



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**MORFOLOGIA ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS
CALICIFORMES DA CONJUNTIVA PALPEBRAL DE CÃES**

ROSÉLIA DE LIMA SOUSA ARAÚJO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA-DF

DEZEMBRO DE 2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**MORFOLOGIA ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS
CALICIFORMES DA CONJUNTIVA PALPEBRAL DE CÃES**

ROSÉLIA DE LIMA SOUSA ARAÚJO
ORIENTADORA: PAULA DINIZ GALERA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 208/2018

BRASÍLIA-DF

DEZEMBRO DE 2018

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Araújo, R.L.S. **Morfologia ultraestrutural de células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães**, Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 38 p. Dissertação de Mestrado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Araújo, Rosélia de Lima Sousa. Morfologia ultraestrutural de células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães /Rosélia de Lima Sousa Araújo. Brasília, 2018. 38 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, 2018. Orientador Paula Diniz Galera.

1.Células caliciformes. 2. Superfície ocular. 3. Cães. 4. Ceratoconjuntivite seca. 5. Microscopia eletrônica.

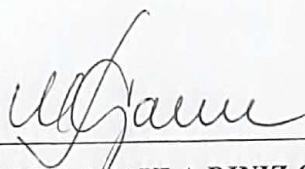
I. Galera, Paula, orientador.

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

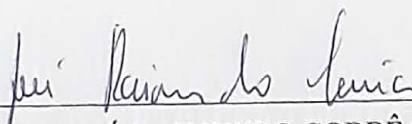
MORFOLOGIA ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS
CALICIFORMES DA CONJUNTIVA PALPEBRAL DE CÃES

ROSÉLIA DE LIMA SOUSA ARAÚJO

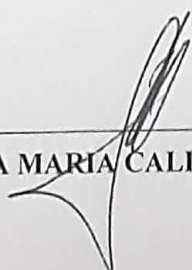
Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciências Animais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Animais



PROF.^a DR.^a PAULA DINIZ GALERA, (Universidade de Brasília- FAV)
(ORIENTADORA)



PROF. DR. JOSÉ RAIMUNDO CORRÊA, (Universidade de Brasília- IB)



PROF.^a DR.^a SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE (Universidade do Oeste Paulista)

BRASÍLIA/DF, 12 de DEZEMBRO de 2018.

Confia no Senhor e faze o bem...
(Sl. 37. 3)

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus familiares, em especial ao meu esposo, Luciano França, e a minha filha, Ruth França, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e dispensando muito amor. Aos meus pais, Severino José e Risalva Lima, e irmãos, Rosinete, Sérgio e Samuel, por sempre se alegrarem comigo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera, pela oportunidade, confiança e apoio que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Oftalmologia Veterinária, Ana Carolina Rodarte, Ana Raquel Ferreira, Rafaela Tozetti, Cecília Braga, Fábio Langsch, Layla Sousa Cruz e Rogério Fonseca por compartilharem seus conhecimentos comigo.

Ao Prof. Dr. José Raimundo, por me abrir as portas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela orientação com a execução deste estudo e pela disponibilidade em compor minha banca. À bióloga Ingrid Gracielle e ao Guilherme Tonelli por todo o auxílio e tempo dispensados a mim.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Franco, por sua disponibilidade em compor minha banca.

Ao Prof. Dr. Márcio Botelho por me ceder as dependências do Laboratório de Patologia Veterinária e colaboração com a revisão das lâminas.

Meus sinceros agradecimentos!!!

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Justificativa	4
1.2 Objetivo	4
2. REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO II	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAIS E MÉTODOS	13
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

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

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Ilustração da distribuição de células caliciformes na superfície ocular humana, observa-se uma maior concentração de células na região nasal (N) (Fonte: GIPSON et al., 2016).

.....2

Figura 2. Ilustração exibido localização de tecido conjuntival canino. **A** Círculo evidenciando área de maior concentração de células caliciformes em tecido conjuntival canino. **B** Representação esquemática de corte histológico mostrando células caliciformes em epitélio palpebral. **C** Célula caliciforme da conjuntiva palpebral em maior aumento.

.....3

CAPÍTULO 2

Figura 1. Corte semifino de conjuntiva palpebral canina. Observe as células caliciformes fortemente coradas na porção epitelial do tecido (setas) (Azul de toluidina).

..... 15

Figura 2. MEV da conjuntiva palpebral de cão. **A** Superfície epitelial da conjuntiva palpebral canina. **B** Pontos de extrusão dispersos por entre células epiteliais, (destacados em amarelo) e macrófagos. **C** Concentração de folículos linfoides (FL) e macrófagos em porção de tecido do fórnix conjuntival. **D** Pontos de extrusão de muco, observar a liberação de pequenas vesículas secretoras (Ve). **E** Macrófago. **F** Microvilosidades apicais.

..... 17

Figura 3. MET de células caliciformes localizadas no epitélio da conjuntiva palpebral de cão, as células são vistas com diferentes diâmetros, observe que os núcleos (N) estão sempre deslocados para a porção basal das células. **A** Célula caliciforme com formato globoso repleta de vesículas secretoras preenchidas por grânulos. **B** Seta destacando bordos celulares

livres indicando liberação de conteúdo mucoso. **C** Célula caliciforme com região basal estreita e núcleo mais alongado, porção apical preenchida por vesículas secretoras, formato característico de cálice, o qual origina a nomenclatura desta célula.

.....18

Figura 4. MET de tecido conjuntival canino. **A** Conteúdo das células caliciformes, vesículas preenchidas por grânulos heterogêneos (Gr), mostram uma rede filamentosa de mucina. **B** Núcleo celular (N), nota-se a cromatina frouxa (Cr) com nucléolo evidente (Nu), a seta indica a delimitação do envoltório nuclear, as camadas fosfolipídicas apresentam-se como linhas enegrecidas. **C** Ribossomos (Rb) livres dispersos no citoplasma. **D** Alta concentração de organelas distribuídas no citoplasma celular. **E** Visualiza-se a face trans do Complexo de Golgi (Cg), diante da face cis estão algumas vesículas de secreção (seta). **F** Mitocôndria (Mt) em corte longitudinal exibindo sua membrana externa e cristas internas. **G** Vista de cortes transversais (setas) e corte longitudinal de mitocôndrias (Mt) circundando o envoltório nuclear. **H** Micrografia da lâmina basal. Observa-se vasos capilares dispostos pelo tecido, evidencia-se as hemácias (Hm) no interior, e fibras de colágeno cortadas transversalmente, vistas como pequenos pontos negros. **I** Vaso capilar, ponta de seta indicando sua delimitação, visualiza-se em detalhes a flexibilidade de uma hemácia (Hm).

.....19

Figura 5. Cortes histológicos de conjuntiva palpebral de cães. **A, B** - Tecido corado com ácido periódico de Schiff (PAS), o conteúdo das células caliciformes foi fortemente corado (setas). **C, D** - Coloração de *Alcian Blue*, aglomerados de células com citoplasma avidamente corados (setas).

.....20

LISTA DE ABREVIATURAS

CALT - Tecido linfoide associado à conjuntiva (*Conjunctiva associated lymphoid tissue*)

CCS - Ceratoconjuntivite seca

FLPR - Filme lacrimal pré-corneano

HE - Hematoxilina-eosina

IL – Interleucina

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de Varredura

PAS - Ácido periódico de Schiff (*Periodic acid-Schiff*)

RER – Retículo endoplasmático rugoso

SRD - Sem raça definida

TGF- β - Fator de crescimento transformador - β (*Transforming growth factor- β*)

TLS - Teste Lacrimal de Schirmer

TRFL - Tempo de ruptura do filme lacrimal

μm – Micrometros

LISTA DE SIGLAS

ARVO - Association for Research in Vision and Ophthalmology

Hvet - Hospital Veterinário de Pequenos Animais

LPV - Laboratório de Patologia Veterinária

LMM – Laboratório de Microscopia e Microanálise

IB – Instituto de Biologia

UnB - Universidade de Brasília

CEUA- Comitê de Ética de Uso Animal

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

As células caliciformes presentes na conjuntiva palpebral são estruturas essenciais para a homeostase da saúde ocular, consideradas células especializadas que produzem o muco, um componente fundamental para a estabilidade do filme lacrimal e proteção da superfície ocular em razão de sua função de favorecer a adesão do fluido lacrimal à superfície ocular (MANTELLI & ARGUESO, 2008; LAMBIASE *et al.*, 2009; MC CAULEY & GUASCH, 2015; TSUBOTA *et al.*, 2017; INABA *et al.*, 2018). O filme lacrimal é composto por três camadas, lipídica, aquosa e mucosa, sendo esta última secretada pelas células caliciformes conjuntivais (TIFFANY, 2008; GARG & ZHANG, 2017; MASTROPASQUA *et al.*, 2018; INABA *et al.*, 2018).

Deficiências qualitativas (redução da porção mucosa e/ou lipídica) e/ou quantitativas (redução da porção aquosa) do filme lacrimal são alterações características da ceratoconjuntivite seca (CCS), importante afecção do sistema lacrimal, que acomete humanos (GIPSON, 2016) e animais domésticos, sendo comumente relatada em cães de diferentes raças (SEBBAG *et al.*, 2017). Seu desenvolvimento pode estar relacionado a um processo pontual ou, a uma combinação de fatores (KLAUSS *et al.*, 2007). Dentre suas causas reportam-se principalmente que seja uma doença imunomediada (DURSUN *et al.*, 2002), e/ou secundário a hipoplasia congênita da glândula lacrimal, blefaroconjuntivite crônica, uso tópico de sulfonamidas e/ou atropina, doenças metabólicas, cinomose (RIBEIRO *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009), leishmaniose (NARANJO *et al.*, 2005), traumas (SANSOM, 1985), fármacos (KLAUSS *et al.*, 2007), e diabetes melitos (CULLEN *et al.*, 2005).

Os protocolos terapêuticos mais utilizados incluem administração tópica de lacrimoestimulantes, antiinflamatórios, antibióticos, mucolíticos e lacrimomiméticos (KASWAN *et al.*, 1995 SEVERIN, 1996). Os lacrimoestimulantes são os únicos reconhecidos pela capacidade de aumentar a produção lacrimal (RAO, 2010), como a ciclosporina A, o tacrolimus e o pimecrolimus (OFRI *et al.*, 2009). Embora a ciclosporina A (CsA) seja amplamente utilizada, dada a sua eficácia nas reações imunomediadas, as informações sobre os efeitos do tratamento oftálmico com imunomoduladores na mucosa conjuntival são limitadas (IZCI *et al.*, 2015).

A distribuição das células caliciformes dentro do epitélio conjuntival segue padrões específicos de acordo com a espécie, tendo-se verificado que em humanos (Fig. 1) e em cães a maior densidade de células caliciformes por área do epitélio é na região nasal (Fig. 2), com menor número de células nas regiões bulbares superior e inferior (MOORE *et al.*, 1987, SANTOS *et al.*, 2018). Diferentes estudos descrevem a densidade e distribuição conjuntival das células caliciformes por meio de microscopia de luz em humanos (GIPSON *et al.*, 2016) e animais, como cães (MOORE *et al.*, 1987), ratos (HUANG *et al.*, 1988), primatas não-humanos (VUJKOVIĆ *et al.*, 2002), cavalos (BOURGES-ABELLA *et al.*, 2007), porquinhos-da-índia (GASSER *et al.*, 2011), chinchilas (VOIGT *et al.*, 2012), coelhos (DOUGHTY, 2013) e gatos (SEBBAG *et al.*, 2016).

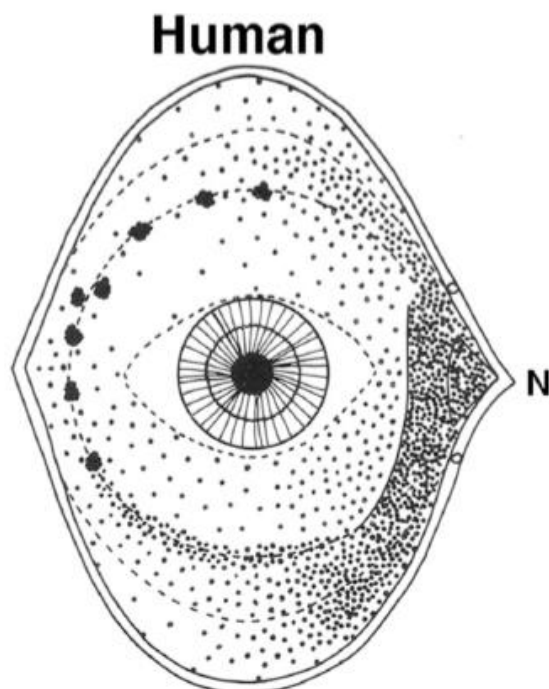


Figura 1. Ilustração da distribuição de células caliciformes na superfície ocular humana, observa-se uma maior concentração de células na região nasal (N) (Fonte: GIPSON *et al.*, 2016).

A distribuição e diferenciação das células caliciformes são essenciais para a saúde e a função da mucosa normal, entretanto, seus mecanismos de diferenciação variam de maneira dependente de sua função (BANSIL & TURNER, 2018). Órgãos internos e regiões que entram em contato com o ambiente externo são revestidos por um epitélio mucoso, necessário para a lubrificação e proteção contra patógenos e detritos externos. Os tratos gastrointestinais,

respiratório superior e inferior e a superfície ocular são tecidos vastamente distintos funcionalmente, mas compartilham características mucosas comuns (MC CAULEY & GUASCH, 2015).

Na superfície da conjuntiva palpebral as células caliciformes são encontradas intercaladas por células epiteliais dentro de um epitélio estratificado (Fig. 2) (CONTRERAS - RUIZ & MASLI, 2015; SEBBAG *et al.*, 2016). Elas produzem muco composto por glicoproteínas hidratadas, incluindo mucinas, imunoglobulinas, ureia, sais, glicose, leucócitos, debris celulares e enzimas como a peroxidase e lisoenzimas (MANTELLI & ARGUESO, 2008; LAMBIASE *et al.*, 2009; GILLAN, 2010).

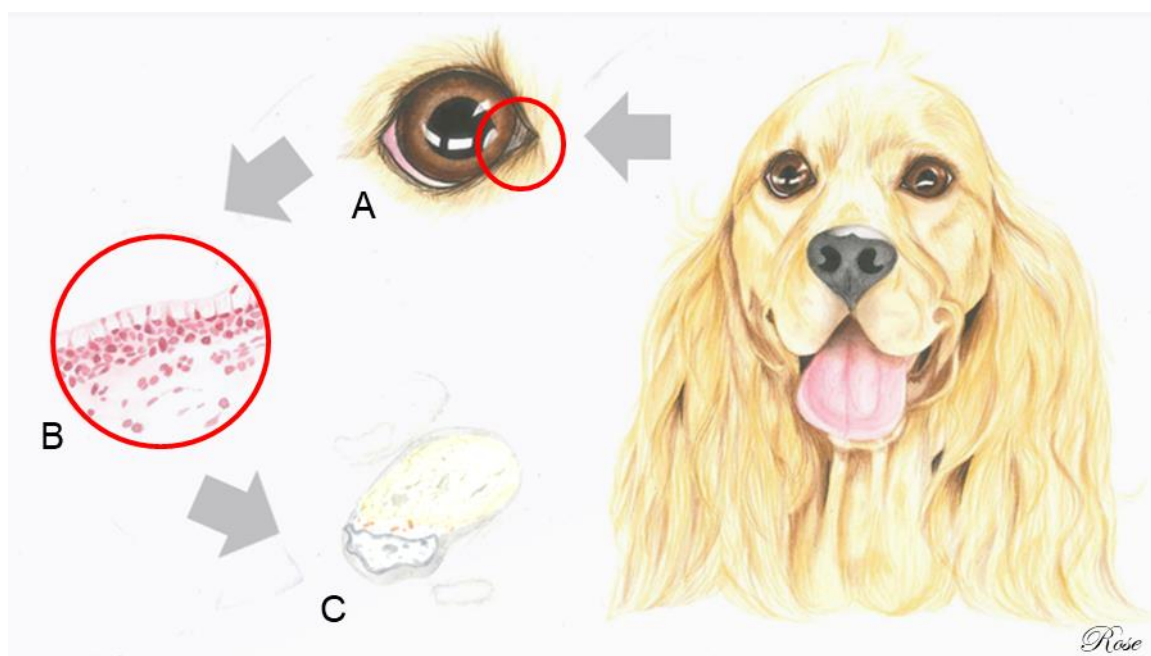


Figura 2. Ilustração demonstrando a localização de tecido conjuntival canino. **A** Círculo evidenciando área de maior concentração de células caliciformes em tecido conjuntival canino. **B** Representação esquemática de corte histológico mostrando células caliciformes em epitélio palpebral. **C** Célula califorme da conjuntiva palpebral em maior aumento.

No epitélio do trato respiratório as células caliciformes são encontradas intercaladas por células epiteliais no epitélio colunar dos tubos condutores da traqueia, brônquios e grandes bronquíolos, no epitélio gastrointestinal estão presentes dentro do epitélio colunar do estômago, do intestino delgado e grosso (BARKER *et al.*, 2008; GIPSON, 2016). Em órgãos como o pulmão, doenças importantes como a fibrose cística, bronquite crônica e asma levam à hiperplasia de células caliciformes (KIM & CRINER, 2013 ; RUBIN, 2014), diferentemente

do observado na conjuntiva ocular onde ocorre redução do número de células quando na presença de afecções (GIPSON, 2016).

Alterações morfológicas no epitélio da conjuntiva palpebral de cães com olhos secos, espécie comumente acometida, necessitam de maiores investigações (MOORE *et al.*, 1987; SANTOS *et al.*, 2018). Com isso, estudos ultraestruturais para avaliação e caracterização do epitélio da conjuntiva palpebral normal auxiliarão na compreensão da fisiopatologia da ceratoconjuntivite seca.

Este estudo tem o intuito de caracterizar as células caliciformes presentes na conjuntiva palpebral de cães sem alterações oculares por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e técnicas de coloração histológica. A descrição morfológica deste tipo celular por meio de microscopia eletrônica tem sido relatada em humanos (GIPSON, 2016) e em espécies geralmente usadas em ensaios laboratoriais como os camundongos (CORRALES *et al.*, 2011) e coelhos (DOUGHTY *et al.*, 2004). O emprego da microscopia eletrônica tem se mostrado valioso na análise de componentes intracelulares há décadas, permite a visualização de microestruturas como o citoesqueleto, sistemas de membrana, organelas e cílios, bem como estruturas especializadas em células diferenciadas (WINEY *et al.*, 2014). Até o momento, pesquisas similares não haviam sido conduzidas em cães.

1.1 Justificativa

O conhecimento da microestrutura celular, através das microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão, permitirá a análise estrutural das células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães, abrindo um novo campo de estudo para a compreensão da fisiologia do filme lacrimal de cães e das afecções decorrentes de alterações sediadas nesta estrutura. Tais dados suscitarão, inclusive, estudos similares dentro da oftalmologia comparada, em outras espécies.

1.2 Objetivos

Descrever a morfologia de células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães sem alterações oculares.

2. REFERÊNCIAS

1. BANSIL, A.R., TURNER, B.S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 124, p. 3-15, 2018.
2. BARKER, N., WETERING, MV., CLEVERS, H. The intestinal stem cell. **Genes & Development**, v. 22, p. 1856-1864, 2008.
3. BOURGES-ABELLA, N, RAYMOND-LETRON, I, DIQUELOU, A. Comparison of cytologic and histologic evaluations of the conjunctiva in the normal equine eye. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, p. 12-18, 2007.
4. CONTRERAS-RUIZ, L., MASLI, S. Immunomodulatory crosstalk between conjunctival goblet cells and dendritic cells. **Plos one**, v.10, p. 1-17, 2015.
5. CORRALES, R. M., DE PAIVA, C. S., LI, D. Q., FARLEY, W. J., HENRIKSSON, J. T., BERGMANSON, J. P., & PFLUGFELDER, S. C. Entrapment of conjunctival goblet cells by desiccation-induced cornification. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 52, p. 3492-3499, 2011.
6. CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A.; McCARVILLE, C. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.4, p.215-225, 2005.
7. DOUGHTY, M., J. Assessment of goblet cell orifice distribution across the rabbit bulbar conjunctiva based on numerical density and nearest neighbors analysis. **Current Eye Research**, v. 38, p.237-251, 2013.
8. DOUGHTY, M.J., BERGMANSON, P.G. Heterogeneity in the ultrastructure of the mucous (goblet) cells of the rabbit palpebral conjunctiva. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 87: 6, p. 377-385, 2004.
9. DURSUN, D., WANG, M., MONROY, D. LI, D.Q., LOKESHWAR, B.L., STERN, M.E., PFLUGFELDER, S.C. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.43, n.3, p. 632-638, 2002.
10. GARG, A., ZHANG, X. Lacrimal gland development: From signaling interactions to regenerative medicine. **Developmental dynamics**, v. 246, p. 970-980, 2017.
11. GASSER, K, FUCHS-BAUMGARTINGER, A, TICHY, A. Investigations on the conjunctival goblet cells and on the characteristics of glands associated with the eye in the guinea pig. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, p. 26-40, 2011.

12. GILLAN, W.D. H. Tear biochemistry: a review. **The South African Optometrist**, v.69, p.100-106, 2010.
13. GIPSON, I.K. Goblet Cells of the Conjunctiva: A Review of Recent Findings. **Progress in retinal and eye research**; v 54, p.49-63, 2016.
14. HUANG, A.J, TSENG, S.C., KENYON, K.R. Morphogenesis of rat conjunctival goblet cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.29, p. 969-975, 1988.
15. INABA, T., TANAKA, Y., TAMAKI, S., ITO, T., NTAMBI, J.M., TSUBOTA, K. Compensatory increases in tear volume and mucin levels associated with meibomian gland dysfunction caused by stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency. **Scientific Reports**, v. 8, p. 3358, 2018.
16. IZCI, C., CELIK, I., ALKAN, F., EROL, SUR, E. Clinical and light microscopic studies of the conjunctival tissues of dogs with bilateral keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 90, p.223-230, 2015.
17. KASWAN, R.L., BOUNOUS, D., HIRSH, S.G. Diagnosis and management of keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary medicine**, v.90, p.539-560, 1995.
18. KIM, V, CRINER, G.J. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 187, p. 228-237, 2013.
19. KLAUSS, G., GIULIANO, E.A., MOORE, G.P., STUHR, C.M., MARTIN, S.L., TYLER, J.W., FITZGERALD, K.E.; CRAWFORD, D.A. Keratoconjunctivitis sicca associated with administration of etodolac in dogs: 211 cases (1992-2002). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.230, n.4, 2007.
20. LAMBIASE, A., MICERA, A., PELLEGRINI, G. MERLO, D. RAMA, P., DE LUCA, M., BONINI, S. BONINI, S. In Vitro Evidence of Nerve Growth Factor Effects on Human Conjunctival Epithelial Cell Differentiation and Mucin Gene Expression. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, p. 4622-4630, 2009.
21. MANTELLI, F, ARGUESO, P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. **Current opinion in allergy and clinical immunology**. v.8, p. 477-483, 2008.
22. MARTINS, D.B., LOPES, S.T.A., FRANÇA, R.T. Cinomose Canina – Revisão de

- Literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.2, p.68-76, 2009.
23. MASTROPASQUA R., AGNIFILI L., MASTROPASQUA, L. Structural and Molecular Tear Film Changes in Glaucoma, **Current Medicinal Chemistry**, v. 25: 1., 2018.
 24. MC CAULEY, H.A, GUASCH. G. Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. **Trends Mol Med**. v.8, p. 492-503, 2015.
 25. MOORE, C.P., WILSMAT, N.J., NORDHEIM, E.V., MAJORS, L.J., COLLIER, L.L. Density and Distribution of Canine Conjunctival Goblet Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, p.1925-1932, 1987.
 26. MOORE, C.P., McHUGH, J.B., THORNE, J.G., PHILLIPS, T.E. Effect of cyclosporine on conjunctival mucin in a canine keratoconjunctivitis sicca model. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.42, p.653-659, 2001.
 27. NARANJO, C., FONDEVILA, D., LEIVA, M., ROURA, X., PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.133, n.1, p. 37-47, 2005.
 28. NELL, B., WALDE, I., BILLICH, A., VIT, P., MEINGASSNER, J.G. The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from an exploratory study. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.1, p.39-46, 2005
 29. OFRI, R.; LAMBROU, G.N.; ALLGOEWER, I.; GRAENITZ, U.; PENA, T.M.; SPIESS, B.M.; LATOUR, E. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: A comparison with cyclosporine A. **The Veterinary Journal**., v.179, p.70-77, 2009.
 30. RAO, S.N. Topical Cyclosporine 0,05% for the prevention of dry eye disease progression. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.26, n.2, 2010
 31. RIBEIRO A.P., BRITO F.L.C., MARTINS B.C., MAMEDE F., LAUS J.L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Ciência Rural**, v. 38, n.2, 2008.
 32. RUBIN, BK. Secretion properties, clearance, and therapy in airway disease. **Translational respiratory medicine**, v. 2, p. 6, 2014.
 33. SANSOM, J., BARNETT, K.C. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. **Journal of Small Animal Practice**, v.26, p.121-131, 1985.

34. SANTOS, D.M., M., FILEZIO M.R., MORATO ABREU, T.G. SILVEIRA C.P.B., CRUZ, N.R.N., LAUS, J.L. Nuclear parameters and chromatin remodeling in epithelial cells and lymphocytes from the palpebral conjunctiva of dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**. p.1-11, 2018.
35. SEBBAG, L., REILLY, C.M., RAMZI EID, R., J. MAGGS, D.J. Goblet cell density and distribution in cats with clinically and histologically normal conjunctiva. **Veterinary Ophthalmology**, p.1-6, 2016.
36. SEBBAG, L., PARK, S. A. KASS, P.H., MAGGS, D.J., ATTAR, M., MURPHY, C.J. Assessment of tear film osmolarity using the TearLab™ osmometer in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, p. 357-364, 2017.
37. SEVERIN, G.A. Keratoconjunctivitis sicca. In: SEVERIN, S. **Veterinary Ophthalmology Notes**. Fort Collins: Mawhiney DesignPoint™ Communications, 3a ed., 1996. 230- 233p.
38. TIFFANY, J.M. The normal tear film. **Developments in Ophthalmology**, v. 41, p. 1-20, 2008.
39. TSUBOTA K., YOKOI N., SHIMAZAKI J., WATANABE H., DOGRU M., YAMADA M., KINOSHITA S., HYO-MYUNG KIM, HUNG-WON TCHAH, HYON J.Y., KYUNG-CHUL YOON, SEO K.Y., SUN X., WEI CHEN W., LIANG L., LI M., LIU Z. New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. **The ocular surface**, v. 15, n. 1. 2017.
40. VOIGT S., FUCHS-BAUMGARTINGER A, EGERBACHER M. Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (*Chinchilla Laniger*). **Veterinary Ophthalmology**, v.15, p. 333–344, 2012.
41. VUJKOVIC V, MIKAC G, KOZOMARA R. Distribution and density of conjunctival goblet cells. **Medicinski pregled**; v.55, p. 195-200, 2002.
42. WINEY M, MEEHL JB, O'TOOLE ET, GIDDINGS TH. Conventional transmission electron microscopy. **Molecular biology of the cell**; v. 25(3), p. 319-323, 2014.

CAPÍTULO II

Morfologia ultraestrutural de células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães

Ultrastructural morphology of goblet cells of the palpebral conjunctiva of dogs

Running Title: Conjunctival goblet cell ultrastructures of dogs

Rosélia L.S. Araújo*, José R. Corrêa † e Paula D. Galera*.

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil, † Laboratório de microscopia e microanálises, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Address communications to:

P.D.Galera

Tel: +55 61 98345-3330

e-mail: dra.paulagalera@gmail.com

RESUMO

Objetivo Descrever a morfologia de células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Animais estudados Dez cães (20 olhos), machos e fêmeas, de diferentes raças, sem alterações oculares.

Procedimentos Dez amostras da conjuntiva palpebral de cães foram coletadas e processadas para as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) e outras 10 amostras foram coradas com PAS e *Alcian blue*, pH 2,5 e analisadas por microscopia de luz.

Resultados Através da MEV foram observados vários pontos de extrusão de muco na porção apical livre das células caliciformes, além de ampla distribuição de folículos linfóides e de macrófagos entremeando microvilosidades das células do epitélio palpebral. Por MET foram visualizadas células caliciformes normais, predominantemente ovaladas com citoplasma amplo de diferentes diâmetros, podendo-se observar grandes vesículas com grânulos heterogêneos e bordas livres sugerindo liberação de conteúdo mucoso na superfície conjuntival. Foram observadas, ainda, organelas citoplasmáticas como o aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e uma alta concentração de mitocôndrias. Todas as amostras foram positivas para PAS e *Alcian blue*.

Conclusão Este estudo descreveu as células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães saudáveis através de técnicas de microscopia eletrônica de forma pioneira. Estes resultados poderão ser utilizados para descrição comparativa com animais que cursem com alterações oculares, bem como com outras espécies.

Palavras-chave: células caliciformes, cães, superfície ocular, ceratoconjuntivite seca, microscopia eletrônica.

ABSTRACT

Objective To describe the morphology of goblet cells of the palpebral conjunctiva of dogs by transmission and scanning electron microscopy.

Studied animals Ten dogs (20 eyes), male and female, from different breeds, without ocular alterations.

Procedures Ten samples of the palpebral conjunctiva of dogs were collected and processed for scanning electron microscopy (SEM) and transmission (MET) and another 10 samples were stained with PAS and Alcian blue, pH 2.5 and analyzed by light microscopy.

Results Through the SEM, several mucus extrusion points were observed in the free apical portion of the goblet cells, as well as a wide distribution of lymphoid follicles and macrophages interspersed with microvilli of the palpebral epithelial cells. By MET, normal goblet cells were seen, predominantly oval with broad cytoplasm of different diameters, being possible to observe large vesicles with heterogeneous granules and free borders suggesting the release of mucous contents on the conjunctival surface. Cytoplasmic organelles such as the Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and a high concentration of mitochondria were also observed. All samples were positive for PAS and Alcian blue.

Conclusion This study described the goblet cells of the palpebral conjunctiva of healthy dogs using electron microscopy techniques in a pioneering way. These results may be used for comparative description of animals with ocular changes as well as other species.

Key words: goblet cells, dogs, ocular surface, dry keratoconjunctivitis, electron microscopy.

INTRODUÇÃO

As células caliciformes presentes na conjuntiva palpebral são essenciais para a homeostase da saúde ocular, sendo consideradas células secretoras especializadas que estão presentes no epitélio das regiões mucosas e úmidas do corpo⁽¹⁾. Na conjuntiva palpebral e bulbar estas células são responsáveis pela produção de muco, sendo a MUC5AC, uma mucina formadora de gel, seu principal componente^(2, 3). O muco gera uma camada hidrofílica sobre a superfície corneal formando um biofilme, facilitando a uniforme propagação da camada lacrimal aquosa, evitando o ressecamento e a contaminação bacteriana da superfície ocular, gerando proteção contra agentes ambientais e diferentes patógenos^(4, 5, 6, 7).

Doenças oculares associadas com a deficiência quantitativa e qualitativa da lágrima são caracterizadas por instabilidade do filme lacrimal, com o posterior ressecamento da superfície ocular. Dentre as principais afecções apresentadas pelos cães em função da deficiência do filme lacrimal destaca-se a ceratoconjuntivite seca (CCS), comumente conhecida como síndrome do olho seco, clinicamente caracterizada por secreção ocular mucopurulenta, conjuntivite, dor, ceratite e úlceras de córnea^(8, 9).

Técnicas de microscopia eletrônica tem se mostrado valiosas na análise de componentes celulares, incluindo o citoesqueleto, membranas e organelas, bem como estruturas especializadas em células diferenciadas, como as microvilosidades⁽¹⁰⁾. Diferentes estudos trazem a descrição por microscopia de luz da densidade e distribuição conjuntival das células caliciformes em humanos e animais, a exemplo de cães⁽¹¹⁾, ratos⁽¹²⁾, primatas não-humanos⁽¹³⁾, cavalos⁽¹⁴⁾, porquinhos-da-índia⁽¹⁵⁾, chinchilas⁽¹⁶⁾, coelhos⁽¹⁷⁾ e gatos⁽⁷⁾.

As alterações morfológicas no epitélio conjuntival palpebral de cães com olhos secos necessitam de maiores investigações, com isso, estudos que caracterizem de forma ultraestrutural o epitélio da conjuntiva palpebral normal auxiliarão na compreensão do olho

seco. Objetiva-se, portanto, descrever a morfologia de células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães sem alterações oculares por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram coletadas amostras de 10 cães saudáveis (20 olhos), 7 fêmeas e 3 machos, sendo quatro cães sem raça definida (SRD), três da raça Shih-tzu e um de cada uma das raças Poodle, Dachshund e York shire, com idades entre 5 meses e 6 anos. Os animais foram submetidos ao teste lacrimal de Schirmer (TLS), tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), teste de coloração com fluoresceína, tonometria de aplanção (Tono-pen® XL) e biomicroscopia com lâmpada em fenda (Slitlamp Kowa® SL-15). Seguiram-se exames físicos e laboratoriais (hemograma e bioquímica sérica) para exclusão de alterações sistêmicas. Todos os pacientes foram incluídos mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos tutores. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA-UnB), com número de protocolo 22/2017, atendendo às normas para experimentação animal da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

2. Coleta e processamento das amostras

Foram coletadas amostras de conjuntiva palpebral das regiões do fórnix palpebral e da conjuntiva palpebral externa da terceira pálpebra de animais submetidos a procedimentos cirúrgicos de orquiectomia e ovariossalpingohisterectomia (procedimentos de castração), sob anestesia geral inalatória. Amostras coletadas de 5 cães (10 olhos) foram tratadas de acordo com os protocolos para microscopia eletrônica, as demais foram preparadas para avaliação histológica por microscopia de luz.

2.1. Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

Amostras da conjuntiva palpebral de cães foram fixadas em paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 24 h, à temperatura ambiente. Após lavagem em 0,1 M de cacodilato de sódio tampão pH 7,2, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 2%, 1,6% ferricianeto de potássio (1: 1 v/v) e 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, durante 1 h, à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2. As amostras foram mantidas durante 24 h em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% a 4°C, lavadas em água destilada e desidratadas numa série ascendente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). O material foi embebido numa mistura de (3: 1 v/v) acetona/resina *Spurr* (Eletron Microscopy Sciences, Co.) durante 6 h, (2: 1 v/v) acetona/resina *Spurr* durante a noite, (1: 1 v/v) acetona/resina *Spurr* para 6 h, (1: 2 v/v) acetona/resina *Spurr* durante a noite e finalmente em resina pura durante 6 h. As amostras foram embebidas em resina *Spurr* por 3 dias em incubadora, a 60°C. Secções semi-finas de um micrômetro foram cortadas em vidro e coradas com azul de toluidina para identificação da região a ser seccionada (Fig. 1). Secções ultrafinas de 70 nm foram seccionadas com faca diamantada de diamante de 45° (micrótomo Leica Ultracut UCT) e contrastadas com acetato de uranila aquoso a 3% e com citrato de chumbo a 10%. As amostras foram analisadas em um MET, JEM 1011 (Electron Microscopy Sciences, Co, Jeol) (19, 20).

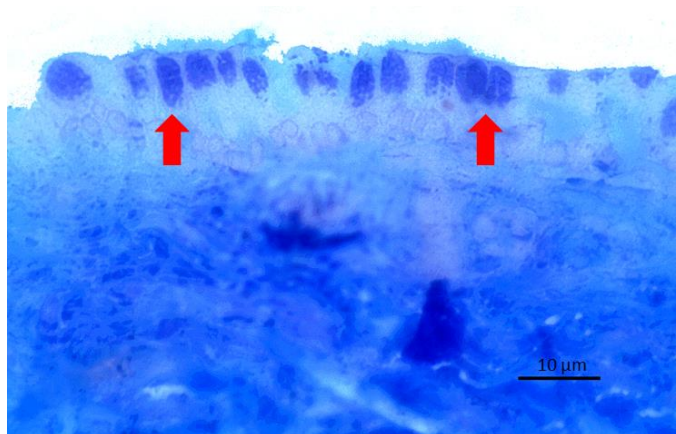


Figura 1. Corte semi-fino de conjuntiva palpebral canina. Observe as células caliciformes fortemente coradas na porção epitelial do tecido (setas) (Azul de toluidina).

2.2. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Semelhantemente ao processamento anterior os fragmentos de tecido foram fixados, contrastados e desidratados numa série ascendente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Posteriormente foi realizada a secagem a ponto crítico (Critical Point Drying - CPD 030, Balzers) em CO² líquido e após a secagem, as amostras foram fixadas em *stubs* metálicos com fitas dupla face de carbono. Em seguida, foram metalizados com uma camada de ouro de 20 nm, com o uso do metalizador de alto vácuo (Leica EM SCD500). Logo após as amostras foram visualizadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão de campo Jeol JSM-7000F (Jeol Ltd.) ⁽¹⁹⁾.

2.3. Histoquímica

Amostras palpebrais de 5 cães (10 olhos) foram fixadas em solução de formaldeído a 10% durante 24 horas, em seguida foram seccionadas e processadas rotineiramente para exame histopatológico, incluídas em parafina, cortadas a 5µm de espessura e coradas com hematoxilina/eosina (HE) e Ácido periódico de Schiff (PAS) e Alcian blue pH 2,5 – PAS ⁽²¹⁾.

3. Tratamento de imagens

Imagens selecionadas foram editadas com o programa Photoshop CC[®] (creative cloud) 2018.

RESULTADOS

Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A observação por MEV do tecido conjuntival revelou uma superfície homogênea formada por células hexagonais justapostas (Fig. 2A), bem como uma ampla distribuição de macrófagos (Fig. 2B, 2E) e folículos linfóides (Fig. 2C). Foram visualizados diversos pontos de extrusão de muco (Fig. 2B, 2D) liberados em pequenas vesículas fusiformes, pelos bordos livres das células caliciformes, entremeando as microvilosidades das células epiteliais (Fig. 2F).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise por MET do epitélio conjuntival de cães saudáveis evidenciou células caliciformes com diferentes diâmetros, predominantemente globosa (Fig. 3A, 3B, 3C), algumas com bordos livres sugerindo liberação de conteúdo mucoso (Fig. 3B). A porção anterior apresentou-se repleta de inúmeras vesículas preenchidas por grânulos mucosos (Fig. 4A) e delimitadas por delgada membrana originada a partir do aparelho de Golgi o qual é bem desenvolvido e geralmente localizado logo acima do núcleo. Membranas celulares e nucleares foram diferenciadas através da nítida visualização estrutural, as bicamadas fosfolipídicas foram vistas como delicadas linhas enegrecidas no envoltório celular (Fig. 4B). Os núcleos localizam-se nos polos basais das células caliciformes, possuem cromatina frouxa e seus nucléolos estão evidentes em células ativas (Fig. 4B, 4C). O citoplasma celular apresentou-se com uma alta concentração de organelas (Fig. 4D, 4E). Observaram-se diversas mitocôndrias com membranas contínuas e cristas paralelas (Fig. 4F, 4G), tanto em cortes transversais como longitudinais, geralmente concentradas circundando o núcleo. Ribossomos livres evidentes estavam dispersos por todo o citoplasma (Fig. 4C),

assim como ligados a membranas ao retículo endoplasmático (Re) (Fig. 4E), caracterizando sua porção rugosa.

As células estão sustentadas por uma lâmina basal organizada por tecido conjuntivo frouxo rico em fibras de colágeno (Fig. 4H), numerosos vasos sanguíneos (Fig. 4I) e linfáticos.

Histoquímica

As células caliciformes foram positivas para o PAS e *Alcian blue*, pH 2,5 PAS. As análises iniciais das lâminas coradas com HE mostraram um tecido bem vascularizado com células caliciformes bem diferenciadas no epitélio. Os cortes tratados com a coloração PAS revelaram células caliciformes fortemente coradas, exibindo um citoplasma abundante (Fig. 5 A, 5B). Os cortes de tecido conjuntival coraram avidamente com *Alcian blue* (pH 2,5 PAS) revelando a presença de glicoproteínas e conteúdo mucoso ácido tanto nas células caliciformes como no epitélio de superfície (Fig. 5C, 5D).

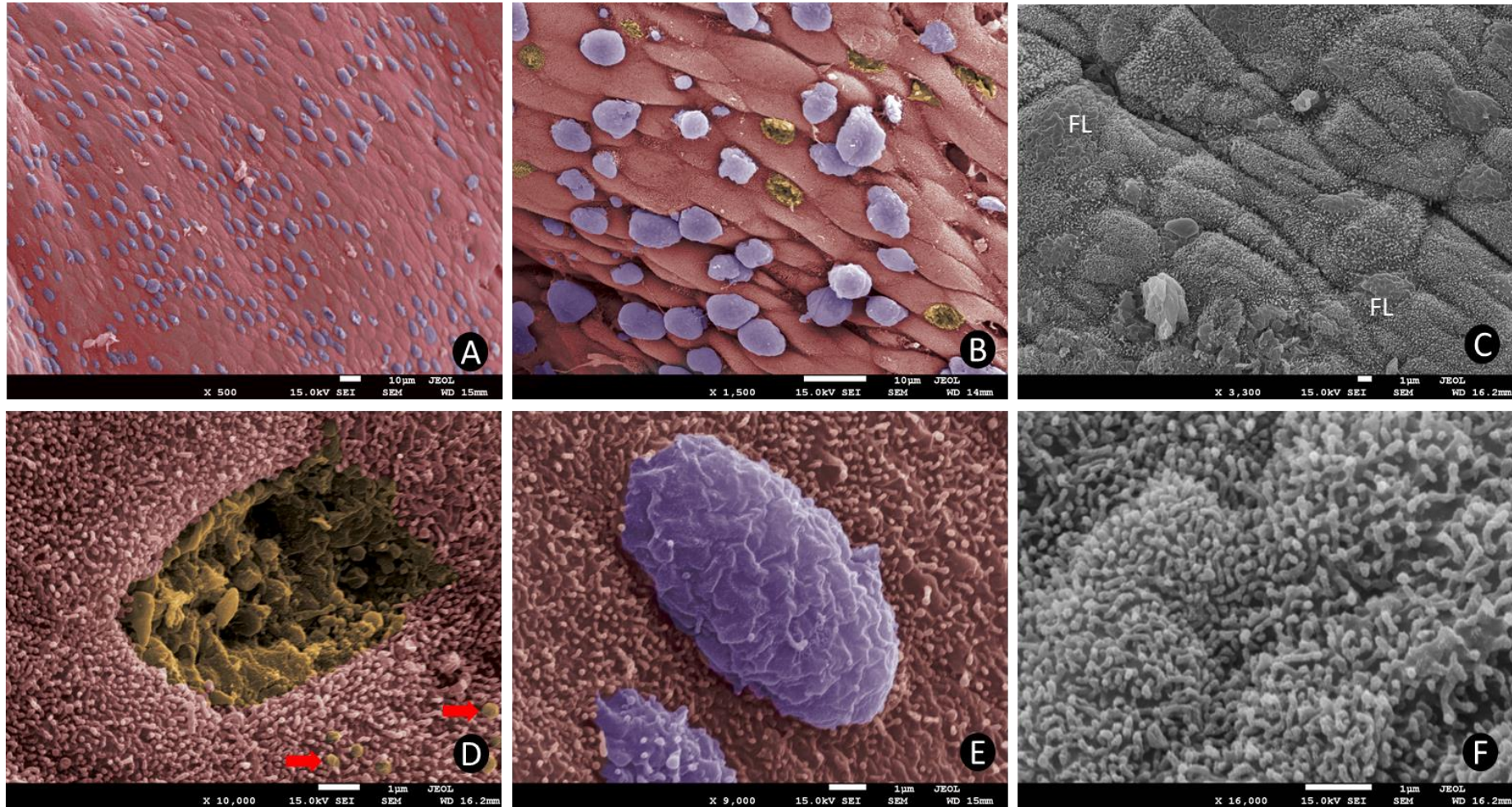


Figura 2. MEV da conjuntiva palpebral de cão. **A** Superfície epitelial da conjuntiva palpebral canina. **B** Pontos de extrusão dispersos por entre células epiteliais, (destacados em amarelo) e macrófagos. **C** Concentração de folículos linfoides (FL) e macrófagos em porção de tecido do fórnix conjuntival. **D** Pontos de extrusão de muco, observar a liberação de pequenas vesículas secretoras (setas). **E** Macrófago. **F** Microvilosidades apicais.

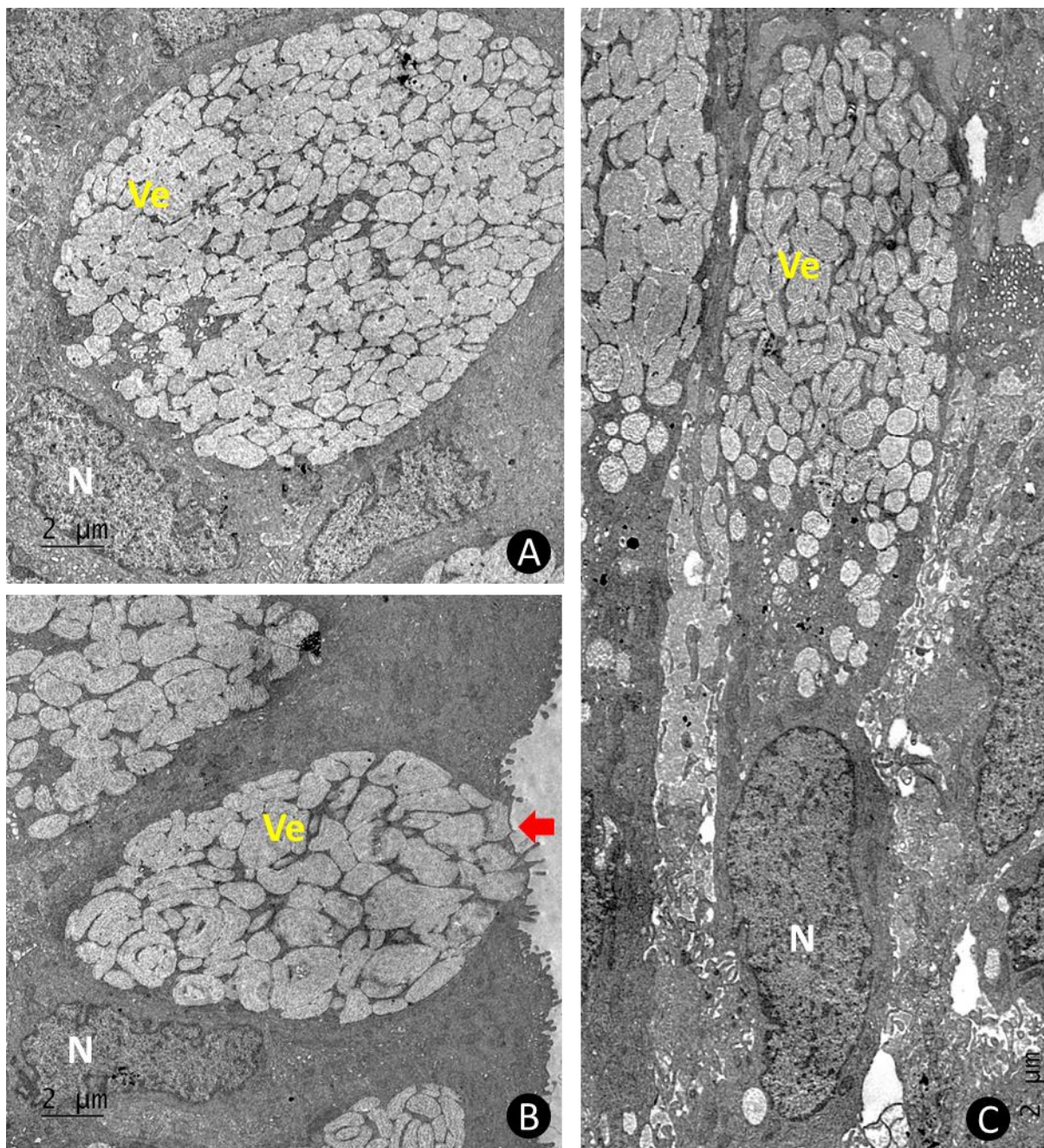


Figura 3. MET de células caliciformes localizadas no epitélio da conjuntiva palpebral de cão, as células são vistas com diferentes diâmetros, observe que os núcleos (N) estão sempre deslocados para a porção basal das células. **A** Célula caliciforme com formato globoso repleta de vesículas (Ve) secretoras preenchidas por grânulos. **B** Seta destacando bordos celulares livres indicando liberação de conteúdo mucoso. **C** Célula caliciforme com região basal estreita e núcleo mais alongado, porção apical preenchida por vesículas secretoras, formato característico de cálice, o qual origina a nomenclatura desta célula.

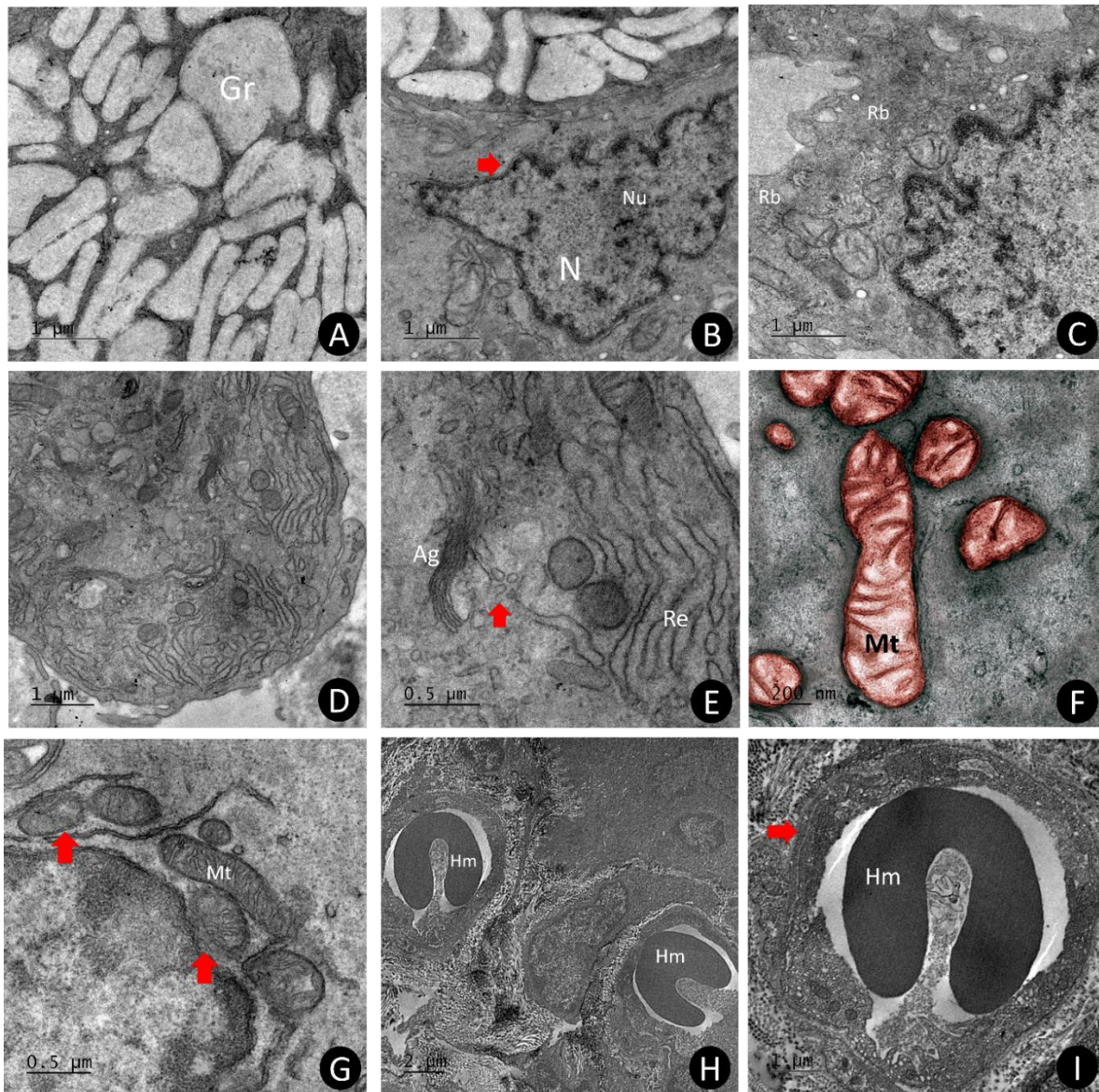


Figura 4. MET de tecido conjuntivo canino. **A** Conteúdo das células caliciformes, vesículas preenchidas por grânulos heterogêneos (Gr), mostram uma rede filamentosa de mucina. **B** Núcleo celular (N), nota-se a cromatina frouxa (Cr) com nucléolo evidente (Nu), a seta indica a delimitação do envoltório nuclear, as camadas fosfolipídicas apresentam-se como linhas enegrecidas. **C** Ribossomos (Rb) livres dispersos no citoplasma. **D** Alta concentração de organelas distribuídas no citoplasma celular. **E** Visualiza-se a face trans do Complexo de Golgi (Cg), diante da face cis estão algumas vesículas de secreção (seta). **F** Mitocôndria (Mt) em corte longitudinal exibindo sua membrana externa e cristas internas. **G** Vista de cortes transversais (setas) e corte longitudinal de mitocôndrias (Mt) circundando o envoltório nuclear. **H** Micrografia da lâmina basal. Observa-se vasos capilares dispostos pelo tecido, evidencia-se as hemácias (Hm) no interior, e fibras de colágeno cortadas transversalmente, vistas como pequenos pontos negros. **I** Vaso capilar, ponta de seta indicando sua delimitação, visualiza-se em detalhes a flexibilidade de uma hemácia (Hm).

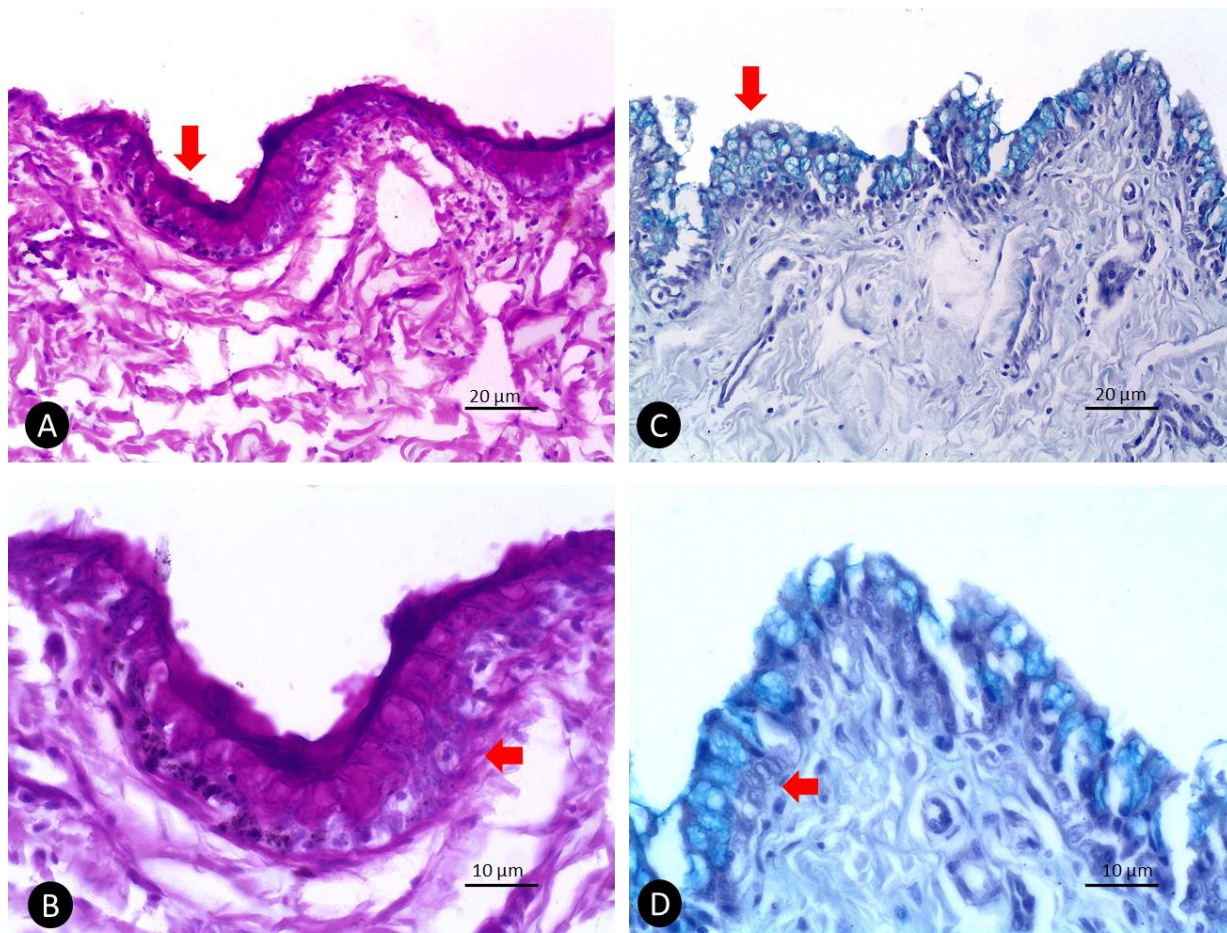


Figura 5. Cortes histológicos de conjuntiva palpebral de cães. **A, B** - Tecido corado com ácido periódico de Schiff (PAS), o conteúdo das células caliciformes foi fortemente corado (setas). **C, D** - Coloração de *Alcian Blue*, aglomerados de células com citoplasma avidamente corados (setas).

DISCUSSÃO

A utilização das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão permitiram uma caracterização rica em detalhes das células caliciformes e suas estruturas intracelulares. Visualizações por MET exibem células caliciformes da conjuntiva palpebral canina com formato globoso (Fig. 3A, 3B) as quais, de acordo com o corte, podem ser vistas com o corpo alongado (Fig. 3C), sendo a base mais delgada e a porção apical mais ampla e repleta por grânulos empacotados. Sua membrana basal prolonga-se por toda a espessura do epitélio estratificado até a superfície apical, semelhantemente ao observado no epitélio conjuntival do

homem ^(3, 22), de coelhos ⁽²³⁾ e de camundongos ⁽²¹⁾. O conteúdo mucoso pode ser visto como grânulos arranjados de forma filamentar, envoltos por uma membrana, semelhantemente a descrição do empacotamento da grande glicoproteína de mucina MUC5AC, como verificado em humanos ou em camundongos ^(2, 3, 24, 25, 26, 27). A evidência das inúmeras vesículas preenchidas por grânulos nas células caliciformes corrobora com a descrição prévia de Bansil & Turner ⁽²²⁾, que descreveram que as mucinas são condensadas, maturadas e empacotadas na face trans do Aparelho de Golgi. Com isso, pode-se inferir que os grânulos de secreção maduros se movem em direção às porções apicais periféricas da célula para armazenamento e secreção por exocitose, onde a fusão da membrana plasmática leva a liberação do conteúdo para o ambiente extracelular.

Gipson e colaboradores ⁽¹⁸⁾ referem que os grânulos de mucina, conforme os visualizados neste estudo, ligam-se a anticorpos ancorados a mucina MUC16. Relata-se que em humanos ⁽²⁸⁾ e em cães ⁽²⁹⁾ esta mucina está presente na porção apical da membrana celular de células apicais da córnea e epitélio conjuntival, agindo como uma barreira, impedindo a aderência de células e patógenos. Já a mucina MUC5AC é secretada para a superfície ocular ^(28, 30)

O citoplasma é rico em organelas da via biosintética e secretora, tendo-se verificado a presença de Aparelhos de Golgi bem desenvolvidos e mitocôndrias, assim como o retículo endoplasmático rugoso (RER) (Fig. 4). Estas organelas, juntamente com o núcleo celular, são os principais constituintes do mecanismo celular encarregado pela síntese de proteínas primárias (RER), pelas modificações pós-traducionais e pelo empacotamento de proteínas (Aparelho de Golgi) ⁽³¹⁾. Os núcleos apresentam-se com interior predominantemente eletro-lucente, e são comumente deslocados para a porção basal das células (Fig. 3), assim como os retículos lisos e rugosos, tal como descrito em células da conjuntiva de coelhos sem alterações oculares ⁽¹⁷⁾, e em células caliciformes do epitélio dos sistemas respiratório ⁽²²⁾ e digestivo ⁽¹⁾. Foram observados pequenos vasos sanguíneos e linfáticos adjacentes à

membrana basal do tecido conjuntival, corroborando com relato prévio na conjuntiva de porquinhos-da-índia. ⁽¹⁵⁾

Por MEV observou-se uma superfície epitelial homogênea, microvilosidades características, folículos linfoides, macrófagos e regiões que sugerem pontos de exocitose mucosa sobre o epitélio, corroborando com a descrição feita em coelhos ⁽¹⁷⁾. No estudo realizado em coelhos verificou-se que no epitélio conjuntival há aberturas ou orifícios localizados entre os ápices das células epiteliais e por vezes um material amorfo pode ser visto estendendo-se a partir deles, presumidamente muco liberado pelas células caliciformes ⁽¹⁷⁾.

Sob condições fisiológicas as mucinas podem ser secretadas por exocitose em pequena quantidade, de forma apócrina ⁽¹⁾ ou em resposta a estímulos neuronais ⁽³²⁾.

Embora as amostras tenham sido coletadas de animais sem alterações oculares macroscópicas, foi visualizado tecido linfoide sobre o epitélio conjuntival, semelhante a outras superfícies mucosas. Sabe-se que a conjuntiva de cães é dotada de tecido linfoide local ou tecido linfoide associado à conjuntiva (CALT), composto por células capazes de aumentar as respostas imunes inatas e adaptativas ^(6,19). O tecido conjuntival abriga células dendríticas, que são detectadas em folículos de CALT e são difusamente distribuídas através da conjuntiva juntamente com linfócitos epiteliais ^(6, 15). Tais folículos linfoides situados na conjuntiva palpebral participam ativamente de respostas imunes nas quais as citocinas inflamatórias, como TGF- β , leucotrienos e IL-13, regulam a atividade da célula caliciforme em condições patológicas ⁽¹⁾.

Para a identificação de glicoconjugados neutros e ácidos em células caliciformes, assim como para observação geral da morfologia conjuntival por microscopia de luz, cortes histológicos foram processados e corados com PAS e *Alcian blue*, contrastadas com hematoxilina, e analisados. O PAS cora glicogênio e substâncias mucosas neutras com grupos glicol, já o

Alcian blue cora substâncias mucosas ácidas no tecido conjuntivo, cartilagem e vários epitélios (células caliciformes, glândulas salivares) ^(15, 21).

A concentração de células caliciformes foi maior na face interna da terceira pálpebra, conforme descrito previamente ^(7,15,30). Nos cortes histológicos as células caliciformes coraram fortemente tanto para o PAS como para o *Alcian Blue*, como anteriormente observado, ^(21, 32) confirmando a presença de muco composto por substâncias glicosiladas neutras (Fig. 5A) e ácidas (Fig. 5B) no conteúdo celular.

CONCLUSÃO

Esta é a primeira descrição ultraestrutural das células caliciformes da conjuntiva palpebral de cães saudáveis. Este estudo servirá de parâmetro para descrição de alterações morfológicas nestas estruturas, bem como parâmetro de comparação às demais espécies animais.

Agradecimentos: À equipe do Laboratório de Microscopia e Microanálise IB/UnB e do Laboratório de Patologia Veterinária FAV/UnB por cederem suas dependências e equipamentos para realização desta pesquisa, bem como a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. McCauley HA, Guasch, G. Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends in Molecular Medicine* 2015; 21: 492-503.
2. Argueso P. Glycobiology of the ocular surface: mucins and lectins. *Japanese journal of ophthalmology* 2013; 57: 150 -155.
3. Gipson IK. Goblet Cells of the Conjunctiva: A Review of Recent Findings. *Progress in retinal and eye research* 2016; 54: 49-63.
4. Davidson HJ & Kuonen VJ. The tear film and ocular mucins. *Veterinary Ophthalmology* 2004; 7: 71-77.
5. Zhou L. & Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in Retinal and Eye Research* 2012; 31:527-550.
6. Contreras-Ruiz L, Masli S, Immunomodulatory crosstalk between conjunctival goblet cells and dendritic cells. *Plos one* 2015;10: 1-17.
7. Sebbag L, Reilly CM, Ramzi eid RJ, Maggs DJ. Goblet cell density and distribution in cats with clinically and histologically normal conjunctiva. *Veterinary Ophthalmology* 2016; 19:38-43.
8. Ribeiro AP, Brito FLC, Martins BC, Mamede F, Laus JL. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. *Ciência Rural* 2008; 38:568-575.
9. Park SA, Taylor KT, Zwingenberger AL, Reilly CM, Toupadakis CA, Marfurt CF, Kathryn L, Good KL, Murphy CJ. Gross Anatomy and morphometric evaluation of the canine lacrimal and third eyelid glands. *Veterinary Ophthalmology* 2016; 19:230-236.
10. Winey M, Meehl JB, O'toole ET, Giddings TH. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular biology of the cell* 2014; 25:319-323.
11. Moore CP, Wilsmaat NJ, Nordheim EV, Major LJ, Collier LL. Density and Distribution of Canine Conjunctival Goblet Cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1987; 28:1925-1932.
12. Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. Morphogenesis of rat conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1988; 29:969-975.
13. Vujkovic V, Mikac G, Kozomara R. Distribution and density of conjunctival goblet cells. *Medicinski pregled* 2002; 55:195-200.

14. Bourges-Abella N, Raymond-Letron I, Diquelou A. Comparison of cytologic and histologic evaluations of the conjunctiva in the normal equine eye. *Veterinary Ophthalmology* 2007; 10:12-18.
15. Gasser K, Fuchs-Baumgartinger A, Tichy A. Investigations on the conjunctival goblet cells and on the characteristics of glands associated with the eye in the guinea pig. *Veterinary Ophthalmology* 2011; 14: 26-40.
16. Voigt S, Fuchs-Baumgartinger A, Egerbacher M. Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (*Chinchilla Laniger*). *Veterinary Ophthalmology* 2012; 15: 333-344.
17. Doughty MJ. Assessment of Goblet Cell Orifice Distribution Across the Rabbit Bulbar Conjunctiva Based on Numerical Density and Nearest Neighbors Analysis. *Current Eye Research* 2013; 38: 237-251.
18. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A. Human conjunctival goblet cells express the membrane associated mucin MUC16: Localization to mucin granules. *Experimental Eye Research* 2016; 145: 230-234.
19. Giuliano EA, Finn K. Characterization of membranous (M) cells in normal feline conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT). *Veterinary Ophthalmology*, 2011; 14: 60-66.
20. De Curcio JS, Silva MG, Silva Bailão, MG, Bão SN, Casaletti L, Bailão AM, De Almeida Soares, CM. Identification of membrane proteome of *Paracoccidioides lutzii* and its regulation by zinc. *Future science OA* 2017; 3: FSO232.
21. Henriksson JT, De Paiva CS, Farley W, Pflugfelder SC, Burns AR, Bergmanson J P. Morphologic alterations of the palpebral conjunctival epithelium in a dry eye model. *Cornea* 2013; 32: 483-490.
22. Bansil AR., Turner BS. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2018; 124: 3-15.
23. Doughty MJ, Bergmansont PG, Heterogeneity in the ultrastructure of the mucous (goblet) cells of the rabbit palpebral conjunctiva. *Clinical and Experimental Optometry* 2004; 87:377-385.
24. Mantelli F, Argueso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2008; 8: 477-483.

25. Gillan WDH. Tear biochemistry: a review. *The South African Optometrist* 2010; 69: 100-106.
26. Inaba T, Tanaka Y, Tamaki S, Ito T, Ntambi JM, Tsubota K. Compensatory increases in tear volume and mucin levels associated with meibomian gland dysfunction caused by stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency. *Scientific Reports* 2018; 8:3358.
27. Guzman-Aranguéz A, Argüeso P. Structure and Biological Roles of Mucin-type O-glycans at the Ocular Surface. *The ocular surface* 2010; 8: 8-17.
28. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Menon BB. Comparison of the Transmembrane Mucins MUC1 and MUC16 in Epithelial Barrier Function. *Plos one* 2014; 9:e100393.
29. Gelatt, KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology*. 5ed. Media: Wlliams & Wilkins, 2013.
30. Umeda Y, Nakamura S, Fujiki K, Toshida H, Saito A, Murakami A. Distribution of goblet cells and MUC5AC mRNA in the canine nictitating membrane. *Experimental Eye Research* 2010; 91: 21-726.
31. Krstic RV Human Microscopic Anatomy. 2 ed., *Springer-Verlag*, 1994.
32. Rios JD, Forde K, Diebold Y, Lightman J, Zieske JD, Dartt DA. Development of conjunctival goblet cells and their neuroreceptor subtype expression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000; 41: 2127-2137.