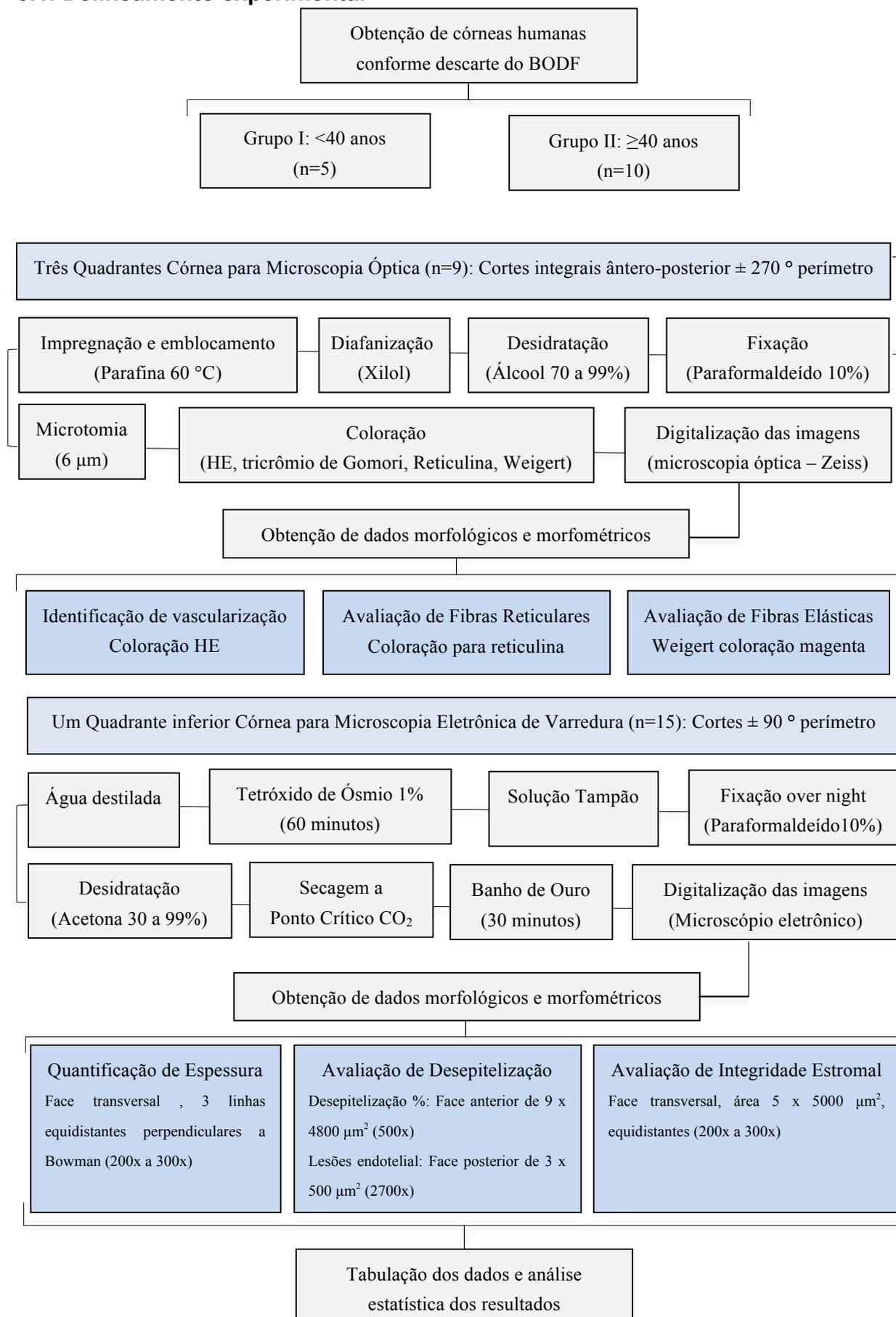


Figura 8. Organograma do estudo.

### **3.2. Tipo de estudo e critérios éticos**

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e comparativo da arquitetura estrutural de córneas humanas normais.

As normas éticas para a experimentação científica em seres humanos, estabelecidas pela declaração de Helsinque (WHO 1976; World Medical Association Recommendation 2000) e pela resolução 196/96 do Ministério da Saúde (1996) foram plenamente obedecidas durante o desenvolvimento desse estudo, havendo isenção ou influência de conflitos de interesse, ficando assegurado o sigilo da identidade dos indivíduos participantes do estudo.

Ressalta-se que os termos de doação a serem assinados pelos responsáveis pelos doadores de órgãos, em caso de óbito, contempla a ciência para a cessão de amostras biológicas para fins científicos, eximindo-se, nesses casos, da assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em conformidade com a legislação vigente (Anexo 1).

A obtenção dos olhos doados ocorreu somente após à aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em 06/09/2017 (CAAE nº 68498117.6.0000.5558).

### **3.3. Indivíduos**

Para o estudo foram utilizadas córneas (n=15) conforme descarte do Banco de olhos, de indivíduos entre 26 a 65 anos de idade, considerando cada córnea um indivíduo separadamente. Para posterior comparação em relação ao envelhecimento os indivíduos foram alocados em grupos de acordo com faixa etária e modificações clínicas pertinentes a idade: Grupo I= com idade menor a 40 anos (n=5); e Grupo II= com idade igual ou maior de 40 anos (n=10).

### **3.4. Critérios de Inclusão e exclusão**

Durante o estudo foram incluídos amostras de córneas normais, mas eram excluídas córneas com histórico de neoplasia corneana e trauma ao tecido que impediam o estudo morfológico do mesmo.

### 3.5. Obtenção das amostras e local do estudo

As córneas normais foram obtidas de olhos doados encaminhados ao Banco de Olhos do Distrito Federal, situado no Hospital de Base do Distrito Federal para a remoção e transplante da córnea, mas que depois de analisados e verificada a inviabilidade de transplantação cirúrgica foram descartados. De acordo com protocolo de doação de órgãos, a enucleação foi feita por um profissional da equipe do Banco de olhos do DF, e as amostras mantidas em solução Eusol® ou NaCl 0,9% a 4 °C. (Figura 3).

O estudo foi realizado no Laboratório de Técnicas Histológicas da Área de Morfologia da Faculdade de Medicina, com a colaboração do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, ambos pertencentes a Universidade de Brasília.



**Figura 9.** Fotografia ilustrativa do meio de preservação das córneas.

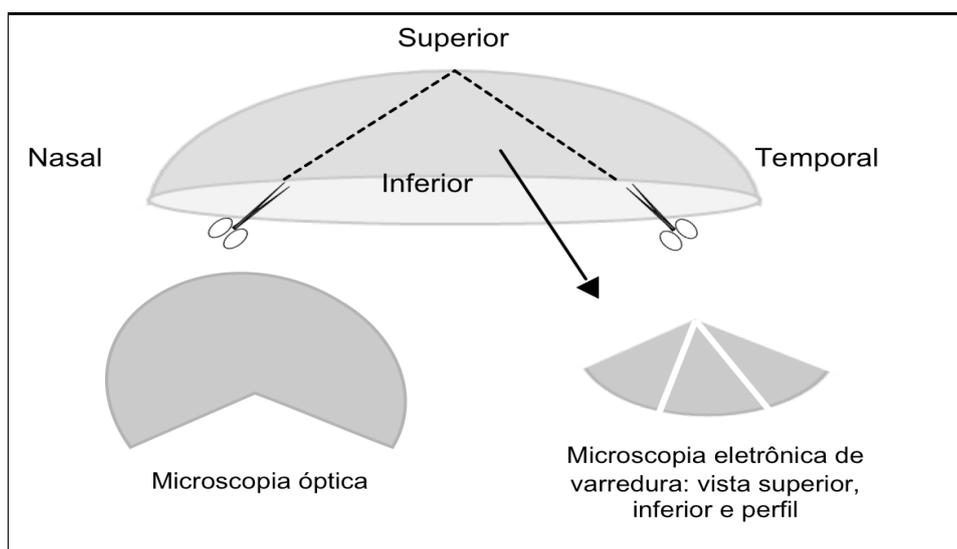
### 3.6. Procedimentos Experimentais

#### 3.6.1. Coleta de dados do prontuário

Para o estudo dos fatores individuais em estudos de correlação foram coletados os dados do prontuário dos indivíduos recebidos no Banco de Olhos relativos aos exames laboratoriais pré-operatórios, sorológicos e bioquímicos, idade, sexo, doenças sistêmicas e/ou oculares associadas e causas de morte.

### 3.6.2. Processamento das amostras

As amostras de córnea coletadas em solução de preservação encaminhadas ao Laboratório de Técnicas Histológicas, foi seccionado um quadrante de cada amostra para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e o restante da amostra processadas conforme protocolo padrão para as análises histológicas por microscopia óptica (MO), sendo estes destinados para as secções histológicas nos planos frontal, e o quadrante destinado à MEV em secções histológicas transversais, do epitélio anterior ao endotélio da córnea (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema demonstrativo da obtenção de amostras para a coleta dos dados morfológicos. Um quadrante de 25% da córneas foi destinado à microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o restante (75%) foi destinado para a microscopia óptica (MO) em secções no plano frontal.

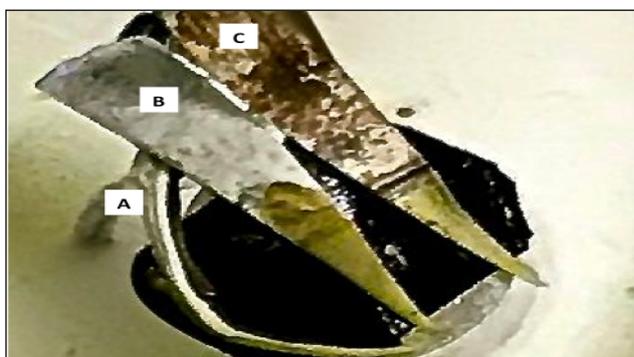
Os espécimes destinados à microscopia óptica foram fixados com 10% de paraformaldeído, desidratados em álcool por 1 h (70%, 80%, 90% e 3x 100%), diafanizados em xilol por 30 minutos (2 banhos), embebidos em parafina a 60 graus Celsius por 1 h (3 banhos) e emblocados em parafina para a microtomia em secções histológicas de 6  $\mu$ m de espessura. Os cortes foram numerados sequencialmente (1a,1b,1c,1d; 2a,2b,2c, 2d; 3a,3b,3c,3d; etc.) para as distintas colorações (Figura 11).



**Figura 11.** Procedimentos de transporte e controle das amostras. Depois de obtidas no Banco de Olhos de Brasília as amostras eram transportadas em caixa de isopor (A), codificadas individualmente no Lab. Técnicas Histológicas – MOR/FM (B), processadas e emblocadas em parafina (C) e seccionadas (6  $\mu$ m) em micrótomo para as colorações (D).

Para a descrição dos tecidos foi utilizada a coloração padrão pela Hematoxilina & Eosina (cortes 1a, 2a, 3a, etc.), para a descrição da matriz extracelular foi empregado o método de Tricrômio de Gomori (cortes 1b, 2b, 3b, etc.), para as fibras reticulares foi utilizado a coloração Gomori para reticulina (cortes 1c, 2c, 3c, etc.) e para as fibras elásticas foram identificadas pelo método histoquímico segundo Weigert (cortes 1d, 2d, 3d, etc.). Depois de coradas, as secções histológicas foram protegidas com lamínulas de vidro e resina sintética (Enthelan<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich) e posteriormente digitalizadas no sistema de fotodocumentação de microscopia óptica (Zeiss, Alemanha) com objetiva de 20 e posteriormente ampliadas (200x) para a coleta dos dados histológicos e histopatológicos (qualitativas, semiquantitativas e morfometria), avaliadas sempre por um único observador.

Para a microscopia eletrônica de varredura, um quadrante perpendicular ao maior eixo de cada amostra de córnea foi seccionado e fixado com 10% de paraformaldeído *overnight*, em seguida lavadas 3 vezes com solução tampão de fosfato ph 7,4. Depois, cada quadrante foi seccionado transversalmente em 3 arcos de tamanho similar para avaliação das faces anterior, posterior e perfil ( Figura 12).



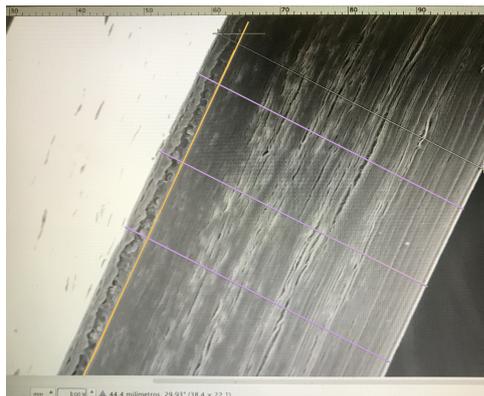
**Figura 12.** Córnea humana após processamento para microscopia eletrônica da varredura. Vista de perfil (A), face anterior (B) e face posterior (C).

Os espécimes histológicos foram tratados por 1 hora em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, lavadas com água destilada e desidratada com solução crescente de concentração de acetona (30%, 50%, 70% e 90%, sendo 15 min/etapa), acetona 100% duas vezes por 10 minutos. Após desidratação, secagem ao ponto crítico. As amostras foram condicionadas em bases metálicas identificadas, conforme posição de avaliação, para posterior impregnação em banho de ouro por 30 minutos. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura do Instituto de Biologia (JEOL, modelo JSM- 7001F,USA) usando aumento para face perfil de 200x para córnea periférica (até 3mm distante do limbo) e 300x para córnea central, 500x para face anterior e 2700x para face posterior.

### 3.7. Obtenção dos dados morfométricos

#### 3.7.1. Avaliação da espessura das camadas corneanas e integridade estromal

Para quantificar a espessura das camadas corneanas foi tomada a média de três medidas equidistantes e perpendiculares à camada de Bowman nas imagens de perfil de cada amostra obtida por MEV, conforme demonstrado na figura 13, utilizando-se o programa de manipulação de imagem GIMP 2.8; os resultados foram expressos em milímetros.



**Figura 13.** Medida da Espessura total da córnea em milímetros. Linha laranja adjacente a camada de Bowman. Linhas em lilás estão equidistantes e perpendiculares a camada de Bowman. Corte transversal de córnea periférica. Aumento 200x.

#### 3.7.2. Avaliação da integridade estromal

Para avaliar a integridade estromal foram quantificadas o total de fraturas lamelares encontradas em 5 campos equidistantes de  $5000 \mu\text{m}^2$  nas imagens de perfil de cada amostra obtida por MEV (Programa de manipulação de imagem GIMP 2.8); os resultados foram expressos em milímetros (Figura 14).



**Figura 14.** Avaliação da Integridade estromal. Presença de fraturas lamelares em área definida de  $5000 \mu\text{m}^2$  (retângulo amarelo). Corte transversal de córnea periférica. Aumento 200x.

#### 3.7.3. Avaliação de alterações epiteliais

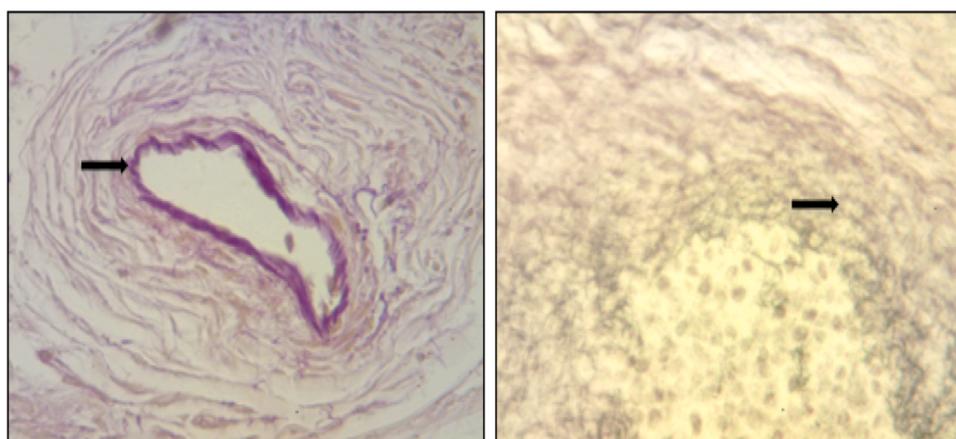
As alterações dos epitélios anterior e posterior foram avaliadas nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura numa área de  $9 \times 4800 \mu\text{m}^2$  (face anterior) e  $3 \times 500 \mu\text{m}^2$  (face posterior). Para o epitélio anterior foi considerado o percentual de justaposição, aderência e desagregação celular, enquanto que para o epitélio posterior foram quantificados o total de lesões endoteliais.

### 3.7.4. Identificação de vascularização

A presença ou ausência de vascularização da córnea foi identificada por microscopia especular (Konan Cell Ckeck EB10 microscópio e Konan Corneal Endothelial Analytics software, Irvine, USA) no banco de olhos, conforme procedimento padrão. Posteriormente, foi feita avaliação qualitativa nas imagens de microscopia óptica obtidas das secções histológicas de 6  $\mu\text{m}$  coradas com Hematoxilina & Eosina.

### 3.7.5. Avaliação das fibras da matriz extracelular

As fibras elásticas foram identificadas pelo método histoquímico segundo Weigert, que cora as fibras elásticas de azul escuro a roxo, núcleos de azul a preto; colágeno de róseo a vermelho e outros elementos de amarelo. Para identificar as fibras reticulares utilizou-se o método histoquímico de Gomori para reticulina, no qual essas fibras se coram de negro (Figura 15).



**Figura 15.** Identificação de fibras da matrix extracelular. Fibras elásticas de cor magenta identificadas pelo método histoquímico segundo Weigert à esquerda (limitante elástica interna – artéria) e fibras reticulares em negro identificadas pelo método histoquímico de Gomori para reticulina à direita.

### 3.8. Análise Estatística

A normalidade e a variabilidade das variáveis foram analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Para a comparação entre dois grupos com distribuição paramétrica foi usado o teste t ou Mann-Whitney para dados com distribuição não paramétrica. Diferenças de  $p < 0,05$  foram consideradas significantes. Os resultados qualitativos foram analisados pelo teste de Qui-quadrado para dados com distribuição normal ou Fisher para distribuição não normal. As análises foram feitas empregando-se o programa Prism® 7 Software Package (Graphpad USA, 2016).

#### **4. RESULTADOS**

Para descrever e comparar a arquitetura estrutural de córneas humanas normais no processo de envelhecimento foram avaliados diferentes parâmetros morfológicos em secções histológicas de 15 córneas humanas de doadores cadáveres.

#### 4.1. PERFIL DOS INDIVÍDUOS

Os doadores apresentavam idade do óbito entre 26 a 65 anos ( $49 \pm 11,8$ ), predominantemente do sexo masculino (80%). Os indivíduos foram agrupados em duas faixas etárias, sendo o grupo 1 < 40 anos ( $n = 5$ ;  $35 \pm 5,4$  anos) e o grupo 2  $\geq 40$  anos ( $n = 10$ ;  $57 \pm 5,8$  anos). As sorologias para HIV, hepatite B e hepatite C foram negativas na maioria das amostras (73,3%). As mortes ocorreram por causas cardiovasculares em 7 indivíduos e traumatismos em 3 deles. Outras causas como cirrose, enforcamento e choque elétrico também foram identificadas; em 2 indivíduos a causa de morte era desconhecida (Tabela 1).

**Tabela 1.** Perfil epidemiológico dos indivíduos dos grupos I e II, segundo prontuário cedido pelo Banco de Olhos do Distrito Federal.

Grupos de estudo	Indivíduos	Sexo	Idade	Sorologias	Causa Mortis	Justificativa de descarte
I (< 40 anos)	MRO	F	26	-	Traumatismo crânio-encefálico	Corpo estranho
	ASJ	M	36	-	Parada cardiorrespiratória	Pós conservação
	JES	M	37	-	Infarto Agudo do Miocárdio	Pós conservação
	LAFJ	M	39	-	Politraumatismo	Pós conservação
	LAFJ	M	39	-	Politraumatismo	Pós conservação
II ( $\geq 40$ anos)	MAL	M	45	-	Cardiopatia	Pós conservação
	JPG	M	53	-	Desconhecida	Causa mortis
	JPG	M	53	-	Desconhecida	Causa mortis
	VLRS	F	54	-	Acidente vascular cerebral	Pós conservação
	ABB	M	56	-	Choque elétrico	Pós conservação
	DSC	M	60	Anti-HBc	Insuficiência cardíaca congestiva	Sorologia
	DSC	M	60	Anti-HBc	Insuficiência cardíaca congestiva	Sorologia
	CLPC	M	61	-	Infarto Agudo do Miocárdio	Pós conservação
	RLV	F	62	Anti-HBsAg	Cirrose hepática	Sorologia
	AHM	M	65	Anti-HBc	Enforcamento	Sorologia

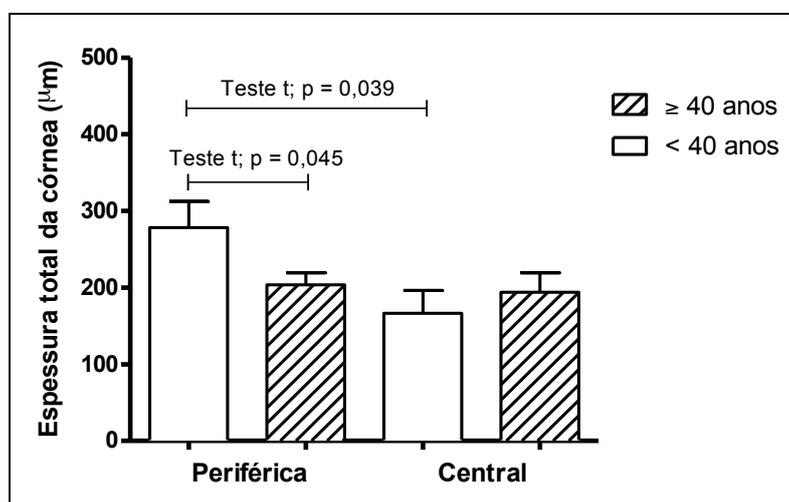
#### 4.2. ESPESSURA DAS CAMADAS DA CÓRNEA

Para avaliar as camadas da córnea dos indivíduos das duas faixas etárias foi medida a espessura total e de todas as camadas (epitélio anterior, camada de Bowman, estroma, camada de Descemet e endotélio) em três regiões equidistantes e posteriormente os dados foram comparados para determinar possíveis diferenças

entre as regiões central e periférica de um mesmo grupo, também diferenças entre os grupos (G1 x G2).

### A. Espessura total e das camadas da córnea

Os resultados mostraram que a média±DP da espessura total da córnea na região periférica dos indivíduos com idades inferiores a 40 anos é maior ( $272,2 \pm 76,2 \mu\text{m}$ ) do que na região central ( $166,4 \pm 67,4$ ) (Teste t;  $p = 0,039$ ), enquanto que no grupo II ( $\geq 40$  anos) não houve diferença entre as duas regiões (Periférica =  $203,8 \pm 44,2 \mu\text{m}$ ; Central =  $194,1 \pm 80,4 \mu\text{m}$ ) (Teste t;  $p > 0,05$ ). Quando comparado os grupos G1 x G2 a região periférica apresentou maior espessura no grupo I ( $272,2 \pm 76,2 \mu\text{m}$ ) do que o grupo II ( $203,8 \pm 44,2 \mu\text{m}$ ) (Teste t,  $p = 0,045$ ), mas não para a região central G1 =  $166,4 \pm 67,4$ ; G2 =  $194,1 \pm 80,4$ ) (Teste t,  $p > 0,05$ ).

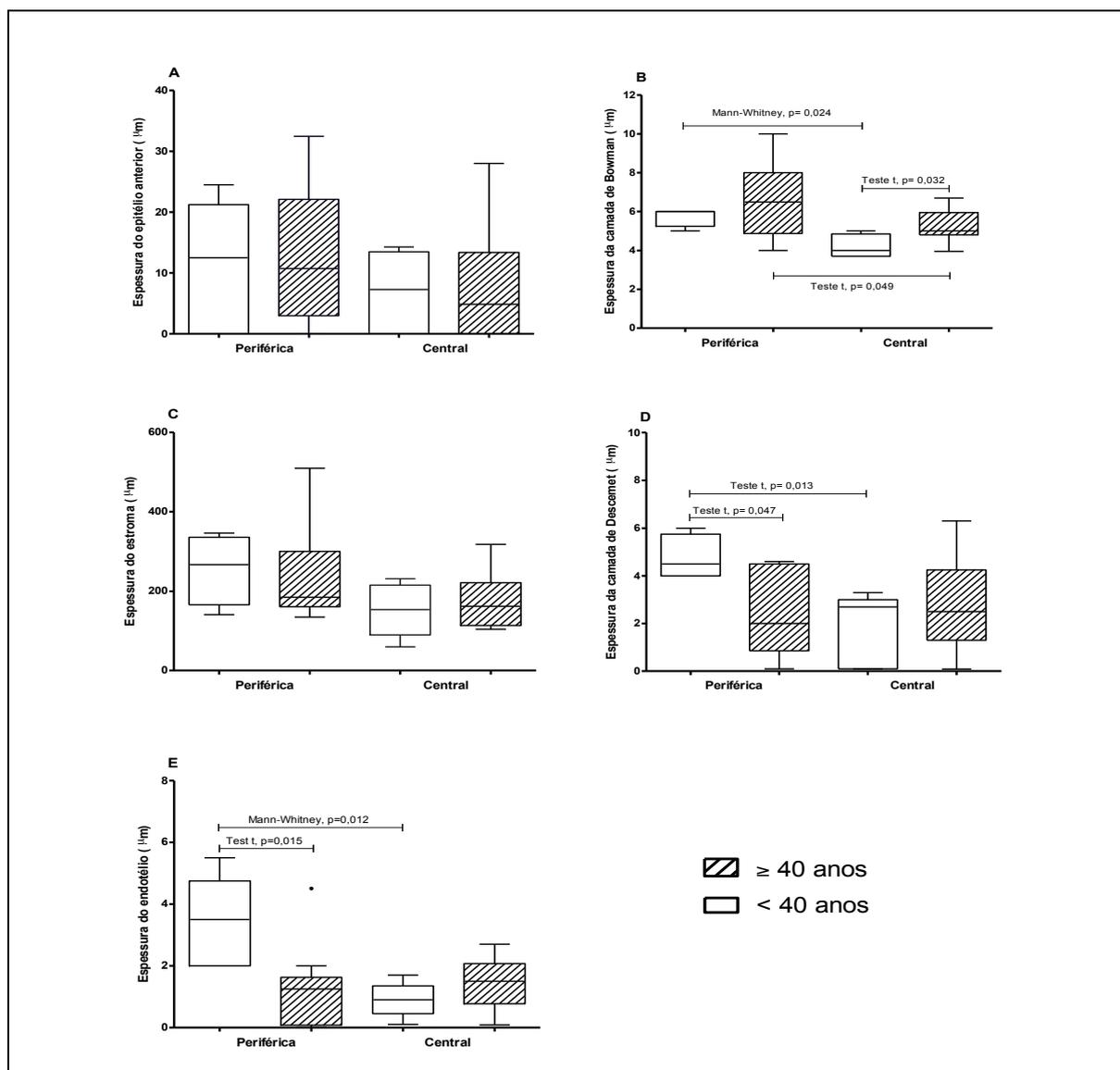


**Figura 16.** Espessura total das córneas dos indivíduos dos grupos G1 (< 40 anos) e G2 ( $\geq 40$  anos). Os resultados indicam que a espessura corneana na sua região central para o grupo G1 é menor do que na região periférica ( $p < 0,05$ ), mas não para o grupo G2 (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). A região periférica apresentou maior espessura no grupo I do que o grupo II (Teste t,  $p = 0,045$ ), mas não para a região central ( $p > 0,05$ ). Estão mostradas as médias e desvio padrão.

Considerando as diferentes camadas que compõem a córnea, os resultados mostraram que no grupo de indivíduos com idades inferiores a 40 anos (G1), as regiões centrais das camadas de Bowman (mediana =  $4 \mu\text{m}$ ), Descemet (média±DP =  $1,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ) e endotélio (mediana =  $0,9 \mu\text{m}$ ) eram menos espessas do que as respectivas regiões periféricas (Bowman / mediana =  $6 \mu\text{m}$ ; Descemet / média±DP =  $4,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ) e endotélio (mediana =  $3,5 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,01$ ) (Figura 11 BDE).

Para os indivíduos do grupo 2 ( $\geq 40$  anos) a camada de Bowman foi mais espessa na região periférica ( $6,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$ ) do que na região central ( $5,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ) (Teste t,  $p = 0,049$ ) (Figura 11 D); a espessura do endotélio não diferiu entre as regiões periférica ( $1,3 \pm 1,3 \mu\text{m}$ ) e central ( $1,4 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ) (Teste t,  $p > 0,05$ ).

Quando comparado os dois grupos, os resultados mostraram que apenas na região periférica do endotélio a espessura foi menor no grupo 2 ( $1,3 \pm 1,3 \mu\text{m}$ ) do que no grupo 1 ( $3,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ) (Teste t,  $p = 0,015$ ) (Figura 17 E).



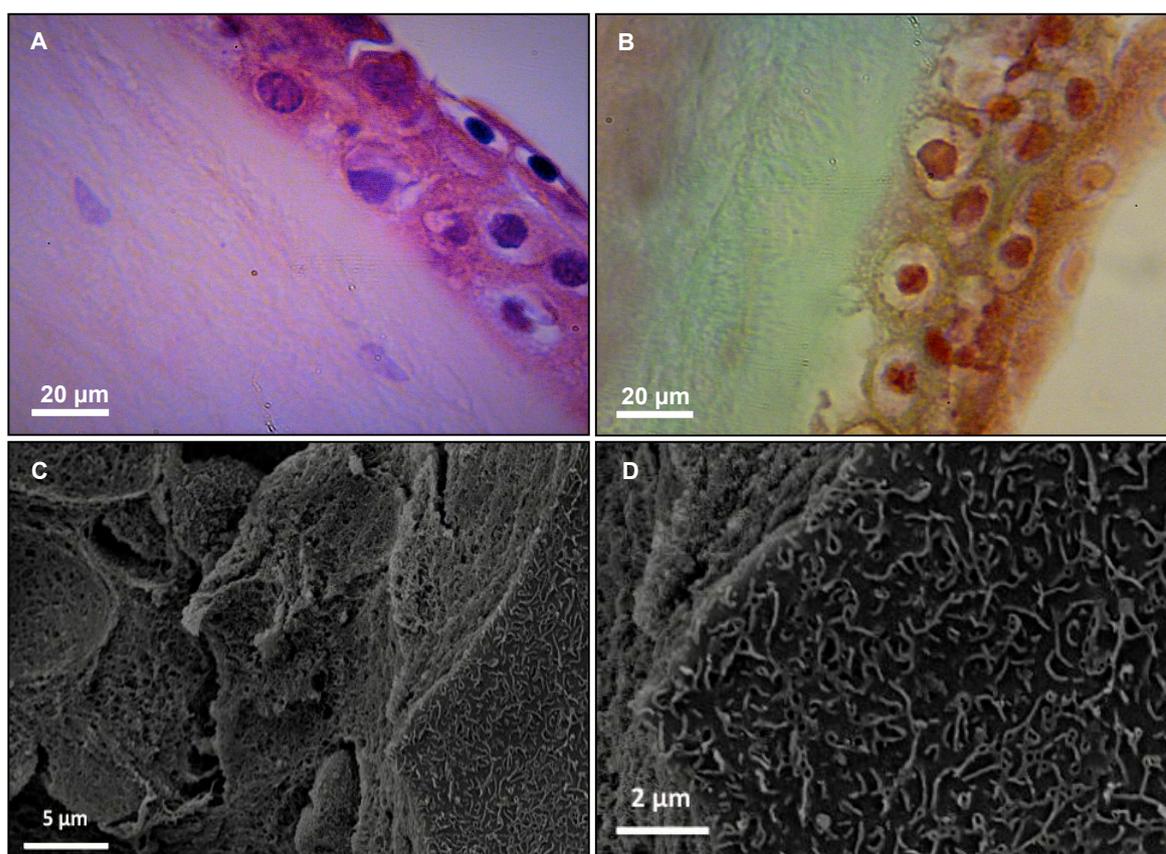
**Figura 17.** Espessura das camadas da córnea dos indivíduos dos grupos G1 ( $< 40$  anos) e G2 ( $\geq 40$  anos), sendo o epitélio anterior (A), camada de Bowman (B), estroma (C), camada de Descemet (D) e endotélio (E). Os resultados indicam que a espessura central é menor que na periferia para o grupo G1 para a camada de Bowman, Descemet e endotélio e para o grupo 2 apenas para a camada de Bowman ( $p < 0,05$ ). O grupo 2 apresentou menor espessura do endotélio na região periférica quando comparado ao grupo 1 ( $p < 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

### 4.3. ARQUITETURA E QUALIDADE DAS CAMADAS DA CÓRNEA

Para identificar a arquitetura das córneas dos indivíduos das duas faixas etárias foram avaliados os parâmetros qualitativos das células epiteliais (integridade, aderência e justaposição) e da matriz extracelular (localização das fibras colágenas, elásticas e reticulares, bem como a integridade lamelar).

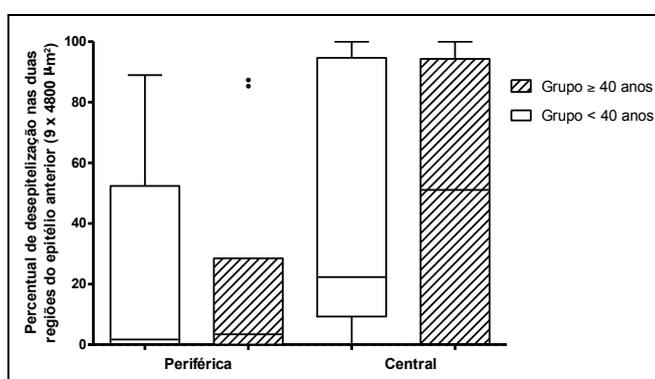
#### A. Epitélio anterior

A qualidade do epitélio anterior foi avaliada uma área equivalente a  $9 \times 4800 \mu\text{m}^2$  nas regiões periférica ou central das córneas. Assim, de uma forma geral o epitélio anterior quando estava preservado era composto por 5 camadas celulares e do tipo estratificado escamoso (figura 12 AB, corte sagital), sendo as células basais cilíndricas/cúbicas altas apoiadas sobre a membrana de Bowman (●), as da região intermediária do tipo poligonais e as da superfície são pavimentosas contendo inúmeros microvilos (Figura 18 CD).

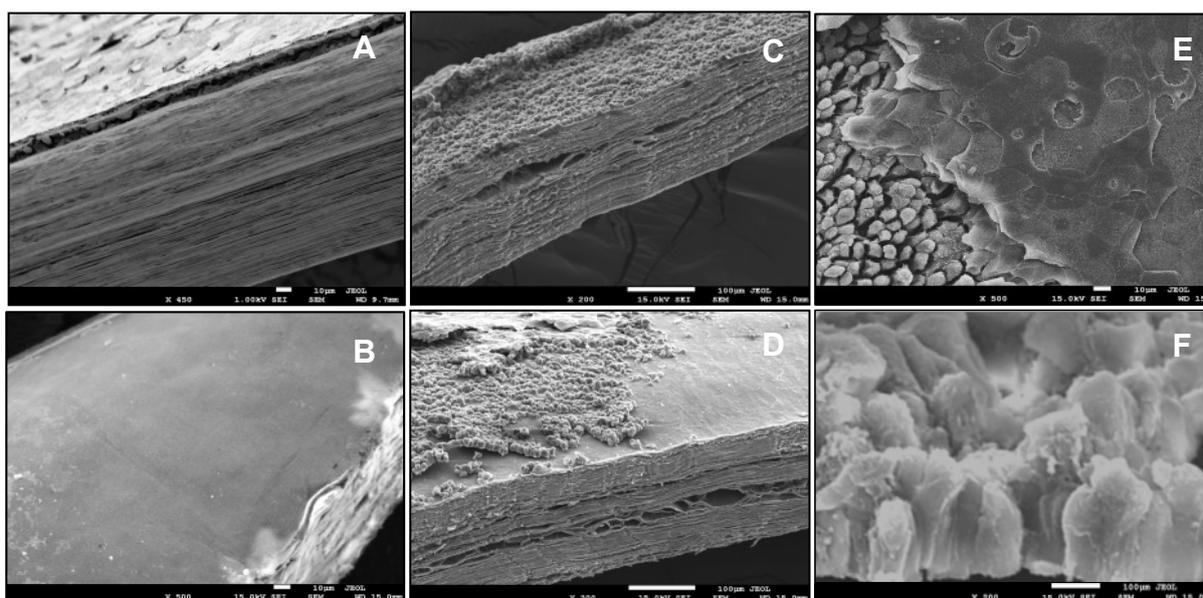


**Figura 18.** Fotomicrografias (A,B) e Eletromicrografias de varredura (C,D) da córnea de indivíduos adultos. Observar o epitélio anterior em cortes sagitais com as camadas de células epiteliais basais, intermediárias e superficiais (A,B) e frontais evidenciando os núcleos esféricos da camada intermediária (C) e as microvilosidades das células superficiais pavimentosas (D). Coloração HE (A) e Tricrômio de Gomori (B).

A avaliação feita por um único observador evidenciou, nas córneas de ambas as faixas etárias, falhas na justaposição celular (adesão célula-célula) e da aderência à camada de Bowman (adesão célula-matriz extracelular) que culminou com a desagregação epitelial. Assim, no grupo 1 (< 40 anos) a desepitelização na periferia da córnea foi 1,7% e na central de 17,4%, enquanto que no grupo 2 ( $\geq$  40 anos) essa perda foi de 3,4% e de 49,2% para as regiões, periférica e central respectivamente. Em que pese a diferença nos percentuais observadas, sobretudo para a região central da córnea, os resultados analisados pelos testes Mann-Witney e teste t não indicaram diferenças entre os grupos para as regiões periférica e central, respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Figura 19 e 20).



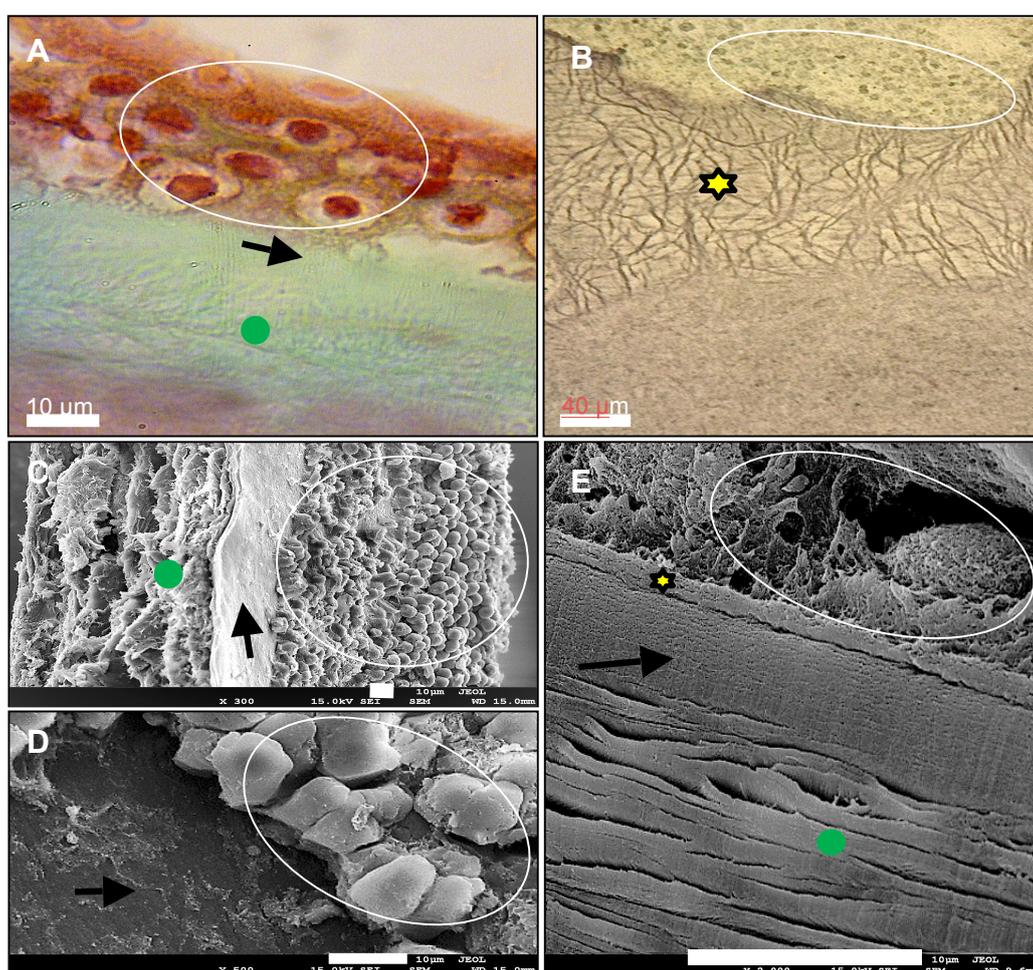
**Figura 19.** Percentual de perda do epitélio anterior nas regiões periférica e central das córneas dos indivíduos dos grupos G1 (< 40 anos) e G2 ( $\geq$  40 anos). Os resultados mostraram que os grupos não diferem entre si, tampouco as regiões, periférica x central, para um mesmo grupo ( $p > 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.



**Figura 20.** Eletromicrografias de varredura da córnea evidenciando o epitélio anterior íntegro (A), perda parcial (C e D) e perda total do epitélio (B). Observar as células epiteliais intermediárias desagregadas e as pavimentosas em descamação em E e em F observar as células basais cilíndricas parcialmente justapostas.

## B. Camada de Bowman

A análise qualitativa das imagens por microscopia óptica (A, B) ou por MEV (C, D, E) nas córneas dos dois grupos mostrou que a camada de Bowman apresenta grande densidade e compactação das fibras de forma muito regular, organizada e com pouca matriz amorfa entre as fibras. No conjunto, estas características tornam a morfologia dessa camada bastante contrastada com a disposição menos densa observada no estroma (Figura 21). A camada de Bowman encontra-se aderida ao estroma pelo estrato reticular da membrana basal, que por sua vez, está aderido à lâmina basal do epitélio anterior, conforme evidenciado na figura 21 A, B e E. A alta densidade da camada de Bowman foi observada inclusive nas regiões de desepitelização ou desagregação lamelar estromal (Figura 21 D, E).



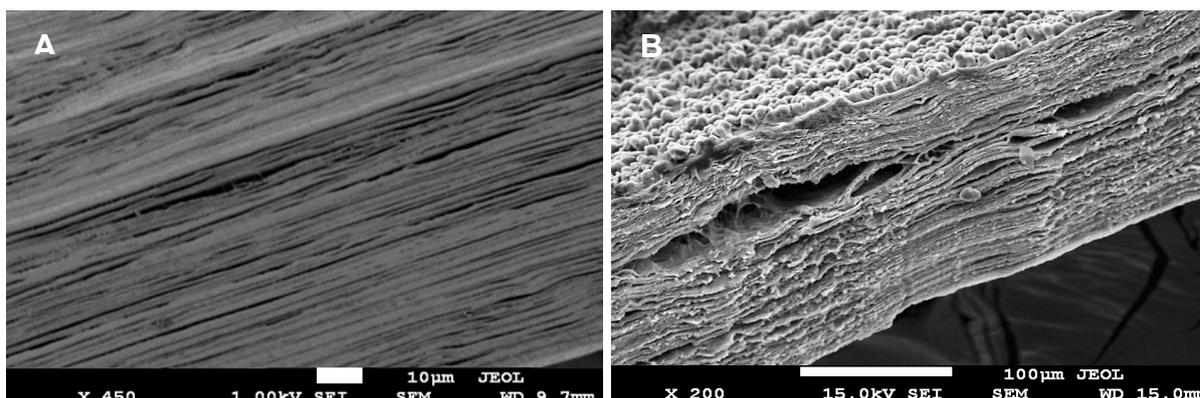
**Figura 21.** Fotomicrografias (A,B) e eletromicrografias por MEV (C,D,E) de córneas humanas evidenciando a camada de Bowman (➔) e estruturas adjacentes. Observar a alta densidade e disposição bastante regular e lamelas muito compactadas que contrastam com as lamelas estromais (●). Observar também o corte tangencial do epitélio anterior (branco) com as fibras reticulares da membrana basal inserindo-se na camada de Bowman (★). Coloração Tricrômio de Gomori (A) e histoquímica para reticulina (B).

### C. Estroma

Para as análises da qualidade do estroma avaliou-se a morfologia nas secções histológicas por microscopia óptica, bem como quantificou-se o total de fraturas/desagregação lamelar em 5 campos equidistantes de  $5000 \mu\text{m}^2$  nas imagens obtidas por MEV de cada córnea.

Os resultados mostraram que o estroma das córneas de ambos os grupos apresentaram de forma geral lamelas colágenas dispostas regularmente em paralelo com as camadas de Bowman e com a membrana de Descemet (Figura 22 A), mas também foram observadas regiões em que as lamelas estavam desagregadas, irregulares e estiradas, permitindo maior exposição da matriz amorfa como observado na figura 22 B.

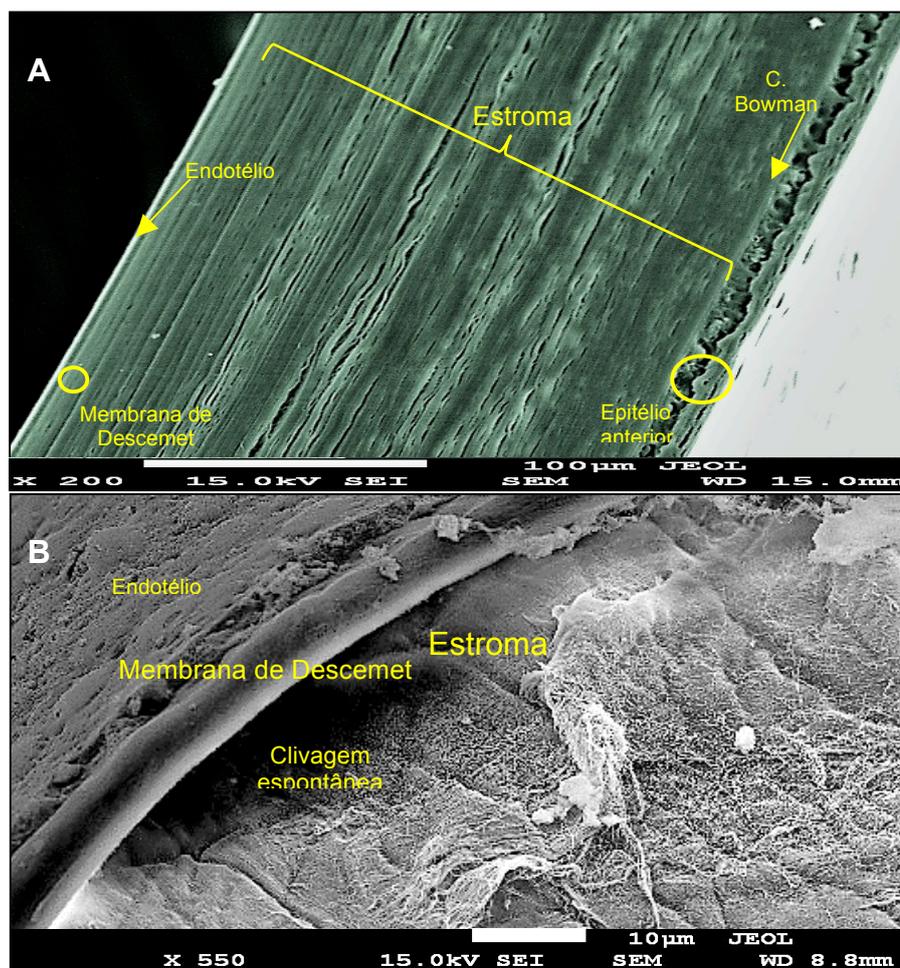
O total de lamelas desagregadas foi de  $7,2 \pm 5,8$  na região central e de  $5,4 \pm 3,8$  na periferia das córneas do grupo I e de  $7,2 \pm 4,4$  ou  $6,3 \pm 3,9$  para as regiões central e periférica, respectivamente para o grupo II; não houve diferenças entre as regiões para as córneas do mesmo grupo, nem entre os grupos (teste t,  $p > 0,05$ ).



**Figura 22.** Eletromicrografias de varredura de córneas humanas evidenciando estroma e estruturas adjacentes. Em A, observa-se o estroma íntegro e alinhamento regular e em B, o estroma apresenta regiões com lamelas desagregadas, sem alinhamento e exibindo cavidades (seta).

### D. Camada pré-Descemet e Membrana Descemet

Durante o processamento foram observadas clivagens espontâneas entre a membrana de Descemet e o estroma das córneas denotando nas córneas dos dois grupos uma fragilidade estrutural natural correspondente à “camada de Dua” (região de clivagem em procedimentos cirúrgicos). Posteriormente, nas imagens obtidas por MEV as membranas de Descemet assumiram uma concavidade voltada para o estroma, conforme mostrado na figura 23.

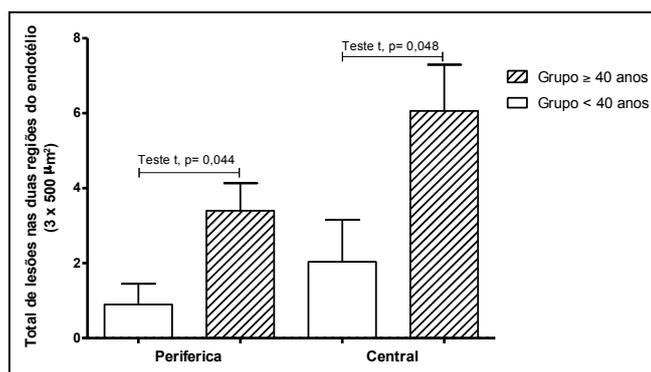


**Figura 23.** Eletromicrografias de varredura da córnea evidenciando as suas camadas (A) e a clivagem espontânea entre membrana de Descemet e o estroma (B).

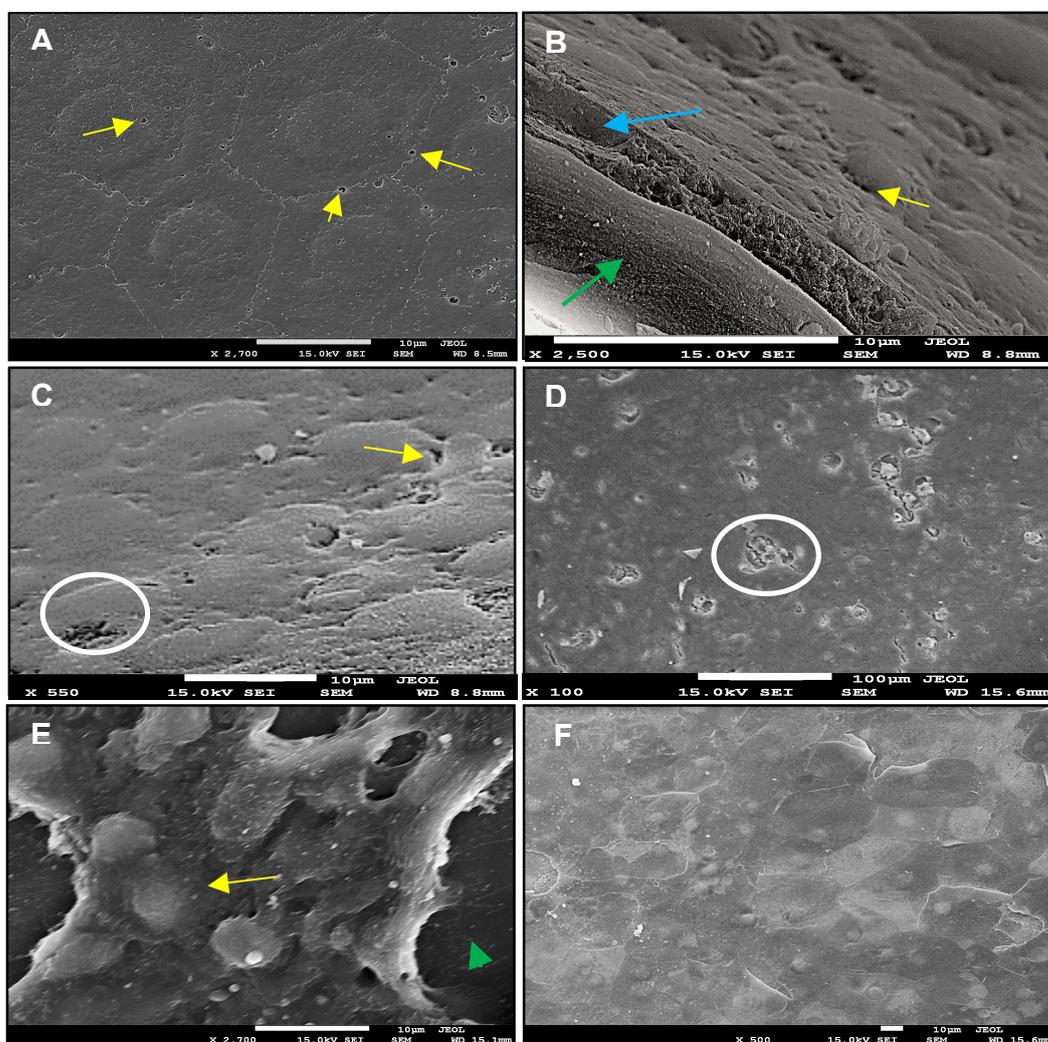
### E. Endotélio

O endotélio foi avaliado de forma qualitativa e semiquantitativa para quantificar lesões endoteliais em três áreas de  $500 \mu\text{m}^2$ .

Os resultados mostraram maior número de lesões endoteliais em ambas as regiões das córneas do grupo II (periférica =  $3,4 \pm 2,3$ ; central =  $6,1 \pm 3,5$ ) do que o grupo I (periférica =  $0,9 \pm 1,2$ ; central =  $2,0 \pm 2,5$ ) (Teste t,  $p < 0,05$ ) (Figura 24). Não houve diferenças entre as regiões, central e periférica, num mesmo grupo (Teste t,  $p > 0,05$ ). A avaliação qualitativa do endotélio evidenciou o epitélio pavimentoso simples constituído por células justapostas de limites bem definidos, hexagonais e com poros medindo de 8 a  $10 \mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 25 A,B). Também, nas córneas dos dois grupos de faixa etária foram identificadas lesões nas células endoteliais (C,D) e até regiões com rompimento parcial (E) ou total do endotélio (F) que deixou exposto o estroma posterior.



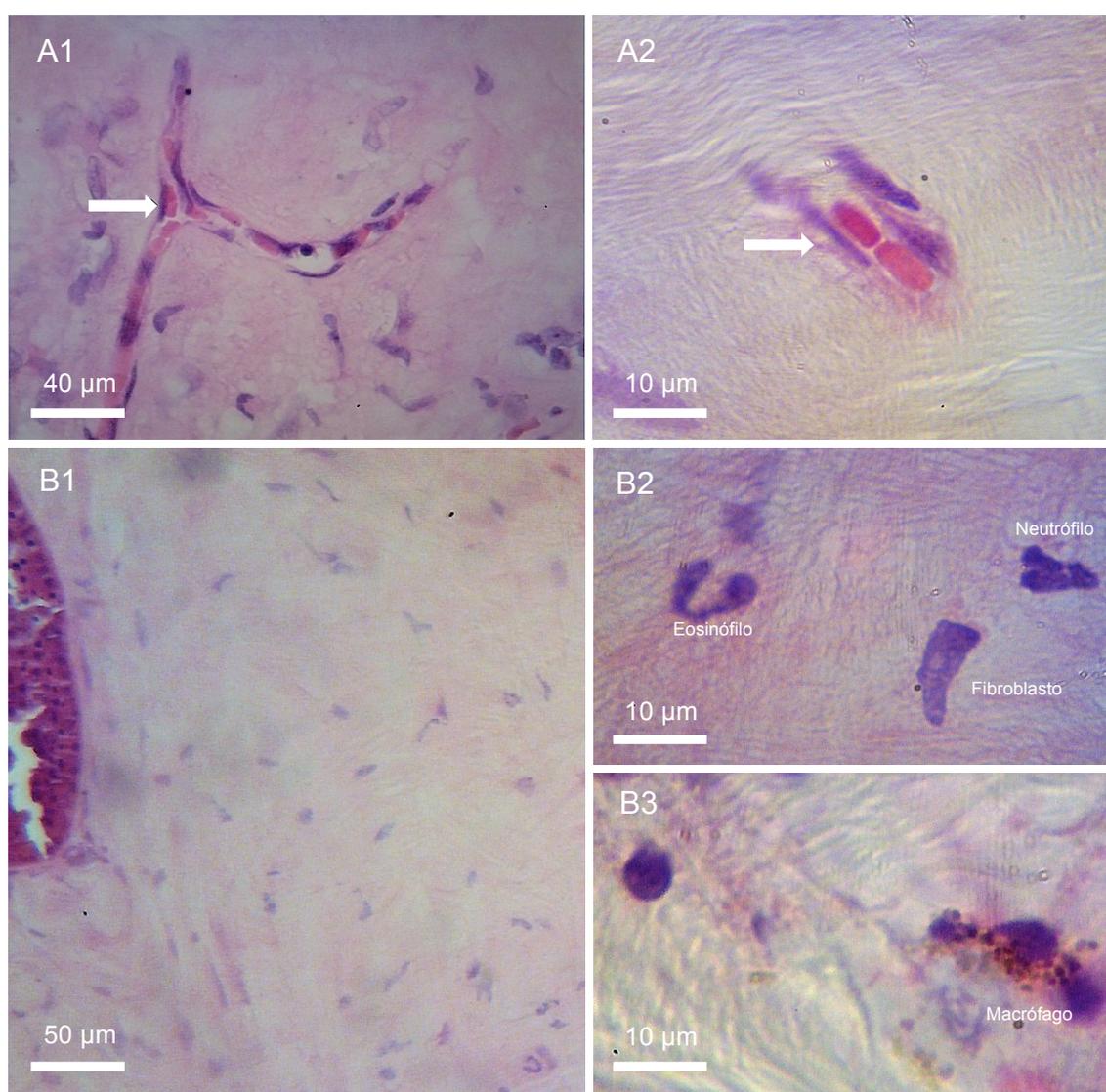
**Figura 24.** Total de lesões no endotélio ( $3 \times 500 \mu\text{m}^2$ ) dos indivíduos dos grupos G1 (< 40 anos) e G2 ( $\geq 40$  anos). Os resultados indicam que o número de lesões endoteliais para o grupo G2 é maior do que para o grupo G1 (Teste t,  $p = 0,04$ ), para ambas regiões periférica e central.



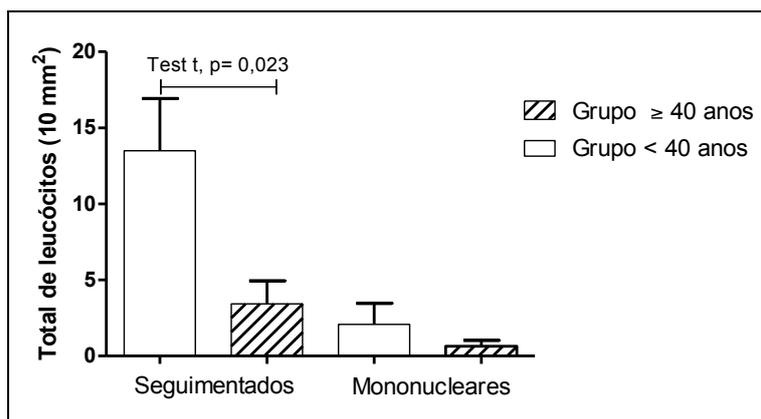
**Figura 25.** Eletromicrografias de varredura da região posterior de diferentes córneas mostrando em A e B o endotélio pavimentoso simples com células achatadas (seta azul), justapostas e poros intercelulares. Observar áreas com lesões (círculo branco) em C e D e perda parcial (E) ou total (F).

## F. Vascularização e células migratórias

As análises seccionais (anteroposterior) mostraram em uma córnea de cada grupo a presença de capilares intraestromais, como demonstrado na figura 26. Quanto aos leucócitos foi observado na região estromal em todas as córneas analisadas, que depois de quantificados mostrou maior número de leucócitos segmentados (neutrófilos e eosinófilos) nas córneas do grupo I ( $13,5 \pm 6,8$  céls/ $10 \text{ mm}^2$ ) do que o grupo II ( $3,4 \pm 3,1$  céls/ $10 \text{ mm}^2$ ) (Teste t,  $p = 0,023$ ). Não foi identificada diferenças no total de leucócitos mononucleares entre o grupo I ( $2,1 \pm 2,7$  céls/ $10 \text{ mm}^2$ ) e o grupo II ( $0,6 \pm 0,9$  céls/ $10 \text{ mm}^2$ ) (Teste t,  $p > 0,05$ ) (Figura 27).



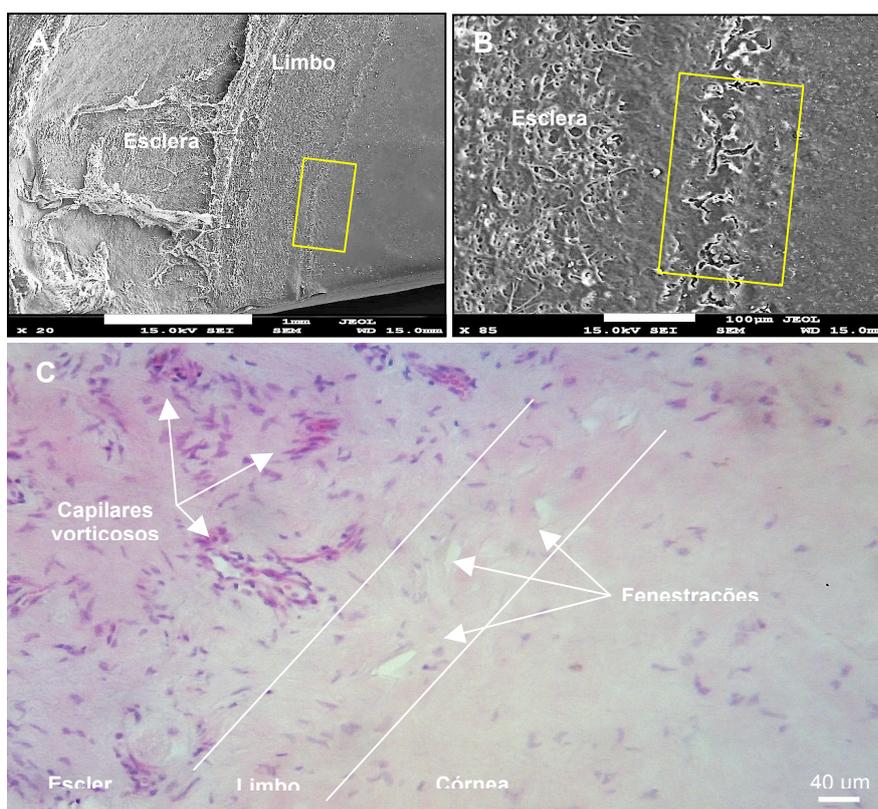
**Figura 26.** Fotomicrografias da região estromal de córneas obtidas dos grupos I e II exibindo em A1 e A2 capilares intraestromais (seta). Em B1 tem-se uma secção frontal e tangencial à córnea exibindo o epitélio anterior (esquerda) e o estroma com inúmeros fibroblastos e alguns leucócitos que são vistos em detalhes em B2 (segmentados) e B3 (mononucleares). Coloração Hematoxilina & Eosina.



**Figura 27.** Total de leucócitos intraestromais ( $10 \text{ mm}^2$ ) nas córneas dos indivíduos dos grupos I e II. Os resultados mostraram maior número de segmentados (neutrófilos/eosinófilos) no grupo I do que no grupo II (Teste t,  $p = 0,023$ ), os resultados dos mononucleares mostraram que os grupos não diferem entre si ( $p > 0,05$ ). Estão mostradas as medias e desvio padrão.

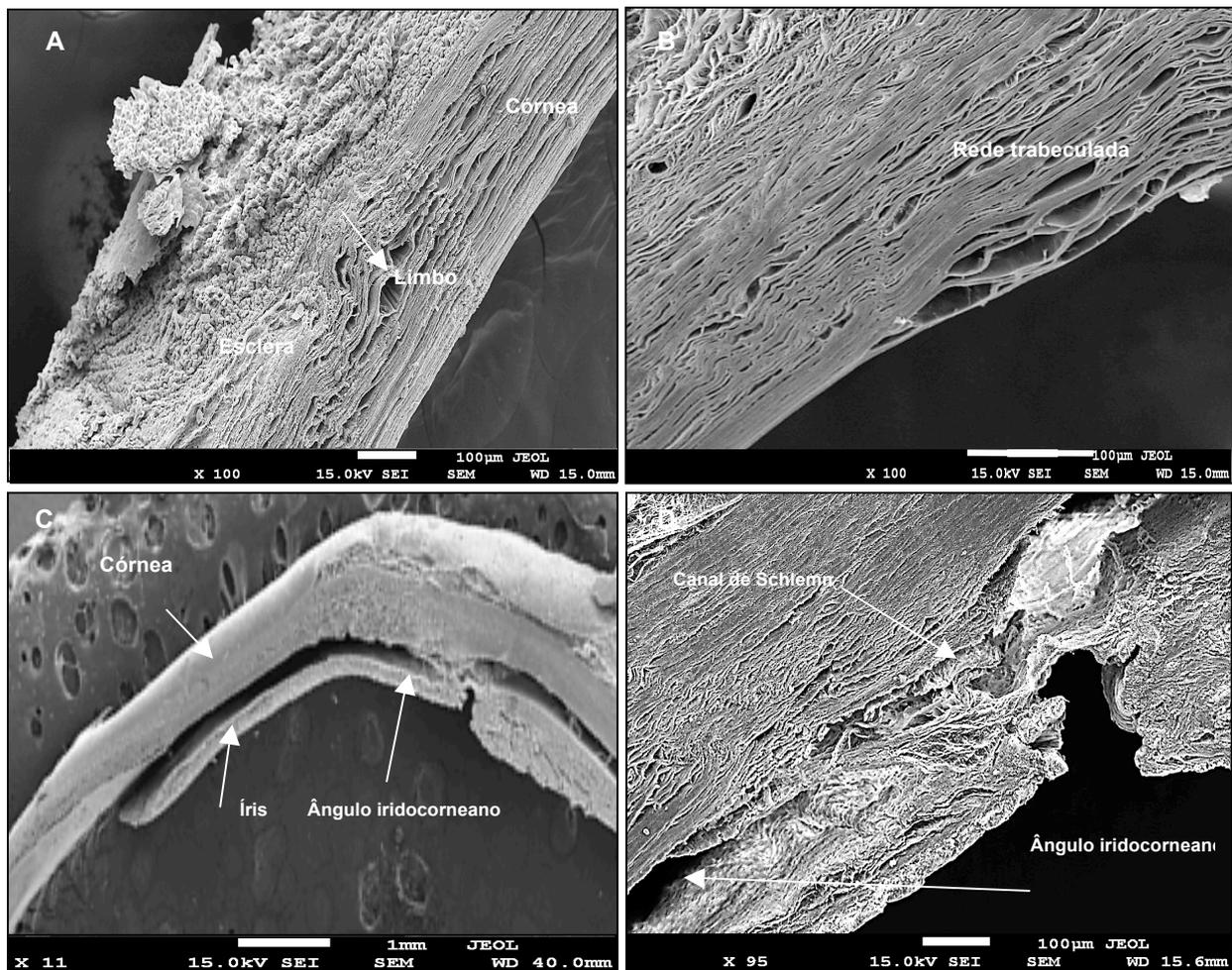
#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS ELÁSTICAS E DO PERÍMETRO CORNEANO

O estudo seccional anteroposterior da córnea por microscopia óptica e de varredura mostrou em todos os espécimes dos grupos G1 ( $< 40$  anos) e G2 ( $\geq 40$  anos) que o seu perímetro delimitado é margeado por uma faixa de fenestrações pericorneanas que avançam para o limbo e esclera e se relacionam com a rede capilar vorticosa (Figura 28 A,B,C).



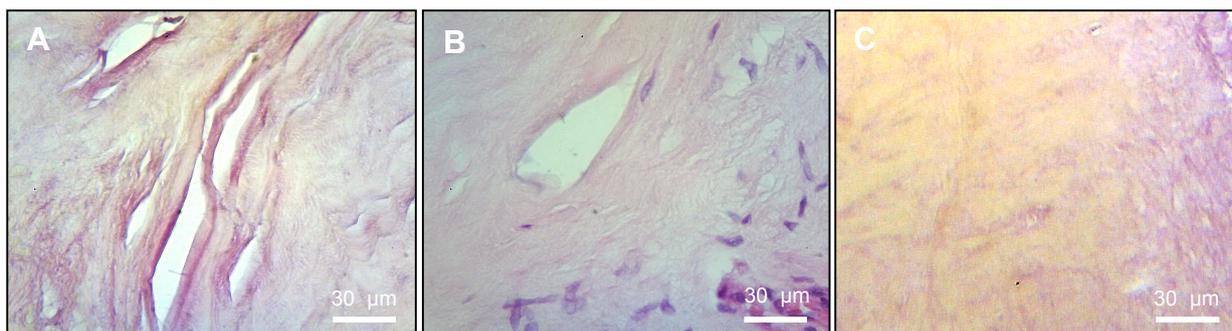
**Figura 28.** Eletromicrografias da face posterior de uma córnea (A,B) exibindo as fenestrações pericorneais, o limbo e a esclera. Em C, tem-se uma fotomicrografia de uma secção frontal da região intermediária de uma córnea exibindo também os capilares vorticosos (coloração Hematoxilina & Eosina).

As análises feitas por um único observador mostraram que as dimensões das fenestrações pericorneais aumentam para a região posterior da córnea próximo ao ângulo iridocorneano aonde se integram com a rede trabecular responsável pela drenagem do humor aquoso a partir da câmara anterior do olho para o canal de Schlemm (Figura 29).



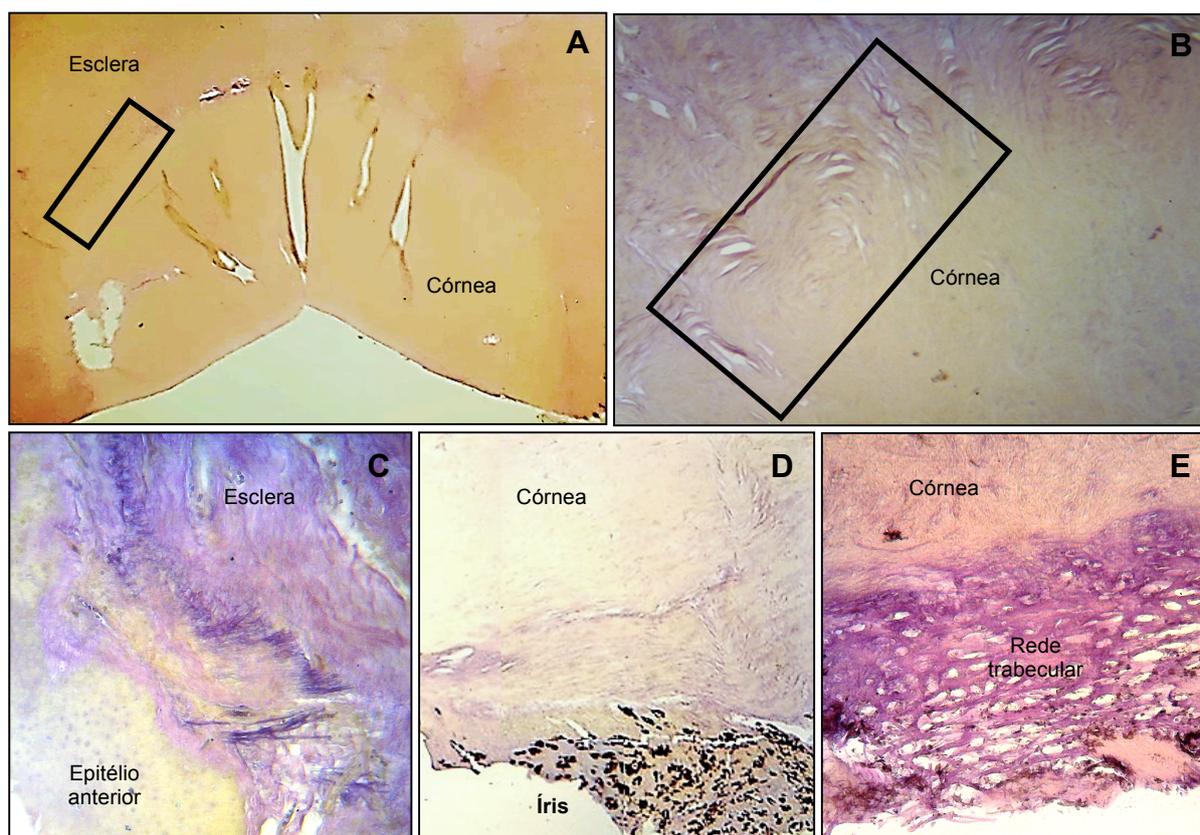
**Figura 29.** Eletromicrografias de uma córnea (secção transversal) exibindo em A as fenestrações pericorneais (seta), o limbo e a esclera, em B a rede trabecular, em C o ângulo iridocorneano e em D, tem-se o canal de Schlemm.

As histoquímicas para as fibras elásticas e para as fibras colágenas mostraram que as fenestrações pericorneais são margeadas por fibras colágenas e por grandes fibras elásticas enoveladas internamente (Figura 30 A,B). No interior da córnea foram observadas as fibras do sistema elástico chamadas elaunínicas que são mais delicadas e possuem menor concentração de elastina (Figura 30 C).

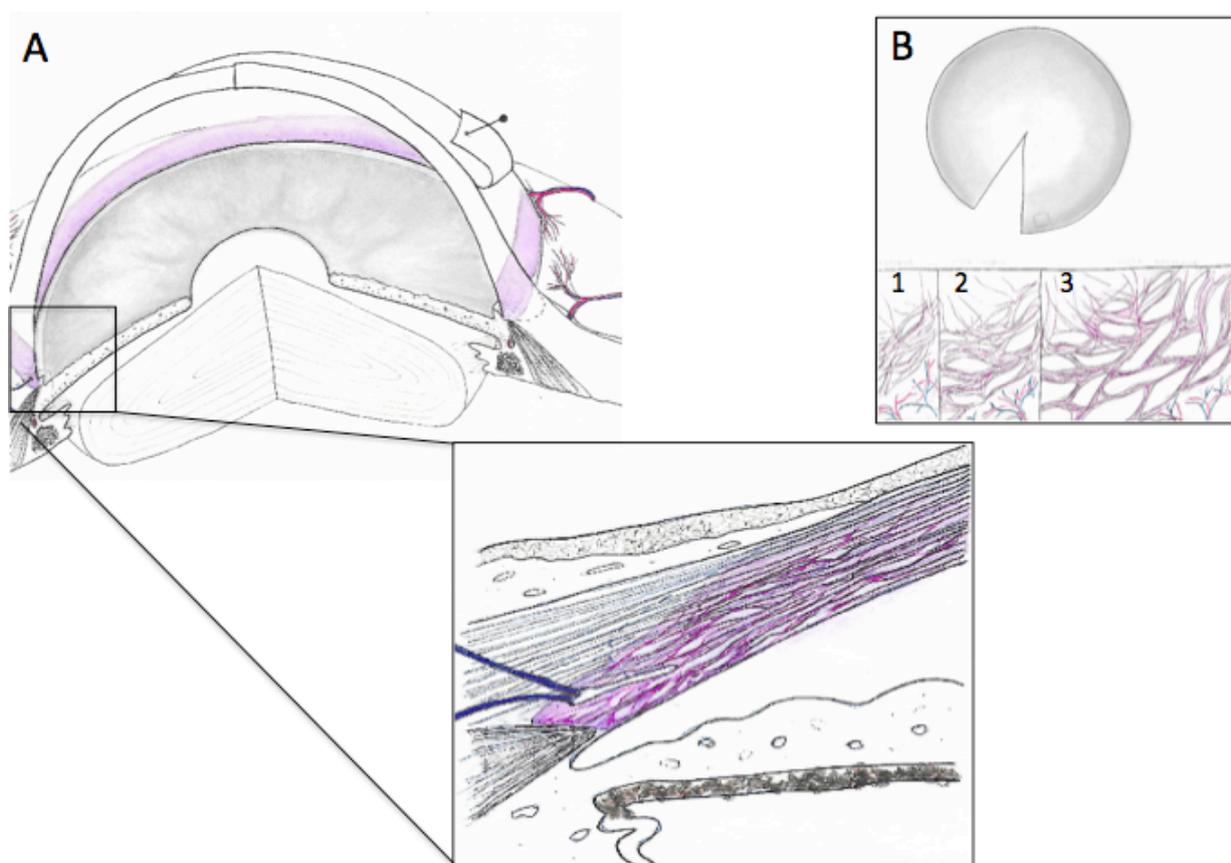


**Figura 30.** Fotomicrografias de três secções histológicas de córnea exibindo as fibras elásticas espessas (A, coloração de Weigert) e as colágenas (B, coloração HE) em torno das fenestrações. Em C (Weigert), observa-se esparsa coloração magenta no estroma corneano que equivale às fibras elásticas (esquerda da imagem) e a maior concentração das fibras elásticas nas proximidades das fenestrações (direita).

Também, observou-se que a concentração das fibras elásticas aumenta para a região da esclera (Figura 31 B,C e 32) e para a região posterior em torno da rede trabecular posterior (D,E).



**Figura 31.** Fotomicrografias de uma secção histológica em vista panorâmica (aumento 10 x) em A e quatro secções histológicas de córneas exibindo as fenestrações em detalhe (B), as fibras elásticas espessas na região anterior e tangencial ao epitélio anterior (C), a região da rede trabecular posterior e adjacente à íris do olho (D) e a região trabecular margeada por espessas fibras elásticas (E). Coloração de Weigert.



**Figura 32.** Organização esquemática de fibras elásticas na região limbal. **A.** Observar à a malha trabecular, a região límbica elástica com folhas de fibras elásticas concentradas em todo perímetro corneano (lilás). **B.** Vista frontal de córnea. fibras elásticas em região: 1- superficial; 2- intermediária; 3- posterior

#### 4.5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Para facilitar a visualização dos dados, a tabela 2 sintetizam os resultados das regiões (periférica e central) do grupo I (<40 anos) em comparação ao grupo II (≥ 40 anos).

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados entre os grupos

Parâmetros Avaliados		GI (<40 anos)		GII (≥ 40 anos)	
		Córnea Periférica	Córnea Central	Córnea Periférica	Córnea Central
Espessura (µm)	Total	275±81	166±81	211	176
	Epitélio anterior	11±5	7±3	13±4	8±3
	Camada de Bowman	6	4±0	7	5±0
	Estroma	254±39	153±30	237±40	177±23
	Membrana de Descemet	5±1	2±1	3±1	3±1
	Endotélio	3±1	1±0	1±0	1±0
Perda do epitélio anterior (18 x 2400 µm <sup>2</sup> )		1,7	17	3	49
Total	Fendas lamelares (5 x 5000 µm <sup>2</sup> )	5±2	7±3	6±1	7±1
	Lesões endoteliais (3 x 500 µm <sup>2</sup> )	1±1	2±1	3±1	6±1
	Leucócitos segmentados (10 mm <sup>2</sup> )		14±7		3±3
	Leucócitos mononucleares (10 mm <sup>2</sup> )		2±3		1±1

**Tabela 3.** Dados descritivos das camadas e fibras elásticas

Região da córnea	Características morfológicas
Epitélio anterior	Cinco camadas de células basais/cilíndricas, intermediárias/poligonais e superficiais pavimentosas e com microvilosidades
Camada de Bowman	Alta densidade, fibras organizadas e muito compactadas, pouca substância interlamelar, aderida ao epitélio e ao estroma
Estroma	Lamelas colágenas dispostas regularmente em paralelo, regiões com lamelas desagregadas/fendas expondo a matriz amorfa
Membrana de Descemet	Apresentaram clivagens entre a membrana de Descemet e o estroma, camada de Dua
Endotélio	Epitélio pavimentoso simples, células justapostas, limites bem definidos, hexagonais e com poros medindo de 8 a 10 µm de diâmetro.
Fibras elásticas	Grandes fibras margeando as fenestrações pericorneais, maior densidade na face posterior associada à rede trabecular/ângulo iridocorneano, fibras elaunínicas estromais.

## **5. DISCUSSÃO**

A córnea é uma estrutura fundamental na visão cuja fisiologia e estrutura ainda não são totalmente conhecidas. O melhor entendimento das nuances desse tecido é fundamental para a maior compreensão das diversas patologias relacionadas a ele, bem como as alterações decorrentes do seu envelhecimento.

Os resultados do presente estudo por imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica têm um valor biológico significativo, pois sugerem uma correlação entre a arquitetura corneana, o declínio da taxa de re-epitelização, a apoptose celular e as alterações morfológicas no processo de envelhecimento da córnea.

Em relação ao perfil dos indivíduos, foram obtidas córneas de 26 a 65 anos, embora não exista limite de idade para doação de córnea (Garcia 2006), o Ministério da Saúde determina que o limite mínimo e máximo de idade do doador fica a critério do responsável técnico do Banco de Tecidos Oculares (Ministério da Saúde 2008); no BODF, o limite é de 65 anos, com projeção para aumentar esse limite até 70 anos, mediante avaliação entre a qualidade endotelial e funcional da córnea doada e o tempo de espera na fila de transplante; quanto maior a idade maior a chance de encontrar danos endoteliais conforme informação pessoal do centro de pesquisa do BODF, embora a idade avançada do doador não impeça o uso de uma córnea para enxertia (Pantaleão 2009), a expectativa de vida de uma célula endotelial transplantada é, até o momento desconhecida (Faragher 1997), por esses motivos esse estudo não obteve indivíduos com idades maiores de 65 anos. A idade média dos indivíduos foi de  $49 \pm 11,8$  anos, sendo o grupo I  $< 40$  anos ( $n = 5$ ;  $35 \pm 5,4$  anos) e o grupo II  $\geq 40$  anos ( $n = 10$ ;  $57 \pm 5,8$  anos), em concordância com a literatura (Adán et al. 2008; Sano et al. 2010; Silva et al 2016), entretanto, provavelmente uma faixa etária mais ampla evidenciaria melhor as alterações do envelhecimento.

Entre as causas *mortis*, as doenças cardiovasculares foram as mais frequentes causas de óbito dos doadores, seguidas por causas externas (trauma), dados semelhantes foram encontrados por outros autores (Adán et al 2008, Sano et al 2010). Alguns autores referem a causa *mortis* como um fator que influencia no metabolismo e na integridade endotelial da córnea (Sano et al. 2010), em oposição, Hirai et al 2009, cita estudos que ressaltam não haver perda de qualidade das córneas doadas nos casos de causas externas, essas divergências podem ser justificadas pelos diferentes mecanismos de patológicos.

Entre os doadores de córnea há um predomínio do sexo masculino,

condizente com dados de outros bancos de olhos (Silva et al. 2014), possivelmente porque os homens morrem mais jovens que as mulheres devido a trauma e doenças cardiovasculares (Adán 2008). Alguns estudos consideram as córneas de mulheres mais finas que dos homens (Galgauskas et al. 2014). Não há uma resposta clara sobre por que as mulheres têm córneas mais finas que os homens. É possível que as alterações hormonais nas mulheres possam explicar essa diferença, no entanto, devido a pequena proporção de mulheres entre os indivíduos (3 mulheres:12 homens), nesse estudo não foi possível analisar diferenças estruturais entre os sexos.

Das justificativas de descartes, quatro das quinze córneas foram descartadas devido a sorologia positiva para Hepatite B. Atualmente, a legislação brasileira não permite o uso de tecidos para transplante, cujo doador apresente sorologia positiva para hepatite B, hepatite C ou HIV (Ministério da Saúde, 2008). O estudo realizado na Santa Casa de São Paulo indica que a hepatite C é causa de olho seco, resultante da diminuição da produção de lágrima, como consequência as células epiteliais vivas sofrem sem a proteção oferecida pelo filme lacrimal (Gomes & Marques 2011), no entanto, mais estudos são necessários para associar os tipos de hepatites com alterações morfológicas da córnea.

A média da espessura total encontrada no estudo tanto na região central quanto na periférica se mostrou menor que 540  $\mu\text{m}$  para região central e 700  $\mu\text{m}$  para periferia como referido pela literatura (CBO 2013a), importante ressaltar nesse estudo que as medidas foram aferidas em tecido seco, desidratado sob ponto crítico diferente do referido na literatura sendo mais espessa em virtude da hidratação do tecido in vivo; no entanto, o procedimento de desidratação foi o mesmo entre os indivíduos possibilitando a comparação entre os grupos e regiões.

Embora nenhum limite claro possa ser identificado entre a córnea central e periférica, essas duas regiões são anatômica e fisiologicamente diferentes em espessura, ceratometria, fontes nutricionais, composição bioquímica e suscetibilidade à doença (Zheng et al. 2016), por esses motivos nesse estudo foram analisadas separadamente cada região, a córnea periférica foi considerada como a área tecidual entre o limbo e cerca 3 mm periférico da córnea.

A configuração anatômica da córnea, descrita na literatura (Gomes & Alves 2011), de ser mais espessa na periferia foi encontrado no grupo I (<40 anos), porém não foi significativo no grupo II ( $\geq 40$  anos), o que pode sugerir uma redução na reposição celular periférica como consequência do envelhecimento das células

troncos do limbo. Conforme estudos prévios, as microestruturas do limbo se tornam mais suaves com a idade o que sugere uma correlação entre a arquitetura límbica e o declínio da taxa de re-epitelização em pacientes idosos (Notara et al. 2013).

Estudos recentes confirmaram uma relação entre a espessura total central da córnea e a idade, isto é, a córnea humana central se torna mais fina com a idade (Rufer et al. 2007; Lekskul et al. 2005; Galgauskas 2009). No entanto, nesse estudo e em outros estudos (Niederer 2007; Prasad 2011; Kamiya 2009), não foi encontrada a mesma dependência na espessura total. Essas divergências corroboram com a necessidade de mais estudos para elucidar as modificações da córnea no envelhecimento.

Ao analisar as diferentes camadas que compõem a córnea, os resultados mostraram que no grupo de indivíduos com idades inferiores a 40 anos (GI), as regiões periféricas das camadas de Bowman, Descemet e endotélio eram mais espessas do que as respectivas regiões centrais, esses dados sobressaltam as diferenças entre as regiões (Zheng 2016). Estudos mostram que essa diferença de espessura entre a região central e periférica pode aumentar dependendo do quadrante periférico avaliado, como exemplo o epitélio é mais espesso na região periférica inferior do que na região periférica superior, ambos são mais espessos que a região central (Reinstein 2008), por esse motivo foi priorizada a secção do quadrante inferior da córnea. Provavelmente em virtude do espaço promovido pela desagregação lamelar (inclusive na medida da espessura estromal) e a desepitelização (que altera a espessura do epitélio anterior), essa diferença entre as regiões periférica e central no grupo com idade inferior a 40 anos (GI) não foram significativas no estroma nem no epitélio anterior.

Em particular, a camada de Bowman apresentou a região periférica mais espessa do que a região central independente da idade. No entanto, nesse estudo houve um aumento da espessura da camada de Bowman da região central com a idade, o que diverge dos dados referentes ao declínio da camada de Bowman de 0,06  $\mu\text{m}$  em sua espessura a cada ano de vida, e a perda em média de 1/3 da espessura entre os 20 a 80 anos de idade descrito em outros estudos (Delmonte & Kim, 2011; Jacob e Naveen, 2016; Schlötzer-Schrehardt e Kruse, 2016; Alzahrani *et al.*, 2017). Essas divergências demonstram a necessidades de maiores estudos em relação a camada de Bowman, principalmente após estudos mostrarem que transplante da camada de Bowman isolado reduziu e estabilizou a ectasia da córnea em olhos com

ceratocone progressivo e avançado (Van Dijk 2015). Segundo Brautaset et al (2013), o ceratocone é um distúrbio de afinamento da pan-córnea baseado no aspecto de afinamento da córnea na região ectática periférica e central, uma hipótese levantada no presente estudo é que a região central da camada de Bowman mais espessa com a idade poderia dar maior resistência e justificar uma menor prevalência de ceratocone em relação a idade, mas atualmente permanece desconhecido se a camada de Bowman contribui para a patogênese do ceratocone.

Além dos parâmetros quantitativos da espessura, o presente estudo analisou o percentual de desepitelização em comparação a idade. A desepitelização pode caracterizar alterações da barreira epitelial. Embora pese a diferença nos percentuais, sobretudo para a região central que mostrou maior porcentagem de desepitelização no atual estudo, os resultados não indicaram diferenças entre os grupos para as regiões periférica e central. Provavelmente devido ao reduzido número de indivíduos não foi possível aferir diferenças significativas entre as regiões, mas estudos demonstram uma capacidade reduzida das células da córnea de regular as moléculas de adesão com o envelhecimento (Hobden 1995); além de um aumento na permeabilidade epitelial com a idade o que pode representar um colapso da função de barreira epitelial (Chang 1993). No entanto, o número e a distribuição de hemidesmossomas ao longo da lâmina basal não parecem mudar com a idade (Trinkaus-Randall 1993).

Segundo Klintworth (1977) quando o tecido da córnea é processado para exame microscópico, as lamelas do estroma geralmente se separam artificialmente, entretanto a união entre as lamelas é estabelecida pelos aminoglicanos; alguns autores consideram os aminoglicanos a “cola” da córnea, responsável por fornecer plasticidade e suporte estrutural necessário para o sucesso da função corneana. Dessa forma, o presente estudo considerou a desagregação lamelar um método indireto para avaliar a qualidade dessa “cola”. Nesse estudo os resultados não apresentaram diferenças entre os grupos, embora no estudo de Pacella et al. 2015 relata diferença dos tipos de aminoglicanos com a idade, foi demonstrado que os aminoglicanos: condroitina, dermatan, ceratan e sulfato de heparan, foram maiores nos indivíduos mais velhos do que nos mais jovens; ao mesmo tempo, a contagem de ácido hialurônico foi significativamente maior nos indivíduos mais jovens do que nos idosos.

Em contrapartida, no atual estudo foi relatado somente uma tendência de desagregação lamelar maior na região central em comparação a periférica do grupo II ( $\geq 40$  anos), uma hipótese é que essa tendência se deve a menor quantidade e/ou qualidade de aminoglicanos na região central do que na periférica. Porém, maiores estudos são necessários para esclarecer as particularidades e o mapeamento dos aminoglicanos em cada região.

Em estados patológicos, o estroma corneano é invadido por células que normalmente não existem nele. Leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e monócitos infiltram a córnea como parte da reação inflamatória. Os leucócitos entram nas córneas antes dos capilares, a este respeito, é de interesse que os extratos de leucócitos promovam a multiplicação celular de fibroblastos. Como apontado por Carrel em 1922, os leucócitos e extratos de leucócitos contêm substâncias capazes de estimular a proliferação. A quantidade de vascularização também é diretamente proporcional ao infiltrado leucocitário (Klintworth 1977; Gan 2001). Em algumas amostras foram identificadas vascularização apenas a microscopia óptica, em razão da microscopia óptica ter maior poder de ampliação em comparação a microscopia especular. Os resultados não mostraram diferença na proporção de córneas vascularizadas com a idade. Quanto aos leucócitos foi observado maior número de leucócitos segmentados nas córneas do grupo I do que o grupo II, o que corrobora a capacidade fagocitária reduzida de polimorfonucleócitos reativos em resposta à infecção com o envelhecimento (Hazlett et al. 1990).

De todas as mudanças, a mais importante e clinicamente relevante na córnea com a idade é a bem documentada perda de células endoteliais da córnea (Rodrigues 2011; Gipson 2013). Estima-se uma perda de células endoteliais gradual em aproximadamente 0,3% a 2,4% por ano (Victor 2018; Arici 2014; Elbaz et al. 2016; Mohammad Salih 2016). No estudo, o endotélio mostrou susceptível a lesões com a idade, apresentando maior quantidade de lesões no endotélio dos indivíduos do grupo II, tanto na periferia e quanto na região central. Nesse estudo a espessura na região periférica do endotélio também mostrou ser mais fina no grupo II ( $\geq 40$  anos). A redução do número de células endoteliais e aumento da variabilidade no tamanho e forma das células que acompanham o normal processo de envelhecimento pode afetar adversamente a função endotelial (Li 2017) embora essa função reduzida também possa ser o resultado de um declínio no metabolismo de alta energia com a idade (Lass 1995). Os mecanismos biológicos por trás dessa perda gradual de células

endoteliais ainda precisam ser elucidados, mas podem envolver mudanças hormonais ou influências ambientais, como irradiação ultravioleta e toxicidade química (Faragher et al. 1997). Em particular, a degradação de enzimas no segmento anterior que normalmente metabolizam e desintoxicam o peróxido de hidrogênio e outros radicais livres pode levar a danos progressivos na camada endotelial (Green 1995). Como consequência do envelhecimento, a função endotelial da bomba se deteriora, a cicatrização da ferida diminui e os resultados da cirurgia refrativa tornam-se pobres (Galgauskas 2014; Dutt et al. 1994).

Nas imagens de microscopia eletrônica foram observadas clivagens entre a membrana de Descemet e o estroma, como uma fragilidade de forma natural durante o processamento das amostras, o que corrobora com Dua et al. (2013).

Diferentemente de outros estudos já mencionados na literatura que geralmente realizam cortes transversais, o presente estudo utilizou cortes frontais e sequenciais de anterior a posterior, incluindo região periférica e margem esclerolimbar em 180 graus para descrever a arquitetura dos tecidos que compõem a córnea, do epitélio anterior ao endotélio da córnea; a morfologia do perímetro corneano, além de identificar e descrever as fibras elásticas. Por meio desse método, pode identificar fenestrações intracorneanas enoveladas internamente por fibras elásticas, localizadas na circunferência periférica avaliada em 180 graus da córnea próxima ao limbo, que penetram na córnea desde a região endotelial em contato com região de ângulo trabecular e com humor aquoso da câmara anterior até camada estromal anterior presente em todas as amostras independente da idade.

Em recente publicação (Lewis et al. 2016), fibras elásticas foram identificadas em uma córnea embrionária de 13 semanas em quatro lamelas muito finas do estroma posterior, formando uma região de 8  $\mu\text{m}$  de espessura anterior ao endotélio. Sua presença neste estágio inicial do desenvolvimento, antes da formação da membrana de Descemet, indica que essas fibras não são o resultado de alterações degenerativas relacionadas à idade, mas presumivelmente cumprem alguma função básica no estroma presumível. A organização estrutural do sistema de fibras elásticas posteriores tem implicações clínicas importantes para a cirurgia de transplante de córnea. O recuo elástico associado tem o potencial de afetar diretamente a córnea periférica, o limbo e as vigas e suas células associadas na malha trabecular, levando à distorção do ângulo, ao fechamento dos canais de fluxo trabecular e, a longo prazo, até mesmo a glaucoma, que tem sido reconhecido como um possível resultado de

ceratoplastia penetrante (Al-Mahmood et al. 2012). Uma vez que, ao contrário do colágeno e dos proteoglicanos, as fibras elásticas não podem ser substituídas como parte do turnover da matriz, seria esperado que a ceratoplastia penetrante alterasse permanentemente as propriedades mecânicas da córnea. Esse mecanismo, portanto, precisa ser considerado em conjunto a aqueles atualmente aceitos como sendo causas potenciais de glaucoma induzido cirurgicamente (Dada et al. 2008).

Além de identificar as fibras elásticas da região posterior, o presente trabalho também identificou fibras elásticas em toda a espessura da córnea. A localização periférica dessas fibras elásticas e sua característica hidrofóbica podem sugerir uma rede de drenagem intraestromal, como uma “via expressa” (edema pós glaucoma com rápida recuperação da córnea), para limbo e malha trabecular. Além disso, o edema corneano ocorre mais frequentemente na região central do que na região periférica (Stickel & Bonanno 2002). Há muito tempo já é relatado, apesar da ausência de canais linfáticos na córnea normal, as substâncias injetadas na córnea podem se difundir para o limbo corneoescleral e drenar para os linfonodos regionais por meio de vasos linfáticos que normalmente estão presentes na conjuntiva (Klintworth 1977; Smolin & Hall 1973) e na esclera conforme figura 28C. Isto pode ser demonstrado pela injeção intracorneal unilateral de proteína estranha. Após esse procedimento, as células produtoras de anticorpos podem ser encontradas nos linfonodos de drenagem homolaterais. O fato de o plexo vascular límbico contribuir significativamente para o fluido nutricional corneano normal é amplamente aceito (Klintworth 1977; Ethier 2004), ainda que pouca atenção tenha sido dedicada ao aumento da permeabilidade vascular límbica na gênese do edema corneano. Langham (1953), demonstrou um aumento da permeabilidade dos vasos capilares límbicos ao corante vital da pontamina, azul solúvel em água, no edema corneano induzido por aloxana (um tipo de edema também associado a lesões endoteliais da córnea).

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos nesse estudo permitem as seguintes conclusões:

### **1. Perfil dos indivíduos**

- Que a idade média dos indivíduos foi de  $49 \pm 11,8$  anos e apresentavam limite máximo de 65 anos por determinação técnica do BODF.

### **2. Espessura das camadas no envelhecimento**

- Que a espessura total da CC < CP para o G1 (<40 a), sem diferença para G2 ( $\geq 40$ a);
- Que a Camada de Bowman, a membrana de Descemet e endotélio mostraram CC < CP para o G1 (< 40 a);
- Que houve redução da espessura CP do endotélio e M. Descemet com à idade.
- Que houve aumento da espessura CC da camada de Bowman com à idade.

### **3. Arquitetura e qualidade**

- Que houve tendência a perda da justaposição do epitélio com a idade, CC > CP;
- Que o número de lesões endoteliais G2 > G1;
- Que o número de leucócitos segmentados G1 (<40 a) > G2;
- Que a clivagem encontrada entre a membrana de Descemet e o estroma corroboram com a hipótese de Dua;

### **4. FIBRAS ELÁSTICAS**

- Que as fibras elásticas estão presentes no perímetro ântero-posterior da córnea envolvendo as fenestrações e irradiando se para o centro da córnea;
- Que na região intermediária da córnea predominam fibras elaunínicas;
- Que as fenestrações delimitam o perímetro externo da córnea.

Em conjunto, os resultados mostraram que o envelhecimento causa alterações estruturais nas camadas da córnea e que o predomínio das fibras elásticas em torno das fenestrações ântero-posteriores, que por sua vez, estão em contato com faixa não vascularizada pré-límbica, possivelmente constitui uma via de drenagem periférica no sentido do ângulo irido-corneano.

Considerando o limite de idade do grupo II foi de 65 anos, sugere novas investigações com indivíduos idosos para elucidar as alterações estruturais identificadas e outras não identificadas nesse estudo.

## **7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS**

O estudo realizado apresentou como limitações a impossibilidade de avaliar as características da deterioração das células da córnea pós-morte do doador, uma vez que no contexto do transplante, poucos estudos avaliaram as características da deterioração das células da córnea pós-morte do doador (Dogaroiu *et al.*, 2014).

Outra limitação importante refere-se à padronização dos ângulos das imagens da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de varredura, que podem gerar viés de aferição. Além dessas, considera-se uma limitação importante a ausência de imunomarcagem para descrever células e fibras que poderia demonstrar mais detalhes da arquitetura.

Dentre as perspectivas pretende-se descrever as alterações do processo natural de envelhecimento no tecido corneano. Considerando os resultados obtidos para o conhecimento da arquitetura da córnea e as mudanças no processo do envelhecimento que refletem nos prognósticos das cirurgias refrativas e entendimentos das patologias corneanas, será de grande valia as alterações das diferentes camadas da córnea decorrentes do envelhecimento.

Os resultados obtidos nesse estudo das fibras elásticas são de suma importância para num futuro próximo identificar a interrelação córnea – limbo – malha trabecular e prováveis avanços nas áreas do glaucoma, transplante de córnea, cirurgias refrativas e na compreensão de algumas patologias corneanas que acarretam edema corneano.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abahussin M, Hayes S, Cartwright NEK, Kamma-Lorger CS, Khan Y, Marshall J, Meek KM. 3D collagen orientation study of the human cornea using X-Ray diffraction and femtosecond laser technology. *Investig. Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:5159–5164.
2. Adán CB, et al. Dez anos de doação de córneas no Banco de Olhos do Hospital São Paulo: perfil dos doadores de 1996 a 2005. *Arq Bras Oftalmol*. 2008; 71(2):176-81.
3. Agarwal A, et al. Pre-Descemet's Endothelial keratoplasty (PDEK). *The British Journal of Ophthalmology* 2014; 98: 1181-1185.
4. Al-Mahmood AM, Al-Swailem SA, Edward DP. Glaucoma and corneal transplant procedures. *J Ophthalmol* 2012;2012:576394.
5. Alkatan H, Alzahem T. Histopathology of the ocular surface. In: Histopathology - an update. *IntechOpen* 2018; 9:67-86.
6. Alzahrani K, et al. Corneal clarity measurements in healthy volunteers across different age groups. *Medicine* 2017; 96:1-6.
7. Ambrósio Jr R, Crema A. Tratado Brasileiro de Catarata e Cirurgia Refrativa. 1. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Cultura Médica: Guanabara Koogan; 2014.
8. American Academy of Ophthalmology. Fundamental and principle of Ophthalmology: section two, Basic and Clinical Science Course. San Francisco, USA: American Academy of Ophthalmology; 2012.
9. Arici C, Arslan OS, Dikkaya F. Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Turkish eyes. *Journal of Ophthalmology* 2014;1-5. [PMCID: PMC3941590].
10. Arnal E, Peris-Martínez C, Menezo JL, Johnsen-Soriano S, Romero FJ. Oxidative stress in keratoconus?. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:8592–8597. [doi:10.1167/iovs.11-7732].
11. Arpitha P, Namperumalsamy VP, Muthiah S, Veerappan M. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: Implications on epithelial stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005; 46:3631–3636.
12. Bechtold, IH. Cristais líquidos: Um sistema complexo de simples aplicação. *Revista Brasileira de Ensino de Física* 2005; 27:333 – 342.
13. Bennett JL, Zeiler SR, Jones KR. Patterned expression of BDNF And NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2996–3005.
14. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: Optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(7):2941-8.
15. Boote C, Hayes S, Young RD, Kamma-Lorger CS, Hocking PM, Elsheikh A, Inglehearn CF, Ali M, Meek KM. Ultrastructural changes in the retinopathy, globe enlarged (Rge) chick cornea. *J. Struct. Biol.* 2009; 166:195–204.
16. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(3):779-8.
17. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye* 2003; 17:912- 918.
18. Brautaset MN, Miller WL, Leach NE, Tukler JH, Bergmanson JPG. Central and peripheral corneal thinning in keratoconus. *Cornea* 2013; 32:257–261.
19. Bueno JM, Gualda EJ, Artal P. Analysis of corneal stroma organization with wavefront optimized nonlinear microscopy. *Cornea* 2011; 30(6):692-701.
20. Carrel A. Growth promoting function of leucocytes. *J Exp Med* 1922; 36:385-391.

21. CBO a. Anatomia do aparelho visual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013: 426-80.
22. CBO b. Doenças externas oculares e córnea. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013: 361-63.
23. CBO c. Fisiologia, Farmacologia e Patologia ocular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013:23-43.
24. Chang SW, Hu FR. Changes in corneal autofluorescence and corneal epithelial barrier function with aging. *Cornea* 1993;12:493–9.
25. Collinson JM, Quinn JC, Hill RE, West JD. The roles of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo. *Dev Biol* 2003; 255(2):303–312.
26. Dada T, Aggarwal A, Minudath KB, Vanathi M, Choudhary S, Gupta V, Sihota R, Panda A. Post-penetrating keratoplasty glaucoma. *Indian J. Ophthalmol* 2008; 56:269–277.
27. De Bonis P, Laborante A, Pizzicoli C, Stallone R, Barbano R, Longo C, Mazzilli E, Zelante L, Bisceglia L. Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX, and TIMP3 in keratoconus. *Mol. Vis.* 2011; 17: 2482–2494.
28. Delmonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2011; 37:588-598.
29. Dogaroiu C, et al. Postmortem corneal changes evaluated by fluorescent staining. *Romanian Journal of Legal Medicine* 2014; 22:1
30. Dua H, et al. Human corneal anatomy redefined. *American Academy of Ophthalmology* 2013; 120:1778-1785.
31. Dua HS, Said DG. Clinical evidence of the pre-descemet's layer (Dua's Layer) in corneal pathology. *Eye (Lond)* 2016; 30(8):1144-5.
32. Dutt S, Steinert RF, Raizman MB, Puliafito CA. One-year results of excimer laser photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. *Arch Ophthalmol* 1994; 112(11):1427–1436.
33. Elbaz U, Mireskandari K, Tehrani N, Shen C, Khan MS, Williams S, Ali A. Corneal endothelial cell density in children: normative data from birth to five years old. *Am J Ophthalmol* 2017; 173:134-138.
34. Ethier CR, Johnson M, Ruberti J. Ocular biomechanics and biotransport. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2004; 6:249-273.
35. Faragher RGA, Mulholland B, Tuft SJ, Sandeman S, Khaw PT. Brief reviews on aspects of aging and the eye: Aging and the cornea. *British Journal Of Ophthalmology* 1997; 81:814–817.
36. Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF. The spatial organization of descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *J Cell Biol.* 1990; 110(4):1457-68.
37. Fukuda K, Ishida W, Fukushima A, Nishida T. Corneal fibroblasts as sentinel cells and local immune modulators in infectious keratitis. *International Journal Of Molecular Sciences Int. J. Mol. Sci* 2017; 18:2-24
38. Galgauskas S, Juodkaite G, Tutkuvienė J. Age-related changes in central corneal thickness in normal eyes among the adult Lithuanian population. *Clin Interv Aging* 2014; 9:1145-51.
39. Galgauskas S, Ringailaite E, Juodkaite G. Central corneal thickness and its relationship to gender, intraocular pressure and corneal curvature. *Medicinos Teorija ir Praktika* 2009; 15(1):19–23.
40. Gan L, Fagerholm P. Leukocytes in the early events of corneal neovascularization. *Cornea* 2001; 20(1):96-9.
41. Garcia VD, Abud Filho M, Neumann J, et al. Transplante de órgãos e tecidos. 2ed. São Paulo, Brasil: Segmento Farma; 2006.
42. Gipson KI. Age-Related changes and diseases of the ocular surface and cornea. *Investig*

*Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:48-53.

43. Gomes JAP, et al. Anatomia funcional da superfície ocular. In: Gomes JAP, Alves MR, eds. Superfície ocular : córnea, limbo, conjuntiva, filme lacrimal. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2011:3.38.
44. Gomes JAP, Pires RTF. Aspectos anatômicos e fisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal. In: Gomes JAP, Pires RTF, Alves MR, Lui Netto A, eds. Doenças da superfície ocular. Rio De Janeiro: Cultura Médica, 2002: 3.16.
45. Gomes RLR, Marques JC, Albers MBV, Endo RM, Dantas PEC, Felberg S. Superfície Ocular e Hepatite C. *Arq Bras Oftalmol* 2011; 74(2):97-101.
46. Green K. Free radicals and ageing of anterior segment tissues of the eye: a hypothesis. *Ophthalmic Res.* 1995; 27:143–9.
47. Grocott T, Johnson S, Bailey AP. Neural crest cells organize the eye via TGF and canonical Wnt signalling. *Nat Commun* 2011; 2:265.
48. Guimarães MR. Histologia e fisiopatologia das incisões na ceratotomia radial. In: Guimarães R, Andrade C, Ambrósio R, eds. Cirurgia Refrativa. Rio de Janeiro: Piramide Editora, 1987:283.294.
49. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010; 91(3): 326-335.
50. Hazlett LD, Kreindler FB, Berk RS, Barrett R. Aging alters the phagocytic capability of inflammatory cells induced into cornea. *Curr Eye Res* 1990; 9:129–38.
51. Hirai FE, Adan CBD, Sato EH. Fatores associados à qualidade da córnea doada pelo Banco de Olhos do Hospital São Paulo. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2009; 72:57-61.
52. Hobden JA, Masinick SA, Barrett RP, Hazlett LD. Aged mice fail to upregulate ICAM-1 after *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:1107–14.
53. Holmes DF, Kadler KE. The precision of lateral size control in the assembly of corneal collagen fibrils. *J. Mol. Biol.* 2005; 345:773–784.
54. Igarashi T, et al. Hydrogen prevents corneal endothelialphysiol, al damage in phacoemulsification cataract surgery. *Scientific Report* 2016; 6:31190
55. Ittner LM, Wurdak H, Schwerdtfeger K, Kunz T, Ille F, Leveen P, Hjalt TA, Suter U, Karlsson S, Hafezi F, Born W, Sommer L. Compound developmental eye disorders following inactivation of TGF beta signaling in neural-crest stem cells. *J. Biol.* 2005; 4-11.
56. Jacob S, Naveen P. Anatomy of the cornea, In: Jacob S, ed. Mastering endothelial keratoplasty. India: Springer, 2016:3.7.
57. Jurkunas, U.V.; Bitar, M.S.; Funaki, T.; Azizi, B. Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of endothelial corneal dystrophy. *Am. J. Pathol.* 2010; 177: 2278–2289.
58. Kamiya K, Shimizu K, Ohmoto F, et al. Effect of aging on corneal biomechanical parameters using the ocular response analyzer. *J Refract Surg* 2009; 25(10):888–893.
59. Kamma-Lorger CS, Boote C, Hayes S, et al. Collagen and mature elastic fibre organization as a function of depth in the human cornea and limbus. *J Struct Biol.* 2010; 169(3):424-30.
60. Kanski JJ. Clinical ophthalmology. A systematic approach. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994:144.154.
61. Kanski JJ. Oftalmologia Clínica: Uma Abordagem Sistemática. Rio De Janeiro: Elsevier, 2012: 7:168.169.
62. Klintworth, GK. The cornea – structure and macromolecules in health and disease. *American Journal of Pathology* 1977; 89-91

63. Klyce SD, Beuerman RW. Structure and function of the cornea. In: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, eds. *The Cornea*. 2<sup>nd</sup> Ed. Massachusetts: Butter-Worth-Heinemann, 1998:3.50.
64. Koçluk Y, Burcu A, Sukgen EA. Demonstration of cornea Dua's layer at a deep anterior lamellar keratoplasty surgery. *Oman Journal Of Ophthalmology* 2016; 9:179-181.
65. Lang RA. Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev Biol*. 2004; 48(8-9): 783–791.
66. Langham M. Observations on the growth of blood vessels into the cornea: Application of a new experimental technique. *Br J Ophthalmol* 1953; 37:210-222.
67. Lass JH, Greiner JV, Merchant TE, Glonek T. The Effects of age on phosphatic metabolites of the human cornea. *Cornea* 1995; 14:89–94.
68. Lee JG, Kay EP. NF-KB is the transcription factor for FGF-2 that causes endothelial mesenchymal transformation in cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(3): 1530–1538.
69. Lekskul M, Aimpun P, Nawanopparatskul B, et al. The correlations between central corneal thickness and age, gender, intraocular pressure and refractive error of aged 12–60 years old in rural Thai community. *J Med Assoc Thai* 2005; 88:175–179.
70. Lewis P, White TL, Young RD, Bell JS, Winlove CP, Meek KM. Three-dimensional arrangement of elastic fibers in the human corneal stroma. *Exp Eye Res*. 2016; 146:43–53.
71. Li Y, Fu Z, Liu J, Li M, Zhang Y, Wu X. Corneal Endothelial Characteristics, Central Corneal Thickness, and Intraocular Pressure in a Population of Chinese Age-Related Cataract Patients. *J Ophthalmol* 2017;2017:9154626.
72. M'Ilroy JH. On the presence of elastic fibers in the cornea. *J. Anat. Physiol*. 1906; 40:282–291.
73. Ma J, Wang Y, Wei P, Jhanji V. Biomechanics and structure of the cornea: Implications and association with corneal disorders. *Survey of Ophthalmology* 2018; 63(6):851-861.
74. Martins TMM. Desenvolvimento e caracterização de córneas humanas descelularizadas e recelularização com células-tronco visando regeneração do epitélio corneano anterior [monografia]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal De Minas Gerais – UFMG; 2017.
75. Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res*. 1970; 10(1):107-8.
76. Meek KM, Holmes DF. Interpretation of the electron microscopical appearance of collagen fibrils in the corneal stroma. *Int J Biol Macromol* 1983; 5:17–25.
77. Meek KM, Leonard DW. Ultrastructure of the corneal stroma: A comparative study. *Biophys. J*. 1993; 64:273–280.
78. Meek MK, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res*. 2015; 49:1–16.
79. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária. Resolução RDC No 67, de 30 de setembro de 2008. Regulamento técnico para o funcionamento de bancos e tecidos oculares de origem humana.
80. Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Resolução 196. 1996. Brasília: CNS; 1996.
81. Mohammad Salih PA. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Malay eyes. *Med J Malaysia* 2016; 66:300-303.
82. Morishige N, Shin-Gyou-Uchi R, Azumi H, et al. Quantitative analysis of collagen lamellae in the normal and keratoconic human cornea by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(12):8377-85.
83. Newton RH, Meek KM. Circumcorneal annulus of collagen fibrils in the human limbus. *Investig. Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:1125–1134.

84. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, Mcghee CN. Age-related differences in the normal human cornea: A laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:1165–69.
85. Notara M, et al. The impact of age on the physical and cellular properties of the human limbal stem cell niche. *Age* 2013; 35:289–300.
86. Pacella et al. Glycosaminoglycans in the human cornea: Age-related changes. *Ophthalmology and Eye Diseases* 2015; 7: 1–5.
87. Pantaleao GR, et al. Avaliação da qualidade das córneas doadoras em relação à idade do doador e causa do óbito. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2009; 72:631-635.
88. Park CY, Lee JK, Chuck RS. Second harmonic generation imaging analysis of collagen arrangement in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(9):5622-9.
89. Patel SP, Bourne WM. Corneal endothelial cell proliferation: A function of cell density. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2009; 50:2742-2746.
90. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. P63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 3156–3161.
91. Prasad A, Fry K, Hersh PS. Relationship of age and refraction to central corneal thickness. *Cornea* 2011; 30(5):553–555.
92. Praus R, Goldman JN. Glycosaminoglycans in human corneal buttons removed at keratoplasty. *Ophthalmic Res.* 1971; 2(3-4):223-30.
93. Puk O, Dalke C, Calzada-Wack J, Ahmad N, Klawns M, Wagner S, et al. reduced corneal thickness and enlarged anterior chamber in a novel Colviii2g257d mutant mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(12): 5653–5661.
94. Quantock AJ, Young RD, Akama TO. Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(6):891-906.
95. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv. Ophthalmol* 1998; 42:297–319.
96. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M, Silverman RH, Coleman DJ. Epithelial thickness in the normal cornea: three-dimensional display with Artemis very high-frequency digital ultrasound. *J Refract Surg.* 2008; 24(6):571-81.
97. Rodrigues MPM, Dantas JM, Dantas AM. Anatomia e embriologia. In: Dantas AM, ed. *Essencial em oftalmologia*. Rio de Janeiro : Cultura Médica : Guanabara Koogan, 2011: 3.8
98. Ruberti JW, Klyce SD. Physiology system models of the cornea. In: Hung GK, ed. *Models of the visual system*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002:3.56.
99. Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering—gaining control of collagen organization. *Prog. Retin. Eye Res* 2008; 27:549–577.
100. Rufer F, et al. Age-Related changes in central and peripheral corneal thickness: Determination of normal values with the Orbscan II topography system. *Cornea* 2007; 26:1–5.
101. Sano FT, et al . Tendência de mudança nas indicações de transplante penetrante de córnea. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2008; 71:400-404.
102. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Anatomy and physiology: Considerations in relation to transplantation corneal transplantation 2016; 9-22.
103. Shih PJ, Wang IJ, Cai WF, Yen JY. Biomechanical simulation of stress concentration and intraocular pressure in corneas subjected to myopic refractive surgical procedures. *Sci Rep.* 2017; 7:13906.
104. Shiraishi A, Converse RL, Liu CY, et al. Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1998; 39:2554–2561.

105. Silva MF, Gomes ATL, Freire ILS, Dantas BAS, Torres GV. Caracterização sociodemográfica e epidemiológica dos doadores de córneas do banco de tecidos oculares do Rio Grande do Norte. *Rev. Bras. Pesq. Saúde, Vitória*, 2014; 16(3): 32-37.
106. Silva RE, Morato RM, Veneziano RTS, Rodrigues FW. Perfil epidemiológico dos doadores de córnea do estado de Goiás. *Rev Bras Oftalmol* 2016; 75:274-8.
107. Smolin G, Hall J. Afferent arc of the corneal immunologic reaction. II. Local and Systemic Response to Bovine Gamma Globulin. *Arch Ophthalmol* 1973; 90:231-234.
108. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 2018; 66(2):190–194.
109. Stickel TE, Bonanno JA. The relationship between corneal oxygen tension and hypoxic corneal edema. *Optometry* 2002; 73(10):598–604.
110. Tanifuji-Terai N, Terai K, Hayashi Y, et al. Expression of keratin 12 and maturation of corneal epithelium during development and postnatal growth. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006; 47:545–551.
111. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z, hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24:1442-3.
112. Trinkaus-Randall V, Tong M, Thomas P, Cornell-Bell A. Confocal imaging of the alpha 6 and beta 4 integrin subunits in the human cornea with aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:3103–9.
113. Van Dijk K, Liarakos VS, Parker J, et al. Bowman layer transplantation to reduce and stabilize progressive, advanced keratoconus. *Ophthalmology* 2015; 122:909–917.
114. Victor TNF. Aspecto epidemiológico e morfológicos das córneas retiradas para transplantes no Distrito Federal [monografia]. Brasília: Universidade de Brasília – Unb; 2018.
115. Whitehart D. Corneal endothelium: Overview. In: Dartt Darlenea, eds. *Encyclopedia of the Eye*. Oxford, UK: Academic Press, 2010: 424.434.
116. White TL, Lewis PN, Young RD, Kitazawa K, Inatomi T, Kinoshita S, Meek KM. Elastic microfibril distribution in the cornea: differences between normal and keratoconic stroma. *Exp Eye Res*. 2017; 159:40–48.
117. Winkler M, Chai D, Kriling S, et al. Non-linear optical macroscopic assessment of 3-D corneal collagen organization and axial biomechanics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:8818-27.
118. Wojcik KA, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14:19294–19308.
119. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Med J Aust*. 1976; 1:206-7.
120. Yahia Chérif H, et al. Efficacy and safety of pre-Descemet's membrane sutures for the management of acute corneal hydrops in keratoconus. *The British Journal Of Ophthalmology* 2015; 99:773-777.
121. Zavala J, Lopez JGR, Barriento CAR, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: Developmental strategies for regeneration. *Eye* 2013; 27:579–588.
122. Zheng T, et al. Comparison of human corneal cell density by age and corneal location: an in vivo confocal microscopy study. *BMC Ophthalmology* 2016; 16:1-10.



 <p><b>GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL</b> SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE BANCO DE OLHOS DO DISTRITO FEDERAL</p>
--

## DECLARAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE OLHOS

Declaro, como responsável pelo corpo de \_\_\_\_\_

que, estou ciente do falecimento do (a) mesmo (a), estando de acordo com a **retirada dos globos oculares** para transplante, objetivos terapêuticos e fins científicos conforme legislação vigente.

- Os pacientes serão selecionados para transplante de córnea, obedecendo à lista de espera e critérios legais e éticos adotados pela Central de Notificação, Captação e Distribuição de órgãos do Distrito Federal em pacientes da lista de espera a serem selecionados por critérios legais e éticos adotados pela Central de Notificação, Captação e Doação de Órgãos do Distrito Federal.

- A utilização para fins científicos somente será permitida depois de esgotadas as possibilidades de utilização para transplante.

- Poderá ocorrer hematoma ou sangramento nas pálpebras do doador, apesar de todos os cuidados adotados para evitá-lo.

- Não será informado à família do doador o(s) nomes(s) do(s) receptor(es).

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_. Hora: \_\_\_\_:\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Nome do Responsável _____		
Parentesco _____	CPF _____	RG _____
Endereço _____		
CEP _____	Cidade _____	
Telefones _____		

Testemunhas

Nome _____	Assinatura _____
Nome _____	Assinatura _____
Responsável pela entrevista _____	RG _____



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
COORDENADORIA DE CAPTAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS HUMANOS

**CCOTH**  
Coordenadoria de Captação  
de Órgãos e Tecidos Humanos

### TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DOAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS

Por este documento, eu \_\_\_\_\_

RG n° \_\_\_\_\_ residente à rua: \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_ Bairro

\_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_

na qualidade de (grau parentesco) \_\_\_\_\_ (se doador menor de 18 anos) e eu \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ RG n° \_\_\_\_\_ residente à rua: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_, na cidade

de \_\_\_\_\_ na qualidade de (grau parentesco) \_\_\_\_\_, estou

ciente do falecimento do Sr(a) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ RG n° \_\_\_\_\_, internado no Hospital \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ no dia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, conforme documentação do seu prontuário médico, baseado na

Lei Federal nº9.434 de 04 de fevereiro de 1997, regulamentada pelo Decreto nº2.268 e na Lei nº

10211 de 23 de março de 2001, autorizo, livre e espontaneamente, sem indução ou coação, a

equipe da Central de Notificação e Captação de órgãos e Tecidos do Distrito Federal a

realizar/providenciar remoção, dos órgãos do mesmo.

✓ Órgãos e Tecidos assinalar: sim ou não

Coração ( )Sim ( ) Não	Rins ( )Sim ( ) Não	Pâncreas ( )Sim ( ) Não	Músculos ( )Sim ( ) Não
Fígado ( )Sim ( ) Não	Córneas ( )Sim ( ) Não	Intestino ( )Sim ( ) Não	Pele ( )Sim ( ) Não
Pulmão ( )Sim ( ) Não	Ossos ( )Sim ( ) Não	Tendões ( )Sim ( ) Não	Vasos ( )Sim ( ) Não

Enfatizo que esta autorização é motivada apenas por razões humanitárias, sem expectativas de receber nenhuma forma de compensação.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

#### Testemunhas

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_