

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DE DIFERENTES
REGIÕES DA CÓRNEA DE SUÍNOS (*Sus scrofa domesticus*)
UTILIZANDO VERMELHO DE ALIZARINA E MICROSCOPIA ÓPTICA**

Lídia Luzia Clerot

PORTO ALEGRE 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Clerot, Lídia Luzia

MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DE DIFERENTES
REGIÕES DA CÓRNEA DE SUÍNOS (*Sus scrofa domesticus*)
UTILIZANDO VERMELHO DE ALIZARINA E MICROSCOPIA ÓPTICA
/ Lídia Luzia Clerot. -- 2015.
39 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. vermelho de alizarina . 2. endotélio da córnea.
3. microscopia óptica. 4. suínos. I. Pigatto, João
Antonio Tadeu, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DE DIFERENTES
REGIÕES DA CÓRNEA DE SUÍNOS (*Sus scrofa domesticus*)
UTILIZANDO VERMELHO DE ALIZARINA E MICROSCOPIA ÓPTICA**

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

Aluno: Lídia Luzia Clerot

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia.

PORTO ALEGRE 2015

**MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DE DIFERENTES
REGIÕES DA CÓRNEA DE SUÍNOS (*Sus scrofa domesticus*)
UTILIZANDO VERMELHO DE ALIZARINA E MICROSCOPIA ÓPTICA**

Aprovada em 24 de abril de 2015

Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

Prof. Dr. André da Silva Carissimi

Profª. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araújo

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, *in memoriam*, por ter sido um grande pai, fonte de inspiração, apoio, carinho e amor, que se sacrificou para que eu me tornasse a pessoa que hoje sou, e por ter me transmitido todos os seus ensinamentos, sendo o principal deles um bom caráter.

À minha mãe, amiga, conselheira, que me apoia, ajuda, acolhe e ama acima de tudo. Ao meu irmão querido, que, mesmo longe, sei que se alegra com minhas conquistas. À minha sogra e meu marido, que também me ajudaram nessa batalha. Aos meus filhos, lindos filhos, que suportaram minhas ausências, amo muitos vocês.

Aos meus colegas de setor, colegas do Hospital, que me ajudaram tanto com os pacientes, com os trabalhos e projetos, mas também me deram sua amizade, de valor inestimável, que espero que perpetue por toda a minha vida. E destas amizades, a de Paula Hünning ou, como a chamo, a santa Paula, minha segunda orientadora, suportando minhas perguntas, mensagens, e-mails, ligações e, ainda mais, me ajudando em todo o projeto - obrigada mais uma vez.

Aos animais, os quais tanto amo, principalmente aos suínos, essas criaturas fascinantes, inteligentes e não menos importantes.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, seus funcionários, professores e servidores, por terem me recebido tão bem.

É claro, por último, o melhor agradecimento, ao meu orientador, professor João Antonio Tadeu Pigatto, que me abriu as portas da oftalmologia veterinária e da pesquisa, a quem eu já admirava muito por seu caráter, amizade, sinceridade, ética e apoio aos colegas e, sobretudo, por seu conhecimento. Hoje, o admiro mais ainda, por seu pioneirismo na oftalmologia veterinária e por sua coragem. Quero que saiba, professor, que o senhor inspira a muitos e assim a mim continuará inspirando, e que estar aqui, convivendo com o senhor e seu grupo, modificou a minha vida, me trouxe felicidade, realização e me tornou com certeza uma pessoa melhor, parabéns pela pessoa que és.

RESUMO

O endotélio da córnea realiza a função importante na manutenção da transparência da mesma e regulação da hidratação do estroma. É composto por uma monocamada de células poligonais, achatadas e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea. Dentre as técnicas utilizadas para avaliação do endotélio, o vermelho de alizarina é uma técnica *in vitro* de baixo custo, de rápida e fácil execução. Objetivou-se avaliar as células do endotélio da córnea de suínos adultos em suas diferentes regiões, utilizando a coloração por vermelho de alizarina e microscopia óptica. Para esse estudo, foram utilizados 24 bulbos oculares de 12 suínos abatidos, 120 dias de idade, da raça Large White, adultos, machos ou fêmeas. As córneas foram removidas, e o endotélio corado com vermelho de alizarina dissolvido previamente em solução isotônica (0,2 g/100 ml), com pH ajustado para 4,2 com ácido clorídrico e avaliadas no microscópio óptico. Foram feitas fotografias das regiões central, inferior, lateral, medial e superior do endotélio da córnea e, após, foi realizado o estudo do formato de 100 células. Para análise estatística, foi utilizado o teste de variância (ANOVA por medidas repetidas). A percentagem média de células hexagonais na região central do globo ocular direito foi de $82,75\% \pm 6,355$, na região inferior $84,83\% \pm 4,108$, na lateral $86,0\% \pm 4,090$, na região medial $83,50\% \pm 2,447$ e na região superior $83,17\% \pm 4,345$. No globo ocular esquerdo, a percentagem média de células hexagonais na região central foi de $81,92\% \pm 2,539$, na região inferior foi de $83,67\% \pm 3,339$, na região lateral de $84,00\% \pm 3,618$, na região medial $84,17\% \pm 3,010$ e na região superior $82,83\% \pm 4,064$. Não houve diferença estatística significativa com relação à morfologia entre as diferentes regiões da córnea e entre os globos oculares direito e esquerdo. A coloração com vermelho de alizarina e a microscopia óptica foram eficazes para avaliação do formato das células do endotélio da córnea de suínos. Os valores obtidos, com relação ao formato das células da região central da córnea, representam todo o mosaico endotelial, podendo ser extrapolados para as regiões periféricas.

Palavras-chave : corante vital, formato celular, microscopia óptica.

ABSTRACT

The corneal endothelium perform are important function in maintaing corneal transparency and regulating stromal hydration. It consists of monolayer polygonal cells, fattened and joined, covering of the posterior surface of the cornea. Among the technique used for evaluating the endothelium, Alizarin red vital dye is a in vitro technique for low coast, fast and easy perform. This study aimed to evaluated the endothelial cells from adult pigs cornea in its different regions used the coloration by Alizarin red and, optical microscopy. For this study we used 24 eye bulbs of 12 slaughtered pigs, 120 day of age, of Large White breed, adults, male or female. The cornea was removed and the endothelium stained with Alizarin red, previously dissolved in isotonic solution (0,2g/100 ml), pH adjusted to 4,2 with hydrochloric acid, and evaluated in optical microscope. Photographs were taken of the central regions, lateral, medial and upper corneal endothelium. After the study was performed of 100 cells format. For statistical analysis we used the analysis of variance (ANOVA for repeated measures). The average percentage of hexagonal cells in the central region in the right eye was $82,75\% \pm 6,355$, in the lower $84,83\% \pm 4,108$, on lateral $86,0\% \pm 4,090$, in the medial region $83,50\% \pm 2,447$ and the upper region $83,17\% \pm 4,345$. In the left eye, the percentage of hexagonal cells in the central region was $81,92\% \pm 2,539$, in lower $83,67\% \pm 3,339$, in lateral $84,00\% \pm 3,618$, in medial $84,17\% \pm 3,010$ and in upper region $82,83\% \pm 4,064$. There was no statistically significant difference in the relation morphology between the different regions of the cornea and between the right and left eyeballs. Staining with Alizarin red and optical microscopy were effective for evaluating the shape of the endothelial cells of the pig cornea. The values obtained in relation of the shape of the central cornea cells, represent the entire endothelial mosaic and can be extrapolated to the peripheral regions.

Keywords: vital dye, cellular form, optical microscopy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 A Córnea.....	11
2.2 O Endotélio corneal.....	11
2.3 .Métodos de avaliação endotelial.....	14
2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	14
2.3.2 Microscopia especular.....	14
2.3.3Microscopia com corantes vitas.....	15
2.3.4 Microscopia confocal.....	16
3 ARTIGO.....	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	25
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais cuja integridade é essencial para a transparência corneal (TUFT & COSTER, 1990; HOPPENREIJS *et al.*, 1996). Essa função é realizada por meio de bombas metabolicamente ativas no endotélio da córnea (ABIB *et al.*, 2012).

Nos vertebrados, em sua maioria, as células endoteliais são compostas por células hexagonais, podendo ser encontradas células entre quatro a oito lados (PIGATTO, 2004 a).

Devido a sua importância para a transparência da córnea, as alterações endoteliais normalmente levam a edema da córnea muitas vezes irreversível (HOPPENREIJS *et al.*, 1996). Muitos fatores podem afetar sua morfologia, como o avanço da idade, fármacos, inflamação, aumento da pressão intraocular, procedimentos cirúrgicos intraoculares, entre outros (WARING *et al.*, 1982).

Além dos inúmeros estudos em humanos, o endotélio da córnea tem sido avaliado em algumas espécies, dentre elas, cavalos (ANDREW *et al.*, 2001), cães (PIGATTO *et al.*, 2008), avestruzes (PIGATTO *et al.*, 2008), gatos (FRANZEN *et al.*, 2010), jacarés (PIGATTO *et al.*, 2004b), coelhos (PIGATTO *et al.*, 2005a), pingüins (PIGATTO *et al.*, 2005b) e chinchilas (BERCHT *et al.*, 2015).

As células de suínos já foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura, o que demonstrou um padrão regular de células poligonais, com formato hexagonal predominante e bordas de células claras. Um núcleo oval, no centro da célula, cílios, as aberturas de vesículas pinocíticas, microvilosidades e barras de fronteira e dos limites das células com a aparência de ziguezague devido às interdigitações também foram observadas (ARANGO *et al.*, 2009).

Esse padrão celular também foi observado em outras espécies como os avestruzes, porém, sem a presença de cílios (PIGATTO *et al.*, 2009). Em cães, também foram encontradas células em sua maioria com seis lados, utilizando-se a microscopia especular (PIGATTO *et al.*, 2008).

O vermelho de alizarina é um corante intercelular que cora a membrana de Descemet, (IGNÁCIO *et al.*, 2005), podendo aumentar a visibilidade do contorno celular (RUGGERI *et*

al., 2010). Das técnicas preconizadas para estudo do endotélio da córnea *in vitro*, o vermelho de alizarina é uma técnica rápida, de baixo custo e fácil execução (SPERLING *et al.*, 1977).

Objetivou-se avaliar o formato das células do endotélio da córnea de suínos adultos (*Sus scrofa domesticus*) nas regiões central, inferior, lateral, medial e superior, utilizando o corante vermelho de Alizarina e a microscopia óptica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Córnea

A córnea faz parte da túnica fibrosa do olho junto com a esclera. A função principal da córnea é a refração dos raios luminosos (MURPHY *et al.*, 2012). Na maioria das espécies, a córnea é composta histologicamente por quatro camadas: epitélio mais externamente, estroma, membrana de Descemet e, a mais interna, o endotélio. As células endoteliais são de formato poligonal e decrescem em número com o envelhecimento (GELLAT *et al.*, 2007).

A córnea é suprida por nervos sensoriais derivados da ramificação do quinto nervo craniano. Sua transparência se deve à ausência de pigmentos, vasos sanguíneos, linfáticos e sua superfície epitelial não queratinizada, fibras nervosas com ausência de mielina, fibras colágenas dispostas de maneira organizada e pela função de deturgescência do endotélio (SLATTER, 2005).

2.1 Endotélio Corneal

O endotélio da córnea é a camada mais posterior da córnea e está em contato direto, em sua face anterior, com a membrana de Descemet, não havendo complexos juncionais, o que explica a facilidade de dano celular após cirurgias intraoculares (TUFT & COSTER, 1990). Em sua face posterior, mantém contato com o humor aquoso e, lateralmente, continua com o endotélio trabecular lateral (ABIB, 2000).

As células do endotélio da córnea se originam da crista neural, e em seus estados iniciais da embriogênese, proliferam-se formando uma monocamada de células poligonais irregulares. No estágio seguinte, a irregularidade é reduzida e as células se tornam simétricas e uniformes

(TUFT & COSTER, 1990; DOUGHTY *et al.*, 1997). Em humanos, a densidade celular média é de 3500 a 4000 células/mm² nos recém-nascidos e de 2500 células/mm² em adultos (SVEDBERGH & BILL, 1972).

Com o avanço da idade, ocorre redução progressiva da densidade celular. Em humanos, no primeiro ano de vida, devido ao aumento do diâmetro da córnea, ocorre um rápido declínio do número de células. Nos anos posteriores, essa perda se torna mais lenta, estimando-se uma perda anual de 0,52%, dos 20 aos 80 anos de idade (TUFT & COSTER, 1990).

As células endoteliais corneais pós-natal raramente se dividem, logo, a investigação do endotélio no intuito de quantificar as células endoteliais e fornecer dados morfométricos tem aplicação importante no que se refere à cirurgia intraocular, pois a manutenção da transparência da córnea e da regulamentação de sua hidratação depende de um processo metabolicamente ativo que ocorre no endotélio. Se a densidade endotelial for baixa, após o procedimento intraocular, o paciente pode sofrer descompensação endotelial, o que acarretará a perda de sua transparência (ABIB *et al.*, 2012).

Há presença de microvilosidades na membrana celular posterior, aumentando a superfície posterior das células endoteliais (BOTEON, 2000). As interdigitações são prolongamentos das membranas laterais que aumentam a superfície de contato celular, podendo, também, estar associadas à função de bomba ativa dessas células (OJEDA *et al.*, 2001). As células endoteliais possuem um citoplasma rico em organelas, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e aparelho de Golgi bem desenvolvido (TUFT & COSTER, 1990).

Os procedimentos intraoculares realizados no segmento anterior do globo ocular levam a danos no endotélio da córnea, nesse sentido, existe a necessidade de estudos envolvendo o conhecimento dos parâmetros endoteliais nas diferentes espécies envolvendo a cicatrização desta camada (MATSUDA *et al.*, 1985; SCHULT *et al.*, 1986; WALKOW *et al.* 2000; PIGATTO *et al.*, 2004a). Quando uma lesão corneana ocorre, as células endoteliais preenchem os espaços resultantes, logo, aumentam seu tamanho e perdem a forma e regularidade, levando, muitas vezes, à perda da funcionalidade.

Quanto à regeneração endotelial, algumas espécies, como seres humanos adultos, felinos, caninos e primatas, possuem uma atividade mitótica baixa, então, as células migram e aumentam de tamanho para manter a monocamada endotelial funcional (GWIN, *et al.* 1982). A população de células endoteliais decresce com a idade e quando ocorrem lesões, resultando em aumento de tamanho, modificação no formato celular, levando à infiltração de fluido no estroma e ao aumento na espessura corneal (CARLSON *et al.*, 1988, GULLAPALLI *et al.*,

1982, GWIN *et al.*, 1982).

A regeneração endotelial é espécie-dependente, existindo estudos que comprovam a assertiva em humanos, gatos, cães, suínos, coelhos e ratos (VAN HORN 1977; RAO *et al.*, 1978; BEFANIS, *et al.*, 1981; ILMONEN *et al.*, 1984; OLSEN & DAVANGER 1984; MATSUDA *et al.*, 1985; LANDSHMAN *et al.*, 1988). Em ratos e coelhos, a reparação envolve migração e alongamento celular nas margens da lesão (VAN HORN 1977; OLSEN & DAVANGER 1984; MATUDA *et al.*, 1985). Em suínos, as células endoteliais nas margens da lesão perdem o formato hexagonal, variando de tamanho e arranjando-se irregularmente para recobrir a lesão. Pode ocorrer, ainda, mitose concomitante (ILMONEN *et al.*, 1984).

Apesar de os suínos serem empregados como modelo experimental em oftalmologia, poucos são os estudos morfológicos e morfométricos sobre o endotélio da córnea desta espécie (VICENTI 2004; COLLIN & COLLIN, 1998). Em estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura, (PIGATTO *et al.*, 2009), encontrou-se um padrão de células com formato hexagonal predominante e bordas de células claras. Foi observado um núcleo oval, que incha no centro da célula, cílios (entre 1-4 por célula), as aberturas de vesículas pinocitóticas, microvilosidades e barras de fronteira e dos limites das células com a aparência de zigzag devido às interdigitações. Cílios estavam presentes apenas em algumas células periféricas e, perto deles, havia aberturas de vesículas pinocitóticas, como pequenos buracos. Microvilosidades estavam presentes na superfície de todas as células endoteliais, como numerosos pontos brancos; constatou-se, no endotélio do suíno, um padrão celular hexagonal semelhante ao relatado em outros mamíferos, aberturas pinocíticas, ou seja, pequenos orifícios na superfície das células, posterior e lateral, como descrito em macacos e humanos. Porém, não foram encontrados cílios como tem sido relatado em outras espécies.

A córnea suína tem sido amplamente utilizada em pesquisa na oftalmologia (LI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2010; TAO *et al.*, 2013). Alguns estudos têm utilizado o suíno como modelo experimental (ZENG *et al.*, 2001), comparando a córnea suína com a humana, como uma substituta, uma vez que há a dificuldade de se conseguir córnea de humanos para a pesquisa.

A estrutura celular e morfometria do endotélio de suínos adultos foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura. Foram encontradas células em padrão hexagonal, núcleo central e oval, presença de cílios, microvilosidades e vesículas pinocíticas. Os cílios são presentes apenas na periferia das células. A área central da córnea encontrada foi de $130,7 \pm 11,6 \mu\text{m}^2$, na periferia $127,6 \pm 12,3 \mu\text{m}^2$. A área celular no centro da córnea foi de $7,625.2 \pm 998,2 \mu\text{m}^2$, e na periferia de $7,909.7 \pm 776,3 \mu\text{m}^2$, havendo uma diferença significativa entre

as duas regiões (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

2.1 Métodos de Avaliação Endotelial

2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Apesar da microscopia eletrônica de varredura (MEV) ser amplamente utilizada na avaliação da ultraestrutura endotelial de vertebrados, ela é bastante limitada, devido às diminuições das dimensões da córnea que ocorrem como resultado do preparo do tecido, sendo a média de retração tecidual de 29,7 % (VAN HORN, 1980).

A técnica também permite avaliar os efeitos dos medicamentos e procedimentos cirúrgicos no endotélio da córnea, morfologia das bordas celulares e padrão do mosaico endotelial (DOUGTHY, 1997).

A MEV é o método mais utilizado para se obterem informações sobre a ultraestrutura endotelial e tem sido empregada amplamente em estudos relacionados à morfologia corneana (OJEDA *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2004a; PIGATTO *et al.*, 2005a; RODRIGUES *et al.*, 2006; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009) e também na avaliação da toxicidade do endotélio por fármacos (ALP *et al.*, 2000; HOLLEY *et al.*, 2001; LIOU *et al.*, 2004).

2.3.2 Microscopia Especular

A microscopia especular é uma técnica amplamente utilizada para análise quantitativa e qualitativa das células endoteliais da córnea. Sua importância é vital na prática clínica, nos pré-operatórios de cirurgias intraoculares e na seleção da córnea doadora para transplantes (MELLO, 2007).

O princípio da microscopia especular se dá quando o feixe luminoso incide sobre a superfície da córnea, ocorrendo três efeitos: reflexão, transmissão e absorção, sendo, destes, o mais importante o de reflexão, que ocorre num ângulo de recepção igual ao da incidência. Logo, parte do feixe luminoso que incide sobre o endotélio reflete de forma especular, sendo capturado pelo aparelho de microscopia especular da córnea, formando a imagem (PHILIPS, *et al.*, 2005).

Maurice (1968) foi quem primeiramente descreveu a microscopia especular, proporcionando um grande avanço na pesquisa do endotélio corneal. Laing *et al* (1975), modificaram o microscópio desenvolvido por Maurice (1968), permitindo exames *in vivo* e gravação de imagens. Kaufmann (1976) conseguiu realizar contagem celular e melhorou a resolução das imagens obtidas.

Desde então, várias pesquisas foram realizadas em humanos e animais na avaliação celular do endotélio da córnea, morfometria e morfologia, de (VICENTI, 2004).

A microscopia especular pode fornecer uma análise morfológica não invasiva da camada de células do endotélio da córnea em indivíduos, em ensaios clínicos, fornecendo uma medida das reservas fisiológicas de células endoteliais no envelhecimento, procedimentos cirúrgicos oculares e exposição a fármacos (MACCAREY *et al.*, 2008).

2.3.3 Microscopia com Corantes Vitais

Métodos histológicos associados aos corantes vitais são utilizados para avaliar a viabilidade, grau de dano à superfície celular e morfologia endotelial. Essas técnicas são realizadas após a excisão da córnea e incubação desta em corantes, de maneira direta ou indireta. Os corantes mais utilizados são nitrato de prata, hematoxilina, vermelho de alizarina e azul de tripano. A imagem resultante dependerá da seletividade topográfica do método de coloração utilizado (SPERLING, 1977).

As técnicas fornecem variações, podendo haver distorção das células endoteliais, devido à pressão exercida no momento de montagem para a captura da imagem (DOUGTHY, 1997). Mesmo existindo limitações, a microscopia óptica associada aos corantes vitais é um método

rápido, prático e simples (TAYLOR & HUNT, 1981). Avaliações toxicológicas e quanto à estocagem em banco de olhos têm sido realizadas utilizando esta técnica (DOUGHTY, 1997; WERNER *et al.*, 1998).

O vermelho de alizarina é um corante celular que cora a membrana de Descemet amplamente utilizado (IGNÁCIO *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2006; SAAD *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.* 2009; TERRY *et al.*, 2009; RUGGERI *et al.*, 2010, LANDRY *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2012). O azul de tripano é muito utilizado em combinação com o vermelho de alizarina para avaliação do núcleo, das bordas celulares do endotélio e áreas com ausência de células endoteliais (SPERLING, 1977; TAYLOR & HUNT, 1981), sendo essas duas colorações as mais utilizadas para determinar morte celular ou lesões nas áreas não vistas à microscopia especular (SAAD, *et al.*, 2008).

2.3.4 Microscopia Confocal

O endotélio da córnea tem sido avaliado, tanto saudável quanto com enfermidades, através da microscopia especular. No entanto, ocorrem limitações nos resultados obtidos, pois há necessidade de um córnea transparente, com superfície endotelial lisa e suave, para se obter reflexão especular. (BOURNE *et al.*, 1976; LAING *et al.*, 1998) . Apesar de as imagens obtidas pelo microscópio especular de contato serem superiores às obtidas com o de não contato, este último tem melhores resultados para a maioria das aplicações (MODIS *et al.*, 2002).

O microscópio confocal foi recentemente introduzido e cujo princípio é bem documentado. Em resumo, uma fonte de luz passa através do orifício e é focado um ponto dentro de um espécime por uma lente objetiva. A luz é refletida de volta, a partir da amostra, é focalizada no detector por passagem, através de uma abertura de orifício, enquanto que, fora do foco de luz, é bloqueada. Ao mudar a posição do plano focal, são obtidas imagens em diferentes profundidades do espécime (CHIOU *et al.*, 1999). Permite o exame de todos os componentes da córnea, camada por camada, de forma não invasiva (MAURICE, 1968).

Avaliações do endotélio da córnea normal e transparente são semelhantes quando realizadas pela microscopia especular e sem contato ou microscópio confocal. No entanto, a

microscopia confocal mostrou-se superior em relação à microscopia especular de não contato quando uma córnea doente foi examinada (HARA *et al*, 2008).

3 ARTIGO

O artigo a seguir foi escrito de acordo com as normas da revista *Clinical & Experimental Ophthalmology* (ISSN 1442-9071) e será traduzido para o inglês no momento da sua submissão.

MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DE DIFERENTES REGIÕES DA CÓRNEA DE SUINOS (*Sus scrofa domesticus*) UTILIZANDO VERMELHO DE ALIZARINA E MICROSCOPIA ÓPTICA

Lídia L. Clerot¹, Paula S. Hünning², João A. T. Pigatto³

¹Mestranda–Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS

²Doutoranda– Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS

³Professor Associado–Faculdade de Medicina Veterinárias – UFRGS

RESUMO

O endotélio da córnea realiza a função importante da transparência da córnea e regulação da hidratação do estroma. É composto por uma monocamada de células poligonais, achatadas e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea. Entre as técnicas utilizadas para a avaliação do endotélio da córnea, o vermelho de alizarina é uma técnica *in vitro*, de baixo custo, rápida e de fácil execução. Objetivou-se avaliar as células do endotélio da córnea de suínos adultos em suas diferentes regiões, utilizando a coloração por vermelho de alizarina e microscopia óptica. Para esse estudo, foram utilizados 24 bulbos oculares de 12 suínos abatidos, da raça Large White, machos ou fêmeas, dos quais, foram removidas as córneas e o endotélio, corados com o corante vital vermelho de alizarina e avaliadas nomicróscópio óptico. Foram realizadas fotografias das regiões central, inferior, lateral, medial e superior do endotélio da córnea, e após, procedeu-se a contagem de 100 células. Para análise estatística, foi utilizado o teste de variância ANOVA por medidas repetidas. O percentual de células hexagonais na região central do globo ocular direito foi de $82,75\% \pm 6,3$, na região inferior $84,8\% \pm 4,1$, na lateral $86,0\% \pm 4,0$, na região medial $83,5\% \pm 2,4$ e na região superior $83,1\% \pm 4,3$. No globo ocular esquerdo, a percentagem média de células hexagonais na região central foi de $81,9\% \pm 2,5$, na região inferior $83,6\% \pm 3,3$, na região lateral $84,0\% \pm 3,6$, na região medial $84,1\% \pm 3,0$ e na região superior $82,8\% \pm 4,0$. Em relação às células com cinco lados, a percentagem média do globo ocular direito região central foi de $7,50\% \pm 3,6$, na região inferior $7,33\% \pm 2,18$, na região lateral $6,5\% \pm 3,0$, na região medial $7,7\% \pm 2,1$ e na região superior $7,6\% \pm 1,7$. No globo ocular esquerdo, a percentagem média na região central foi de $7,9\% \pm 1,7$, na região inferior $7,8\% \pm 2,5$, na região lateral $7,5\% \pm 2,0$, na região medial $7,3\% \pm 1,9$ e na superior $7,6\% \pm 2,7$. Também foram avaliadas as percentagens de células com sete lados. No globo ocular direito, na região central, foi encontrada uma percentagem média de $9,0\% \pm 2,6$, na região inferior $7,7\% \pm 2,3$, na região lateral $7,5\% \pm 2,0$, na região medial $8,7\% \pm 2,9$ e na região superior $9,5\% \pm 3,4$. No globo ocular esquerdo, a percentagem média de células com sete lados na região central foi de $10,1\% \pm 2,8$, na região inferior $9,6\% \pm 2,5$, na região lateral $8,5\% \pm 2,9$, na região medial $8,5\% \pm 2,4$ e na região superior $9,6\% \pm 2,7$. Não houve diferença estatística significativa com relação à morfologia entre as diferentes regiões da córnea e entre os globos oculares direito e esquerdo. A coloração com vermelho de alizarina associada à microscopia óptica foi eficaz para a avaliação do formato das células do endotélio da córnea de suínos. Os valores obtidos, com relação ao formato das células do endotélio da região central da córnea, representam todo o mosaico endotelial, podendo ser extrapolados para as regiões periféricas.

Palavras-chave: corante vital, formato celular, microscopia óptica.

ABSTRACT

The corneal endothelium perform are important function in maintaing corneal transparency and regulating stromal hydration. It consists of monolayer polygonal cells, fattened and joined, covering of the posterior surface of the cornea. Among the technique used for evaluating the endothelium, Alizarin red vital dye is a in vitro technique for low coast, fast and easy perform. This study aimed to evaluated the endothelial cells from adult pigs cornea in its different regions used the coloration by Alizarin red and, optical microscopy. For this study we used 24 eye bulbs of 12 slaughtered pigs, 120 day of age, of Large White breed, adults, male or female. The cornea was removed and the endothelium stained with Alizarin red, previously dissolved in isotonic solution (0,2g/100 ml), pH adjusted to 4,2 with hydrochloric acid, and evaluated in optical microscope. Photographs were taken of the central regions, lateral, medial and upper corneal endothelium. After the study was performed of 100 cells format. For statistical analysis we used the analysis of variance (ANOVA for repeated measures). The average percentage of hexagonal cells in the central region in the right eye was $82,75\% \pm 6,355$, in the lower $84,83\% \pm 4,108$, on lateral $86,0\% \pm 4,090$, in the medial region $83,50\% \pm 2,447$ and the upper region $83,17\% \pm 4,345$. In the left eye, the percentage of hexagonal cells in the central region was $81,92\% \pm 2,539$, in lower $83,67\% \pm 3,339$, in lateral $84,00\% \pm 3,618$, in medial $84,17\% \pm 3,010$ and in upper region $82,83\% \pm 4,064$. There was no statistically significant difference in the relation morphology between the different regions of the cornea and between the right and left eyeballs. Staining with Alizarin red and optical microscopy were effective for evaluating the shape of the endothelial cells of the pig cornea. The values obtained in relation of the shape of the central cornea cells, represent the entire endothelial mosaic and can be extrapolated to the peripheral regions.

Key words: vital dye, cellular form, optical microscopy

INTRODUÇÃO

A córnea é a camada transparente anterior da túnica fibrosa externa do globo ocular. Na maioria das espécies, ela é composta por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio¹⁻². Ela realiza inúmeras funções em conjunto com a esclera, dentre elas, a de proporcionar suporte estrutural e proteção do conteúdo intraocular e na refração e transmissão da luz³.

A transparência da córnea é essencial para o seu funcionamento, em virtude da ausência de vasos sanguíneos e pigmentos, e organização da estrutura celular das fibras de colágeno¹. Além disso, o endotélio da córnea possui papel fundamental na permanência da transparência da córnea, com o controle de hidratação do estroma, que é realizado por meio de bombas metabolicamente ativas no endotélio da córnea⁴⁻⁵.

Em 1919, Vogt descreveu a aparência do endotélio da córnea normal e doente usando o microscópio especular, trazendo uma grande compreensão das patologias endoteliais e uma estimativa da densidade celular antes e após a cirurgia⁶. A análise endotelial inclui avaliação de densidade celular, área celular, polimegatismo e pleomorfismo. Esses parâmetros morfométricos e morfológicos são importantes para avaliar as condições do endotélio da córnea⁷.

Além dos inúmeros estudos em humanos, o endotélio da córnea tem sido avaliado em algumas espécies, dentre elas, cavalos, cães, avestruzes, gatos, jacarés, coelhos e pinguins⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹²⁻¹³.

As células de suínos já foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura, o que demonstrou um padrão regular de células poligonais, com formato hexagonal predominante e bordas de células claras. Um núcleo oval que incha no centro da célula, cílios (entre 1 e 4 por célula), aberturas de vesículas pinocíticas, microvilosidades, barras de fronteira e dos limites das células com a aparência de zigzag devido às interdigitações¹⁴. Esse padrão celular também foi observado em outras espécies como os avestruzes, porém sem a presença de cílios¹⁵. Em cães, também foram encontradas células em sua maioria com seis lados utilizando-se a microscopia especular¹⁵. VICENTI (2010) avaliou o endotélio da córnea de suínos através da microscopia especular, no entanto, sua análise limitou-se apenas à região central¹⁶.

Vários são os métodos utilizados na avaliação do endotélio da córnea, investigação clínica e *in vitro*. Dentre eles, a coloração por vermelho de alizarina é um método *in vitro*, de fácil execução, rápido e barato¹⁷. O vermelho de alizarina é um corante intercelular que cora a membrana de Descemet, podendo aumentar a visibilidade do contorno celular e permitir uma estimativa fidedigna dos parâmetros morfométricos e morfológicos das células endoteliais da córnea¹⁸⁻¹⁹.

Em suínos, são escassos os estudos avaliando-se o endotélio da córnea utilizando a coloração por vermelho de alizarina e, muito menos, comparando-se os parâmetros morfométricos nas diferentes regiões da córnea com esta coloração, o que nos objetivou a realizar esse estudo. Por outro lado, a espécie tem se tornado frequente na prática clínica veterinária, pois os chamados “mini-porcos” vêm ganhando espaço como animais de estimação. No entanto, não foram encontrados na literatura estudos relacionados à morfologia do endotélio de diferentes regiões da córnea de suínos. Objetivou-se avaliar o formato das células endoteliais de diferentes regiões da córnea de suínos utilizando o vermelho de alizarina e a microscopia óptica.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi conduzido conforme as normas da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) e foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Foram avaliados 24 bulbos oculares, oriundos de 12 suínos, machos ou fêmeas, com 120 dias de idade e peso médio de 170 Kg, da raça Large White, obtidos no abatedouro Agroindústria Salvadori Embutidos, no município de Roca Sales, no Rio Grande do Sul.

Foram estudados globos oculares retirados em até seis horas *post-mortem*. Apenas bulbos oculares saudáveis foram incluídos no estudo. Todos os olhos foram submetidos a exame oftálmico que incluiu biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa, SL 15, Nagoya, Japão) e prova da fluoresceína.

Após o óbito dos animais, foi realizada enucleação subconjuntival, e os olhos foram mantidos em câmara úmida e caixa refrigerada até a coleta das córneas.

Logo, a córnea foi removida em sua totalidade e posicionada em lâmina, com o endotélio voltado para cima. Foram realizadas quatro incisões (em cruz) para melhor acomodação da córnea na lâmina.

Foi realizada a coloração com vermelho de alizarina (Alizarin red S, Sigma Aldrich) dissolvido previamente em solução isotônica (0,2 g/100 ml) e o pH ajustado (para 4,2) com ácido clorídrico. Foram instiladas três gotas desta solução sobre o endotélio, as quais permaneceram sobre este por 90 segundos. Após, a córnea foi lavada por cerca um minuto em solução salina balanceada, para a remoção do corante, e submetida à microscopia óptica para avaliação das regiões celulares central, inferior, lateral, medial e superior do endotélio.

Posteriormente, foram realizadas análise e fotomicrografias das regiões central, superior, inferior, lateral, medial e superior da córnea.

Para avaliação das imagens, foi utilizado um aumento de 40 vezes nas diferentes regiões da córnea. Para análise da morfologia endotelial, foram avaliadas 100 células. Utilizando o recurso *Paint* (Windows, da Microsoft), marcou-se o número de lados e também as células circunvizinhas até se alcançar o total desejado. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo examinador.

A análise estatística foi realizada pelo Núcleo de Assistência Estatística (NAE) da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), utilizando o método ANOVA por medidas repetidas.

RESULTADOS

Utilizando-se o microscópio óptico e o corante vermelho de alizarina, foi possível analisar e obter imagens do endotélio da córnea de suínos de todas as regiões da córnea. Foram observadas células poligonais, uniformes e contínuas em todas as regiões estudadas (Figuras 1 e 2).

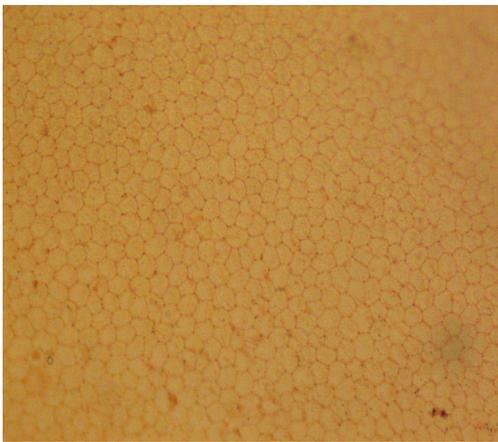


Figura 1

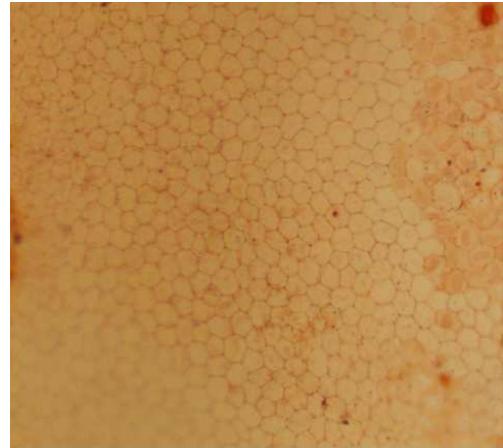


Figura 2

Figura 1– Fotomicrografia do endotélio da região central da córnea de suíno hígido, corado com vermelho de alizarina. Observam-se células poligonais. Aumento de 40 X.

Figuras 2 –Fotomicrografia do endotélio da região periférica da córnea de suíno hígido, corado com vermelho de alizarina. Observam-se células poligonais. Aumento de 40 X.

Os resultados das percentagens médias das células com sete, seis e cinco lados em ambos

os globos oculares, estão representados a seguir.

GLOBO OCULAR/ REGIÃO	GOD 7	GOD 6	GOD 5	GOE 7	GOE 6	GOE 5
CENTRAL	9,0	82,7	7,5	10,1	82,9	7,9
INFERIOR	7,0	84,8	7,33	9,6	83,6	7,8
LATERAL	7,5	86,0	6,5	8,5	84,0	7,5
MEDIAL	8,7	83,5	7,7	8,5	84,1	7,3
SUPERIOR	9,5	83,1	7,6	9,6	82,3	7,6

GOD 7- Percentagem média de células com sete lados no globo ocular direito

GOD 6- Percentagem média de células com seis lados no globo ocular direito

GOD 5- Percentagem média de células com cinco lados no globo ocular direito

GOE 7- Percentagem média de células com sete lados no globo ocular esquerdo

GOD 6- Percentagem média de células com seis lados no globo ocular esquerdo

GOD 5- Percentagem média de células com cinco lados no globo ocular esquerdo

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Entre os parâmetros utilizados para avaliação endotelial, podem ser incluídos a área celular, a densidade e o formato das células endoteliais⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹¹⁻¹³⁻²⁰⁻²¹⁻²²⁻²³⁻²⁴.

Várias são as técnicas empregadas, sendo elas *in vivo* ou *in vitro*. Das técnicas *in vivo*, a mais utilizada para a análise endotelial é a microscopia especular. Esta fornece parâmetros do mosaico endotelial de forma não invasiva, sendo útil também no pré e pós-cirúrgico de cirurgias intraoculares²³⁻²⁴⁻²⁵. Nas técnicas *in vitro*, a coloração por vermelho de alizarina é amplamente utilizada por ser rápida, barata e de fácil execução¹⁸⁻¹⁹⁻²⁸.

A opção do estudo *in vitro* facilitou o trabalho, pois as amostras foram obtidas de animais abatidos para o consumo. Os bulbos oculares fornecidos foram viáveis para o propósito, o que corrobora com outros estudos utilizando olhos enucleados por via subconjuntival e conservados em câmara úmida até seis horas *post-mortem* sem que houvesse perda das estruturas celulares¹⁴⁻¹⁷⁻³⁰.

As imagens obtidas pela microscopia óptica no presente estudo tornaram possível a avaliação do mosaico endotelial dos suínos, a fim de precisar a morfometria do endotélio da córnea destes em suas diferentes regiões.

A técnica do uso do vermelho de alizarina já foi descrita e comparada utilizando diversas concentrações. Park *et al* (2012) comparam a alizarina nas concentrações de 1% e 0,5%, concluindo que a concentração mais baixa demarcou mais as bordas celulares, porém, com um tempo de ação maior sob o endotélio da córnea de cabras²⁷.

No presente estudo, com o uso do vermelho de alizarina foi possível a visualização do mosaico endotelial, definindo o contorno celular e facilitando a contagem dos lados da célula. A preparação do corante vital se baseou em técnicas já descritas com sucesso, quando utilizada na concentração de 0,2%²⁷⁻²⁸. É um método efetivo que demarca as margens celulares, sendo também rápido e barato. O que corrobora com outros autores que utilizaram a mesma técnica¹⁹⁻²⁷⁻³⁰⁻³¹⁻³².

Além de possibilitar a avaliação da morfologia endotelial, a alizarina vermelha tem sido utilizada também para avaliar a toxicidade de medicamentos ou substâncias para o mosaico endotelial, associada ou não com outros corantes³³⁻³⁴⁻³⁵.

Gerosky & Edelhauser (1986), em estudo comparando o vermelho de alizarina e a

microscopia especular em coelhos e humanos, observaram que o uso do vermelho de alizarina é uma técnica eficaz para a análise morfométrica do endotélio³¹. O mesmo resultado foi encontrado por Matsuda *et al* (1985), porém, percebendo-se um decréscimo na área celular utilizando o corante em comparação com a microscopia celular, tanto em coelhos como em humanos³⁶.

No presente estudo, foi observado que o endotélio de suínos adultos é constituído de uma monocamada de células poligonais. Tendo sido analisadas 100 células endoteliais de cada região, a fim de se manter um padrão. Também foi feita a marcação destas com o número de lados de maneira contínua pelo mesmo examinador, utilizando-se o recurso *Paint* (Windows, da Microsoft) para facilitar a contagem e a não ocorrência de erros por parte do examinador, ou seja, evitar que fosse contada mais de uma vez a mesma célula. Quanto ao número de células a serem avaliadas, há divergência entre os autores, variando de 30, 50, 75 até 100 células³⁷⁻³⁸⁻³⁹. Recente estudo tem utilizado software que marca o contorno das células endoteliais a fim de facilitar a contagem destas e diminuir o erro humano, porém, este ainda não se encontra disponível¹⁹.

A escolha da espécie para o estudo deve-se ao fato de que, apesar do suíno ser um modelo experimental em oftalmologia, poucos são os estudos morfológicos e morfométricos sobre o endotélio da córnea deste espécie¹⁶⁻⁴⁰. O conhecimento do formato celular de diferentes regiões da córnea permitirá que futuros estudos experimentais possam ser realizados e extrapolados para a espécie humana⁴¹.

Existem inúmeros métodos de avaliação do endotélio da córnea *in vivo* e *in vitro*. A microscopia especular é uma técnica *in vivo*, amplamente utilizada para avaliar a área celular e o formato endotelial⁴⁻⁵⁻¹⁵⁻²². As limitações dessa técnica incluem a dificuldade de diferenciação entre células degeneradas e saudáveis, quanto ao uso em animais de grande porte, devido à necessidade de contenção²⁸, ou até mesmo nos menores como os silvestres, que podem necessitar de sedação, acrescentando tanto no custo do exame quanto no risco de vida para o paciente. Outro fator seria o custo alto do aparelho e a dificuldade deste em capturar imagens de áreas lesadas do endotélio da córnea¹³.

Estudos comparando a região central com a região periférica do endotélio da córnea apresentam resultados semelhantes, em que a densidade celular é maior na região central do que na periférica⁷⁻²⁴⁻²⁸. Entretanto, Amann *et al* (2003) observaram uma maior concentração celular de densidade endotelial na região periférica em comparação à região central⁴².

No presente estudo, apenas comparou-se a relação entre as células com cinco, seis e

sete lados, entre as diferentes regiões da córnea, e comparando-se estas entre os bulbos oculares direito e esquerdo. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas em relação ao pleomorfismo nas regiões estudadas entre os bulbos dos olhos esquerdos e direitos. Afirmativa essa que corrobora com o resultado obtido em estudos prévios⁸⁻⁹⁻¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻³⁹.

Os valores obtidos com relação ao formato das células do endotélio da região central podem ser extrapolados para as regiões periféricas da córnea de suínos hípidos.

REFERÊNCIAS

1. Gellat KN. Diseases and surgery of canine cornea and sclera. In: Gellat KN. *Veterinary Ophthalmology*, 4th edn. Blackwell publishing, 2007; p. 690- 752.
2. Turner SM. *Oftalmologia de pequeños animales*. Elsevier Saunders: España, 2010; p. 370.
3. Maggs DJ. Córnea e esclera. In: Slatter JD. *Fundamentos da Oftalmologia Veterinária*, 3ed. São Paulo: Rocca, 2005; p. 283-338.
4. Abib FC. *et al.* Corneal Specular Microscopy with reability and reproducibility. 1. ed. Rio de Janeiro-Brasil: Editora Cultura Médica, 2006.
5. Abib FC. *et al.* The endothelial sample size analysis in corneal specular microscopy clinical examination. *Cornea* 2012; **31**: 546-50.
6. Tuft SJ. & Coster DJ. The corneal endothelium, *Eye* 1990; **4**: 389- 424.
7. Gwin RN. *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol.* 1982; **22**: 267-271.
8. Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG. & Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanated horses. *Am j Vet Res* 2001; **62**: 479-82.
9. Pigatto JAT. *Extracapsular extração do cristalino, comparativamente à facuemulsificação, com enfoque nas repercussões endoteliais corneanas em cães (Canis familiares- Linnaeus 1758)*. 2004, 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.
10. Pigatto JAT. *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciênc. Rural*, 2009; **39**: 926-29.
11. Franzen AA. *et al.* Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell

morphology and morphometry in enucleated cats eyes. *Vet Ophthalmol* 2010; **13**: 222-226.

12. Pigatto JAT. *et al.* Análise morfológica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2005a; **33**: 41-45.

13. Pigatto JAT. *et al.* Corneal endothelium of magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Zoo Wildl Med* 2005b; **36**:702-705.

14. Tamayo-Arango LJ. Ultrastructural morphology and morphometry of the corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciênc Rural*. 2009; **39**: 117-122.

15. Pigatto JAT. *et al.* Morphology analysis of the corneal endothelium in eyes of dog using specular microscopy. *Pesq Vet Bras*, 2008; **28**: 427-430.

16. Vicente FM. *Morfologia e morfometria do endotélio corneano de suínos (Sus scrofa domesticus, LINNAEUS, 1758) à microscopia especular*.2004, 61p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

17. Sperling S. Combined stained of corneal endothelium by alizarine red an trypan blue. *Acta Ophthalmol*, 1977; **55**: 573-580.

18. Rodrigues EB. *et al.* The use of Vital Dyes in Ocular Surgery. *Surv Ophthalmol*, 2009; **54**: 576-517.

19. Ruggeri A, Scarpa F, Luca M. *et al.* A system for the automatic estimation of morphometric parameters of corneal endothelium in alizarine red-stained images. *Br J Ophthalmol* 2010; **94**: 643-647.

20. Ojeda JL. *et al.* The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection -SEM approach. *Journal of Anatomy*,2001; **5**: 567-576.

21. Abib FC, Barreto J. Behaviour of corneal endothelial density over a lifetime. *J Cataract and Refrac surg* 2001; **27**:1574-1578.

22. Pigatto JAT *et al.* Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Braz J Vet Res An Sci*2006; **43**:476-480.

23. Abib FC. Microscopia especular da cornea: Manual e atlas. 1.ed. Rio Med Livros, Rio de Janeiro. 2000; 140p.
24. Maccrarey BE, Edelhauser HF, Lynn M. Review of corneal endothelial microscopy for FDA clinical trials of refractive products, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea*, 2008; v. **27**:1-16.
25. Bercht BS *et al.* Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. *Vet Ophthalmol* 2015; **18**:137-142.
26. Ledbetter EC, Scarlett JM. *In vivo* confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Vet Ophthalmol* 2009; **12**: 57-64.
27. Park S *et al.* Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea*. 2012; **31**:1476-1479.
28. Taylor M.J, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Brit J Ophthalmol*, 1981; **65**:815-819.
29. Saad HA, Terry M. A, Shamie, N.*et al.* An Easy and Inexpensive Method for Quantitative Analysis of Endothelial Damage by Using Vital Dyes Staining and Adobe Fotoshop Software . *Cornea*,2008; **27**:818-824.
30. Spence DJ, Peymann GA. A new technique of vital staining of the corneal endothelium. *Ophthalmology*; 1976, **15**:1000-1002.
31. Geroski DH, Edelhauser, HF. Morphometric analysis of the corneal endothelium. *Investigative Ophthalmol Vis Sci*,1989; **30**:254-259.
32. Faganello CS. Morfologia celular endotelial de diferentes regiões da córnea de equinos (*Equus caballus*) com a coloração vermelho de Alizarina. 2014, 61p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal- Equinos, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS.
33. Werner LP *et al.* Toxicity of xylocaine to rabbit corneal endothelium. *J Cataract and Refract Surg* 1998; **24**:1371-1376.

34. Oh JY *et al.* Short-term effect of intracameral triamcinolone acetonide on corneal endothelium using the rabbit model. *Eye*, 2007; **21**:812-818.
35. Landry H *et al.* Corneal endothelial toxicity of Air and SF 6. *Cornea*. 2011; **52**: 2279-2286.
36. Matsuda M *et al.* Cellular migration and morphology in corneal wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985;**26**: 443-449.
37. Laing RA. *et al.* Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res*, 1976; **22**:587-594.
38. Binder P; Akers P, Zavala E. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmology*, 1979; **10**:1831-1847.
39. Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbit. *J Vet Med Sci*. 1985; **57**:273-277.
40. Collin SP, Collin HB. A comparative study of corneal endothelium in vertebrates. *Clin Exp Optom*, 1998; **81**:245-254.
41. Zeng Y *et al.* A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *J Biomech*, 2001; **34**:33-537.
42. Amann J *et al.* Increase Endothelial Cell Density in Paracentral and Peripheral Regions of the Human Cornea. *Am J Ophthalmol*, 2003. v. **135**: 584- 590.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse estudo, foi possível evidenciar que a metodologia utilizada para avaliação das células do endotélio da córnea de suínos foi eficaz, sendo esta desde sua coleta, armazenamento, coloração, e observação através da microscopia óptica.

Logo, este trabalho propiciou um maior conhecimento da morfometria dessas células e da relação delas nas diferentes regiões da córnea dos suínos.

REFERÊNCIAS

ABIB, F. C. *et al.* The endothelial sample size analysis in corneal specular microscopy clinical examination. **Cornea**, New York, v. 31, n. 5, p. 546-550, may 2012.

ABIB, F.C. **Microscopia especular da córnea**: manual e atlas. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p.140.

ALP, B. N. *et al.* The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. **Cornea**, New York, v. 19, n. 4, p. 546-550, Jul 2000.

ANDREW, S. E *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatised horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 479-82, 2001.

BEFANIS, B J.; PFEIFER, R. L.; BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, n. 4, p.590-595, Apr 1981.

BERCHT, B. S. *et al.* Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchilas (*Chichilla lanigera*) *in vivo*. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 137-142, 2015.

BOTEON, J.E. Histology do endotélio corneano. In: ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea**: Manual e Atlas. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000, p. 3-5.

BOURNE, W. M.; KAUFMANN, H. E. Specular microscopy of human corneal endothelium *in vivo*. **American journal of Ophthalmology**, New York, v. 81, n. 3, p. 319-323, Mar 1976.

CARLSON, K. H. *et al.* Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. **Experimental Eye Reserch**, London, v. 47, n. 1, p. 227-241, Jul 1988.

CHIOU, A. G. *et al.* Characterization of epithelial down growth by confocal microscopy. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, v. 25, n.8, p. 1172-1174, Aug 1999.

COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. A comparative study of corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, Richmond, v. 81, n. 6, p. 245-254, Nov. /Dec. 1998.

DOUGHTY, M. J.; SPITERI, M.; DILTS, D. M. Determination of the unit size of the corneal endothelial cell mosaic from Fourier component image analysis. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 29, n. 2, p. 229-238, Apr 1997.

FRANZEN, A. A. *et al.* Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell

- morphology and morphometry in enucleated cats eyes. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 13, n.4, p. 222-226, Jul 2010.
- GELLAT, K. N. Diseases and surgery of canine cornea and sclera. In: **Veterinary Ophthalmology**. 4th ed. Blackwell, 2007. p.1672.
- GULLAPALLI, N. *et al.* Cell size-shape relationship in corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology Vision & Science**. v. 22, n. 2, p. 271-274, 1982.
- GWIN, R. N. *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 22, n.2, p. 267-271, Feb 1982.
- HARA, M. *et al.* Comparison of Confocal Biomicroscopy and Noncontact Specular for Evaluation of the Corneal Endothelium. **Cornea**, Hagerstown, v. 22, n. 6, p. 512-515, Aug 2003.
- HOLLEY, G. P. *et al.* Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability. An in vitro study. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, v. 28, n. 6, p. 1027-1033, Jun 2001.
- HOPPENREIJS, V. P. *et al.* Corneal endothelium and growth factors. **Survey of Ophthalmology**, New York, v. 41, n.2, p. 155-164, Sept./oct.1996.
- IGNÁCIO, T. S. *et al.* A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 139, n. 2, p. 325-330, Feb 2005.
- ILMONEN, M. *et al.* Initial healing of the posterior corneal surface following perforating trauma in guinea pig: a scanning electron microscope study. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 62, n.5, p. 787-795, Oct 1984.
- LAING, R. A.; SANDSTROM, M. M.; LEIBOWITZ, H. M. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 97, n.9, p.1720-1725, Sep 1979.
- LAING, R. A.; OAK, S. S.; LEIBOWITZ, H. M. Specialized microscopy of the cornea. In: **Corneal disorders**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders. 1998. p.182.
- LANDRY, H. *et al.* Corneal endothelial toxicity of Air and SF 6. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v.52, n. 5, p. 2279-2286, Apr 2011.
- LANDSHMAN, N. *et al.* Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 29, n. 7, p.1100-1109, Jul 1988.
- LEDBETTER, E. C; SCARLETT, J. M. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 57-64, Nov./Dec. 2009.
- LEE, J. K. *et al.* The effect of liophilization on graft acceptance in experimental

xenotransplantation using porcine cornea. **Artificial organs**, Cambridge, v. 34, n. 1, p. 37-45, Jan 2010.

LI, A. *et al.* Comparison of immunogenicity and porcine-to-rhesus lamellar corneal xenografts survival between fresh preserved and dehydrated porcine corneas. **Xenotransplantation**, Copenhagen, v. 18, n.1, p. 45-55, Jan./Feb. 2011.

LIU, S. W.; CHIU, M. D.; WANG, I. J. Effect of intracameral injection of lidocaine and cabachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, v. 30, n. 6, p. 1351-1355, Jun 2004.

MACCAREY, B. E.; EDELHAUSER, H. F.; LYNN, M. Review of corneal endothelial microscopy for FDA clinical trials of refractive produces, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. **Cornea**, Hargetown, v. 27, n.1, p. 1-16, Jan 2008.

MATSUDA, M. *et al.* Celular migration and morphology in corneal wound repair. **Investigative Ophthalmology Vision & Science**, St. Louis, v.26, n. 4, p. 443-449, Apr 1985.

MAURICE, D. M. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. **Experientia**, Basel, v. 24, n.11, p. 1094-1095, Nov 1968.

MELO, C. M. **Estudo das amostras endoteliais de microscopia especular da córnea**. 2007, XXip.,95. Tese (Doutorado em Oftalmologia Médica). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MODIS, L. J. R.; LANGENBUCHER A.; SEITZ, B. Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and non-contact specular microscopy. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, v. 28, n. 10, p.1763–1769, Oct 2002.

MORITA, H. *et al.* Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbit. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 273-277, Apr 1985.

MURPHY, C.; SAMUELSON, D.; POLLOCK, R. The eye. In: **Miller's anatomy of dog**. 4thed., St Louis: Saunders. 2012. p. 1270.

OH, J.Y. *et al.* Short-term effect of intracameral triamcinolone acetone on corneal endothelium using the rabbit model. **Eye**, London, v. 21, n, p. 812-818, Jun 2007.

OJEDA, J. L.; VENTOSA, J. A.; PIEDRA, S. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection -SEM approach. **Journal of Anatomy**, Oxford, v. 199, n. 5, p. 567-576, Nov 2001.

OLSEN, E. G.; DAVANGER, M. The healing of rabbit corneal endothelium. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 62, n. 5, p. 796-807, Oct 1984.

PARK, S. *et al.* Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelial Cells. **Cornea**, Hagerstown, v. 31, n. 12, p.1476-1479, Dec 2012.

PHILIPS, C.; LAING, R.; YEE, R. Specular Microscopy. In: Krachmer, J. H.; Mannis, M; S.; Holland, E. J. (Ed.). **Cornea**. 2nd ed. London:Elsevier Mosby. 2005, p. 261-281.

- PIGATTO, J. A. T. **Extracapsular extração do cristalino, comparativamente à facuemsulfificação, com enfoque nas repercussões endoteliais corneanas em cães (*Canis familiares- Linnaeus 1758*)**. 2004. 112 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004a.
- PIGATTO, J. A.T. *et al.* Morfometric analisys of the corneal endothelium of yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 205-208, 2004b.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 41-45, Nov 2005a.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Corneal endothelium of magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 36, n. 4, p.702-705, 2005b.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Morphology analysis of the corneal endothelium in eyes of dog usin specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 9, p. 427-430, Sep 2008.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostric (*Struchio camelus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 926-929, May./ June. 2009.
- PONTES, K. C. S. *et al.* Membrana amniótica canina utilizada como bandagem no tratamento de úlcera superficial de córnea em coelhos- aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 5, p. 1069-1074, Oct 2008.
- RAO, M. N. *et al.* Morphological appearance of the healing corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 96, n. 11, p. 2027-2031, Nov 1978.
- ROGRIGUES, E. B. *et al.* The use of Vital Dyes in Ocular Surgery. **Survey of Ophthalmology**, New York, v. 54, n. 5, p. 576-617, Sept./ Nov. 2009.
- RODRIGUES, E. B. *et al.* Corneal endothelium cell morphology of normal dog in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.9, n. 2, p. 101-107, Mar./ Apr. 2006.
- RUGGERI, A. *et al.* A system for the automatic estimation of morphometric parameters of corneal endothelium in alizarine red- stained images. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 94, n.5, p. 643-647, May 2010.
- SAAD, H.A. *et al.* An Easy and Inexpensive Method for Quantitative Analisys of Endothelial Damage by Using Vital Dyes Staining and Adobe Fotoshop Software. **Cornea**, Hagerstown, v. 27, n.7, p.818-824, Aug 2008.
- SCHULTZ, R. O. *et al.* Response of the corneal endothelium to cataract surgery. **Archives of**

Ophthalmology, Chicago, v. 104, n.8, p. 1116-1169, Aug 1986.

SLATTER, D. Córnea e esclera. In: **Fundamentos da oftalmologia veterinária**. 3ªed. São Paulo: Rocca, 2005. Cap. 11, p. 283-338.

SPERLING, S. Combined stained of corneal endothelium by alizarine red an trypan blue. **Acta Ophthalmology**, Copenhagen, v. 55, p. 573-580, Aug 1977.

SVEDBERGH, B.; BILL, A. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**. v. 50, p. 321-335, 1972.

TAO, C. et al. Effects of collagen crosslinking on the interlamellar cohesive strength of porcine cornea. **Cornea**, v. 32, n.2, p. 169-173, 2013.

TAMAYO- ARANGO, L. J. et al. Ultrastrutural morphology and morphometry of the corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural**. v. 39, n. 1, p. 117-122, 2009.

TAYLOR, M. J.; HUNT, C. J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**. v. 65, p.815-819, 1981.

TERRY, M. A. et al. Endothelial keratoplasty. The influence of insertion techniques and incision size on donor endothelial survive. **Cornea**. v. 28, p. 24-31, 2009.

TUFT, S.J. & COSTER, D. J. The corneal endothelium, **Eye**. v.4, p. 389-424, 1990.

TURNER, S. M. **Oftalmologia de pequeños animales**. Elsevier Saunders: España. 2010, p. 370.

VAN HORN, D.L. et al. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**,v. 16, n.7, p. 587-613, 1977.

VICENTI, F. M. **Morfologia e morfometria do endotélio corneano de suínos (*Sus scrofa domestica*, LINNAUES ,1758) à microscopia especular**. 2004, 61p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária)- Curso de Pós-graduação em Cirurgia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. São Paulo.

WALKOW, T.; ANDERS, N.; KLEBE, S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: Relation to preoperative e intraoperative parameters. **Journal of Cataract and Refractive**

Surgery. v. 26, p. 727-732, 2000.

WERNER, L. P. et al. Toxicity of xylocaine to rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery.** v. 24, p. 1371-1376, 1998.

WARING, G.O.; BOURNE, W.M.; EDELHAUSER, H.F. The corneal endothelium: Normal and pathologic structure and function. **Ophthalmology.** v. 8, p. 531-590, 1982.

ZENG, Y. et al. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. **Journal of Biomechanics.** v. 34, p. 533-537, 2001.

ZHU, Z. et al. Technique of preparation of the corneal endothelium-descemet membrane complex for transplantation. **Cornea.** v. 25, p. 705-709, 2006.