

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Taciana Pontes Spinelli**

Recife  
2022

**Taciana Pontes Spinelli**

**ESTUDO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE OCULAR *Bradypus variegatus*  
(Schinz, 1825).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Spinelli, Taciana  
ESTUDO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE OCULAR *Bradypus variegatus* (Schinz,  
1825)./Taciana Spinelli.-2021. 74f.:il.

Orientador: Joaquim Evêncio Neto.  
Coorientador: Fabricio Bezerra de Sa.  
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) -Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2022.

1. Bicho preguiça. 2. superfície ocular. 3. córnea. 4. glândula lacrimal. 5. glândula da terceira pálpebra. I. Neto, Joaquim Evencio, orient. II. Sa, Fabricio Bezerra de, coorient. III. Título

CDD 636.089

**Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Taciana Pontes Spinelli**

**ESTUDO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE OCULAR *Bradypus variegatus*  
(Schinz, 1825).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária

28 de fevereiro de 2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. O Dr. Jose Anchieta de Brito  
Universidade de Pernambuco

---

Dra. Priscilla Virgínio de Albuquerque  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho aos Bicho-preguiça, criaturas fascinantes, que tristemente estão sendo assoladas pelos seres humanos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CETAS- TANGARÁ-PE (Centro de triagem de animais selvagens) por permitir este estudo e a toda sua equipe pelo trabalho e dedicação aos animais, em especial Yuri, Luana e Nathalia pela ajuda na coleta de material.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Doutor Joaquim Evêncio Neto pela paciência e por sempre me tranquilizar nos momentos de desespero e por toda a orientação e conhecimento transmitido.

Ao Professor Doutor Francisco de Assis Leite pela ajuda técnica, pelos momentos de tertúlia científica regados ao seu café salvador.

A Doutora Edna Gomes de Barros pela ajuda com a histoquímica e pelas aulas de gestão financeira.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Oftalmologia Experimental da UFRPE, Thais de Andrade Moraes, Beatriz Costa e Bruno Henrique, Bruno Daby, Stephanie Ingrid, enfim, a todos que contribuíram de alguma forma.

Ao meu companheiro, amigo e coorientador, Fabrício Bezerra de Sá pelo carinho, amor, paciência e apoio imensurável durante todos estes anos.

À minha tia avó Terezinha Paiva, pelo amor, carinho, e pelas conversas e muitas risadas sobre a vida.

A todos vocês o meu muito obrigada!!!

“Será possível que a humanidade do futuro nos permita abandonar os orçamentos militares, a loucura da guerra? Será possível que os humanos diminuam uma parcela do egoísmo? Não será possível que, até certo ponto, nós humanos possamos trabalhar para nós mesmos com a intenção de recriar uma humanidade um pouco melhor?”

“Porque, afinal, qual o sentido do avanço tecnológico se, do ponto de vista dos conteúdos da vida humana, permanecemos estagnados, polidos pelo egoísmo, com uma enorme falta de empatia por quem nos acompanha na vida. E nos encontramos num mundo limitado, que está marcado pelo trabalho do homem e pela acumulação do homem, e estamos progredindo do ponto de vista técnico permanentemente, mas notoriamente estamos agredindo a natureza, e seguimos prisioneiros de uma civilização que confunde ser com ter?”

“E finalmente, pareceria que lutamos por uma humanidade mais rica para o indivíduo, mas com uma estagnação em termos de valores e de solidariedade entre os humanos que assusta. Por que essas reflexões?”

***Pepe Mujica, 2022***

## RESUMO

O Bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) é comumente encontrado no Brasil e está sendo direta ou indiretamente assolada pela ação do homem, seja por atropelamentos, choques, desmatamento, caça para consumo de carne exótica e envenenamento por pesticida. Vários estudos sobre os aspectos da ecologia, reprodução e padrões nutricionais de animais silvestres já foram publicados, no entanto, a maioria das características anatômicas são descritas de forma generalista ou permanecem desconhecidas. A oftalmologia veterinária é um campo em expansão e as pesquisas em oftalmologia comparada produzem uma gama de conhecimentos que permitem o entendimento dos diferentes processos evolutivos entre as espécies. A superfície ocular é de vital importância para a visão, estando em contato direto com o meio ambiente, é vulnerável a ressecamento, lesões e patógenos e por isso, possui um mecanismo complexo para manutenção de sua homeostasia. Os bicho preguiça (*Bradypus variegatus*) podem ser afetados por diversas alterações oculares, assim como humanos, decorrentes de várias etiologias, evidenciando a importância de caracterizar os tecidos normais da superfície ocular nestes animais, uma vez que estudos sobre a anátomo-fisiologia ocular do bicho preguiça ainda são escassos. Este trabalho teve como objetivo descrever a superfície ocular da preguiça-comum (*Bradypus variegatus*) onde foram analisados histologicamente as pálpebras, glândulas lacrimais, conjuntiva, limbo e córnea. Para o desenvolvimento do estudo histomorfométrico da superfície ocular, foram usados olhos enucleados de animais que vieram a óbito por motivos não relacionados a esta pesquisa, processados para inclusão em blocos de parafina e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), bem como os métodos histoquímicos de tricrômico de masson, azul de alcian e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foram descritas as características anatômicas, histológicas e histoquímicas da glândula lacrimal, das glândulas superficiais e profundas da terceira pálpebra, das glândulas palpebrais, da córnea e do limbo do Bicho-preguiça. O exame histológico revelou que estes animais não têm tarso, glândulas tarsais e cílios. Possuem glândulas sebáceas bem desenvolvidas associadas à pêlos acessórios ao longo das pálpebras. A face interna das pálpebras apresenta a conjuntiva palpebral com um epitélio estratificado e com células caliciformes. No estroma profundo de ambas as pálpebras foram observadas glândulas lacrimais acessórias mistas. A glândula lacrimal está situada no ângulo dorsolateral da órbita. Histologicamente, a glândula é do tipo túbulo-alveolar. A terceira pálpebra projeta-se do canto medial sobre a superfície anterior do globo e sua cartilagem se assemelha a uma âncora. Macroscopicamente e em exame histológico observou-se tecido glandular superficial e profundo (harderiano). A glândula profunda é grande e situada na região anteroventral da órbita. É túbulo-alveolar, com uma única camada ou células colunares. O epitélio anterior da córnea consiste em uma única camada de células basais, que têm forma colunar e se encontram sobre uma fina membrana basal; possui três camadas de células poliédricas; e três camadas de células escamosas não queratinizadas, sem membrana de bowman e um estroma vascularizado.

**Palavra-chave:** Bicho preguiça, superfície ocular, córnea, glândula lacrimal, glândula harderiana



## ABSTRACT

Sloths (*Bradypus variegatus*) are directly or indirectly affected by human action, for example: car accidents with collisions, deforestation, hunting for consumption of exotic meat and pesticide poisoning occur frequently. Several studies on ecology, reproduction and nutritional aspects of wild animals have already been published, however, most anatomical characteristics are described in a generalist way or remain unknown. Veterinary ophthalmology is an expanding field and research in comparative ophthalmology produces a range of knowledge that allows the understanding of different evolutionary processes among species. The ocular surface is of vital importance for vision, being in direct contact with the environment, it is vulnerable to dryness, injuries and pathogens and therefore has a complex mechanism for maintaining its homeostasis. Sloths (*Bradypus variegatus*) may be affected by several ocular diseases, like humans, due to different etiologies, thus the importance of characterizing the normal tissues of the ocular surface in these animals since studies on the sloth ocular anatomy and physiology are still scarce. The present study aimed to characterize the normal anatomy of the ocular surface of this species. For the development of the histomorphometric study of the ocular surface, eyes were collected from animals that died for reasons unrelated to this research. The eyes were processed for inclusion in paraffin blocks and stained by the Hematoxylin-Eosin (HE), Schiff's Periodic Acid (PAS), alcian blue, tricromic masson, and then submitted to evaluation by light microscopy. Anatomical, histological, and histochemical characteristics of the lacrimal gland, the superficial and profound glands of the third eyelid, palpebral glands, cornea and limbus were described. Histologic examination revealed tarsus, tarsal glands and cilia were not present. Instead, well-developed sebaceous glands associated with accessory hairs along the palpebrae were present. The inner face of the eyelids is lined with the palpebral conjunctiva, which consists of a thin layer of loose connective tissue with a stratified epithelium. Mixed-secreting accessory lacrimal glands were noted in the deep stroma of both palpebrae. The lacrimal gland was situated in the dorsolateral angle of the orbit between the dorsal rectus and the lateral rectus muscles. Histologically, the gland is a tubuloalveolar type. The third eyelid protrudes from the medial canthus over the anterior surface of the globe, its cartilage resembles an anchor in shape. The stroma of the nictitans consists of loose to dense connective tissue that supports glandular and lymphoid tissue. Histological and histochemical examination revealed a superficial and a deep (harderian) glandular tissue. The deep gland is large and situated in the anteroventral region of the orbit. It is a compound branched, tubulo-alveolar, with a single layer or columnar cells. The cornea is elliptical in shape, with a horizontal diameter greater than the vertical. The anterior epithelium consists of a single cell layer of basal cells, which are columnar in shape and lie on a thin basement membrane; two three layers of polyhedral cells; and three layers of nonkeratinized squamous cells. The Bowman membrane is absent, and vessels are present in the stroma reaching the central cornea.

**Key word:** Sloth, Ocular surface, cornea, conjunctiva, lacrimal gland, harderian gland.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Figura 1.-** Figura esquemática da superfície ocular do cão A e do suíno B. (Fonte em A. Adaptação de Slatter 2008. Fonte em B: Crespo-Moral et al. 2020).
- Figura 2.-** Ácinos da glândula lacrimal. A) Humanos, mostrando células colunares com núcleo basal e lúmen estreito. Fonte: (SINGH; BASU, 2020). B) Glândula lacrimal do canino com conformação semelhante, demonstrando células colunares com lúmen central estreito. Fonte: (EL-NASEERY et al., 2016). C) glândula lacrimal do *Chaetophractus villosus* que apresenta PAS positivo, com produção mucosa (MC) e seromucosa (seta). Fonte: (HERNAN et al., 2002).
- Figura 3.-** Forma da cartilagem da terceira pálpebra nas diferentes espécies de animais domésticos. a) Cão tem uma forma semelhante a uma nadadeira com uma base mais ampla. b) Gato tem forma que se assemelha a uma nadadeira. c) Suíno tem cartilagem em forma de âncora. d) bovino tem cartilagem em forma de âncora e) caprino tem uma forma semelhante a uma nadadeira com uma base mais ampla f) cavalo tem uma forma de anzol. ( Fonte: Schlegel, 2001).
- Figura 4.-** Glândula Harderiana em diferentes espécies.
- Figura 5.-** Histologia da córnea do camundongo. HE 10x ( Fonte: Arquivo pessoal 2010).
- Figura 6.-** Paliçadas de Vogt no canino. (Fonte: Patruno 2017).

**Figura 6.-** Fotografia de Bicho-Preguiça (*Bradypus variegatus*).

## CAPÍTULO II

### Artigo 1

**Figura 1.-** Conjuntiva palpebral do Bicho preguiça. A) Conjuntiva palpebral demonstrando um epitélio colunar pseudoestratificado com inúmeras células caliciformes PAS positivas. B) Conjuntiva palpebral demonstrando epitélio colunar pseudoestratificado com tecido linfóide difuso e vasos. C) Conjuntiva palpebral marginal demonstrando epitélio colunar com 2 a 3 camadas celulares demonstrando em seta azul células caliciformes PAS positivo. D) Conjuntiva palpebral marginal apresentando epitélio colunar com 2 a 3 camadas celulares e tecido conjuntivo com grandes vasos (asteriscos).

**Figura 2.-** Pálpebra do Bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) **Sp** superfície palpebral. **Sc** Superfície conjuntival. **m** melanócitos **Td** Tecido conjuntivo denso. **Fp** Folículo piloso. **Gsb** Glândulas sebáceas. **Gsu** Glândulas sudoríparas. Fibras musculares.

**Figura 3.-** Glândulas acessórias palpebrais do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). **GLa** – Glândula lacrimal acessória. **Dct**- Ductos excretores. **Fxc**- Fornix conjuntival. **L**- Lúmen. A) glândula acessória presente na região da pálpebra marginal, próximo a superfície conjuntival, apresentando 3 lóbulos separados por tecido conjuntivo denso. B) Glândula lacrimal acessória com ductos Interlobulares. C) glândula lacrimal acessória presente com ducto desembocando no fórnix conjuntival. D) Ácinos da glândula lacrimal acessória, apresentando ácinos serosos com

lúmen apresentando secreção serosa e ácidos mucosos com lúmen estreito (**seta azul**).

**Figura 4.-** Macrografia da terceira pálpebra do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). A) Olho do bicho-preguiça evidenciando a terceira pálpebra ( seta azul) note-se a base pigmentada. B) cartilagem da terceira pálpebra após dissecação, apresenta forma de âncora.

**Figura 5.-** Histologia da terceira pálpebra do Bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). **Sb-** Superfície bulbar. C- cartilagem da terceira pálpebra. **Sp-** Superfície palpebral. M- melanócitos **Flo** - tecido linfóide organizado (folículo linfóide). **Fld-** Tecido linfóide difuso).

**Figura 6.-** Ácidos da glândula superficial da terceira pálpebra. HE 40X.

**Figura 7.-** Figura 7- Ácidos da glândula superficial da terceira pálpebra. Evidencia-se citoplasma fortemente corado, com lúmen apresentando conteúdo seroso. H.E.

**Figura 8.-** Glândula profunda da terceira pálpebra do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). **S-** septos interlobulares. **L-** Lúmen. **Seta laranja** – evidenciando os ácidos com autofluorescência. Em A, observa-se septos Interlobulares separando ácidos de diferentes tamanhos e vários ductos excretores. Em B, há a presença de ácidos apresentando células com núcleos arredondados, conteúdo amorfo de tamanhos e formas diferentes. H.E. Em C demonstrando a presença de intensa autofluorescência. D) setas laranjas evidenciando os ácidos com autofluorescência.

**Figura 9.-** Glândula lacrimal dorso lateral do bicho preguiça. A) A glândula é dividida em vários lóbulos. Inúmeros ductos (**dct**) estão presentes entre os ácidos e septos (**S**) se irradiam entre a

glândula formando vários lóbulos. Marcadas PAS positivo B) ácidos marcando Azul de Alcian positivo. C) ácidos Azul de Alcian positivos com lúmen estreito e ácidos azul de Alcian negativos com lúmen grande.

## Artigo 2

**Figura 1.-** Histologia da córnea do bicho preguiça. A) seta vermelha demonstrando vasos em estroma superficial. Coloração tricrômica de Masson. Seta amarela demonstrando membrana de Descemet B) histologia da córnea demonstrando epitélio, estroma e endotélio. Seta vermelha demonstrando vasos no estroma profundo e superficial da córnea. Seta preta demonstrando endotélio.

**Figura 2.-** Em A seta azul evidenciando arteríolas adentrando a córnea atingindo a parte central da córnea e apresentando ramificações. Em B Seta preta evidenciando círculo arterial subconjuntival e seta azul arteríolas direcionando-se à córnea central.

**Figura 3.-** Corte histológico do limbo do Bicho-preguiça evidenciando criptas em forma de Paliçadas na base do epitélio limbal (setas em azul) e presenças de vasos associados à região do limbo (v). AiC- Ângulo iridocorneano H.E.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1	A SUPERFÍCIE OCULAR.....	2
2.1.1	As Pálpebras e suas glândulas acessórias .....	3
2.1.2	Glândula lacrimal.....	4
2.1.3	Terceira pálpebra e sua glândula ( superficial e profunda).....	4
2.1.4	A conjuntiva.....	9
2.1.5	A córnea.....	10
2.1.6	O limbo .....	12
2.2	O Bicho-preguiça.....	13
2.2.1	Estudos com o olho do bicho-preguiça.....	15
	REFERÊNCIAS.....	17
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>18</b>
3.1	ARTIGO I - Histologia e histoquímica da glândula lacrimal e da terceira pálpebra do bicho preguiça ( <i>Bradypus variegatus</i> ).....	18
3.2	ARTIGO II - descrição histológica e histoquímica da córnea e limbo do bicho preguiça ( <i>Bradypus variegatus</i> ).....	44
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>12</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) é comumente encontrado no Brasil e embora esta espécie não esteja em perigo de extinção, está sendo direta ou indiretamente assolada pela ação do homem, por exemplo, atropelamentos, choques, desmatamento, caça para consumo de carne exótica e envenenamento por pesticida ocorrem com frequência. A espécie é mais vulnerável devido ao seu comportamento e características fisiológicas como movimentos lentos e por viverem em copas de árvores; sendo, a camuflagem seu principal mecanismo de defesa (CASSANO, 2006).

Embora existam vários estudos sobre os aspectos da ecologia, reprodução e padrões nutricionais de animais silvestres (ALVARES et al., 2015; BARROSO; ACEVEDO; VICENTE, 2020), a maioria das características anatômicas são descritas de forma generalista ou permanecem desconhecidas. Dados obtidos sobre aspectos da anatomia, macro ou microscópicas, podem auxiliar no conhecimento e na determinação de características espécie-específicas. Ainda, estes podem servir de referência às áreas de: cirurgia, clínica e reabilitação animal, evitando que erros ocorram devido às frequentes homologias com animais domésticos (MARTIN, 2018).

A oftalmologia veterinária é um campo em expansão e as pesquisas em oftalmologia comparada produzem uma gama de conhecimentos que permitem o entendimento dos diferentes processos evolutivos da visão entre as espécies. Ainda, o estudo da anatomia, fisiologia e histologia, são ferramentas importantes para o esclarecimento dos diferentes mecanismos envolvidos na saúde e doença ocular das diferentes espécies incluindo o olho humano. Dados sobre a anátomo-fisiologia ocular do bicho preguiça ainda são escassos (SILVA et al., 2014), portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever a superfície ocular da preguiça-comum (*Bradypus variegatus*) onde foram analisados histologicamente as pálpebras, glândulas lacrimais, conjuntiva, limbo e córnea.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- A SUPERFÍCIE OCULAR

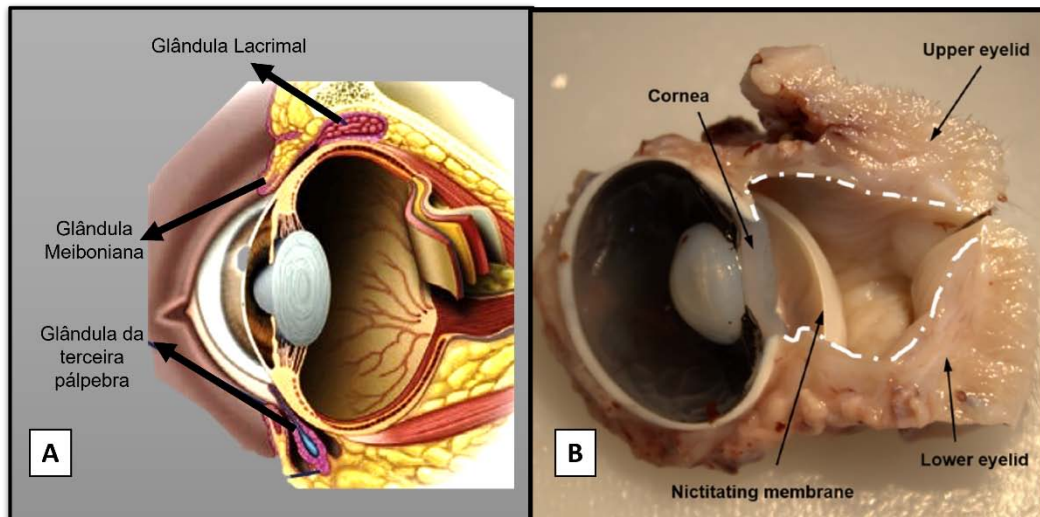


Figura 1- Figura esquemática da superfície ocular do cão A e do Suíno em B. (Fonte em A. Adaptação de Slatter 2008. Fonte em B: Crespo-Moral et al. 2020)

A superfície ocular é de vital importância para a visão. Como está em contato direto com o meio ambiente é vulnerável ao ressecamento, a lesões e patógenos e por isso, possui um mecanismo complexo para manutenção de sua homeostasia. O termo superfície ocular foi inicialmente introduzido em 1977 por Thoft e Friend, quando demonstram a importância do filme lacrimal, córnea e conjuntiva na reepitelização da córnea. Em 2007 Gipson estendeu o conceito de superfície ocular, onde sugere que as pálpebras, glândulas palpebrais acessórias, glândulas lacrimais assim como a córnea, conjuntiva e filme lacrimal estão ligados funcionalmente para manutenção da homeostasia da superfície ocular (Figura 1). Segundo os autores supracitados, todos estes elementos trabalham de forma sinérgica para manter a saúde e transparência da principal superfície de refração ocular dos mamíferos: a córnea (GIPSON, 2007).

O epitélio da superfície ocular é contínuo sem interrupções entre córnea e conjuntiva e segue pelo epitélio dos ductos nasolacrimais e glândulas; todos derivados do ectoderma. As glândulas lacrimais assim como as glândulas meibomianas se originam do mesmo epitélio e cada região deste epitélio contínuo encontra-se integrada ao sistema nervoso, endócrino, circulatório e imune da superfície ocular. Com isto, todo o sistema da superfície ocular encontra-se



totalmente integrado, sendo innervado principalmente pelo nervo trigêmeo que recebe sinais de qualquer uma dessas regiões promovendo respostas compensatórias como o ato de piscar, o lacrimejamento e a secreção celular (GIPSON, 2007).

### 2.1.2- AS PÁLPEBRAS E SUAS GLÂNDULAS

As pálpebras dos mamíferos são formadas por duas pregas móveis músculo fibrosas que servem para bloquear a luminosidade além de proteger, nutrir e lubrificar a córnea. As comissuras lateral e medial são formadas a partir do encontro das pálpebras superior e inferior, a abertura entre elas denomina-se fissura palpebral. Os pontos lacrimais, por onde flui a lágrima, se abrem nas margens da pálpebra, próximo ao ângulo medial do olho. A pálpebra é composta pela camada mais externa coberta por pele que é composta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e derme de tecido conjuntivo frouxo; logo abaixo encontra-se uma camada de feixes de músculo estriados que formam o músculo orbicular do olho, disposto circularmente estes feixes musculares se unem à camada da lâmina tarsal e ao músculo liso tarsal da pálpebra. O tarso é composto por tecido conjuntivo denso formando uma placa palpebral que dá sustentação à pálpebra. Nela localizam-se as glândulas meibomianas, responsável pela produção da camada oleosa, a mais superficial do filme lacrimal, que é responsável por evitar a evaporação precoce da camada aquosa. Alguns animais não apresentam tarso ou glândula meibomiana, como o elefante-asiático (*Elephas maximus*), o bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) e o damão-do-cabo (*Procavia capensis*) (WONG et al., 2012; GELATT, 2013; SENA et al., 2022). A camada mais interna da pálpebra é revestida pela conjuntiva palpebral. Nas espécies domésticas, a camada externa da pálpebra, ou a pele, é coberta por uma camada densa de pêlos com glândulas tubulares sebáceas. Na maioria das espécies, as margens das pálpebras possuem pêlos especializados ou cílios que tipicamente são mais proeminentes em espessura e comprimento do que os pêlos faciais. Na pálpebra inferior, os cílios, quando presentes, tendem a ser consideravelmente mais curtos e mais finos que na pálpebra superior. Pelos táteis (*pili supraorbitalis*), comparável a sobrancelhas em seres humanos, podem estar presentes nas proximidades das pálpebras superiores. Feixes de fibras musculares lisas se estendem dos folículos em direção a borda palpebral. Estes feixes estão ausentes nos carnívoros e em humanos, mas eles são bastante comuns em

ruminantes. As raízes dos grandes cílios estão em estreita associação com glândulas sebáceas proeminentes (glândulas de Zeis) e glândulas sudoríparas (glândulas de Moll, glândulas ciliares) (GELATT, 2013). As glândulas de Moll são semelhantes em todas as espécies e em primatas, incluindo humanos. Estudos demonstraram a presença de proteínas antimicrobianas sugerindo que estas glândulas apócrinas têm função antimicrobiana (STOECKELHUBER et al.; 2004). Glândulas lacrimais acessórias também podem ser encontradas nas pálpebras superior e inferior, embora sua contribuição na produção do filme lacrimal mostrou-se insignificante no gato, em espécies não domésticas possui um papel importante, tanto no desenvolvimento quanto na composição secretória. O peixe-boi da Flórida (*Trichechus manatus*), por exemplo possui estas glândulas, que se alinham de forma contígua em grande parte da porção posterior da pálpebra superior e inferior e são responsáveis pela produção da maior parte do filme lacrimal nestes animais. São glândulas de secreção principalmente mucosas, possuindo um extenso sistema de ductos e um tecido linfóide associado (CALT) bem desenvolvido. Em humanos estas glândulas são conhecidas como glândula de Wolfring localizadas nas pálpebras e glândulas de Krause localizadas no fórnix conjuntival (GELATT, 2013).

### 2.1.3- A GLÂNDULA LACRIMAL

A glândula lacrimal desempenha um papel de fundamental importância na manutenção do microambiente e homeostasia do epitélio da superfície ocular. É uma glândula túbulo-alveolar, localizada na região dorsolateral do globo e seus ductos (entre 15 a 20 ductos) desembocam no fórnix conjuntival superior (GELATT, 2013). Sua função é a produção da porção serosa (aquosa) do filme lacrimal, porém em algumas espécies um componente mucoso também é produzido, como por exemplo no rato, na alpaca, ovino e no coelho (DING et al., 2011; GELATT, 2013). Esta glândula contém múltiplos lóbulos e cada lóbulo está composto por vários ácinos e ductos intralobulares. Entre os lóbulos entrelaçados em tecido conjuntivo estão localizados vasos, fibras nervosas, fibroblastos, células plasmáticas e alguns linfócitos. As células plasmáticas produzem IgA que é secretado na lágrima. Os ácinos estão compostos por células com forma piramidal com um lúmen central (Figura 2). Estas células contêm vários grânulos PAS-positivos (periodic acid shiff) e

têm um núcleo deslocado basalmente. Células mioepiteliais envolvem os ácinos e são responsáveis pela contração e expulsão do conteúdo secretado (OBATA, 2006).

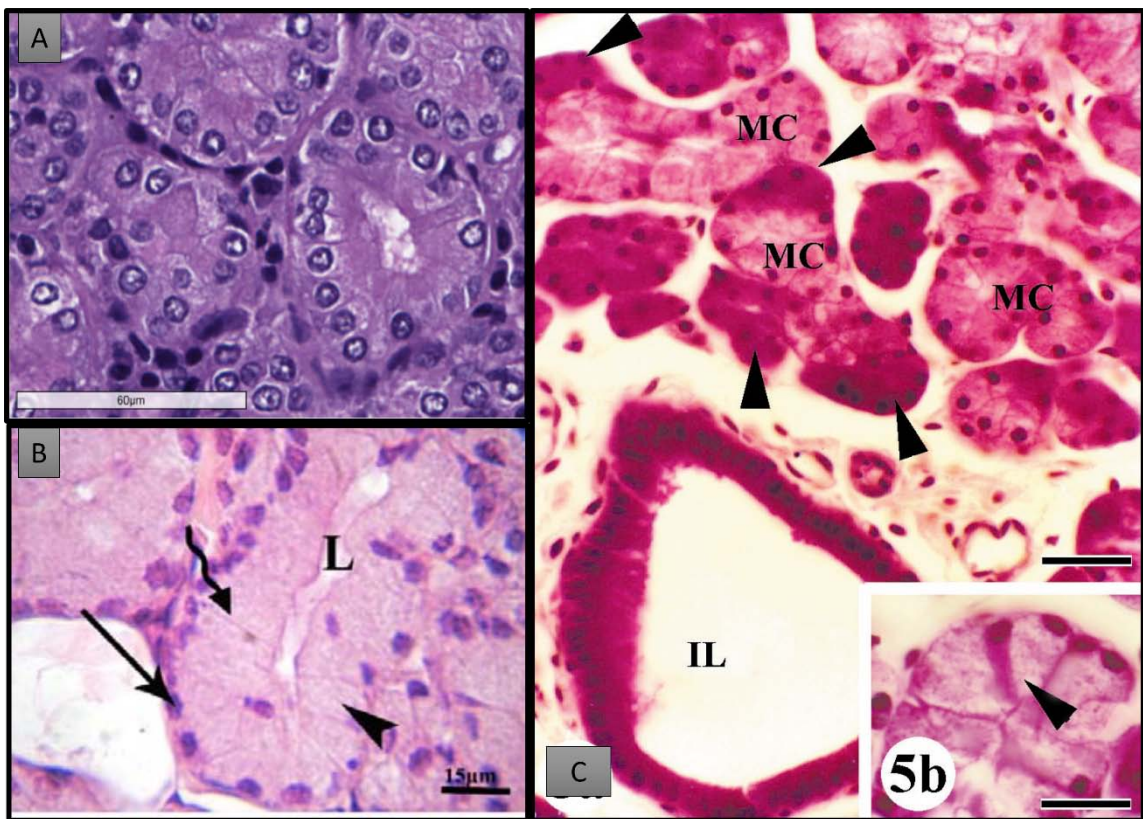


Figura 2.- Ácinos da glândula lacrimal. A) Humanos, mostrando células colunares com núcleo basal e lúmen estreito. Fonte: (SINGH; BASU, 2020). B) Glândula lacrimal do canino com conformação semelhante, demonstrando células colunares com lúmen central estreito. Fonte: (EL-NASEERY et al., 2016). C) glândula lacrimal do *Chaetophractus villosus* que apresenta PAS positivo, com produção mucosa (MC) e seromucosa (seta). Fonte: (HERNAN et al., 2002).

#### 2.1.4- A TERCEIRA PÁLPEBRA, GLÂNDULA SUPERFICIAL E PROFUNDA DA TERCEIRA PÁLPEBRA ( HARDERIANA).

Os mamíferos domésticos possuem três pálpebras. Além da pálpebra superior e a inferior, eles possuem uma terceira pálpebra conhecida como membrana nictitante ou prega semilunar da conjuntiva. Sua forma e constituição varia nas diferentes espécies, podendo ser triangular, como nos cavalos, em forma de folha como em ruminantes ou com forma de lua crescente em cães e gatos (BREHM; AMSELGRUBER, 2001; KAMALI; KHAKSAR; GHOLAMI, 2015). É formada por uma cartilagem que promove suporte e possui uma leve curvatura para se adaptar a

convexidade da córnea. Sua cartilagem apresenta forma que se assemelha a um “T” ou em algumas espécies se assemelha a uma âncora (SCHLEGEL; 2001).

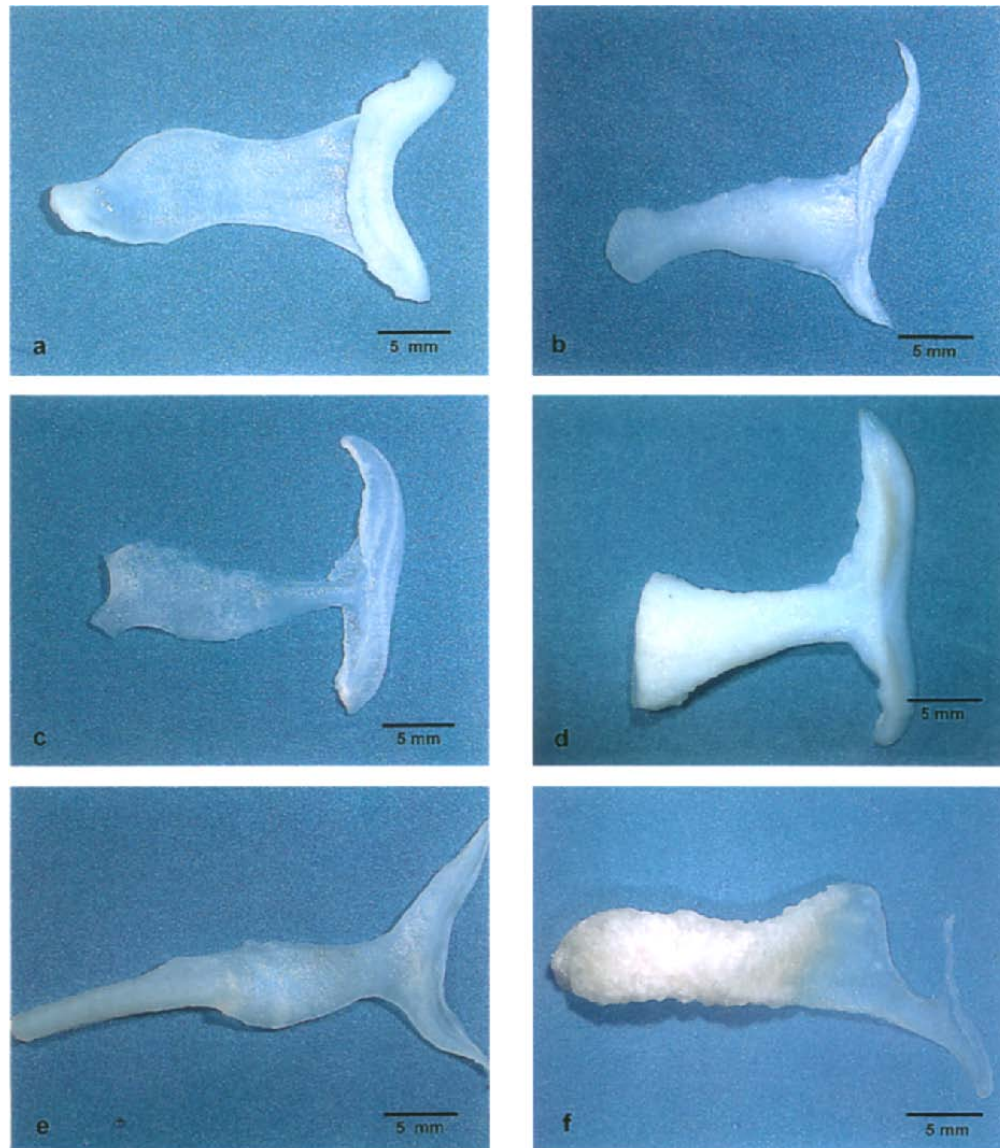


Figura 3. Forma da cartilagem da terceira pálpebra nas diferentes espécies de animais domésticos. a) Cão tem uma forma semelhante a uma nadadeira com uma base mais ampla. b) Gato tem forma que se assemelha a uma nadadeira. c) Suíno tem cartilagem em forma de âncora. d) bovino tem cartilagem em forma de âncora e) caprino tem uma forma semelhante a uma nadadeira com uma base mais ampla f) cavalo tem uma forma de anzol. ( Fonte: Schlegel, 2001)

A borda da terceira pálpebra é livre sendo pigmentada na maioria dos animais. O seu estroma é composto por tecido conjuntivo denso a frouxo que contém tecido linfóide e glandular. A base da cartilagem é circundada pela glândula

da terceira pálpebra. Em vários animais a terceira pálpebra apresenta duas porções da glândula, que se distingue em glândula superficial e glândula profunda da terceira pálpebra (glândula Harderiana). A glândula superficial é uma glândula lacrimal acessória, multilobular e tubulo-acinar com produção mista, seromucosa ou mucosa, variando conforme a espécie (PINARD et al., 2003; CABRAL et al., 2005; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015).

A glândula profunda da terceira pálpebra, também conhecida por glândula harderiana, é uma glândula que está localizada na região posterior do globo ocular na maioria dos vertebrados terrestres. Desde sua descoberta por Johann Jacob Harder em 1656, inúmeros estudos relataram a presença desta glândula, não apenas em mamíferos, mas também em anfíbios, répteis e aves. Ao longo dos anos atribuíam-lhe a função única de produção de lágrima. No entanto, estudos que se seguiram demonstraram que suas secreções são predominantemente lipídicas ao invés de serosas, como ocorre com as glândulas lacrimais. Segundo Sakai et al. (1981) as glândulas harderianas são glândulas oculares, tubuloalveolares que secretam lipídeos por um mecanismo merócrino. A ausência de glândula harderiana foi relatada em quiróptera ( morcegos), carnívora ( cães e gatos) perissodáctilos ( equinos) e primatas (humanos e não humanos) (SAKAI, 1981). Não se sabe se a ausência nestes animais se deve a um processo de seleção natural ou uma derivação genética.

Nos insetívoros as glândulas da terceira pálpebra são encontradas em porco-espinho e musaranhos e estão ausentes em toupeiras. Possuem uma glândula harderiana alongada e grande. Em lagomorfos e roedores é uma glândula bem desenvolvida apresentando tamanho maior que o globo ocular ( Figura 4). Mamíferos aquáticos, incluindo cetáceos, pinípedes e dugongos também possuem uma GH bem desenvolvida com múltiplos ductos excretores. Em aves a GH possui numerosas células plasmáticas e é considerado um órgão imunológico acessório.

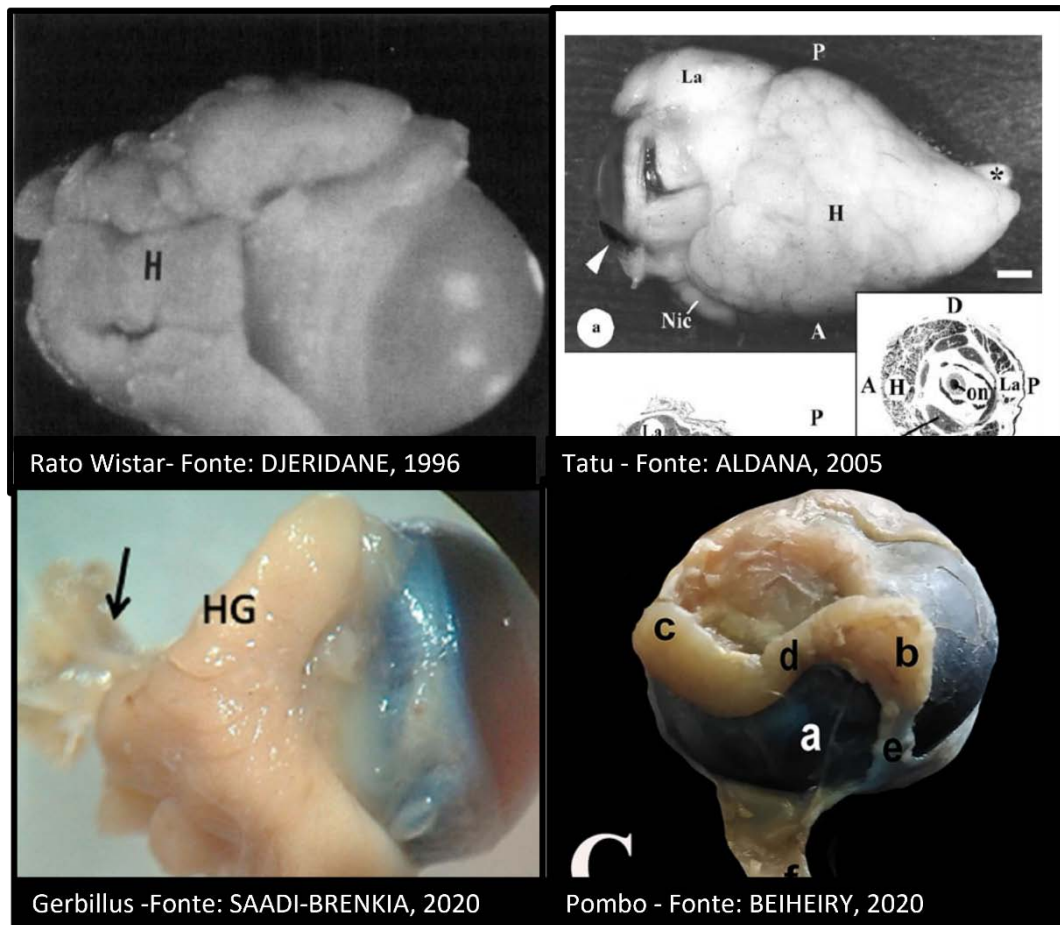


Figura 4. Glândula Harderiana em diferentes espécies.

A peculiaridade da GH está na natureza de sua secreção que varia consideravelmente entre as espécies. Entretanto, são mais comuns a produção de lipídeos e mucopolissacarídeos, encontrados em diferentes espécies, desde mamíferos até anfíbios. É sabido que seus componentes seromucosos tem função de lubrificação ocular enquanto seu produto lipídico pode ter função de feromônio (PAYNE, 1996) além de termorregulação (SHANAS E TERKEL, 1996). Nela também ocorre a produção de melatonina e porfirinas, estas foram amplamente estudadas em GH de roedores e acredita-se que possam atuar como foto transdutores que modulam a melatonina *in loco*, isto graças à capacidade das porfirinas de absorver luz UV. Assim sugeriu-se uma participação da GH no eixo retina-pineal. Outra função descoberta recentemente é a sua contribuição na síntese de hormônios esteróides. A distinção entre as GH e Glândula da terceira pálpebra foi introduzida por Sakai 1981 onde se baseou na natureza de sua secreção. No entanto esta distinção diz respeito unicamente a mamíferos, já que em vertebrados inferiores investigados notou-se secreção de glicoproteínas, e ausência na produção de lipídios

(MENENDEZ-PELAEZ; BUZZELL, 1992; PAYNE, 1994; BUZZELL, 1996; DJERIDANE, 1996; SANTILLO et al., 2020).

### 2.1.5 A CONJUNTIVA

A conjuntiva é uma fina membrana mucosa que cobre a face interna das pálpebras, percorre as faces internas e externas da membrana nictitante e em seguida repousa sob superfície do bulbo ocular até alcançar o limbo. Na união da conjuntiva palpebral com a conjuntiva bulbar há um fórnice (saco conjuntival). A conjuntiva promove uma superfície lisa para que as pálpebras deslizem sobre a córnea e tem importante papel de manutenção da homeostasia ocular, funcionando como barreira de proteção contra microrganismos (GIPSON, 2007). O epitélio é cilíndrico não-queratinizado e contém muitas células caliciformes (células globosas) produtoras de muco. A sua secreção contribui para a porção mucóide do filme lacrimal permitindo que a porção aquosa do filme lacrimal se espalhe sobre o epitélio corneano evitando o ressecamento. A substância própria possui uma camada superficial, glandular, onde se encontram agrupamentos de linfócitos que, quando são estimulados por antígenos, formam folículos ativos. Estes folículos estão presentes ao longo de toda a conjuntiva, podendo variar dependendo da espécie (SLATTER, 2005). Tecido linfóide semelhante ao encontrado na conjuntiva ocorre em outras mucosas como a intestinal sendo conhecida como tecido linfóide associado à mucosa (MALT). Na conjuntiva é denominado: tecido linfóide associado à conjuntiva (CALT – em inglês: Conjunctival Associated Lymphoid tissue) e atua como um nódulo linfático, sendo capaz de iniciar e regular uma resposta imune localmente, reagindo aos antígenos aos quais a superfície ocular é exposta (SLATTER, DOUGLAS, 2005).

## 2.1.6 - CÓRNEA

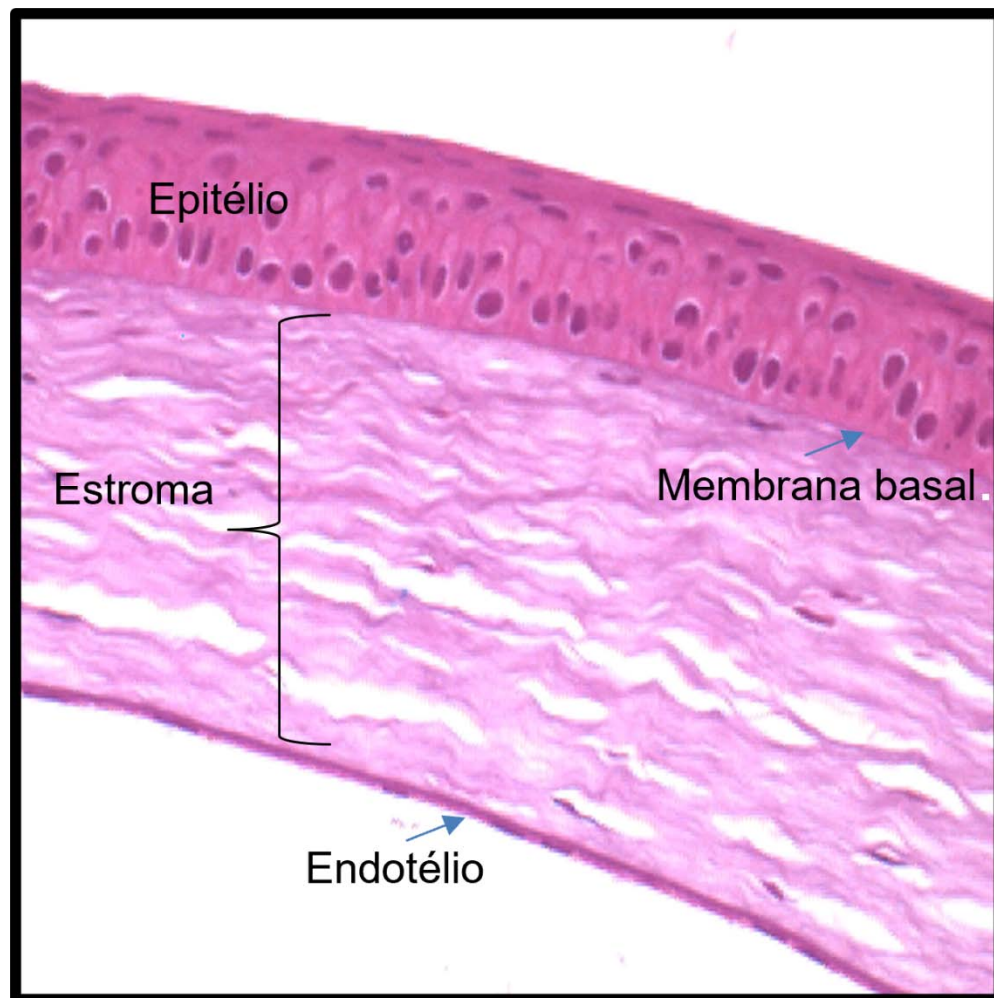


Figura 5 – Histologia da córnea do camundongo. HE 10x. ( Fonte: Arquivo pessoal 2010)

A córnea é a porção transparente e mais anterior da camada fibrosa do globo ocular. Sua transparência se deve ao fato de ser um tecido avascular com epitélio não queratinizado e não pigmentado, suas fibras nervosas são amielínicas e suas fibras de colágeno estão organizadas de forma paralela e regular. Possui forma convexa e em conjunto com o cristalino, converge os raios luminosos vindos do meio externo para um ponto focal na retina (SLATTER, DOUGLAS, 2005) Além destes fatores, o estado de transparência e deturgescência da córnea se deve a integridade funcional do endotélio corneano, a camada mais interna da córnea, que é responsável pelo bombeamento contínuo de líquidos intersticiais, e que mantém o estroma desidratado em um nível de 78% através das bombas de sódio e potássio, presentes nas membranas celulares endoteliais (LAVKER et al., 2020). Cada uma



das cinco camadas da córnea tem características e funções próprias. A superfície epitelial é protegida contra danos e patógenos pelo filme lacrimal, embora não visualizado no corte histológico, o filme lacrimal é considerado a camada mais externa da córnea. Possui uma porção externa e lipídica que evita a evaporação da camada intermediária que é aquosa. A porção interna do filme lacrimal é composta por mucina e fica em contato com o epitélio corneano. A função do filme lacrimal é de proteção e nutrição da córnea pelo fornecimento de oxigênio, lubrificação e remoção de débris e corpos estranhos e contém fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF) para promover regeneração epitelial. O epitélio da córnea é composto por 5 a 7 camadas de células epiteliais do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado. Com alta capacidade de regeneração as suas células poliédricas estão ancoradas a uma membrana basal subjacente. Essa membrana é composta por colágenos dos tipos IV, VII e XVIII, por hialuronato de sódio e por fibronectina, formando uma estrutura desprovida de células que confere rigidez e resistência à córnea. Estima-se que a renovação epitelial ocorra a cada 7-10 dias e é desempenhada tanto pelas células da camada basal quanto pelas células tronco epiteliais do limbo (MICHELACCI, 2003). O estroma corresponde a 90% da espessura da córnea, sendo composto por uma rede densa de fibras colágenas (Tipo I e V) que são produzidas pelos ceratócitos, estas células também produzem proteoglicanos e glicoproteínas da matriz extracelular. A membrana Descemet separa o estroma da camada endotelial, sendo composta basicamente por uma rede tridimensional de colágeno tipo VIII. É uma estrutura elástica e é considerada a camada basal do endotélio (MICHELACCI, 2003). O endotélio é a camada mais interna da córnea e fica em contato direto com o humor aquoso. É formado por uma monocamada de células hexagonais. Devido a forma em que as células estão dispostas é chamada também de mosaico endotelial. Suas células têm renovação lenta e escassa na córnea adulta, assim, quando ocorre a perda de uma célula dessa camada há o deslocamento e aumento do tamanho das células vizinhas para preencher a área lesionada (SLATTER, 2005) (Figura 5).

A córnea dos mamíferos é o tecido com maior inervação da superfície corporal. Além de sua função sensorial, promovem homeostasia do epitélio corneano pela liberação de neuropeptídeos tróficos que ativam os circuitos tronco encefálicos promovendo lacrimejamento reflexo e estímulo para piscar. Os nervos da córnea são amielínicos e se organizam em quatro camadas, aqueles localizados no

estroma, na área sub epitelial, sub basal e intraepitelial. Sendo que o plexo sub basal é o mais denso de todos e mais fácil de ser identificado (MARFURT et al., 2019). Sua arquitetura varia conforme a espécie, em primatas, cães, camundongo, rato e no porquinho da índia possui uma arquitetura em espiral centrípeta; nos coelhos e ruminantes possui arquitetura horizontal surgindo do limbo temporal e direcionando-se a região nasal e no suíno surge no eixo superior direcionando-se de forma centrípeta (MARFURT et al., 2019).

### 2.1.7 O LIMBO

O limbo é uma zona de transição anular, localizada entre a conjuntiva opaca e a córnea transparente. O epitélio do limbo possui aproximadamente 10 camadas celulares, melanócitos e células de Langerhans e assim como ocorre com o epitélio da córnea, o epitélio do limbo não possui células caliciformes (LAVKER et al., 2020). Possuem uma região com elevações radiais fibrovasculares, entrelaçada por vasos e nervos conhecida como Paliçadas de Vogt. (GOLDBERG; BRON, 1982) As paliçadas de Vogt foram inicialmente descritas por Goldberg em 1982, e foram identificadas no limbo de humanos. Outros estudos também revelaram sua presença no limbo de equinos, suínos e cães (Figura 6), estando ausente em gatos e camundongos (PATRUNO et al., 2017).

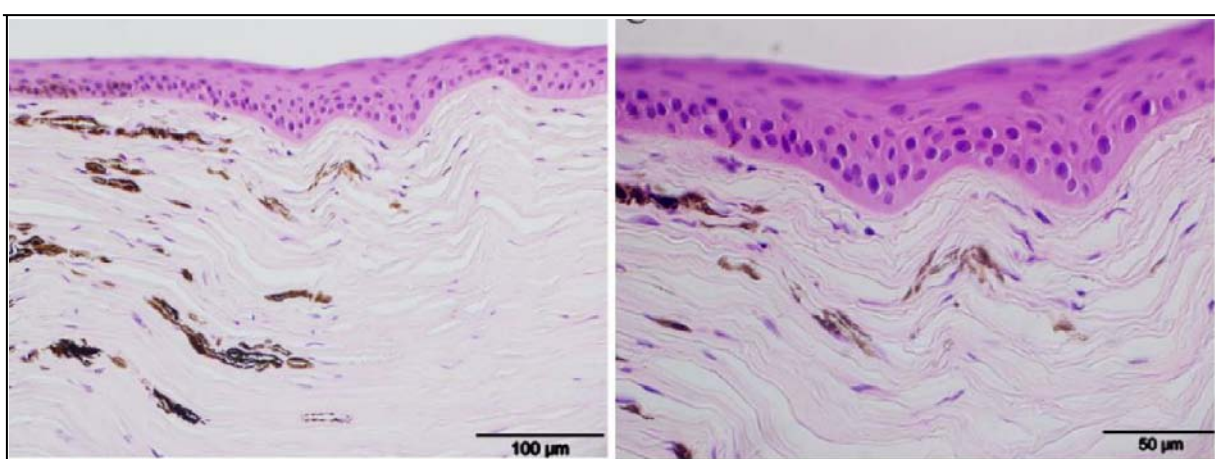


Figura 6. Paliçadas de Vogt no canino. (Fonte: Patrino 2017)

Schermer et. al. (1986) foi o primeiro a propor que células tronco do epitélio corneano estão localizados na região das paliçadas de Vogt, mais precisamente na

camada basal do limbo, denominando esse grupo de células de nicho celular. O nicho de células tronco do limbo é uma área de grande atividade, característica comum aos tecidos que precisam de regeneração contínua. Sua descrição como nicho celular se deve ao agrupamento de diferentes células nesta região, albergando diferentes populações de células que são responsáveis pela manutenção de um ambiente favorável às células tronco. O limbo possui densa vascularização, inervação, fibroblastos e melanócitos, entretanto, devido a sua complexidade e heterogeneidade ainda há muitas incógnitas sobre o papel e mecanismos destes nichos (SHANMUGANATHAN et al., 2007; OSEI-BEMPONG; FIGUEIREDO; LAKO, 2013). As células-tronco responsáveis pela regeneração da córnea são compostas por células pluripotentes e células amplificadoras transitórias (CAT). As células pluripotentes após a divisão celular inicial, mantém uma das células filha indiferenciada para recompor o arsenal celular original enquanto a outra célula filha torna-se uma célula amplificadora transitória (CAT) com capacidade mitótica e de diferenciação celular. As CAT irão sofrer vários estágios de mitose seguindo um processo de diferenciação ao longo do epitélio corneano que culmina em sua descamação (SCHERMER; GALVIN; SUN, 1986; CHEN et al., 2004; OSEI-BEMPONG; FIGUEIREDO; LAKO, 2013).

#### 2.1.8- O BICHO PREGUIÇA (*Bradypus variegatus*)

Os bichos-preguiça são mamíferos pertencentes à Superordem Xenarthra (Xenarthra, do grego xenos "estranho", e arthros "articulação"), assim como tamanduás e tatus. Estes animais apresentam articulações adicionais entre as vértebras lombares, característica que é denominada de xenarthra, esta particularidade ocorre também nos tatus e tamanduás, estando ausente nos demais mamíferos. As preguiças pertencem a ordem pilosa (junto com os tamanduás) e subordem folivora que se divide em duas famílias: a Bradypodidae, que contém as preguiças-de-três-dedos; e a Megalonychidae, com dois dedos. Na família Bradypodidae o gênero *Bradypus* abrange as espécies *Bradypus torquatus*, *Bradypus tridactylus* e *Bradypus variegatus* (GARDNER, 2008). O *B. variegatus* é popularmente conhecido como preguiça-comum, preguiça-marmota, preguiça-de-bentinho e preguiça-de-óculos; elas têm pelos longos, grossos e ondulados, apresentam manchas esbranquiçadas concentradas na parte dorsal próxima aos membros posteriores, têm coloração que varia do marrom-pálido ao

marrom-amarelado dando origem ao nome da sua espécie: “variegatus”, que se refere à variado, ou seja, com cores e tonalidades variadas (Figura 7). Os machos apresentam uma mancha dorsal com pelos curtos e macios, de coloração amarelo a laranja e manchas pretas com padrões variados entre os indivíduos, estando ausente nas fêmeas, o que caracteriza o dimorfismo sexual nesta espécie. As manchas aparecem em indivíduos jovens antes de entrar na maturidade sexual, entre 1-2 anos de idade, e as cores tornam-se mais intensas nos machos adultos em época reprodutiva (EMMONS; FEER, 1997; EISENBERG; REDFORD, 2000). As preguiças têm os pêlos da face mais curtos e na faixa suborbital apresentam cor mais clara, ressaltando uma faixa de cor negra que contorna os olhos, como uma máscara, e que se estende para baixo pelas laterais da face. Seus membros torácicos são cerca de 1,5 vezes mais longos que os pélvicos. Os dedos terminam em longas garras que auxiliam na locomoção pelas copas das árvores. Apresentam cauda curta com cerca de 5 cm.

A espécie está distribuída no sul de Honduras, passando pelos Andes no Equador e na Colômbia, seguindo até a Bolívia, norte da Argentina e Brasil (ANDERSON; HANDLEY, 2001; CASTRO VASQUEZ et al., 2010; MARTIN, 2015). No Brasil, é encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Pernambuco, Alagoas, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (GARDNER, 2008).

*Bradypus variegatus* Schinz, 1825, está entre as espécies afetadas por perturbações antrópicas (GLISTA et al., 2009). Encontra-se na Lista Vermelha da IUCN na categoria pouco preocupante (LC) (MEDEIROS, 210; MARTIN, 2015). As principais ameaças para espécie decorrem do alto grau de antropização pela expansão das metrópoles e cidades, com isto, estes animais perdem seus habitats, sendo forçados a viver e utilizar os recursos oferecidos pelos fragmentos de vegetação nas áreas urbanas. Ficam, desta forma, expostos a atropelamentos e a fios de alta tensão, que são utilizados pelos animais como apoio para se deslocarem, provocando choques, levando a queimaduras, amputações e óbito (XAVIER et al; 2010). Em Pernambuco, na Região Metropolitana do Recife, *B. variegatus* lidera a lista da mastofauna apreendida pelo CETAS/IBAMA (AMORA, 2010; XAVIER, et al. 2010) e pelo Corpo de Bombeiro Militar. A estrada de aldeia (PE-27), que percorre os municípios de Camaragibe, Paudalho, margeando o município do Paulista, Abreu e Lima até Araçoiaba é a região de onde mais *B. variegatus* são recolhidos (AMORA, 2010; DUQUE et al., 2012).



Figura 7- Fotografia de Bicho-Preguiça (*Bradypus variegatus*).

O *B.variegatus* é um mamífero folívoro neotropical e tem o metabolismo mais lento entre os mamíferos que conhecemos. Estes animais possuem um conjunto de adaptações associadas a este metabolismo extremamente baixo, sendo estas de origem anatômicas, fisiológicas e comportamentais que estão ligadas a conservação de energia e a digestão de alimentos fibrosos e pouco nutritivos ( SUNQUIST & MONTGOMERY, 1973; NAGY & MONTGOMERY, 1980; FOLEY et al. 1995; PAULI et al. 2016). Possuem taxa metabólica que se encontra entre 40 a 60% daquelas esperadas em relação a massa muscular; possuem temperatura corporal baixa quando comparados a outros mamíferos, podendo variar de 32,7°C a 35,5°C. Sua alimentação é composta principalmente por folhas de embaúba (*Cecropia* sp.) que possuem um baixo conteúdo energético e um certo grau de toxicidade, requerendo longos períodos para digestão (GILMORE, 2000).

Estudos indicam que o gênero *bradypus* pode ter cerca de vinte milhões de anos, e portanto possuem um conjunto adaptativo de mamíferos placentários ancestrais

(GAUDIN & CROFT, 2015). A espécie possui particularidades anatômicas que permite sua adaptação a variações de altitude e temperatura sendo encontradas a partir do nível do mar até pelo menos 2.400m de altitude (UREÑA et al. 1986; CLIFFE, R.N. 2018) e sua extensão de ocorrência equivale a mais de seis milhões de km<sup>2</sup> sendo a sua área de ocupação é maior que 2.000 km<sup>2</sup> (SUPERINA et al. 2010). Por exemplo, preguiças não possuem artérias braquial e ilíaca em seus membros, estes são vascularizados por plexos arteriovenosos, dispostos em feixes vasculares conhecidos como rete mirabile ou rede maravilhosa (GOFFART, 1971). Está composto por um conjunto de vasos e artérias entrelaçados onde o sangue venoso e o sangue arterial circulam em sentidos opostos, criando assim um sistema de contracorrente. Acredita-se que esta rede representa um mecanismo interno de conservação de calor ou atua como um sistema facilitador do retorno de sangue para o coração (SCHOLANGE e CROG, 1957).

#### 2.1.8 ESTUDOS COM O OLHO DO BICHO PREGUIÇA

Estudos relacionados a visão do bicho-preguiça demonstram que estes animais apresentam características de baixa acuidade visual, tais como: ausência do músculo ciliar (sugerindo incapacidade de acomodação), ausência de mácula, escassez de células ganglionares e das fibras nervosas do disco óptico (GOFFART, 1971). Estudos também demonstraram que o músculo dilatador da pupila é pouco desenvolvido, enquanto o músculo esfíncter da pupila é bem desenvolvido. Suas pupilas são de diâmetro reduzido ainda em condições de baixa luminosidade e os reflexos pupilares são lentos; com esses resultados os autores concluíram que as preguiças possuem olhos adaptados principalmente para visão em baixas intensidades de luz. Relataram também que a distribuição vascular da retina é pseudoangiótica, isto é, avascular, com uma zona estreita de vasos sanguíneos dispostos radialmente em torno do disco óptico (GOFFART, 1971).

Os olhos da preguiça têm cerca de 30mm de distância entre eles e tem posição frontal, são de tamanho moderado e possuem uma córnea convexa, é quase circular com dimensões de 8,4mm axial e 8,3 mm no equador. O ângulo entre a eixos ópticos divergentes de cada olho foi estimado 50° e os campos visuais binoculares foram calculados a 70° com uma sobreposição binocular de 35° (MENDEL; PIGGINS; FISH, 1985). Andrade-da-Costa et al. (1987), examinaram

montagens globais da retina de *Choloepus hoffmanni* e *Bradypus variegatus* para um análise quantitativa da distribuição topográfica e observaram que o tamanho das células ganglionares aumentavam em densidade gradualmente à medida que se aproximavam da periferia. Assim a área central da retina continha células ganglionares pequenas em maior quantidade do que na área periférica, onde predominavam células grandes (COSTA et al., 1987). Em estudo ocular do *Bradypus variegatus* conduzido por Braz et al. (2020), os olhos da preguiça apresentam formato cilíndrico com comprimento axial médio de  $7,5 \pm 1,29$ mm estando totalmente inserido na órbita corroborando com estudo realizado por Mendel, Piggins, Muntz (1985) onde observaram que o bicho-preguiça possui uma câmara anterior rasa quando comparada ao comprimento axial do globo ocular e possui uma lente que ocupa cerca de 40% do volume ocular. Segundo os autores, esta característica da lente, que ocupa grande espaço do globo, com aproximação da câmara anterior à córnea e aproximação da lente ao segmento posterior, compensa a ausência de músculo ciliar, ausência de mácula e a retina pobre em células ganglionares e com poucos cones. Na retina e na coróide não foram evidenciados vasos sanguíneos macroscopicamente (BRAZ et al., 2020). Em estudo do olho do bicho preguiça (*Bradypus variegatus*) desenvolvido por Senna et al (2022), aferiu-se a produção lacrimal através do teste Schirmer e obtiveram o valor de 04 mm/min no bulbo ocular direito e 05 mm/min no esquerdo. A pressão intraocular apresentou valores com média de 13 mmHg no bulbo ocular direito e 08 mmHg no esquerdo. Em estudos histológicos foram identificados tecido cartilaginoso e glandular de 3ª pálpebra, assim como uma grande camada de tecido de glândulas lacrimais, ausência de tarso e glândulas meibomianas (SENA et al., 2022).

## REFERÊNCIAS

ALDANA MARCOS, H. J.; AFFANNI, J. M. Anatomy, histology, histochemistry and fine structure of the Harderian gland in the South American armadillo *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia). **Anatomy and Embryology**, v. 209, n. 5, p. 409–424, 1 jun. 2005.

ALVARES, E. et al. IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS APLICADOS DE ANATOMIA ANIMAL PARA A PRESERVAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES. p. 5, 2015.

ANDERSON, R.; HANDLEY, C. A new species of three-toed sloth (Mammalia: Xenarthra) from Panamá, with a review of the genus *Bradypus*. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 114, p. 1–33, 19 abr. 2001.

AMORA, T.D. Perfil de distribuição e ameaças à preguiça-comum (*Bradypus variegatus*, Schinz, 1825) registradas pelo CETAS/IBAMA/PE. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 50p, 2010.

BARROSO, P.; ACEVEDO, P.; VICENTE, J. The importance of long-term studies on wildlife diseases and their interfaces with humans and domestic animals: A review. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 00, n. n/a, p. 1–15, 7 nov. 2020.

BRAZ, R. S. et al. Macroscopic morphological aspects, ecometry and rebound tonometry of the eye bulb in sloth (*Bradypus variegatus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 707–716, set. 2020.

CABRAL, V. P. et al. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands' macroscopic and morphometric characteristics. **Ciência Rural**, v. 35, p. 391–397, abr. 2005.

CASTRO-VÁSQUEZ, MEZA, M, PLESE, T.; MORENO-MORA, S. Activity patterns, preference and use of floristic resources by *Bradypus variegatus* in a tropical dry forest fragment, Santa Catalina, Bolívar, Colombia. **Edentata**, v. 11, n. 1, p. 62-69, 2010. <https://doi.org/10.1896/020.011.0111>



CHEN, Z. et al. Characterization of Putative Stem Cell Phenotype in Human Limbal Epithelia. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 22, n. 3, p. 355–366, 2004.

CLIFFE, R.N.; SCANTLEBURY, D.M.; KENNEDY, S.J. ; AVEY-ARROYO, J.; MINDICH, D.; WILSON, R.P. The metabolic response of the Bradypus sloth to temperature. **PeerJ**, 6, e5600. 2018

COSTA, B. L. et al. Unusual distribution of ganglion cells in the retina of the three-toed sloth (*Bradypus variegatus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 20, n. 6, p. 741–748, 1987.

DING, C. et al. Not All Lacrimal Epithelial Cells are Created Equal—Heterogeneity of the Rabbit Lacrimal Gland and Differential Secretion. **Current Eye Research**, v. 36, n. 11, p. 971–978, 1 nov. 2011.

DJERIDANE, Y. Comparative histological and ultrastructural studies of the Harderian gland of rodents. **Microscopy research and technique**, v. 34, n. 1, p. 28–38, 1 maio 1996.

DUQUE, P.R.; FONSECA, F.S., VALENÇA, Y.M.; FONSECA, C.F. & XAVIER, G.A.A. Ocorrências de acidentes por choques elétricos em preguiça-comum *Bradypus variegatus* (Pilosa: Bradypodidae) no Município de Camaragibe, Pernambuco. Pp. 106-108. In: XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. Anais do... **ABRAVAS**. 2012

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics, Volume 3: Ecuador, Bolivia, Brazil**. 1a edição ed. Chicago: University of Chicago Press, 2000.

EMMONS, L.; FEER, F. **Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide**. Second edição ed. Chicago: University of Chicago Press, 1997.

FOLEY, W.J., ENGELHARDT, W. V., CHARLES-DOMINIQUE, P. The passage of digesta, particle size, and in vitro fermentation rate in the three-toed sloth *Bradypus*

tridactylus (Edentata: Bradypodidae). **J. Zool.** 236(4): 681–696. doi:10.1111/j.1469-7998.1995.tb02739.x. 1995

GARDNER, A. L. **Mammals of South America, Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats.** [s.l.] University of Chicago Press, 2008.

GAUDIN, T.J., and CROFT, D.A.. Paleogene xenarthra and the evolution of South American Mammals. **J. Mammal.** 96(4): 622–634. doi:10.1093/jmammal/gyv073 2015

GELATT, K. N. **Essentials of veterinary ophthalmology.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

GIPSON, I. K. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 48, n. 10, p. 4390–4398, out. 2007.

GLISTA, D. J.; DEVAULT, T. L.; DEWOODY, J. A. A review of mitigation measures for reducing wildlife mortality on roadways. *Landscape and Urban Planning*, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2009.

GOFFART, M. **Function and Form in the Sloth.** [s.l.] Elsevier Science & Technology, 1971.

GOLDBERG, M. F.; BRON, A. J. Limbal palisades of Vogt. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 80, p. 155–171, 1982.

HARPER, J. Y.; SAMUELSON, D. A.; REEP, R. L. Corneal vascularization in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and three-dimensional reconstruction of vessels. **Veterinary ophthalmology**, v. 8, n. 2, p. 89–99, 1 mar. 2005.

HAYSEN, V. *Bradypus variegatus* (Pilosa: Bradypodidae). **Mammalian Species**, v. 42, n. 850, p. 19–32, 25 jan. 2010.

JEAN CARLOS RAMOS SILVA. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. 2. ed. [s.l.] Roca, 2014. v. 1

KAMALI, Y.; KHAKSAR, Z.; GHOLAMI, S. Third eyelid in the small Indian mongoose (*Herpestes javanicus*): a morphological and histological study. **Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia**, v. 120, n. 3, p. 144–149, 1 jan. 2015.

KLEĆKOWSKA-NAWROT, J. et al. Histological, histochemical and fine structure studies of the lacrimal gland and superficial gland of the third eyelid and their significance on the proper function of the eyeball in alpaca (*Vicugna pacos*). **Folia morphologica**, v. 74, p. 195–205, 28 maio 2015.

LAVKER, R. M. et al. Corneal epithelial biology: Lessons stemming from old to new. **Experimental Eye Research**, v. 198, p. 108094, 1 set. 2020.

MARFURT, C. et al. Comparative Anatomy of the Mammalian Corneal Subbasal Nerve Plexus. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 60, n. 15, p. 4972–4984, 2 dez. 2019.

MARTIN, A. Behavior of *Bradypus variegatus* in an urban area (UFPB Campus, João Pessoa, Brazil). Paris: Université Paris 13 - UFR Lettres, Sciences de l'Homme et des Sociétés, 2015.

MARTIN, L. F. Retrospective study on the species distribution and common diseases in exotic pets presented to the Clinic for Zoo Animals, Exotic Pets and Wildlife, University of Zurich from 2005 to 2014. 2018.

MEDEIROS, S. T. A. Proposta para implantação de estruturas para a conexão ecológica entre os fragmentos florestais do Campus I da UFPB e do seu entorno. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2010.

MENDEL, F. C.; PIGGINS, D.; FISH, D. R. Vision of Two-Toed Sloths (*Choloepus*). **Journal of Mammalogy**, v. 66, n. 1, p. 197–200, 1985.

MENENDEZ-PELAEZ, A.; BUZZELL, G. R. Harderian Gland Indoles. In: WEBB, S. M. et al. (Eds.). . **Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1992. p. 219–234.

MICHELACCI, Y. M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 8, p. 1037–1046, ago. 2003.

NAGY, K.A., MONTGOMERY, G.G. Field Metabolic Rate, Water Flux, and Food Consumption in Three-Toed Sloths (*Bradypus variegatus*). **J. Mammal.** 61(3): 465–472. .1980. doi:10.2307/1379840

OBATA, H. Anatomy and Histopathology of the Human Lacrimal Gland. **Cornea**, v. 25, p. S82, dez. 2006.

OSEI-BEMPONG, C.; FIGUEIREDO, F. C.; LAKO, M. The limbal epithelium of the eye – A review of limbal stem cell biology, disease and treatment. **BioEssays**, v. 35, n. 3, p. 211–219, 2013.

PATRUNO, M. et al. Morphological description of limbal epithelium: searching for stem cells crypts in the dog, cat, pig, cow, sheep and horse. **Veterinary Research Communications**, v. 41, n. 2, p. 169–173, 1 jun. 2017.

PAULI, J.N., PEERY, M.Z., FOUNTAIN, E.D., KARASOV, W.H. Arboreal Folivores Limit Their Energetic Output, All the Way to Slothfulness. **Am. Nat.** 188(2): 196–204, 2016. doi:10.1086/687032.

PAYNE, A. P. The harderian gland: a tercentennial review. **Journal of Anatomy**, v. 185, n. Pt 1, p. 1–49, ago. 1994.

PINARD, C. L. et al. Normal Anatomical and Histochemical Characteristics of the Lacrimal Glands in the American Bison and Cattle. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, n. 5, 2003.

REHOREK, S. J. et al. Whale tear glands in the bowhead and the beluga whales: Source and function. **Journal of Morphology**, v. 281, n. 3, p. 316–325, 2020.

SANTILLO, A. et al. The Harderian gland: Endocrine function and hormonal control. **General and Comparative Endocrinology**, v. 297, p. 113548, 1 out. 2020.

SCHERMER, A.; GALVIN, S.; SUN, T. T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. **Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 1, p. 49–62, 1 jul. 1986.

SCHLEGEL, T.; BREHM, H.; AMSELGRUBER, W. M. The cartilage of the third eyelid: A comparative macroscopical and histological study in domestic animals. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 183, n. 2, p. 165–169, 1 mar. 2001.

SENA, C. DA S. P. DE et al. Ocular microscopy of *Bradypus variegatus*. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 51, n. 1, p. 85–90, 2022.

SHANMUGANATHAN, V. et al. Morphological characteristics of the limbal epithelial crypt. **The British journal of ophthalmology**, v. 91, p. 514–9, 1 abr. 2007.

SLATTER, DOUGLAS. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005.

STOECKELHUBER, M.; STOECKELHUBER, B. M.; WELSCH, U. Apocrine Glands in the Eyelid of Primates Contribute to the Ocular Host Defense. **Cells Tissues Organs**, v. 176, n. 4, p. 187–194, 2004.

SUPERINA, M.; PLESE, T.; MORAES-BARROS, M. & Abba, A.M. The 2010 Slot Red List Assessment. **Edentata**, 11(2): 115-134.2010.

SUNQUIST, A.M.E., MONTGOMERY, G.G. Activity Patterns and Rates of Movement of Two-Toed and Three-Toed Sloths (*Choloepus hoffmanni* and *Bradypus infuscatus*). *J. Mammal.* 54(4): 946–954, 1973. doi:<https://doi.org/10.2307/1379088>.

THOFT, R. A.; FRIEND, J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. ***Investigative Ophthalmology & Visual Science***, v. 16, n. 1, p. 14–20, 1 jan. 1977.

UREÑA, H.M.; Chacón, C.R.; Faerrón, A.S. & Lizano, S.T. Hallazgo de *Bradypus griseus* y *Choloepus hoffmanni* (Edentata: Bradypodidae) en tierras altas de Costa Rica. ***Revista Biología Tropical***, 34: 165-166. 1986.

WONG, M. A. et al. PERIOcular ANTERIOR ADNEXAL ANATOMY AND CLINICAL ADNEXAL EXAMINATION OF THE ADULT ASIAN ELEPHANT (*ELEPHAS MAXIMUS*). ***Journal of Zoo and Wildlife Medicine***, v. 43, n. 4, p. 793–801, dez. 2012.

XAVIER, G.A.A.; AMORA, T.D.; VALENÇA, Y.M. & CABRAL, M.C.C. Apeensões de preguiças *Bradypus variegatus* SCHINZ, 1825 e casos de acidentes com choques elétricos envolvendo estes animais na Mesorregião Metropolitana do Recife, Pernambuco. Pp. 301-308. In: Seabra, G.F.; Silva, J.A.N. da & Mendonça, I.T.L. (org.). *A conferência da Terra: aquecimento global, sociedade e biodiversidade*. Vol. I. **Editora Universitária da UFPB**, João Pessoa.2010a.

YASUI, T. et al. Morphological and histochemical characterization of the secretory epithelium in the canine lacrimal gland. ***European Journal of Histochemistry : EJH***, v. 65, n. 4, p. 3320, 2 nov. 2021.

### 3 CAPÍTULO II

#### 3.1 Artigo I –

Histologia e histoquímica da glândula lacrimal e da terceira pálpebra do *Bradypus variegatus*.

Histology and histochemistry of the lacrimal and nictitans gland of the *Bradypus variegatus*.

#### RESUMO

As pálpebras, glândulas lacrimais, glândulas superficiais e profundas da terceira pálpebra, glândulas meibomianas, assim como a conjuntiva e córnea estão ligados funcionalmente para manutenção e proteção do olho. As estruturas responsáveis pela produção lacrimal possuem grande diversidade entre os animais, e ainda temos conhecimento limitado sobre estas diferenças e seu papel na homeostasia da superfície ocular. O objetivo deste estudo foi identificar e descrever histologicamente e histoquimicamente as pálpebras, glândulas lacrimal e glândulas profunda e superficial da terceira pálpebra. O presente estudo revelou que estes animais não têm tarso, glândulas tarsais e cílios. Possuem glândulas sebáceas bem desenvolvidas associadas à pêlos acessórios ao longo das pálpebras. A face interna das pálpebras apresenta a conjuntiva palpebral com um epitélio estratificado e com células caliciformes. No estroma profundo de ambas as pálpebras foram observadas glândulas lacrimais acessórias mistas. A glândula lacrimal está situada no ângulo dorsolateral da órbita, é do tipo túbulo-alveolar. A terceira pálpebra projeta-se do canto medial sobre a superfície anterior do globo e sua cartilagem se assemelha a uma âncora. Macroscopicamente e em exame histológico observou-se tecido glandular superficial e profundo (harderiano). É túbulo-alveolar, com uma única camada ou células colunares, escamosas não queratinizadas.

**Palavra-chave:** Bicho-preguiça, superfície ocular, glândula lacrimal, glândula harderiana, terceira pálpebra.

#### ABSTRACT

The eyelids, lacrimal glands, superficial and deep glands of the third eyelid, meibomian glands, as well as the conjunctiva and cornea are functionally linked for maintenance and protection of the eye. The structures responsible for lacrimal production have great diversity among animals, and we still have limited knowledge about these differences and their role in homeostasis of the ocular surface. The objective of this study was to identify and describe histologically and histochemically the eyelids, lacrimal glands, and deep and superficial glands of the third eyelid. The present study revealed that these animals lack tarsal glands and eyelashes. They have well-developed sebaceous glands associated with accessory hairs along the eyelids. The inner surface of the eyelids (palpebral conjunctiva) has a stratified epithelium and goblet cells. Accessory lacrimal glands were observed in the deep stroma of both eyelids. The lacrimal gland is situated in the dorsolateral angle of the orbit and is of the tubulo-alveolar type. The third eyelid projects from the medial corner onto the anterior surface of the globe and its cartilage resembles an anchor. Macroscopically and in histological examination, superficial and deep glandular (harderian) tissue was observed. It is tubulo-alveolar, with a single layer or columnar cells of non-keratinized squamous cells.

**Key words:** Three toed sloth, ocular surface, lacrimal gland, harderian gland, third eyelid.

## INTRODUÇÃO

A superfície ocular está constantemente exposta ao meio ambiente e, portanto, é vulnerável ao ressecamento, a lesões e patógenos. As pálpebras, glândulas lacrimais, glândulas superficiais e profundas da terceira pálpebra, glândulas meibomianas, assim como a conjuntiva e córnea estão ligados funcionalmente para manutenção e proteção do olho. Todos estes elementos trabalham de forma sinérgica para manter a saúde e transparência da principal superfície de refração ocular: a córnea. A glândula da membrana nictitante, a glândula lacrimal e a glândula harderiana (presente em algumas espécies, e, também denominada glândula profunda da terceira pálpebra) juntos com as glândulas meibomianas (ausente em algumas espécies), são responsáveis pela produção do filme lacrimal através de secreções serosas, mucosas ou seromucosas. O filme lacrimal é composto por três camadas, a maior camada, a parte aquosa é produzida pela glândula lacrimal e glândula superficial da terceira pálpebra na maioria das espécies.

A glândula lacrimal de seres humanos, cães, gatos, cavalos, suínos, coelhos, ovelhas, caprinos, porquinho da índia e do elefante foram descritas e possuem forma túbulo-alveolar produzindo uma secreção seromucosa que forma a porção aquosa do filme lacrimal. Na maioria das espécies a glândula lacrimal é responsável pela maior parte do filme lacrimal. O tecido conjuntivo intersticial contém linfócitos, células plasmáticas, fibroblastos, vasos sanguíneos e fibras nervosas. As células plasmáticas secretam IgA anticorpos necessários para a imunidade da mucosa na superfície ocular (CABRAL et al., 2005; OBATA, 2006; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015; PINARD et al., 2003; YASUI et al., 2021). A glândula profunda da terceira pálpebra está localizada na órbita, podendo ser tubular ou túbulo-alveolar e seu ducto desemboca na superfície da terceira pálpebra. Os ductos são formados por uma única camada de células epiteliais colunares circundadas por células mioepiteliais. As suas células epiteliais possuem grânulos ou vacúolos cujo conteúdo pode ser mucoso, seroso ou lipídico. Nem todos os animais apresentam a glândula profunda da terceira pálpebra (GPT); carnívoros como cães e gatos, primatas incluindo humanos por exemplo, não possuem esta glândula, não foi descrita nos peixes nem nos urodelos, mas está presente em crocodilos e cetáceos. Esta glândula está bem desenvolvida em camundongos, em coelhos e no tatu ocupando



grande parte da órbita (PAYNE, 1994; DJERIDANE, 1996; AFFANNI, 2005). As funções atribuídas a GPt são muitas e diversas. Entre as funções descritas, é considerado um sítio de resposta imunológica, fonte de termorregulação, produção de lipídios, fonte de feromônios e fotoproteção. As GPt secretam várias substâncias no saco conjuntival, como substâncias bactericidas e fatores de crescimento, além de auxiliar também na lubrificação da córnea (MENENDEZ-PELAEZ; BUZZELL, 1992).

Com morfologia e especialização ecológica bastante distintas, a superordem Xenarthra inclui os tatus (*Cingulata*), os tamanduás (*Vermilingua*) e as preguiças (*Pilosa*). Os olhos dos bicho preguiça estão sempre em risco, estando expostos à ação perigosa de insetos e galhos de plantas, uma vez que estes animais se alimentam e copas de árvores se alimentando principalmente de imbaúbas, planta que contém uma grande quantidade de formigas (HAYSSEN, 2010).

As estruturas responsáveis pela produção lacrimal possuem grande diversidade entre os animais, e ainda temos conhecimento limitado sobre estas diferenças e seu papel na homeostasia da superfície ocular. O objetivo deste estudo foi identificar e descrever histologicamente e histoquimicamente a superfície ocular do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*), com ênfase nas glândulas lacrimal, glândulas profunda e superficial da terceira pálpebra.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

A pesquisa foi delineada de acordo as normas internacionais da ARVO – Association for Research in Vision and Ophthalmology, com registro no Sisgen e licença pelo ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, com o seguinte número de registro no SISBIO – Sistema de Autorização e informação em biodiversidade: SISBIO.

Para o desenvolvimento do estudo, foram utilizados olhos enucleados de animais encaminhados ao CETAS (30 olhos de 15 animais) que vieram a óbito por motivos não relacionados a esta pesquisa. Para o estudo macroscópico foram utilizados 12 olhos, onde foram realizadas medidas de comprimento da fenda palpebral e diâmetros horizontais e verticais da córnea com auxílio de paquímetro e dissecados para visualização e descrição topográfica das glândulas lacrimais.

Os demais olhos (18 olhos) foram fixados em meio Davidson e encaminhados ao Laboratório de Oftalmologia Experimental (LOE) da UFRPE para processamento pela técnica histológica rotineira de inclusão em parafina (BEHMER et al., 2003). Os blocos elaborados foram cortados em micrótomo com espessura de 5 (micrômetro). As lâminas histológicas produzidas foram coradas por Hematoxilina – Eosina, tricômico de Masson, azul de alcian, Ácido Periódico de Schiff (PAS) (REHOREK et al., 2020; YASUI et al., 2021) e analisadas em microscópio óptico.

## **RESULTADOS**

As pálpebras inferior e superior do Bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) consiste numa superfície externa coberta por pele composta por um epitélio estratificado queratinizado com 3 a 5 camadas celulares. A camada basal possui inúmeros melanócitos dispersos. Na face interna a pálpebra está coberta por uma membrana mucosa (conjuntiva) composta por um epitélio colunar pseudoestratificado com presença de inúmeras células caliciformes marcadas fortemente pelo PAS (Figura 1). A conjuntiva recobre a pálpebra desde sua margem (zona marginal) seguindo até a porção bulbar (zona orbital) formando um fórnix que recobre a superfície bulbar até se inserir na região do limbo.

A conjuntiva na região marginal apresenta epitélio colunar não queratinizado com grande quantidade de células caliciformes que marcam PAS positivo (Figura 1C)

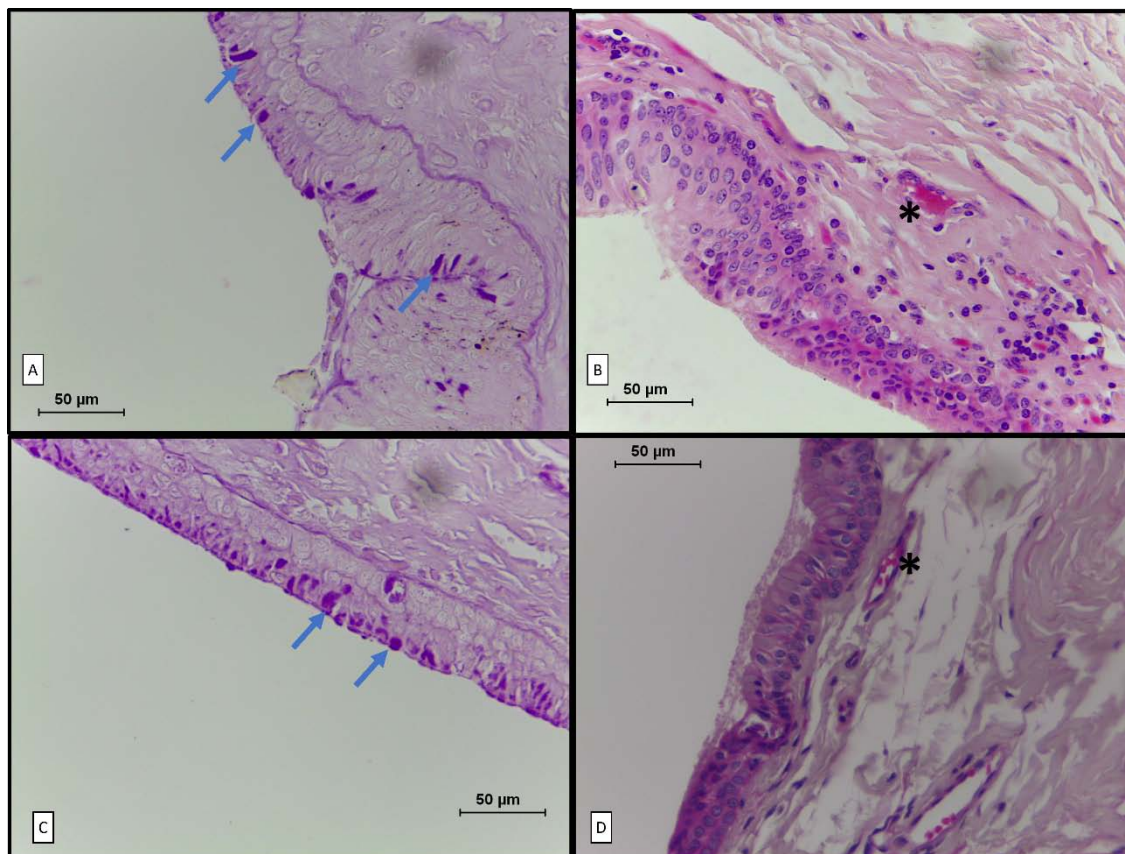


Figura 1- Conjuntiva palpebral do Bicho preguiça. A) Conjuntiva palpebral demonstrando um epitélio colunar pseudoestratificado com inúmeras células caliciformes PAS positivas. B) Conjuntiva palpebral demonstrando epitélio colunar pseudoestratificado com tecido linfóide difuso e vasos. C) Conjuntiva palpebral marginal demonstrando epitélio colunar com 2 a 3 camadas celulares demonstrando em seta azul células caliciformes PAS positivo. D) Conjuntiva palpebral marginal apresentando epitélio colunar com 2 a 3 camadas celulares e tecido conjuntivo com grandes vasos (asteriscos).

Histologicamente os cílios e tarso, assim como as glândulas meibomianas normalmente associadas aos cílios estão ausentes em todos os animais avaliados. Adjacente ao folículo piloso estão presentes 2 a 3 grupos de glândulas sebáceas bem desenvolvidas que se encontram ramificadas com 2 ou 3 sistemas de ductos desembocando no folículo piloso (Figura 2). Inúmeras glândulas sudoríparas (glândulas ciliares) encontram-se localizadas abaixo dos folículos pilosos formando agregados separados em 2 a 5 lóbulos. Uma camada de feixes musculares (músculo elevador da pálpebra) está localizado abaixo dos folículos pilosos, na porção intermediária da pálpebra e envolvido por tecido conjuntivo com rede de fibras de colágeno.

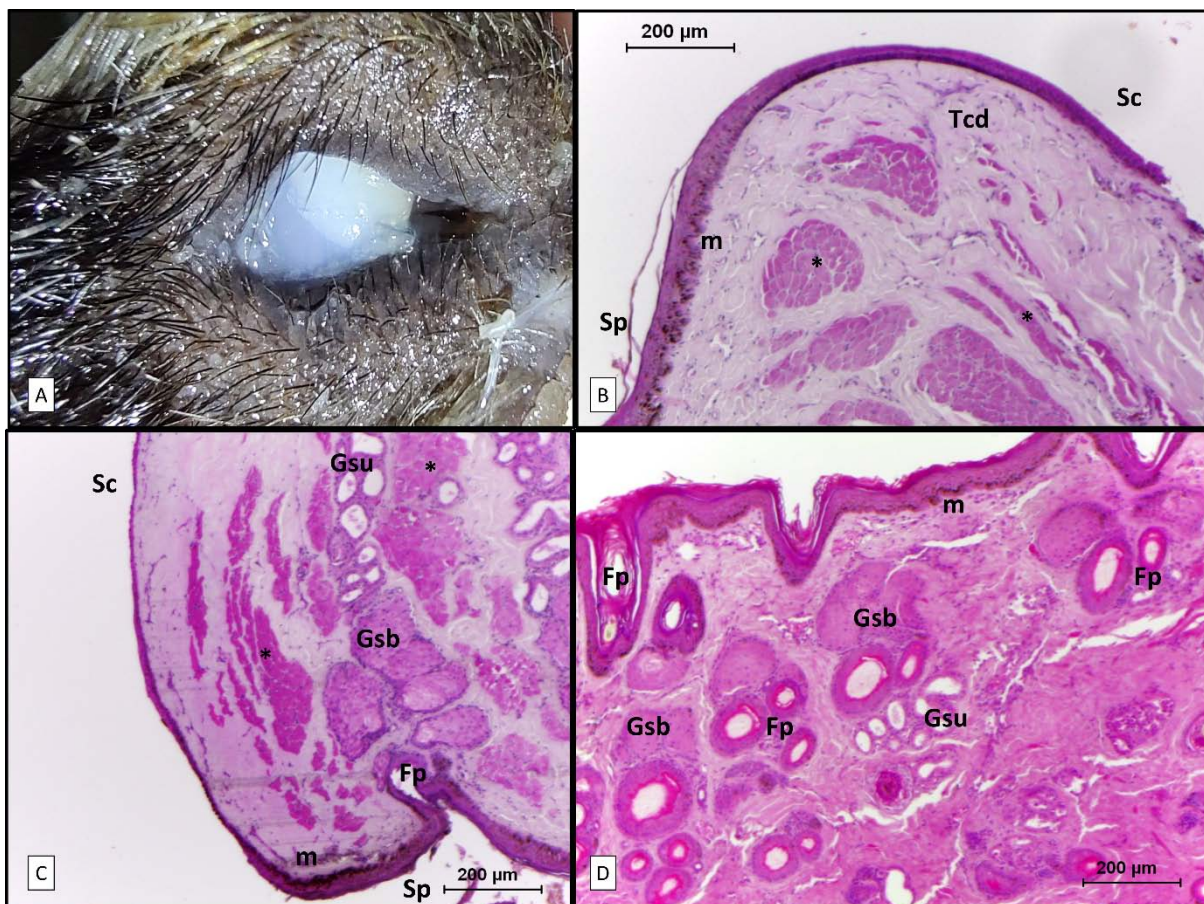


Figura 2- Pálpebra do Bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) **Sp** superfície palpebral. **Sc** Superfície conjuntival. **m** melanócitos **Tcd** Tecido conjuntivo denso. **Fp** Folículo piloso. **Gsb** Glândulas sebáceas. **Gsu** Glândulas sudoríparas. \* Fibras musculares.

Os pelos da pele das pálpebras são abundantes, inicialmente estes pelos se assemelhavam a cílios, no entanto após avaliação mais minuciosa eles não se associam à margem palpebral. As pálpebras superior e inferior se unem no canto lateral e medial formando a fissura palpebral. O tamanho da fissura palpebral apresenta uma média de 8,3 mm para o olho esquerdo e 8,9 mm para o olho direito (Tabela 1). As pálpebras repousam sob a superfície ocular cobrindo a porção da conjuntiva bulbar, que quando abertas não expõe a conjuntiva bulbar, ficando exposta unicamente a córnea (Figura 2).

Tabela 1. Comprimento da Fenda palpebral do bicho Preguiça (*Bradypus variegatus*).

ANIMAIS	OLHO ESQUERDO	OLHO DIREITO
1 fêmea	8mm	8mm
2 macho	8,5mm	8,6mm
3 macho	9,5mm	10mm
4 macho	9,0 mm	9,0 mm
5 macho	9,0 mm	9,0mm
6 macho	9,0 mm	9,0 mm
MÉDIA	8,3mm	8,9mm

Glândulas lacrimais acessórias foram visualizadas nas pálpebras superior e inferior assim como no fórnix conjuntival do Bicho-preguiça. Apresentam de 2 a 3 lóbulos divididos por feixes de tecido conjuntivo denso. São glândulas túbulo alveolares mistas, com ácinos mucosos e serosos, sendo os serosos mais frequentes. As glândulas lacrimais acessórias possuem mais de um sistema de ductos excretores (Figura 3) que desembocam diretamente na conjuntiva palpebral. Tecido linfóide difuso está presente circundando os ácinos e próximo da conjuntiva.

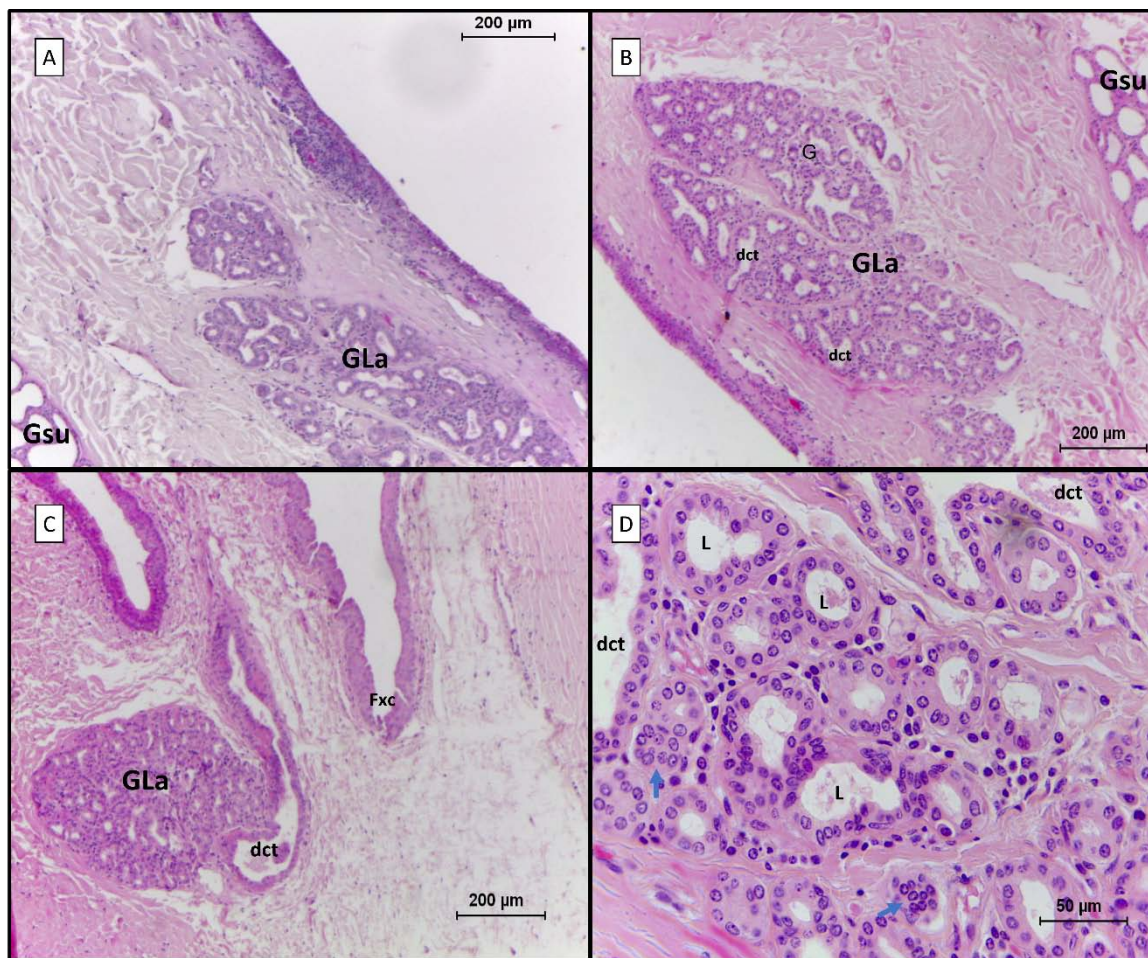


Figura 3- Glândulas acessórias palpebrais do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). **GLa** – Glândula lacrimal acessória. **Dct**- Ductos excretores. **Fxc**- Fornix conjuntival. **L**- Lúmen. A) Glândula acessória presente na região da pálpebra marginal, próximo a superfície conjuntival, apresentando 3 lóbulos separados por tecido conjuntivo denso. B) Glândula lacrimal acessória com ductos Interlobulares. C) glândula lacrimal acessória presente com ducto desembocando no fornix conjuntival. D) Acinos da glândula lacrimal acessória, apresentando ácidos serosos com lúmen apresentando secreção serosa e acinos mucosos com lúmen estreito (**seta azul**).

A terceira pálpebra ou membrana nictitante (*plica semilunaris*) encontra-se localizada na região ventro medial da órbita e sua borda é pigmentada. Apresenta uma placa cartilaginosa em forma de âncora com base ampla, a porção horizontal é paralela à borda livre da membrana (Figura 4).

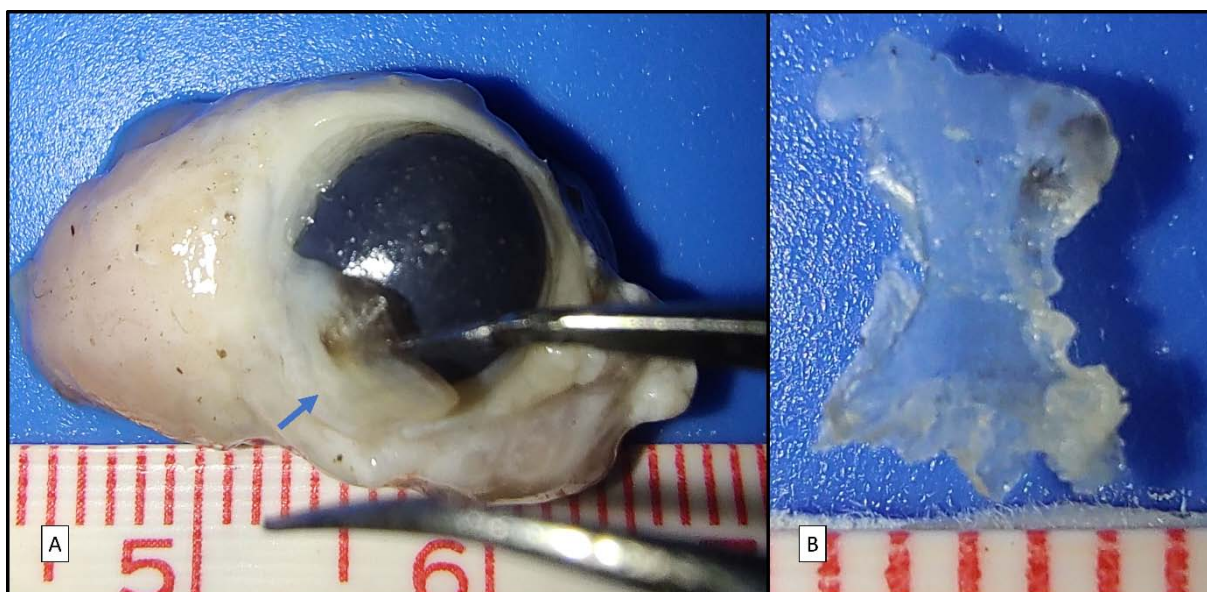


Figura 4- Macrografia da terceira pálpebra do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). A) Olho do bicho-preguiça evidenciando a terceira pálpebra ( seta azul) note-se a base pigmentada. B) cartilagem da terceira pálpebra após dissecação, apresenta forma de âncora.

Histologicamente observa-se uma fina camada de tecido conjuntivo denso que circunda sua cartilagem rico em tecido linfóide difuso e folículos linfóides. A cartilagem é composta de tecido hialino com numerosos condrócitos e pequena quantidade de substância intercelular. Os condrócitos têm forma oval e são na sua maioria simples ou formando grupo composto de 2-3 células. A superfície palpebral da membrana nictitante possui epitélio escamoso estratificado não queratinizado com três a seis camadas de células. A superfície bulbar da membrana nictitante possui epitélio colunar simples. Em seu estroma, foram encontrados tecido linfóide difuso, além de tecido linfóide organizado formando grupos de folículos ( Figura 5)

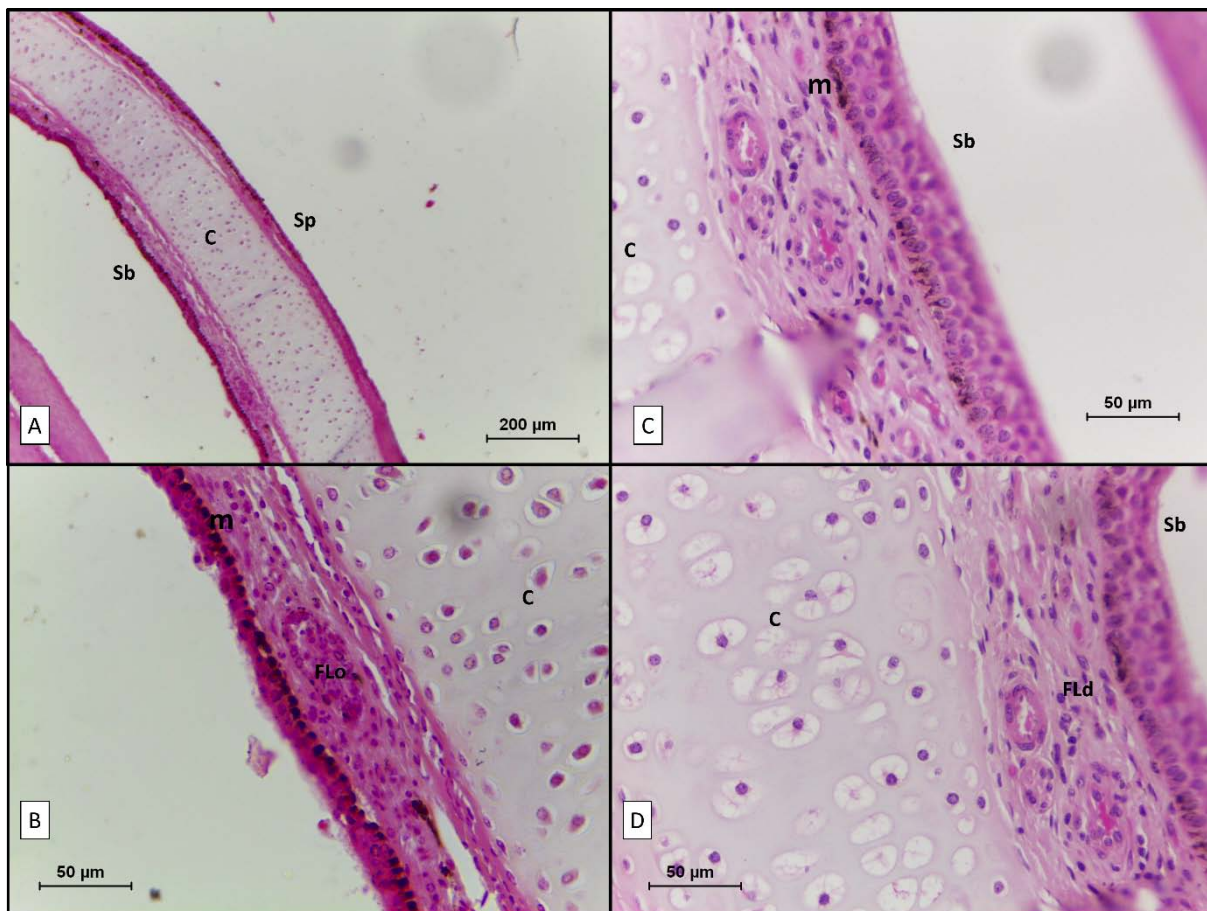


Figura 5- Histologia da terceira pálpebra do Bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). **Sb**- Superfície bulbar. **C**- cartilagem da terceira pálpebra. **Sp**- Superfície palpebral. **M**- melanócitos **Flo** - tecido linfóide organizado (folículo linfóide). **FLd**- Tecido linfóide difuso).

A membrana nictitante do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) possui uma glândula lacrimal proeminente (glândula lacrimal superficial da terceira pálpebra) localizada na sua base e posicionada no lado bulbar. Observou-se uma extensão da glândula se posicionando mais profundamente na órbita, circundando o globo, até o polo posterior e posicionado externamente ao cone muscular (Figura 6).



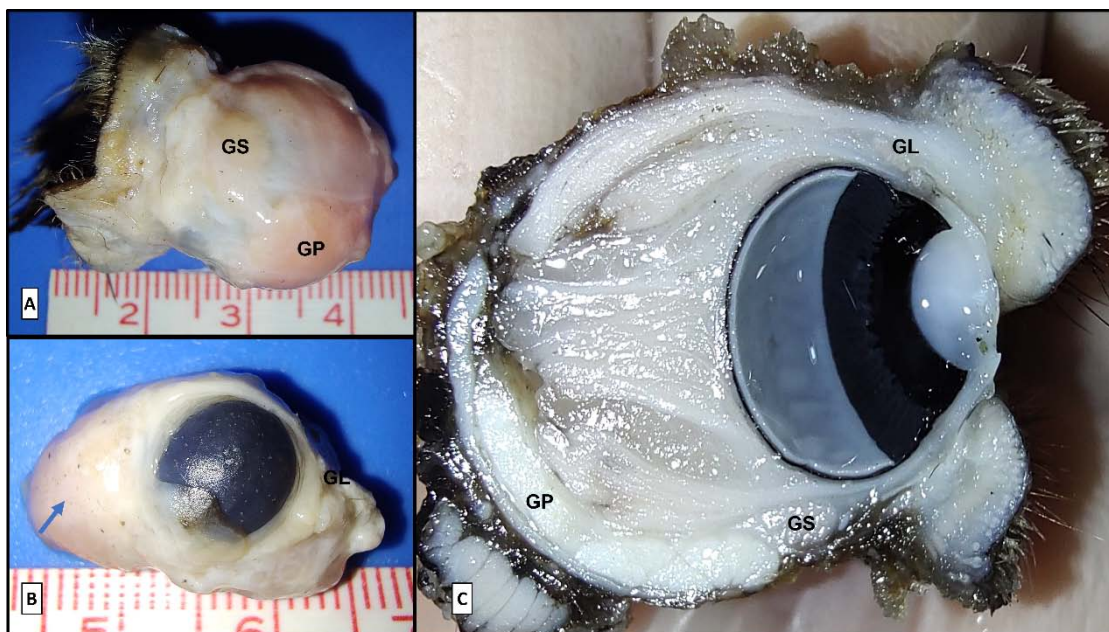


Figura 6- Macrografia do olho da preguiça demonstrando as glândulas superficiais e profundas da terceira pálpebra. **GS** glândula superficial. **GP** glândula profunda **GL** Glândula lacrimal ventrolateral **Seta Azul**- Glândulas superficial e profunda da terceira pálpebra

A glândula da membrana nictitante se divide em lóbulos irregulares separados um de outro por tecido conjuntivo rico em fibras reticulares, vasos sanguíneos e fibras nervosas. Histologicamente a porção superficial da glândula lacrimal da terceira pálpebra possui estrutura túbulo-alveolar. Os ácinos apresentam células cônicas com citoplasma granular, núcleo arredondado localizado próximo a base das células (Figura 7).

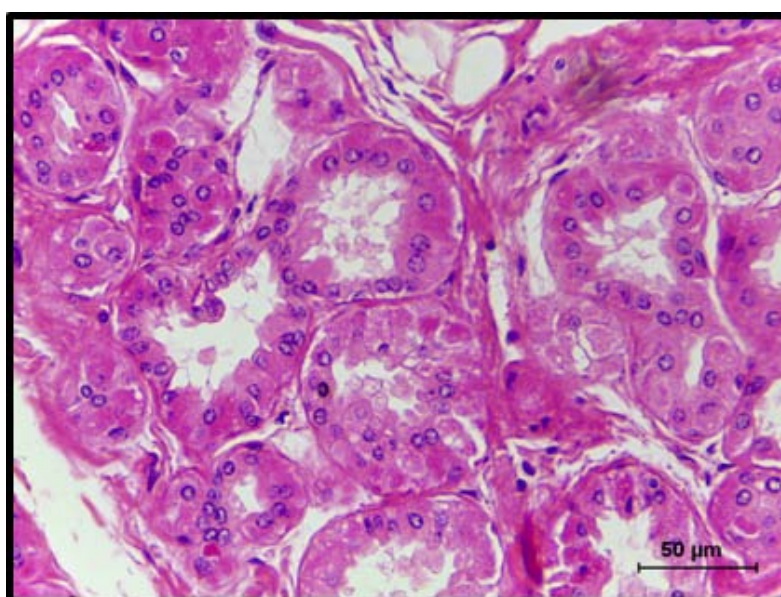


Figura 7- Ácinos da glândula superficial da terceira pálpebra do bicho-preguiça. Evidencia-se citoplasma fortemente corado, com lúmen apresentando conteúdo seroso. H.E.

Na porção mais profunda a glândula está dividida em vários lóbulos, cada um contendo várias unidades secretoras. Possui estrutura túbulo-alveolar com amplo lúmen central. Seus ácinos são compostos por um epitélio colunar pseudoestratificado. Dois tipos de células secretoras foram visualizadas, sendo a maioria de células prismáticas caracterizadas por um citoplasma altamente vacuolizadas. Células piramidais com citoplasma basófilo também estão presentes, embora em menor quantidade. No lúmen é possível se visualizar a presença de conteúdo secretório amorfo e gotículas de lipídios. A microscopia de fluorescência confirmou a presença de porfirinas ( Figura 8).

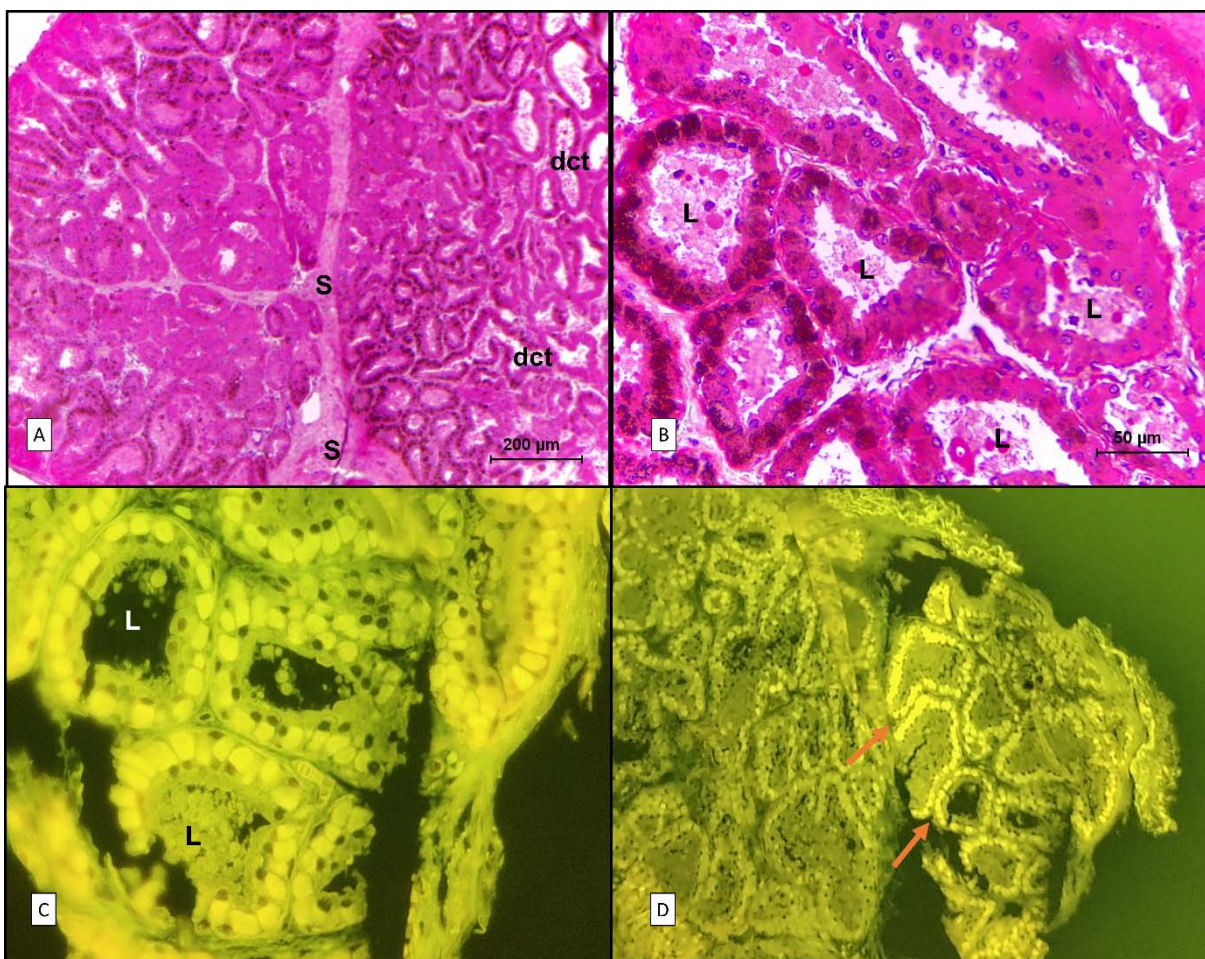


Figura 8- Glândula profunda da terceira pálpebra do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). **S**- septos interlobulares. **L**- Lúmen. **Seta laranja** – evidenciando os ácinos com autofluorescência. Em A, observa-se septos Interlobulares separando ácinos de diferentes tamanhos e vários ductos excretores. Em B, há a presença de ácinos apresentando células com núcleos arredondados, conteúdo amorfo de tamanhos e formas diferentes. H.E. Em C demonstrando a presença de intensa autofluorescência. D) setas laranjas evidenciando os ácinos com autofluorescência.

A glândula lacrimal do bicho-preguiça tem forma ovalada e está localizada na região dorsolateral do globo. Estava envolta por uma cápsula de tecido conjuntivo que divide a glândula em vários lóbulos. Cada lóbulo apresenta vários ácinos e ductos intralobulares e vasos entre os ácinos. Apresentava ácinos com células em forma piramidal e cubóide com núcleo redondo, deslocado para porção basal com lúmen central estreito positivo para Azul de Alcian. Ácinos com lúmen grande, PAS positivos, apresentando conteúdo amorfo em seu lúmen estavam presentes em maior quantidade (Figura 9).

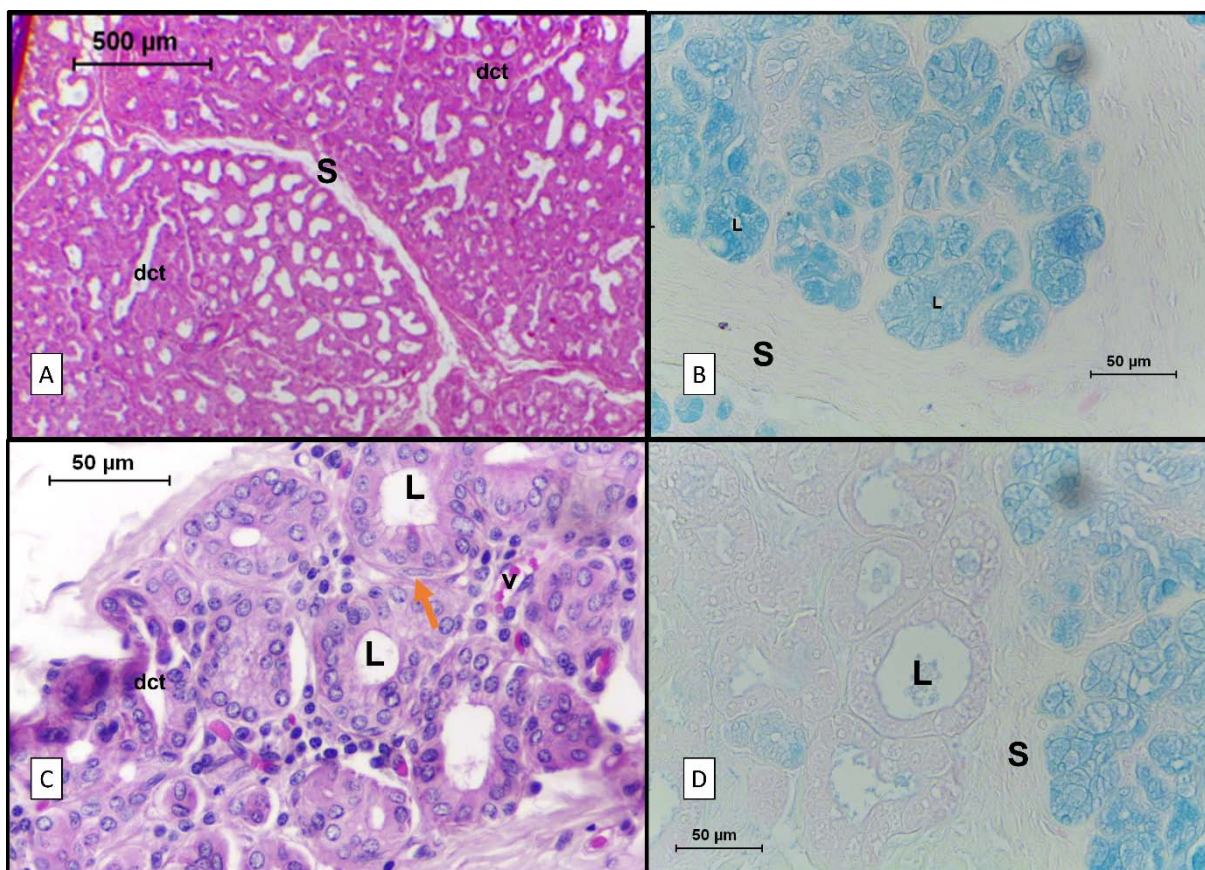


Figura 9- Glândula Lacrimal dorso lateral do bicho preguiça. A) A glândula é dividida em vários lóbulos. Inúmeros ductos (**dct**) estão presentes entre os ácinos e septos (**S**) se irradiam entre a glândula formando vários lóbulos, marcadas PAS positivo B) acinos Azul de Alcian positivo. C) Ácinos corados em H.E, circundados por mioblastos (seta), vasos (**v**), lúmen (**L**). D- ácinos Azul de alcian positivos com lúmen estreito e ácinos azul de alcian negativos com lúmen grande.

## DISCUSSÃO

Neste estudo descrevemos as pálpebras e glândulas presentes na órbita do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). Existe um único estudo que descreve as pálpebras e glândula lacrimal nesta espécie, este estudo desenvolvido por Sena et al (2022) avaliou todas as estruturas oculares do bicho preguiça, não se aprofundando nos tecidos periorbitais. Nossos achados corroboram com os de Sena et al (2022) no que diz respeito à ausência de tarso e glândulas meibomianas, além da ausência de cílios nesta espécie. No entanto, seu estudo difere do nosso em outros aspectos, tais como a descrição da presença de glândulas lacrimais acessórias palpebrais, a presença da glândula harderiana e do tecido linfóide associado a conjuntiva (CALT) que não foram descritos no estudo que desenvolveram.

A pálpebra é uma estrutura importante para a proteção do globo ocular. São compostas por pregas de tecido musculo fibroso, delgadas na maioria das espécies que é contínuo com a pele da face (GELLAT, 2013). O bicho-preguiça possui pálpebras semelhantes a outras espécies, composta por pregas musculo fibrosas, no entanto suas pálpebras possuem uma espessura significativamente maior. As pálpebras recobrem a maior parte do globo ocular deixando unicamente a córnea exposta quando abertas. Esta característica pode estar relacionada a adaptação a um ambiente hostil, com presença de galhos e insetos ao qual estes animais se expõem.

Como resultado da evolução, os cílios têm diferentes estruturas e funções nos diferentes animais. Os cílios são pelos sensitivos delicados que auxiliam na proteção do olho quando exposto a estímulo externo, promovendo estímulo para piscar. Também possuem função de proteção à luz solar. Em humanos, estudos demonstram que os cílios se diferenciam dos cabelos (presentes no couro cabeludo) pela profundidade de sua inserção, estando os cabelos inseridos na hipoderme enquanto os cílios na derme. Outro fator que distingue os pelos dos cílios é a presença do músculo *arrector pili* que é encontrado próximo aos folículos capilares e ausente nos cílios. A maioria dos mamíferos apresenta cílios, estudos demonstraram a presença de cílios na pálpebra superior de cães, ovinos e suínos. Em estudo desenvolvido por KLEĆKOWSKA-NAWROT et al.(2016) as pálpebras superiores do canguru vermelho (*Macropus rufus*) apresentavam cílios longos e espessos e na

pálpebra inferior cílios pequenos e finos estavam presentes. De acordo KEMPSTER; BANCROFT; HIRST, (2002) o Koala (*Phascolarctos cinereus*) apresentavam cílios nas pálpebras superiores e inferiores. No gato, as pálpebras inferior e superior não apresentam cílios. No entanto, a pálpebra superior apresenta uma fileira principal de pêlos próximos à margem e que, segundo Gellat et al (2013) podem ser considerados cílios acessórios. A ausência de cílios também foi relatada no elefante asiático (*Elephas maximus*) porém os autores descrevem a presença de pêlos acessórios, bem desenvolvidos próximos a margem palpebral e relatam que poderiam ser considerados semelhantes a sobrancelhas em humanos (WONG et al, 2012). Os Hiracóides tampouco possuem cílios (GELATT, 2013). Os cílios estão ausentes no *Bradypus variegatus*, tanto na avaliação macroscópica quanto na avaliação microscópica. No entanto inúmeros folículos pilosos, bem desenvolvidos estavam presentes acima da margem palpebral. A presença de uma pálpebra bem desenvolvida e espessa com pouca exposição do globo podem explicar a ausência de cílios. Além da ausência de cílios a preguiça não apresenta tarso nem glândulas meibomianas. Esta característica também foi relatada por WONG et al 2012, no elefante asiático, onde estavam ausentes, cílios e glândulas meibomianas. Também, como no elefante asiático os pelos presentes próximo a margem palpebral apresentaram glândulas sebáceas bem desenvolvidas que podem ser responsáveis pela produção da camada gordurosa do filme lacrimal substituindo as glândulas meibomianas, ausentes nesta espécie (SAMUELSON, 2007; WONG et al., 2012).

A conjuntiva que recobre a face interna da pálpebra consiste em uma fina camada de tecido conjuntivo que possui um epitélio que varia conforme a espécie, sendo na maioria dos animais composto por um epitélio simples se tornando consistentemente estratificado ao se direcionar a margem bulbar podendo apresentar um epitélio colunar pseudoestratificado ou cubóide. Semelhante a descrição de outras espécies, em *Bradypus variegatus* a superfície conjuntival é transicional de um epitélio colunar simples para um epitélio pseudoestratificado à medida que atinge a superfície bulbar e o fórnix conjuntival. (KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015; Y. AL-RAMADAN, 2015; WONG et al., 2012; AL-RAMADAN; ALI, 2012).

No presente estudo, glândulas lacrimais acessórias estavam presentes nas pálpebras do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*). Estas encontram-se localizadas

ao longo da margem palpebral inferior e superior e próximo ao fórnix conjuntival. Estas glândulas são conhecidas em humanos como glândula de Krause e Wolfring. As localizadas na pálpebra superior denominam-se de Wolfring e as que estão presentes no fórnix são conhecidas como glândulas de Krause. Estudos destas glândulas em humanos demonstrou que expressam lactoferrina, lisozima, fatores de crescimento epidermal (EGF), Imunoglobulinas e fosfolipase (SEIFERT et al., 1993; OBATA, 2006). As glândulas lacrimais acessórias estão presentes em várias espécies. São responsáveis principalmente pela produção de uma secreção serosa, mas podem produzir uma porção mucosa também, no entanto sua contribuição para formação do filme lacrimal varia entre as espécies. A camada aquosa do filme lacrimal em cães é produzida principalmente pela glândula lacrimal, representando 62% da sua produção, sendo os outros 35% produzidas pela glândula lacrimal da terceira pálpebra enquanto apenas 3% são produzidos pelas glândulas lacrimais acessórias. No elefante asiático a contribuição das glândulas lacrimais acessórias é de maior importância já que estes animais não apresentam glândula lacrimal principal, embora não se saiba qual percentual da sua contribuição estudos demonstraram que está presente em abundância na pálpebra destes animais, provavelmente para compensar a ausência da glândula lacrimal dorsolateral (WONG et al., 2012). Em gatos, sua contribuição para formação do filme lacrimal foi determinada como insignificante. Por outro lado, no peixe-boi da Flórida encontra-se em abundância nas pálpebras superior e inferior possuindo grande importância na produção lacrimal nesta espécie. No bicho-preguiça do presente estudo foram encontradas várias glândulas lacrimais acessórias que estavam alinhadas à superfície palpebral inferior e superior e estavam localizadas no fórnix conjuntival o que sugere ter importância significativa na produção lacrimal desta espécie.

A terceira pálpebra do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) é uma membrana semi lunar que está situada na região medial do globo semelhante à descrita em alguns elasmobrânquios, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (com exceção de humanos). A terceira pálpebra do *Bradypus variegatus* apresenta pigmentação concentrada na borda externa e sua cartilagem apresenta uma forma de âncora semelhante à descrita no suíno, na Alpaca (*Vicugna pacos*) e no bisão europeu (*Bison bonasus bonasus*), no entanto a cartilagem da preguiça possui uma base mais larga (CONSTANTINESCU; MCCLURE, 1990; KLEĆKOWSKA-NAWROT; DZIEGIEL, 2007; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015a; KLEĆKOWSKA-NAWROT

et al., 2015b; SCHLEGEL; BREHM; AMSELGRUBER, 2001). Na análise histológica a cartilagem da terceira pálpebra do *Bradypus variegatus* é composta por um tecido cartilaginoso hialino com poucos condrócitos e grande quantidade de substância intercelular. Composição semelhante foi observada em cangurus vermelhos, coalas, suínos, cães, ratos e ruminantes (BISARIA; BISARIA, 1978; SCHLEGEL; BREHM; AMSELGRUBER, 2001; KEMPSTER; BANCROFT; HIRST, 2002 ; KLEĆKOWSKA-NAWROT; DZIEGIEL, 2007; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015a; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015b; (KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2016; ). Em equinos, no gato e camelos a cartilagem é composta por tecido cartilaginoso elástico (CONSTANTINESCU & MOORE, 1998; SCHLEGEL; BREHM; AMSELGRUBER, 2001; AL-RAMADAN; ALI, 2012).

A superfície palpebral conjuntival da terceira pálpebra do bicho-preguiça apresenta epitélio estratificado escamoso não queratinizado e a face bulbar possui epitélio colunar simples. As duas faces apresentam melanócitos e células calciformes. Canguru, cães e ruminantes apresentam epitélio escamoso estratificado não-queratinizado (Y. AL-RAMADAN, 2015; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015a; KLEĆKOWSKA-NAWROT; DZIEGIEL, 2007)

No estroma da superfície bulbar, logo abaixo da conjuntiva foram vistos agrupamentos de células que se assemelham a folículos linfóides, atribuímos este agrupamento de células ao tecido linfóide associado a conjuntiva (CALT), no entanto, estudos com imuno-histoquímica precisam ser desenvolvidos para confirmar que se trata do CALT no bicho-preguiça. O CALT desempenha papel importante na proteção da superfície ocular, regulando sua resposta imune (KNOP; KNOP, 2005, 2000; STEVEN; GEBERT, 2009; SIEBELMANN et al., 2013; AGNIFILI et al., 2014). Estudos com macacos e avestruz demonstraram que a superfície conjuntival entre a porção que apresenta este tecido linfóide não apresenta células calciformes, sendo, portanto, uma característica importante para distinguir áreas de CALT (KAGEYAMA et al., 2006; BAYRAKTAROĞLU et al., 2011), semelhante aos resultados encontrados no Bicho-preguiça no presente estudo. No canguru vermelho (KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2016) foram encontrados folículos linfóide organizados unicamente na pálpebra inferior.

Em humanos o CALT está presente nas pálpebras sob a forma de folículos linfóides organizados além de tecido linfóide difuso, no entanto, a forma folicular é mais abundante nas pálpebras inferiores (KNOP; KNOP, 2000; SIEBELMANN et al.,

2013). Em estudos realizados em chinchila (*Chinchilla lanigera*) (SUSANNE VOIGT et al., 2012) e porquinho-da-índia (GASSER et al., 2011), havia poucas células caliciformes presentes no epitélio conjuntival da região linfóide. Em ratos e camundongos o CALT não se apresenta de forma organizada estando presente em pequena quantidade nas pálpebras de forma difusa (KNOP; KNOP, 2005). O CALT também foi descrito em bovinos, cães, gatos, ovinos, equinos e suínos apresentando folículos tanto de forma difusa quanto de forma folicular organizada (RAMOS et al., 1992; AŞTI et al., 2000; BAYRAKTAROGLU; ASTI, 2009; GIULIANO; FINN, 2011; HONG et al., 2011)

A glândula lacrimal do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) está localizada na região dorsolateral adjacente a peri órbita, entre o músculo reto dorsal e reto lateral do globo ocular. Esta localização é descrita na maioria das espécies, incluindo os humanos (GELLAT et al., 2013). Apresenta forma oval e alongada no *bradypus variegatus*, semelhante a ovinos e asininos (GARGIULO et al., 2000; ALSAFY, 2010). Na maioria das espécies descritas, apresenta forma triangular como descrito no canguru vermelho, no suíno, em humanos e em bovinos (PINARD et al., 2003; KLEĆKOWSKA-NAWROT; DZIEGIEL, 2008; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2016). No cão apresenta forma irregular, ligeiramente retangular (EL-NASEERY et al., 2016). Na avaliação histológica a glândula lacrimal do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) é tubuloalveolar. Está coberta por uma cápsula de tecido conjuntivo espesso, composto por fibras de colágeno que se entrelaçam no tecido glandular formando inúmeros lóbulos grandes. Os ácinos possuem epitélio com células em forma piramidal e cubóide e contém citoplasma eosinofílico. Com conteúdo amorfo no interior de seu lúmen. Estes achados se assemelham aos do bovino, do canguru vermelho, do bisão europeu, bisão americano, alpaca, rato wistar e do búfalo (PINARD et al., 2003; SHADKHAST; BIGHAM, 2010; KLE, 2013; EL-FADALY et al., 2014; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015a; KLEĆKOWSKA-NAWROT et al., 2015b)

A glândula superficial da terceira pálpebra do *Bradypus variegatus* está localizada na porção ventral do globo, na base da cartilagem da terceira pálpebra. A glândula foi relatada em várias espécies, incluindo os cães e gatos, elefante asiático, nos marsupiais australianos, no tatu, em bovinos, suínos, ovinos entre outros (SAKAI; VAN LENNEP, 1984; PINARD et al., 2003; WONG et al., 2012; GELATT, 2013). No bicho preguiça apresenta forma redonda e achatada com aparência



macroscópica lisa. A maior parte envolve a base da cartilagem da terceira pálpebra e apresenta-se ligada por uma faixa de tecido conjuntivo a uma porção mais profunda da glândula.

A glândula profunda do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*), também denominada de glândula hardeniana, apresenta de quatro a cinco lóbulos que se estendem até região posterior do globo próximo ao nervo óptico se expandindo ventral e medialmente, envolvendo o globo. A posição da glândula hardeniana no *Bradypus variegatus* se assemelha ao descrito em outras espécies (SAKAI, 1981; PAYNE, 1994). Em se tratando de sua morfologia, as glândulas hardenianas são exócrinas, tubuloalveolar e que secreta lipídeos por exocitose (WOODING, 1980; SAKAI; YOHRO, 1981 WINTERHAGER; KÜHNEL, 1983). Bioquimicamente sua secreção contém substâncias incomuns como 1-álquil-2,3-diacilgliceróis (OTSURU et al., 1983) e porfirinas (KENNEDY, 1970; MENENDEZ-PELAEZ; BUZZELL, 1992). Fisiologicamente, várias funções foram atribuídas a esta glândula como produção de feromônios, termorregulação, participação no eixo retina-pineal entre outras (SAKAI, 1981 KENNEDY, 1970; PAYNE, 1994). Segundo Kennedy, 1970 quanto mais avançado na escala evolutiva menor será sua produção de lipídeos e porfirinas, se assemelhando cada vez mais a glândula lacrimal principal. No ponto de vista evolucionário as glândulas hardenianas e as glândulas lacrimais apareceram quando os vertebrados deixaram a água, estando presentes em répteis e anfíbios assim como na maioria dos mamíferos. Com isto, a sua presença seria esperada nos xenarthra, como já relatado no tatu, e agora no nosso estudo, no bicho-preguiça (WEAKER, 1981; KENNEDY, 1970). No entanto, não se sabe a razão de alguns animais não apresentarem esta glândula, por exemplo, em marsupiais da América do Sul a presença da glândula hardeniana foi confirmada por histologia e histoquímica por Paule em 1957, já outro estudo, desenvolvido por Lennep em 1984 relatou a ausência da glândula hardenianas em algumas espécies de marsupiais australianos.

Os grânulos no interior dos acinos da glândula hardeniana do bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) possuíam densidade e tamanhos e formas diferentes e alguns acinos possuíam autofluorescência. A porfirina quando expostas a luz UV produz uma intensa fluorescência vermelha, em contraste com o nosso estudo onde as secreções produziam uma fluorescência amarelo-esverdeada intensa (COHN, 1955). É sabido que a glândula hardeniana em ratos, hamsters e camundongos

possui fluoresceína vermelha enquanto no porquinho da índia sua fluorescência é amarela clara em fêmeas e amarronzado em machos. No tatu possui fluorescência amarelo intenso, como observado por nosso estudo com o *Bradypus variegatus*, o que sugere a presença de porfirina no bicho-preguiça (*Bradypus variegatus*) (ORTIZ et al., 2001). Devemos considerar que a superfície ocular do bicho-preguiça está bem adaptada ao seu ambiente hostil, em contato constante com inúmeros insetos e galhos e exposto a intensa luz solar, possuindo através de suas glândulas anexas ao olho inúmeros mecanismos de proteção, além de servir como marcador territorial. O presente é o primeiro a relatar a presença de glândula acessória nas pálpebras, tecido linfóide e glândula harderiana no bicho-preguiça.

## REFERÊNCIAS

AGNIFILI, L. et al. Immunology and Microbiology In Vivo Confocal Microscopy of Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in Healthy Humans, 2014.

ALDANA MARCOS, H. J.; AFFANNI, J. M. Anatomy, histology, histochemistry and fine structure of the Harderian gland in the South American armadillo *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia). *Anatomy and Embryology*, v. 209, n. 5, p. 409–424, 1 jun. 2005.

AL-RAMADAN, S. Y.; ALI, A. M. Morphological Studies on the Third Eyelid and its Related Structures in the One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Veterinary Anatomy*, v. 5, n. 2, p. 71–81, 1 out. 2012.

ALSAFY, M. A. M. Comparative Morphological Studies on the Lacrimal Apparatus of One Humped Camel, Goat and Donkey. *Journal of Biological Sciences*, v. 10, n. 3, p. 224–230, 15 mar. 2010.

AŞTI, R. N. et al. Electron microscopic studies on conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in Angora goats. *DTW Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, v. 107, n. 5, p. 196–198, 1 maio 2000.

BAYRAKTAROĞLU, A. et al. Conjunctiva associated lymphoid tissue in the ostrich (*Struthio camelus*). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, v. 17, p. 89–94, 1 jan. 2011.

BAYRAKTAROĞLU, A. G.; ASTI, R. N. Light and electron microscopic studies on Conjunctiva Associated Lymphoid Tissue (CALT) in cattle. *Revue de médecine vétérinaire*, v. 160, n. 5, p. 252–257, 2009.

BISARIA, K. K.; BISARIA, S. D. The third eyelid in the albino rats (A histological study). *Indian Journal of Ophthalmology*, v. 26, n. 2, p. 25, 4 jan. 1978.

CABRAL, V. P. et al. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands' macroscopic and morphometric characteristics. *Ciência Rural*, v. 35, p. 391–397, abr. 2005.

COHN, S. A. HISTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON THE HARDERIAN GLAND OF THE ALBINO MOUSE. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 3, n. 5, p. 342–353, 1 set. 1955.

CONSTANTINESCU, G. M.; MCCLURE, R. C. Anatomy of the orbital fasciae and the third eyelid in dogs. *American journal of veterinary research (USA)*, 1990.

DJERIDANE, Y. Comparative histological and ultrastructural studies of the Harderian gland of rodents. *Microscopy research and technique*, v. 34, n. 1, p. 28–38, 1 maio 1996.

EL-FADALY, A. et al. Age-Related Alterations in the Lacrimal Gland of Adult Albino Rat: A Light and Electron Microscopic Study. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, v. 196, 1 set. 2014.

EL-NASEERY, N. et al. The structural characterization of the lacrimal gland in the adult dog (*Canis familiaris*). *Benha Veterinary Medical Journal*, v. 31, n. 2, p. 106–116, 1 dez. 2016.

GARGIULO, A. M. et al. Complex carbohydrate histochemistry and ultracytochemistry of the sheep lacrimal gland. *Anatomia, histologia, embryologia*, v. 29, n. 1, p. 19–23, 1 mar. 2000.

GASSER, K. et al. Investigations on the conjunctival goblet cells and on the characteristics of glands associated with the eye in the guinea pig. *Veterinary ophthalmology*, v. 14, n. 1, p. 26–40, jan. 2011.

GELATT, K. N. *Essentials of veterinary ophthalmology*. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

GIULIANO, E. A.; FINN, K. Characterization of membranous (M) cells in normal feline conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT). *Veterinary Ophthalmology*, v. 14, p. 60–66, 2011.

HAYSEN, V. *Bradypus variegatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Mammalian Species*, v. 42, n. 850, p. 19–32, 25 jan. 2010.

HONG, I.-H. et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the third eyelid conjunctiva in a dog. *Veterinary Ophthalmology*, v. 14, n. 1, p. 61–65, 2011.

KAGEYAMA, M. et al. Ocular defense mechanisms with special reference to the demonstration and functional morphology of the conjunctiva-associated lymphoid tissue in Japanese monkeys. *Archives of Histology and Cytology*, v. 69, n. 5, p. 311–322, 2006.

KEMPSTER, R. C.; BANCROFT, B. J.; HIRST, L. W. Intraorbital anatomy of the koala (*Phascolarctos cinereus*). *The Anatomical Record*, v. 267, n. 4, p. 277–287, 1 ago. 2002.

KENNEDY, G. Y. Harderoporphyrin: a new porphyrin from the Harderian glands of the rat. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 36, n. 1, p. 21–36, 1 set. 1970.

KLE, J. Morphology of the Lacrimal Gland and Superficial Gland of the Third Eyelid of Roe Deer (*Capreolus Capreolus* L.). *Pak Vet J*, p. 6, 2013.

KLEĆKOWSKA-NAWROT, J. et al. Histological, histochemical and fine structure studies of the lacrimal gland and superficial gland of the third eyelid and their significance on the proper function of the eyeball in alpaca (*Vicugna pacos*). *Folia morphologica*, v. 74, p. 195–205, 28 maio 2015a.

KLEĆKOWSKA-NAWROT, J. et al. Histology, histochemistry and fine structure of the Harderian gland, lacrimal gland and superficial gland of the third eyelid of the European bison, *Bison bonasus bonasus* (*Artiodactyla: Bovidae*). *Zoologia (Curitiba)*, v. 32, n. 5, p. 380–394, out. 2015b.

KLEĆKOWSKA-NAWROT, J. et al. Functional Morphology of the Upper and Lower Eyelids, Third Eyelid, Lacrimal Gland and Superficial Gland of the Third Eyelid in the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Folia Biologica*, v. 64, n. 3, p. 163–181, 28 out. 2016.

KLEĆKOWSKA-NAWROT, J.; DZIEGIEL, P. Morphology of the third eyelid and superficial gland of the third eyelid on pig fetuses. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 36, n. 6, p. 428–432, dez. 2007.

KLEĆKOWSKA-NAWROT, J.; DZIEGIEL, P. Morphology of lacrimal gland in pig fetuses. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 37, n. 1, p. 74–77, fev. 2008.

KNOP, E.; KNOP, N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *Journal of Anatomy*, v. 206, n. 3, p. 271–285, 2005.

KNOP, N.; KNOP, E. Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in the Human Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 41, n. 6, p. 1270–1279, 1 maio 2000.

MENENDEZ-PELAEZ, A.; BUZZELL, G. R. Harderian Gland Indoles. In: WEBB, S. M. et al. (Eds.). *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1992. p. 219–234.

OBATA, H. Anatomy and Histopathology of the Human Lacrimal Gland. *Cornea*, v. 25, p. S82, dez. 2006.

ORTIZ, G. G. et al. Different Patterns in the Histology and Autofluorescence of the Harderian Glands of the Syrian Hamster, Rat, Mouse, Mongolian Gerbil and Guinea Pig. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 30, n. 2, p. 107–115, 2001.

OTSURU, O. et al. The characterization of 2, 3-alkanediol diacyl esters obtained from the Harderian glands of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *The Journal of Biochemistry*, v. 94, n. 6, p. 2049–2054, 1983.

PAULE, W. J. *The comparative histochemistry of the Harderian gland*. [s.l.] The Ohio State University, 1957.

PAYNE, A. P. The harderian gland: a tercentennial review. *Journal of Anatomy*, v. 185, n. Pt 1, p. 1–49, ago. 1994.

PINARD, C. L. et al. Normal Anatomical and Histochemical Characteristics of the Lacrimal Glands in the American Bison and Cattle. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 32, n. 5, 2003.

RAMOS, J. A. et al. Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine. *American journal of veterinary research*, v. 53, n. 8, p. 1418–1426, 1992.

SAKAI, T. The Mammalian Harderian Gland: Morphology, Biochemistry, Function and Phylogeny. *Archivum histologicum japonicum*, v. 44, n. 4, p. 299–333, 1981.

SAKAI, T.; VAN LENNEP, E. W. The Harderian Gland in Australian Marsupials. *Journal of Mammalogy*, v. 65, n. 1, p. 159–162, 1984.

SAKAI, T.; YOHRO, T. A histological study of the Harderian gland of Mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. *The Anatomical Record*, v. 200, n. 3, p. 259–270, 1981.

SCHLEGEL, T.; BREHM, H.; AMSELGRUBER, W. M. The cartilage of the third eyelid: A comparative macroscopical and histological study in domestic animals. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, v. 183, n. 2, p. 165–169, 1 mar. 2001.

SEIFERT, P. et al. The architecture of human accessory lacrimal glands. *German journal of ophthalmology*, v. 2, n. 6, p. 444–454, 1 nov. 1993.

SENA, C. DA S. P. DE et al. Ocular microscopy of *Bradypus variegatus*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 51, n. 1, p. 85–90, 2022.

SHADKHAST, M.; BIGHAM, A. S. A histo-anatomical study of dorsal lacrimal gland in Iranian river buffalo. *Vet Scan*, v. 5, n. 1, 2010.

SIEBELMANN, S. et al. Development, alteration and real time dynamics of conjunctiva-associated lymphoid tissue. *PLoS One*, v. 8, n. 12, 20 dez. 2013.

STEVEN, P.; GEBERT, A. Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue – Current Knowledge, Animal Models and Experimental Prospects. *Ophthalmic Research*, v. 42, n. 1, p. 2–8, 2009.

SUSANNE VOIGT et al. Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (*Chinchilla Laniger*). *Veterinary ophthalmology*, v. 15, n. 5, p. 333–344, set. 2012.

WEAKER, F. J. Light microscopic and ultrastructural features of the Harderian gland of the nine-banded armadillo. *Journal of Anatomy*, v. 133, n. Pt 1, p. 49–65, ago. 1981.

WINTERHAGER, E.; KÜHNEL, W. Membrane specializations of the cells of the Harderian gland of the rabbit with particular reference to the mechanism of exocytosis. *Cell and Tissue Research*, v. 231, n. 3, p. 623–636, 1983.

WONG, M. A. et al. PERIOcular ANTERIOR ADNEXAL ANATOMY AND CLINICAL ADNEXAL EXAMINATION OF THE ADULT ASIAN ELEPHANT (*ELEPHAS MAXIMUS*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 43, n. 4, p. 793–801, dez. 2012.

WOODING, F. B. P. Lipid droplet secretion by the rabbit Harderian gland. *Journal of ultrastructure research*, v. 71, n. 1, p. 68–78, 1980.

Y. AL-RAMADAN, S. HISTOLOGICAL FEATURES AND MUC1 DISTRIBUTION IN THE PALPEBRAL CONJUNCTIVA OF THE DROMEDARY CAMEL (*CAMELUS DROMEDARIUS*). *Assiut Veterinary Medical Journal*, v. 61, n. 146, p. 179–186, 1 jul. 2015.

YASUI, T. et al. Morphological and histochemical characterization of the secretory epithelium in the canine lacrimal gland. *European Journal of Histochemistry : EJH*, v. 65, n. 4, p. 3320, 2 nov. 2021.

### 3.1 Artigo II –

#### VASCULARIZAÇÃO DA CÓRNEA E CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO LIMBO DO BICHO PREGUIÇA (*Bradypus Variegatus*). CORNEAL VASCULARIZATION AND LIMBUS CHARACTERIZATION OF THE THREE TOED SLOTH (*Bradypus variegatus*)

##### Resumo

A superfície ocular é de vital importância para a visão, estando em contato direto com o meio ambiente, é vulnerável a ressecamento, lesões e patógenos e por isso, possui um mecanismo complexo para manutenção de sua homeostasia. A córnea mantém sua transparência por ser um tecido avascular com epitélio não queratinizado e não pigmentado, fibras nervosas amielínicas e fibras de colágeno organizadas de forma paralela e regular. O limbo possui características únicas e alberga células tronco, responsáveis pelo suprimento constante de células no epitélio da córnea. Nichos de células tronco estão presentes em estruturas conhecidas como paliçadas de vogt. O presente estudo avaliou a histologia e histoquímica da córnea e limbo do bicho-preguiça. 5 animais (10 olhos) foram submetidos a injeções com Látex líquido através da artéria carótida comum afim de marcação do vasos relacionados ao bulbo ocular. 20 olhos foram fixados em meio Davidson e processados para histologia e histoquímica. A córnea apresenta forma convexa, epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, não possui membrana de bowman, o estroma apresenta vasos que se ramificam a partir do anel ciliar até a córnea central. O limbo possui paliçadas de vogt com presença de grande quantidade de melanócitos na camada basal do epitélio.

Palavras-chave: Córnea, vascularização, limbo, células tronco

##### ABSTRACT

The ocular surface is of vital importance for vision, since it's in direct contact with the environment, it is vulnerable to dryness, injuries and pathogens and therefore has a complex mechanism to maintain its homeostasis. The cornea keeps its transparency because it is an avascular tissue with non-keratinized and non-pigmented epithelium, amyelinic nerve fibers and collagen fibers that are organized in a parallel and regular way. The limbus has unique characteristics and harbors stem cells, which are responsible for the constant supply of epithelium cells to the cornea. Stem cell niches are present in structures known as vogt palisades. The present study evaluated the histology and histochemistry of the cornea and limbus of the three toed sloth. Five animals (10 eyes) were injected with liquid latex through the common carotid artery to mark the vessels related to the eye bulb. 20 eyes were fixed in Davidson's medium and processed for histology and histochemistry. The cornea has a convex shape, non-keratinized stratified epithelium, bowman's membrane was absent, and vessels were present in the stroma reaching the central cornea. Vogt palisades are present in the limbus and many melanocytes were present in the basal layer of the epithelium.

Key words: cornea, vascularization, limbus



## INTRODUÇÃO

O epitélio da córnea constitui uma barreira que impede a entrada de patógenos ao globo ocular, entretanto, porque a córnea deve ser transparente permitindo a passagem de luz, ela não apresenta vasos sanguíneos e depende de outros tecidos para manutenção de sua hemostasia. A presença de vasos sanguíneos na córnea é referida como angiogênese corneana e é considerada como uma condição patológica que pode afetar a acuidade visual. As causas de vascularização da córnea são variadas podendo incluir infecções, processos imunológicos, ceratoconjuntivite seca, queimaduras alcalinas entre outros. No entanto, um estudo com o peixe boi (*Trichechus manatus latirostris*) demonstrou a presença de vasos na córnea sem alterações patológicas (HARPER; SAMUELSON; REEP, 2005). Neste estudo os autores concluíram que a presença de vasos não interferia na visão desse animal. E estava presente de forma fisiológica em todos os peixe-bois estudados.

As células do epitélio corneano estão em constante renovação, estima-se que a renovação epitelial ocorra a cada 7-10 dias e é desempenhada pelas células tronco epiteliais do limbo. O limbo é formado pela junção da córnea e o epitélio conjuntival e se assemelha macroscopicamente nas diferentes espécies, porém, histologicamente a borda epitelial varia entre as espécies. Nesta região foram identificadas células multipotentes. Schermer et. al. (1986) foi o primeiro a propor que células tronco do epitélio corneano estão localizados na no limbo, na camada basal do seu epitélio, esse grupo de células foi denominado de nicho celular, são responsáveis pela regeneração celular da córnea. Estes nichos celulares encontram-se agrupados numa região com elevações radiais fibrovasculares, entrelaçada por vasos e nervos conhecida como Paliçadas de Vogt. Estudos para caracterização do limbo foram desenvolvidos para cães, suínos, equinos, ovinos, camundongos e humanos. As paliçadas de vogt foram identificadas nos equinos e suínos, estando ausentes em cães, gatos e camundongos (PATRUNO et al., 2017; SHANMUGANATHAN et al., 2007).

## MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi delineada de acordo as normas internacionais da ARVO – Association for Research in Vision and Ophthalmology, com registro no Sisgen e licença pelo ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, com o seguinte número de registro no SISBIO – Sistema de Autorização e informação em biodiversidade: SISBIO.

## ANIMAIS E COLETA

Para o desenvolvimento do estudo, foram utilizados olhos enucleados de animais encaminhados ao CETAS (30 olhos de 15 animais) que vieram a óbito por motivos não relacionados a esta pesquisa e cabeças de animais (05) pertencentes ao acervo anatômico do museu de anatomia Animal do DMFA, onde foram realizadas injeções com Látex Líquido através da artéria carótida comum afim de marcação do vasos relacionados ao bulbo ocular. Os outros 20 olhos foram fixados em meio Davidson e encaminhados ao Laboratório de Oftalmologia Experimental (LOE) da UFRPE para processamento pela técnica histológica rotineira de inclusão em parafina (BEHMER et al., 2003). Os blocos elaborados foram cortados em micrômetro com espessura de 5 (micrômetro). As lâminas histológicas produzidas foram coradas por Hematoxilina – Eosina, tricrômico de Masson e analisadas em microscópio óptico.

## RESULTADOS

A córnea do bicho preguiça apresenta forma convexa, com um diâmetro horizontal maior do que o vertical. A superfície externa é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado. O epitélio é composto por uma única camada de células basais cilíndricas que repousa sobre uma fina membrana basal e não possui membrana de bowman. Possui duas a três camadas de células poliédricas e uma camada de células pavimentosas não queratinizadas. O estroma anterior apresenta vasos em todos os animais estudados. O estroma da córnea é a maior camada da córnea e contém ceratócitos espalhados entre as fibrilas de colágeno que se encontram organizadas em lamelas paralelas. o epitélio posterior (endotélio) está composto por uma única camada de células. Vasos sanguíneos estavam presentes no estroma anterior, se aprofundando até as porções mais

centrais da córnea, estando evidenciadas em coloração de tricrômico de masson ( Figura 1).

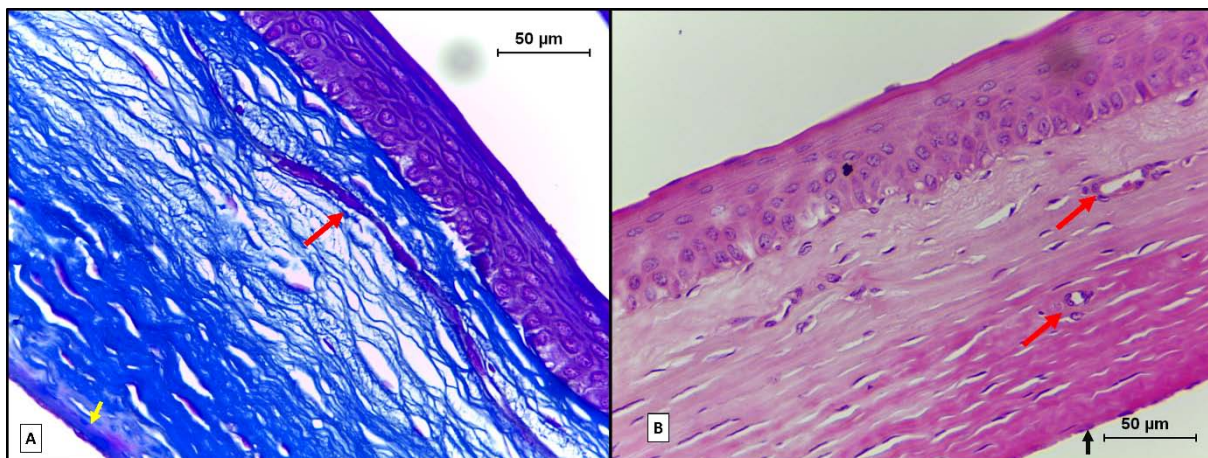


Figura 1- Histologia da córnea do bicho preguiça. A) seta vermelha demonstrando vasos em estroma superficial. Coloração tricrômica de masson. Seta amarela demonstrando membrana descemet B) histologia da córnea demonstrando epitélio, estroma e endotélio. Seta vermelha demonstrando vasos no estroma profundo e superficial da córnea. Seta preta demonstrando endotélio.

Estudo macroscópico revela a presença de uma zona vascular embaixo da conjuntiva, originária das artérias ciliares anteriores formando um arco vascular por onde partem arteríolas de forma radial penetrando no estroma anterior da córnea até a porção central, formando uma extensa rede de vasos com anastomoses colaterais (Figura 2).

O limbo apresenta epitélio mais espesso do que o da córnea, com células basais apresentando escasso citoplasma. A camada basal do epitélio possui uma região com projeções em forma de paliçadas. O estroma perde o arranjo regular e adquire aparência de tecido conjuntivo denso irregular, entrelaçado por vasos e artérias ciliares (Figura 3).

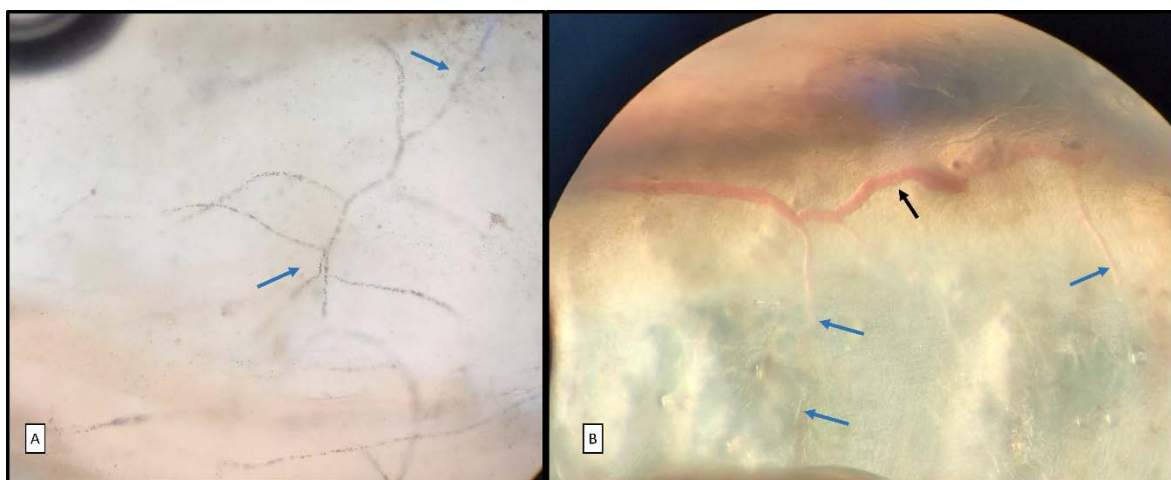


Figura 2- Em A seta azul evidenciando arteríolas adentrando as córneas atingindo a parte central da córnea e apresentando ramificações. Em B Seta preta evidenciando círculo arterial subconjuntival e seta azul arteríolas direcionando a córnea central.

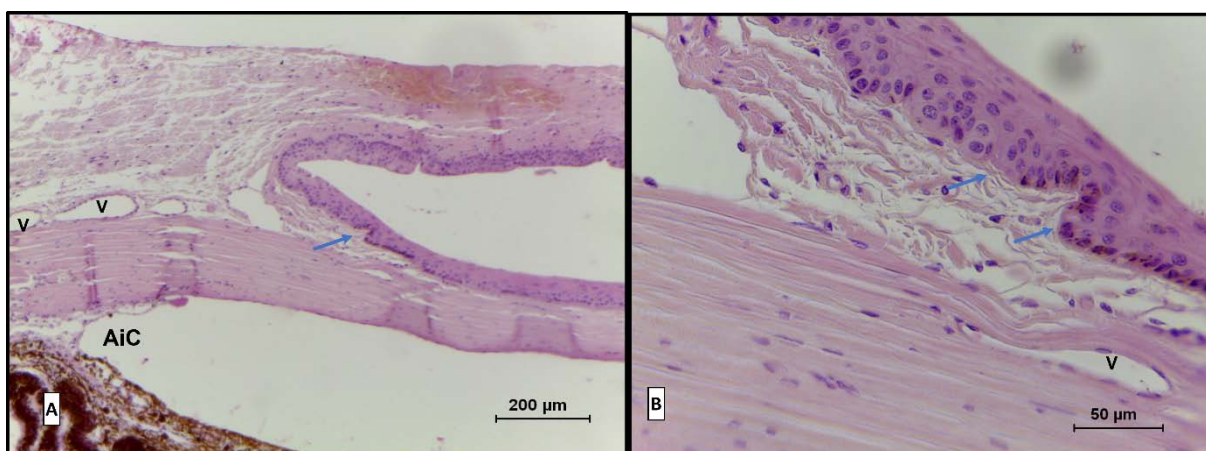


Figura 3- Corte histológico do Limbo do Bicho-preguiça evidenciando criptas em forma de Paliçadas na base do epitélio limbal (setas em azul) e presenças de vasos associados a região do limbo (v). AiC- Ângulo iridocorneano H.E.

## DISCUSSÃO

A presença de qualquer atividade angiogênica no estroma corneal é indicativo de lesão e está relacionada a reparação frente a injúrias, a persistência destes vasos é considerada como uma condição patológica e os fatores que levam a vascularização podem ser locais ou sistêmicos. No entanto, é sabido que em alguns animais ocorre a vascularização não patogênica, esses animais incluem o Carneiro-selvagem (Bighorn sheep), o tatu, a Salamandra-gigante-do-japão, o peixe-boi da flórida e alguns camundongos geneticamente modificados, como o Camundongo nude e a linhagem de camundongos sem pêlos SKH1hr/hr ( HARPER; SAMUELSON; REEP, 2005 ). A presença de vasos no tatu pode ser um fator evolutivo para superordem xenarthra, no entanto estudos devem ser feitos para confirmar esta hipótese. Os estudos com peixe-boi demonstraram que esses vasos ocupam entre 0,1% a 5% do tecido corneal, em média 1%, não causando interferência na passagem de luz através da córnea. No presente estudo todos os animais apresentavam vasos intra estromais, porém sem envolvimento da camada epitelial, diferente do que foi relatado no peixe-boi (HARPER; SAMUELSON; REEP, 2005) que embora estavam presentes na camada estromal também estavam localizados na camada basal do epitélio.

Várias moléculas estão envolvidas no processo de vascularização da córnea. Estas agem em conjunto para suprimir a neovascularização. No entanto, há evidências que moléculas podem inibir este processo de forma individual. Uma das primeiras moléculas reconhecidas com esta característica inibitória é o fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF). Esta é abundante em tecidos cartilaginoso avasculares e tem papel importante na inibição da neovascularização da retina. PEDF está presente no estroma da córnea e quando inibida em estudos experimentais promove a neovascularização da córnea ( PEEK et al., 1998)

No peixe-boi da Flórida a presença destes vasos na córnea foi vinculada à ausência de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) receptor 1. A presença deste fator de crescimento previne a neovascularização através da inibição de um potente estimulador angiogênico (VEGF-A) que ocorre em condições saudáveis e está presente em todas as outras espécies de mamíferos (AMBATI et al., 2006; MADDULA et al., 2011). Outros estudo associam a deficiência da proteína Lrp5 a alterações vasculares no olho, como a persistência da artéria hialóide, mas estão associadas a alterações ósseas como baixa densidade óssea e osteoporose em

humanos (KATO et al., 2002). Várias outras moléculas podem estar envolvidas na prevenção da neovascularização da córnea como moléculas semelhantes a angiopoetina, AngX ( PEEK et al., 1998; MAKINO et al., 2001).

O bicho preguiça possui metabolismo lento e temperatura corporal inferior aos demais mamíferos, variando de 32.7° a 35.5°C (GILMORE; DA-COSTA; DUARTE, 2000). Estudos demonstram que o bicho-preguiça e vários mamíferos aquáticos apresentam adaptações vasculares únicas em seus membros e caudas formando uma extensa rede de vasos, conhecida como rede admirável (*rete mirabilis*) permitindo um controle de sua temperatura (MCNAB, 1985). Em pinípedes e cetáceos, incluindo o peixe-boi da flórida, já foi demonstrada a presença de uma rede admirável associada aos tecidos oculares está relacionada a conservação da temperatura garantindo seu perfeito metabolismo mesmo com extensas variações da temperatura ambiental (NINOMIYA; IMAMURA; INOMATA, 2014).

No Bicho-preguiça os vasos presentes na córnea apresentavam ramificações aleatórias que atingem várias camadas do estroma indo da porção anterior a parte profunda, anastomosando-se, com padrão que se assemelhavam a rede admirável, no entanto, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo pelo qual ocorre a vascularização na córneas desta espécie e sua associação com uma rede admirável.

Compreender estes mecanismos pode auxiliar a desvendar os processos patológicos envolvidos na neovascularização da córnea em humanos.

A homeostasia da córnea depende de uma população de células tronco localizadas numa área altamente vascularizada denominada limbo. O limbo é uma zona de transição anular, situada entre a conjuntiva opaca e a córnea transparente. Estudos sugerem que as células tronco epiteliais limbal residem em uma área do limbo que apresenta projeções no epitélio, denominadas paliçadas de vogt (SHORTT et al., 2007; DZIASKO et al., 2014). As células tronco do epitélio limbal tem ciclo celular lento e estão localizadas na camada basal do epitélio, morfológicamente apresenta alta relação núcleo citoplasma. Estão em estreita relação com um nicho celular que repousa em um microambiente complexo (LAVKER et al., 2020). A presença de pigmentos nas paliçadas de vogt foi relatada por Davanger e Evensen (1971), estes pigmentos foram atribuídos a presença de melanócitos localizados na camada basal do epitélio e promovem proteção como antioxidante.

Este estudo analisou as características morfológicas do limbo do bicho-preguiça. Pudemos observar a presença da paliçada de vogt, as células da camada basal apresentavam melanócitos, o epitélio apresenta aproximadamente 8 camadas celulares e não possui células caliciformes. Paliçadas de vogt já foram relatadas em humanos, equinos, suínos e cães estando ausente em gatos e camundongos (PATRUNO et al., 2017). Novos estudos precisam ser realizados para confirmar que o nicho celular/vascular presente na região do limbo em Bicho-preguiça é de fato um local de reserva de células tronco, semelhante ao já descrito em várias espécies.

## REFERÊNCIAS

- AMBATI, B. K. et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 993–997, 2006.
- DAVANGER, M.; EVENSEN, A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. **Nature**, v. 229, n. 5286, p. 560–561, 1971.
- DZIASKO, M. A. et al. Localisation of epithelial cells capable of holoclone formation in vitro and direct interaction with stromal cells in the native human limbal crypt. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94283, 2014.
- GILMORE, D. P.; DA-COSTA, C. P.; DUARTE, D. P. F. An update on the physiology of two-and three-toed sloths. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 129–146, 2000.
- HARPER, J. Y.; SAMUELSON, D. A.; REEP, R. L. Corneal vascularization in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and three-dimensional reconstruction of vessels. **Veterinary ophthalmology**, v. 8, n. 2, p. 89–99, 1 mar. 2005.
- KATO, M. et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. **The Journal of cell biology**, v. 157, n. 2, p. 303–314, 2002.
- LAVKER, R. M. et al. Corneal epithelial biology: Lessons stemming from old to new. **Experimental Eye Research**, v. 198, p. 108094, 1 set. 2020.
- MADDULA, S. et al. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. **Ophthalmology**, v. 118, n. 3, p. 591–599, 2011.
- MAKINO, Y. et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 550–554, 2001.
- MCNAB, B. K. Energetics, population biology, and distribution of xenarthrans, living and extinct. 1985.
- NINOMIYA, H.; IMAMURA, E.; INOMATA, T. Comparative anatomy of the ophthalmic rete and its relationship to ocular blood flow in three species of marine mammal. **Veterinary ophthalmology**, v. 17, n. 2, p. 100–105, 2014.
- PATRUNO, M. et al. Morphological description of limbal epithelium: searching for stem cell crypts in the dog, cat, pig, cow, sheep and horse. **Veterinary Research Communications**, v. 41, n. 2, p. 169–173, 1 jun. 2017.
- PEEK, R. et al. Molecular cloning of a new angiopoietin like factor from the human cornea. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 39, n. 10, p. 1782–1788, 1998.



SHORTT, A. J. et al. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. **Stem cells**, v. 25, n. 6, p. 1402–1409, 2007.

## ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79626-1	Data da Emissão: 28/04/2022 10:33:27	Data da Revalidação*: 28/04/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Fabrício Bezerra de Sá	CPF: 695.225.374-20
Título do Projeto: Histologia da superfície ocular do Bicho-preguiça ( <i>Bradypus variegatus</i> , Schiz, 1825)	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material para processamento na UFRPE	06/2022	02/2023

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	JOAQUIM EVÊNCIO NETO	Orientador	359.091.534-04	Brasileira
2	TACIANA PONTES SPINELLI	Coleta e processamento das amostras	249.852.428-29	Brasileira

#### Observações e ressalvas

1	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
2	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0796260120220428

Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79626-1	Data da Emissão: 28/04/2022 10:33:27	Data da Revalidação*: 28/04/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Fabrício Bezerra de Sá	CPF: 695.225.374-20
Título do Projeto: Histologia da superfície ocular do Bicho-preguiça ( <i>Bradypus variegatus</i> , Schiz, 1825)	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

#### Observações e ressalvas

9	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.

#### Outras ressalvas

1	CPB João Pessoa-PB
---	--------------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Centro de Triagem de Animais Silvestres-CETAS Tangará, localizado na PE 16, Km 8,1 (antiga Estrada da Mumbeca), na Guabiraba, Recife	Recife-PE	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Bradypus variegatus</i>	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0796260120220428

Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79626-1	Data da Emissão: 28/04/2022 10:33:27	Data da Revalidação*: 28/04/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Fabrício Bezerra de Sá	CPF: 695.225.374-20
Título do Projeto: Histologia da superfície ocular do Bicho-preguiça ( <i>Bradypus variegatus</i> , Schiz, 1825)	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Xenarthra)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas (Serão realizadas coletas de olhos dos cadáveres de bicho-preguiça)

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal Rural de Pernambuco	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0796260120220428

Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79626-1	Data da Emissão: 28/04/2022 10:33:27	Data da Revalidação*: 28/04/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Fabrício Bezerra de Sá	CPF: 695.225.374-20
Título do Projeto: Histologia da superfície ocular do Bicho-preguiça ( <i>Bradypus variegatus</i> , Schiz, 1825)	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0796260120220428

Página 4/4