

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DA
CÓRNEA DE EQUINOS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA**

GÉSSICA MARIA RIBEIRO DA SILVA

PORTO ALEGRE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DA
CÓRNEA DE EQUINOS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA**

**Autora: Gêssica Maria Ribeiro da
Silva**

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Medicina Animal:
Equinos**

**Orientador: Prof. Dr. João Antonio
Tadeu Pigatto**

PORTO ALEGRE

2018

CIP-Catálogo na Publicação

Maria Ribeiro da Silva, Gêssica

Morfologia e morfometria das células do endotélio da córnea de equinos utilizando a microscopia eletrônica de varredura. / Gêssica Maria Ribeiro da Silva. -- 2018.

50 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Equinos. 2. Endotélio. 3. Córnea. I. Antonio Tadeu Pigatto, João, orient. II. Título.

Géssica Maria Ribeiro da Silva

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DA CórNEA
DE EQUINOS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Aprovada em 27 MAR 2018

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

Orientador e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Pacheco de Araújo

Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck

Membro da Comissão

M.V. Dr^ª. Maria Cristina Caldart de Andrade

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família. Meus pais Gélío e Terezinha, meu irmão Júnior, meu noivo Alisson, meus filhotes Jhow, Jolie e Rebecca. Por formarem a base do meu ser e, desta forma, me ampararem diariamente na jornada do mestrado; obrigada por terem colaborado de inúmeras formas e por terem entendido todos os momentos de ausência nos últimos meses. À Ângela Bacchin, que se tornou parte da minha família, dividindo as alegrias, os pacientes e as angústias vividas nos últimos dois anos. Vocês me fizeram chegar até aqui.

Ao meu orientador, professor Pigatto, muito obrigada por ter proporcionado a oportunidade de estar presente no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, acompanhando teu trabalho e aprendendo oftalmologia veterinária. Muito obrigada por cada conselho, cada atendimento clínico e cada procedimento cirúrgico em que me ensinastes a ser uma profissional melhor. Obrigada pela orientação e por instigar em mim o desejo de ser uma médica veterinária e uma pessoa melhor, cresci muito convivendo contigo e por isso sou infinitamente grata a ti.

Aos amigos. Bruna e Eduardo, que me apoiaram desde a decisão de iniciar o mestrado até a conclusão da dissertação, vocês me ajudaram em inúmeras situações nos aspectos técnicos, éticos e emocionais. Natália e Patrick, afinal ninguém melhor do que uma bacharelada em relações internacionais e um engenheiro mecânico para me ajudarem com o inglês e com os cálculos. Jéssica e Tayfran, por serem lindos presentes que o último ano me trouxe, junto com a Bud, a Kate, o Bubba, a Marcelina e o recém-chegado Dejair, saber que posso contar com vocês para qualquer coisa e a qualquer momento tem um valor inestimável. Graci e Léo, que me ajudaram com as inúmeras planilhas de excel e com as fórmulas mais mirabolantes que possam existir. À NSTecnologia, que me acolheu de braços abertos, me fez sentir parte da família e disponibilizou toda a infraestrutura da empresa para os últimos ajustes da dissertação. À Clesi, MÔ, Silvia, Leti e Bia, que me apoiaram com conselhos e estiveram sempre disponíveis para o que fosse preciso.

Ao Jonas, pelo desenvolvimento dos cálculos estatísticos e explicações a respeito.

À médica veterinária Neide e toda a equipe do abatedouro de equídeos Foresta, por disponibilizarem o espaço e o material biológico para o desenvolvimento do experimento.

À Faculdade de Veterinária da UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, ao Hospital de Clínicas Veterinárias e todos os seus colaboradores, por propiciarem o ambiente de aprendizado e troca de experiências. A todos os integrantes do Serviço de Oftalmologia do HCV, em especial à Marcela, que me apoiou em inúmeras situações, à Marcele, por anestésiar inúmeros pacientes com muita segurança, permitindo assim que todos os procedimentos cirúrgicos fossem realizados com tranquilidade e por ter me acompanhado na viagem até São Gabriel, junto com a Renata, a Paula, a Eduarda, a Cecília e a Bruna. À Mariana e ao professor Canal, por disponibilizarem o laboratório de virologia para o preparo das soluções empregadas no experimento. Às técnicas Denise e Raquel e ao Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS. À bibliotecária da Favet, Ana Vera, por ter sanado dúvidas a respeito de normas técnicas para a escrita da dissertação.

Aos pacientes e tutores atendidos no HCV, por me trazerem e ajudarem a superar todos os desafios propostos.

Meus sinceros agradecimentos. Este estudo não teria sido o mesmo sem vocês.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio da córnea de um equino. A estrela encontra-se no interior de uma célula com nove lados..... 29
- Figura 2** Eletromicrografia de varredura da região periférica superior do endotélio da córnea de um equino. A quantidade de lados de cada célula avaliada na região está indicada por números arábicos..... 30
- Figura 3** Eletromicrografia de varredura do endotélio da córnea de um equino. As estrelas indicam células com sete lados de diferentes tamanhos..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm^2 : micrômetros quadrados

ARVO: *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

cél/mm²: células por milímetro quadrado

CMM: Centro de Microscopia e Microanálise

CO₂: dióxido de carbono

ISSN: *International Standard Serial Number*

kV: quilovolt

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mm: milímetros

mm²: milímetros quadrados

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

μm : micrômetros

RESUMO

O conhecimento da morfologia endotelial nas diferentes regiões da córnea é de suma importância para avaliação de endotélios corneanos saudáveis e doentes e de suas respostas ao uso de medicações. O objetivo do presente estudo foi descrever a morfologia do endotélio nas regiões central e periférica superior da córnea saudável de equinos, medir a área média das células pentagonais, hexagonais e heptagonais presentes nas regiões avaliadas, calcular o polimegatismo de cada tipo celular e correlacionar estes parâmetros entre os diferentes formatos celulares. Foram estudados dez equinos, machos ou fêmeas, de diferentes idades, provenientes de um abatedouro licenciado. Imagens da superfície posterior do endotélio da córnea foram obtidas com uso de microscopia eletrônica de varredura. A morfologia do endotélio de diferentes regiões da córnea foi avaliada. Além disso, foi correlacionada a variabilidade do tamanho celular médio com a morfologia endotelial. A análise estatística foi conduzida usando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (Post-Hoc), com nível de significância de 5%. As amostras avaliadas foram compostas em sua maioria por células hexagonais (60,5%), pentagonais (21,4%) e heptagonais (16,9%), células com quatro, oito ou nove lados compuseram 1,3%. A área celular média das células pentagonais foi 203,58 μm^2 , das hexagonais foi 223,84 μm^2 e nas heptagonais foi 270,54 μm^2 . O polimegatismo encontrado foi de 16% nas células pentagonais e hexagonais e de 20% nas heptagonais. A morfologia das células endoteliais de equinos saudáveis não diferiu entre as regiões central e periférica superior da córnea, sugerindo que a região central é representativa da região periférica. As células com sete lados apresentaram polimegatismo maior em relação às células de seis e de cinco lados.

Palavras-chave: cavalos, endotélio da córnea, morfologia, polimegatismo, microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

The knowledge of the endothelial morphology in the different regions of the cornea is important for the evaluation of healthy and sick corneal endothelium and its response to drugs. In order to describe the endothelial morphology in the central and superior peripheral regions of the equines' cornea, evaluate area from pentagonal, hexagonal and heptagonal cells present in the evaluated regions, calculate the polimegathism and correlate these parameters, two healthy corneas were collected of ten equine, male or female, of different ages. Images of the posterior surface of the corneal endothelium were taken with scanning electron microscope. The endothelial morphology was studied in the different regions of the equines' cornea. In addition, the polimegathism and morphology was also correlated. A statistical analysis was conducted using the Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's Test (Post-Hoc), with a 5% level of significance. In the central region, the endothelium consisted of 58.8% hexagonal cells, 22.6% pentagon, 17.1% heptagonal and 1.4% cells with either four, eight or nine sides. In the superior peripheral region, 62.1% of the cells were hexagonal, 20.2% pentagon, 16.6% heptagonal and 1.1% cells with four or eight sides. The average cell area of the pentagonal cells was $210.77 \pm 31.53 \mu\text{m}^2$ in the central region and $196.39 \pm 34.35 \mu\text{m}^2$ in the superior peripheral region; in hexagonal cells, the average cell area found in the central region was $216.12 \pm 37.09 \mu\text{m}^2$ and $231.56 \pm 34.95 \mu\text{m}^2$ in the superior peripheral region; and in cells with seven sides, the average cell area was $261.76 \pm 55.29 \mu\text{m}^2$ in the central region and in the superior peripheral region was found $279.32 \pm 52.37 \mu\text{m}^2$. When not considering the corneal regions, the polymegathism found was 16% in the pentagonal and hexagonal cells and 20% in the heptagonal cells. The morphology results obtained did not differ between the central and peripheral regions of the cornea, suggesting that the central region is representative of the peripheral region. The highest coefficient of variation was seen in cells with seven sides.

Key words: horse, corneal endothelium, morphology, polymegathism, scanning electron microscopy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Córnea	13
2.1.1	Endotélio.....	15
2.1.1.1	Função endotelial.....	15
2.1.1.2	Reparação endotelial.....	17
2.1.1.3	Morfologia e morfometria endotelial.....	17
2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	22
3	ARTIGO CIENTÍFICO	25
3.1	Artigo: Morfologia e morfometria das células do endotélio da córnea de equinos utilizando a microscopia eletrônica de varredura	25
	Resumo.....	25
	Introdução.....	26
	Materiais e Métodos.....	27
	Resultados.....	29
	Discussão.....	33
	Conclusões.....	38
	Referências.....	38
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os cavalos são altamente dependentes da visão. A saúde ocular é essencial para um bom desempenho de suas funções, principalmente no caso de animais atletas. Dentre as alterações oftálmicas, doenças na córnea são as mais frequentemente encontradas em equinos (CLODE, 2011; GILGER, 2013).

A córnea dos equinos é formada por quatro camadas, sendo elas epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (NAUTSCHER *et al.*, 2016). O endotélio corneano é composto por uma camada única de células predominantemente hexagonais, que recobre a superfície posterior da córnea (TUFT; COSTER, 1990; LEDBETTER; SCARLETT, 2009).

Existe uma tendência natural do estroma em atrair líquido e conseqüentemente aumentar sua espessura e desorganizar o posicionamento de suas fibras de colágeno. Em contrapartida, o endotélio atua exercendo duas funções: uma função barreira, que diminui a passagem de líquido para o estroma; e uma função bomba, a partir do transporte de líquido do estroma para a câmara anterior com objetivo de manter um constante estado de deturgescência da córnea (TUFT; COSTER, 1990).

As funções barreira e bomba do endotélio são responsáveis pela manutenção da transparência corneana através da regulação da hidratação estromal. A perda da função endotelial pode causar edema de córnea que resulta em aumento da opacidade corneana e redução ou perda da acuidade visual (JOYCE, 2003).

O endotélio da córnea é constituído por um número limitado de células. Assim, quando há perda celular por apoptose ou injúrias a esta camada, a cicatrização ocorre pelo alargamento das células adjacentes à lesão, as quais se esticam e deslizam para restabelecer a cobertura total da superfície posterior da córnea (DOUGHTY, 1989; JOYCE, 2003).

A função endotelial eficiente e a conseqüente transparência da córnea dependem de um número mínimo de células endoteliais, de forma que uma redução excessiva na quantidade de células leva à falência endotelial e ao conseqüente edema de córnea (MISHIMA, 1982; JOYCE, 2003).

Diferentes técnicas são empregadas para avaliar o endotélio corneano saudável e suas possíveis alterações. A microscopia especular foi utilizada para avaliação endotelial de uma série de espécies como ratos (MEYER; UBELS; EDELHAUSER, 1988), cães (GWIN *et al.*, 1982; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008), cavalos (ANDREW

et al., 2001), gatos (FRANZEN *et al.*, 2010), chinchilas (BERCHT *et al.*, 2015), galinhas (ALBUQUERQUE; FREITAS; PIGATTO, 2015) e também em humanos (WILSON; ROPER-HALL, 1982; ABIB; BARRETO JR, 2001; FARIAS *et al.*, 2007), entre outras. O endotélio da córnea de outras espécies incluindo ovelhas, lhamas e alpacas foi estudado através da microscopia especular de não contato (ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002; COYO *et al.*, 2015). A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada em estudos da morfologia, morfometria e ultraestrutura da superfície posterior das células do endotélio saudável da córnea de diferentes espécies de animais (COLLIN; COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; RODRIGUES *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Esta também é uma técnica eficiente para a avaliação dos efeitos de medicamentos e de procedimentos cirúrgicos no endotélio da córnea (DOUGHTY; BERGMANSON; BLOCKER, 1997; EGGELING *et al.*, 2000; ANDRADE, 2016; TERZARIOL *et al.*, 2016).

O endotélio corneano saudável de equinos foi avaliado por microscopia óptica (FAGANELLO *et al.*, 2016), microscopia confocal (LEDBETTER; SCARLETT, 2009) e microscopia especular de não contato (ANDREW *et al.*, 2001). A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada por Andrade (2016) para avaliar as repercussões do corante azul brilhante 0,05% no endotélio da córnea de equinos. No entanto, ao se recorrer à literatura, não foram encontrados estudos empregando a microscopia eletrônica de varredura para análise e descrição do endotélio da córnea de equinos saudáveis.

A relação entre forma e área celular tem sido realizada para análise endotelial (NURZYNSKA; PIORKOWSKI, 2016; PIORKOWSKI *et al.*, 2015). O polimegatismo, ou coeficiente de variação, é o termo utilizado para denotar heterogeneidade no tamanho das células endoteliais (ABIB, 2000). Doughty (1989) recomenda que o coeficiente de variação seja calculado entre os diferentes formatos celulares.

O objetivo do presente estudo é descrever a morfologia do endotélio da córnea saudável de equinos nas regiões central e periférica superior, medir a área média das células pentagonais, hexagonais e heptagonais presentes nas regiões avaliadas, calcular o polimegatismo de cada tipo celular e correlacionar estes parâmetros entre os diferentes formatos celulares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Córnea

A córnea é a porção transparente da túnica fibrosa do bulbo ocular, sendo protegida do ambiente externo pelas pálpebras superior, inferior e terceira pálpebra. A córnea atua como barreira primária contra infecções e é responsável pela contenção dos constituintes intraoculares, auxiliando, dessa forma, na manutenção estrutural do olho (DELMONTE; KIM, 2011; SAMUELSON, 2013).

O formato corneano é elíptico, com o diâmetro horizontal alongado em relação ao vertical. Em cavalos adultos, o diâmetro da córnea varia entre 23 e 26,4 mm no eixo vertical e entre 29,7 e 34 mm no eixo horizontal (RAMSEY; HAUPTMAN; PETERSON-JONES, 1999). Segundo Samuelson (2013), a combinação da dimensão corneana e da posição orbital lateral nos animais de pastagem pode ser resultado adaptativo do comportamento alimentar destes indivíduos, pois proporciona maior proteção contra predadores.

A espessura da córnea varia entre as espécies, raças e até mesmo entre os indivíduos (SAMUELSON, 2013). Em equinos, a espessura corneana média encontrada por Andrew *et al.* (2001) foi de 893 μm , sendo que os quadrantes dorsal e ventral da córnea foram mais espessos do que os quadrantes laterais e mediais e a porção central da córnea. No estudo de Ledbetter e Scarlett (2009), a espessura corneana média avaliada na região central foi de 835 μm , variando de 725 a 920 μm . Van der Woerdt *et al.* (1995) encontraram na região central espessura de 793 μm . Os autores concluíram também que a periferia da córnea é mais espessa comparativamente à região central. Segundo Ramsey, Hauptman e Peterson-Jones (1999), a espessura da córnea não é afetada pelo sexo dos equinos, nem difere entre o olho direito e esquerdo, mas existe uma relação positiva entre a espessura da córnea e a idade. Nos estudos de Andrew *et al.* (2001) e Ledbetter e Scarlett (2009), não foi observada influência da idade na espessura corneana. No entanto, em ambos os estudos foi feita discussão a respeito do pequeno número de animais avaliados.

As lesões de córnea são dolorosas, principalmente as mais superficiais, pois a córnea é amplamente inervada e a terminação das fibras nervosas ocorre nas camadas

superficiais no epitélio (SAMUELSON, 2013). A inervação corneana extensa fornece proteção à região ocular e estimula a cicatrização de feridas (CLODE, 2011).

As funções da córnea incluem suporte ao conteúdo intraocular, refração e transmissão de luz (DELMONTE; KIM, 2011).

A córnea saudável de equinos é formada histologicamente por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (NAUTSCHER *et al.*, 2016).

A córnea é recoberta pelo filme lacrimal. Tal componente previne o ressecamento e distribui oxigênio e nutrientes para o epitélio corneano e o estroma anterior, captura e remove corpos estranhos da superfície ocular em conjunto com as pálpebras e fornece um meio pelo qual células inflamatórias podem ter acesso à região corneana. O filme lacrimal é composto por três camadas incluindo, mucosa, aquosa e lipídica (DUBIELZIG *et al.*, 2010).

O epitélio da córnea é do tipo estratificado, escamoso e não queratinizado. Entre as células epiteliais existem complexos juncionais que impedem que o filme lacrimal entre nos espaços intercelulares e flua para o estroma (TUFT; COSTER, 1990; DELMONTE; KIM, 2011). Em equinos, o epitélio é de duas a três vezes mais espesso do que dos carnívoros (NAUTSCHER *et al.*, 2016).

O estroma compreende aproximadamente 90% da espessura da córnea dos cavalos. Ele é formado por lamelas de fibras colágenas paralelas entre si e a transparência corneana resulta desta organização (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003, CLODE, 2011). O estroma é hidrofílico e cerca de 80% dele é formado por água, o que o caracteriza como relativamente desidratado em comparação a outros tecidos. Tal estado de desidratação é garantido pelo epitélio e pelo endotélio, que são hidrofóbicos. Entretanto, quando ocorrem alterações em alguma destas camadas hidrofóbicas, há hidratação do estroma, desorganização das suas lamelas de colágeno e consequente opacidade corneana (CLODE, 2011; DELMONTE; KIM, 2011; SAMUELSON, 2013).

Posteriormente ao estroma está localizada a membrana de Descemet, uma membrana acelular, lisa, com propriedades elásticas que é considerada a lâmina basal do endotélio da córnea (DUBIELZIG *et al.*, 2010; SAMUELSON, 2013). A membrana de Descemet é recoberta posteriormente por uma camada única de células denominada endotélio (NAUTSCHER *et al.*, 2016). Não existem complexos juncionais entre a membrana de Descemet e as células endoteliais (TUFT; COSTER, 1990).

As células endoteliais são poligonais, uniformes em tamanho e forma e compõem o mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989).

2.1.1 Endotélio

O endotélio corneano é uma monocamada de células localizadas na superfície posterior da córnea. Anteriormente, as células endoteliais estão em contato com a membrana de Descemet e posteriormente com o humor aquoso, que preenche a câmara anterior (TUFT; COSTER, 1990).

O citoplasma das células endoteliais é rico em organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático liso, aparelho de Golgi e vesículas pinocíticas, as quais indicam alta atividade metabólica destas células (TUFT; COSTER, 1990).

Na superfície posterior das células endoteliais existem vesículas pinocíticas, microvilosidades e cílios. As vesículas pinocíticas são formadas pela invaginação da membrana celular, destacam-se da membrana e transportam substâncias através do citoplasma, as microvilosidades existem em cerca de 20 a 30 unidades por célula e os cílios são menos frequentemente encontrados (BOTEON, 2000). Em coelhos, os cílios se projetam da superfície endotelial e parecem ser capazes de rebrotarem imediatamente após serem quebrados (GALLAGHER, 1980).

Lateralmente, a membrana celular tem curso oblíquo e tortuoso, formando interdigitações entre as células adjacentes. Tais reentrâncias e saliências aumentam a superfície de contato entre células vizinhas (TUFT; COSTER, 1990; BOTEON, 2000; SAMUELSON, 2013).

2.1.1.1 Função endotelial

O endotélio é responsável por manter o relativo estado de desidratação do estroma, possibilitando transparência corneana (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003). O correto desempenho de tal função depende de um número mínimo de células endoteliais, e uma perda significativa destas células leva à descompensação e possível falência endotelial permanente, com conseqüente edema de córnea e comprometimento da acuidade visual (MISHIMA, 1982).

O estroma possui uma pressão de embebição que atrai líquidos para a córnea. Dessa forma, a manutenção da transparência corneana depende da integridade do epitélio e das funções barreira e bomba endotelial (MAURICE, 1972; TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003; BOURNE; McLAREN, 2004).

A função barreira endotelial atua para que a água não flua livremente entre o humor aquoso e o estroma, mas este é um mecanismo limitado devido à falta de uma junção contínua e estreita entre as células endoteliais. A barreira física endotelial retarda o fluxo do aquoso ao estroma, mas não o impede (YEE *et al.*, 1985; TUFT; COSTER, 1990; BOURNE; McLAREN, 2004).

A membrana celular posterior das células endoteliais transporta ativamente íons do estroma para o humor aquoso e o excesso de fluido é removido atrelado a estes íons, via bomba ativa de Na^+/K^+ . A função bomba depende do metabolismo aeróbico celular, mas o movimento de água segue passivamente o fluxo dos íons pelo endotélio (MAURICE, 1972; YEE *et al.*, 1985; TUFT; COSTER, 1990).

O processo metabólico ativo de deturgescência é assistido por mecanismos passivos. Externamente, a evaporação na superfície ocular pode aumentar a osmolaridade do filme lacrimal e atrair água do estroma para o filme lacrimal. Internamente, na presença de endotélio corneano intacto, a pressão intraocular sobre a córnea força a saída de água do estroma (TUFT; COSTER, 1990).

O envelhecimento causa mudanças na monocamada endotelial e em suas funções. Segundo Bourne e McLaren (2004), a função barreira aumenta com a idade, visto que embora ocorra uma diminuição no número de células endoteliais e aumento da paquimetria corneana, estas alterações não são proporcionais, o que seria explicado pelo fato de que a permeabilidade endotelial diminui com o envelhecimento. O'Neal e Polse (1986) sugeriram que a função barreira física endotelial permaneça em grande parte intacta com o envelhecimento normal e que dificuldade em manter o estado de deturgescência estromal seria devido a uma taxa de bomba endotelial reduzida. Já em relação a moléstias que aumentam a permeabilidade endotelial, Geroski (1985) evidenciou que a densidade local de bombas ativas de Na^+/K^+ pode ter um aumento compensatório, da mesma forma que sua função, embora estas alterações não sejam suficientes para compensar a perda celular. A perda da função endotelial pode causar hidratação excessiva do estroma e consequente edema e aumento da opacidade corneana, com perda ou diminuição da acuidade visual (JOYCE, 2003).

A função endotelial pode ser estimada através de técnicas funcionais que avaliam sua capacidade metabólica, divididas em exames da capacidade de barreira física e da bomba endotelial; e através de técnicas morfológicas e morfométricas, visto que a morfologia também está relacionada com a função endotelial (TUFT; COSTER, 1990; ABIB; BARRETO JR., 2001).

2.1.1.2 Reparação endotelial

O endotélio é formado por uma monocamada de células uniformes em tamanho e forma. A estrutura e a função endotelial podem ser alteradas pelo envelhecimento e por inúmeras injúrias, tais como doenças oculares, procedimentos cirúrgicos intraoculares e contato de medicações com o endotélio e outros traumas (MISHIMA, 1982).

Com o envelhecimento e a ocorrência de traumas, as células endoteliais vão sendo perdidas. A ausência de complexos juncionais entre elas e a membrana de Descemet facilita o seu descolamento anterior. O endotélio da córnea possui um número limitado de células que permanecem sem replicação ao longo da vida (JOYCE, 2003). O mecanismo de reparo endotelial após um trauma é o alargamento celular, pois a célula aumenta de tamanho e desliza lateralmente, de forma a preencher lacunas deixadas por perda endotelial e garantir que a porção posterior da córnea permaneça recoberta por uma monocamada de células (DOUGHTY, 1989; TUFT; COSTER, 1990; DÍAZ-VALLE *et al.*, 1998; JOYCE, 2003).

Como a forma predominante de reparo é o alargamento celular, ocorre aumento da área e diminuição da densidade das células com o avanço da idade. Da mesma forma, o deslizamento celular para preencher áreas desnudas gera uma alteração gradual no formato celular, que originalmente era tipicamente hexagonal, tornando-se mais poligonal e pleomórfico (YEE *et al.*, 1985; COLLIN; COLLIN, 1998).

2.1.1.3 Morfologia e morfometria endotelial

A área celular média, a densidade celular, a porcentagem de células hexagonais e o coeficiente de variação da área celular são parâmetros frequentemente avaliados no endotélio corneano de diversas espécies (GWIN *et al.*, 1982; BERGMANSON, 1992; DOUGHTY, 1994; ANDREW *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; BERCHT *et al.*, 2015; COYO *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017).

O pleomorfismo ou polimorfismo refere-se ao termo designado para espelhar a variação do formato hexagonal das células do endotélio da córnea (DELMONTE; KIM, 2011). Visto que a maioria das células endoteliais possuem seis lados, o pleomorfismo é inversamente proporcional a hexagonalidade, tida como a porcentagem de células

hexagonais (LAING, 1976; GWIN *et al.*, 1982; DOUGHTY, 1989; DÍAZ-VALLE, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2006).

O endotélio corneano de vertebrados tem um padrão formado principalmente por células hexagonais (COLLIN; COLLIN, 1998; BOURNE; MCLAREN, 2004). Em estudo morfológico das células endoteliais de equinos, Faganello *et al.* (2016) descreveram o polimorfismo do endotélio corneano normal nesta espécie, composto em sua maioria por células hexagonais (57,6%), seguido por células pentagonais (20,7%), heptagonais (19,5%) e octagonais (2,3%).

Em coelhos e avestruzes, o endotélio corneano foi constituído por 75% de células hexagonais, 14% de pentagonais e outros 11% de células heptagonais (PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2009). Na análise morfológica do endotélio da córnea de jacarés, Pigatto *et al.* (2004) encontraram 78% de células hexagonais, seguidas de 13,2% de células pentagonais, 5,8% de heptagonais e 2% de células com 4 lados. Em pinguins, foram encontrados 80% de células hexagonais, 14,2% de células pentagonais e 5% de células heptagonais (PIGATTO *et al.*, 2005b). Em cães, foram encontrados 68% de células hexagonais, 17% de células pentagonais, 11% de células heptagonais, 2% de células com quatro lados e outros 2% de células com oito lados (PIGATTO *et al.*, 2008).

Estudos em diferentes espécies avaliaram a morfologia endotelial na região central e em regiões periféricas da córnea com objetivo de estabelecer se há diferença entre as regiões ou se a região central é representativa de toda a córnea (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; HÜNNING, 2015; . FAGANELLO *et al.*, 2016).

A avaliação morfológica das diferentes regiões da córnea saudável de equinos foi realizada por Faganello *et al.* (2016) com uso do corante vermelho de alizarina e microscopia óptica. O percentual médio de células hexagonais encontradas foi de 55,4%, 57,8%, 58,6%, 56,1% e 56,9% nas regiões central, superior, inferior, temporal e nasal, respectivamente. A porcentagem de células com menos de seis lados na área central foi de 22,7%, na área superior foi de 20,8%, na área inferior foi de 20,1%, na área temporal foi de 21,7% e na área nasal foi de 21,6%. Em relação às células com mais de seis lados, a porcentagem média encontrada foi de 21,9% no centro, 21,3% na área superior, 21,2% na área inferior, 22,2% na área temporal e 21,5% na área nasal. Não foram encontradas diferenças significativas entre as regiões avaliadas.

No que diz respeito à morfologia, resultados semelhantes foram encontrados em cães. Hünning (2015) avaliou o endotélio saudável desta espécie com uso de microscopia

óptica e verificou que os resultados não diferiram significativamente entre as regiões estudadas.

Já em suínos, as células hexagonais representaram 61,7% da região central e 53,2% da região periférica, células com cinco lados formaram 21,3% e 28,9% do centro e da periferia, respectivamente, e as células heptagonais compuseram 11% da região central e 18,1% da região periférica. Neste estudo, as porcentagens de células hexagonais e heptagonais foram estatisticamente diferentes entre a córnea central e periférica (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

Em humanos, a região central da córnea foi comparada às regiões periféricas através de valores de densidade celular, não sendo visualizada diferença estatística entre as regiões endoteliais em córneas saudáveis (HOFFER, 1979; BLACKWELL; GRAVENSTEIN; KAUFMAN, 1977; AMANN *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2004).

Com o envelhecimento e a ocorrência de fatos que levem a danos endoteliais, o deslizamento celular que ocorre durante a fase de reparação altera a forma das células, deixando-as mais alongadas em direção ao defeito e, possivelmente, com diferentes números de lados (YEE *et al.*, 1985). Estudos demonstram que o pleomorfismo aumenta com o envelhecimento em humanos, cães, coelhos, gatos, ovelhas e chinchilas (LAING, 1976; GWIN *et al.*, 1982; RODRIGUES *et al.*, 2006; FRANZEN *et al.*, 2010; COYO *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017).

Em cães submetidos à facomulsificação, foi observada diminuição no percentual de células hexagonais após o procedimento cirúrgico, mas este parâmetro retornou aos valores basais em até 30 dias (NAGATSUYU *et al.*, 2014). Em humanos, o coeficiente de variação e a hexagonalidade voltaram aos seus valores normais cinco meses depois da cirurgia de catarata (SCHULTZ *et al.*, 1986).

As características funcionais do endotélio regenerador se correlacionam com sua aparência morfológica e uma alta porcentagem de células hexagonais no mosaico endotelial tem sido visto como indicador de endotélio corneano saudável (YEE *et al.*, 1985; MÜLLER *et al.*, 2004). Landshman *et al.* (1988) lesionaram o endotélio da córnea de felinos domésticos e realizaram avaliações pós-operatórios durante seis meses. Os autores observaram transparência da córnea nos animais que possuíam maior número de células hexagonais. Com base nesta observação, sugeriram uma relação direta entre a porcentagem de células hexagonais no tecido endotelial e a função de manutenção da deturgescência da córnea.

A célula endotelial humana mede cerca de 5µm de altura e 19µm de largura (TUFT; COSTER, 1990). A área celular média representa o tamanho médio de uma população de células endoteliais estudadas e sua unidade é dada em µm². A densidade endotelial é a estimativa da quantidade de células contidas em 1 mm² (ABIB, 2000).

A densidade celular endotelial média da espécie equina foi descrita por Andrew *et al.* (2001) e Ledbetter e Scarlett (2009), que obtiveram os valores de 3.155 ± 765 cél/mm² e 3.002 cél/mm², respectivamente. Espera-se uma diminuição na densidade celular com o envelhecimento, pois as células endoteliais aumentam de tamanho com a idade para compensar a perda celular, conseqüentemente há um maior tamanho celular médio e uma diminuição na densidade endotelial (KOCHAR *et al.*, 2016).

Em humanos, a densidade endotelial diminui rapidamente no primeiro ano de vida devido ao aumento da área celular de uma população fixa de células em resposta ao crescimento da córnea (TUFT; COSTER, 1990). A densidade endotelial de humanos foi estimada em 5.700 cél/mm² nos recém-nascidos e em 2.500 cél/mm² em adultos (WILLIANS *et al.*, 1992). O mesmo padrão foi observado por Gwin *et al.* (1982) em cães avaliados em diferentes faixas etárias: até 1 ano, entre 1 e 9 anos e com mais de 10 anos. Nestes animais foram encontradas 2.600 cél/mm², entre 2.300 e 2.500 cél/mm² e entre 1.900 e 2.100 cél/mm², respectivamente. Ocorre um declínio rápido, mas não linear na densidade endotelial, pois inicialmente há uma queda brusca na quantidade de células e em seguida ocorre estabilização na perda celular. À medida que a densidade de células endoteliais diminui, aumenta o desvio padrão deste parâmetro (ABIB; BARRETO JR., 2001).

Embora as células endoteliais sejam perdidas ao longo da vida, raramente ocorre descompensação endotelial em córneas saudáveis, pois existe uma reserva fisiológica endotelial. Para ocorrer edema irreversível de córnea em humanos, a densidade endotelial crítica é estimada em 10-15% da contagem normal (GEROSKI *et al.*, 1985; TUFT; COSTER, 1990). Em felinos, o endotélio é capaz de manter a desidratação da córnea quando a densidade reduz até cerca de 45% do valor normal (MISHIMA, 1982).

O polimegatismo, ou polimegetismo, é o termo utilizado para denotar heterogeneidade no tamanho das células endoteliais (ABIB, 2000). O dado semiológico que representa o polimegatismo é o coeficiente de variação e se dá pela divisão do desvio padrão de um grupo celular pela sua área celular média (DOUGHTY, 1989).

Em cães e jacarés o polimegatismo encontrado foi de 22%. Em coelhos foi 21%, 6% em avestruzes e 8% em pinguins (PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a;

PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2009). Quanto mais próximo de zero for o coeficiente de variação, mais uniforme é o grupo de células avaliadas (O'NEAL; POLSE, 1986).

Embora o polimegatismo não tenha sido estatisticamente diferente entre faixas etárias em estudos com ovelhas (COYO *et al.*, 2015), em humanos, cães, coelhos e chinchilas foi observado aumento do polimegatismo com o envelhecimento (GWIN *et al.*, 1982; TUFT; COSTER, 1990; DOUGHTY, 1994; BOURNE; MCLAREN, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2006; BERCHT *et al.*, 2015; KOCHAR *et al.*, 2016). Tal acréscimo no polimegatismo é observado porque na medida em que ocorre perda celular endotelial, as células remanescentes aumentam de tamanho de forma irregular (TUFT; COSTER, 1990; ABIB; BARRETO JR, 2001).

O'Neal e Polse (1986) avaliaram a resposta corneal à hipóxia em 10 pessoas de diferentes idades, divididas por faixas etárias em dois grupos. A ambos os grupos demonstraram aumento da espessura corneana devido ao edema, mas a taxa de recuperação corneal foi inversamente correlacionada com o polimegatismo endotelial das córneas avaliadas. Em pinguins, foi observada uma correlação negativa entre a hexagonalidade e o polimegatismo das amostras avaliadas (PIGATTO *et al.*, 2005b). Em ambos os estudos, observa-se que o polimegatismo esteve associado com a função endotelial.

Com o envelhecimento e trauma, ocorrem perdas endoteliais e as células remanescentes aumentam de tamanho como forma de reparação. Assim, tem-se uma área celular média maior, menor densidade endotelial, maior pleomorfismo e o polimegatismo também aumenta com a perda celular acumulada (JOYCE, 2003). Segundo Abib e Barreto Jr. (2001), os valores de densidade celular e a porcentagem de células hexagonais são os principais parâmetros avaliados para estimativa da função endotelial. No entanto, O'Neal e Polse (1986) sugeriram que a função bomba endotelial é mais afetada pelo aumento da variabilidade relativa do tamanho celular (polimegatismo) do que pelo tamanho médio das células.

O endotélio da córnea pode ser avaliado por microscopia especular (LAING, 1976; GWIN *et al.*, 1982; WILSON; ROPER-HALL, 1982; MEYER; UBELS; EDELHAUSER, 1988; ANDREW *et al.*, 2001; ABIB; BARRETO JR, 2001; ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002; PIGATTO *et al.*, 2006; FARIAS *et al.*, 2007; PIGATTO *et al.*, 2008; FRANZEN *et al.*, 2010; BERCHT *et al.*, 2015; ALBUQUERQUE; FREITAS; PIGATTO, 2015; COYO *et al.*, 2015; PADUA *et al.*, 2018), microscopia

óptica com uso de corantes vitais (SAAD *et al.*, 2008; HÜNNING, 2015; ANDRADE, 2016; FAGANELLO *et al.*, 2016), microscopia confocal (LEDBETTER; SCARLETT, 2009), tomografia de coerência óptica (KITAZAWA *et al.*, 2016) e microscopia eletrônica de varredura (COLLIN; COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; RODRIGUES *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; ANDRADE, 2016), associados a programas de computador ou não. O grande diferencial da microscopia eletrônica de varredura é o grande aumento obtido com alta resolução, permitindo avaliar a ultraestrutura das células endoteliais e sua morfologia com maior exatidão.

2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

O microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que fornece informações sobre a morfologia e que pode identificar elementos químicos das amostras avaliadas. Seu uso permite capturar imagens com aumento de 300.000 vezes ou mais, sendo comumente usado em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Em estudos do endotélio corneano, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia e ultraestrutura normal das células endoteliais saudáveis e a toxicidade endotelial mediante contato com medicações em diferentes espécies (COLLIN; COLLIN, 1998; EGGELING *et al.*, 2000; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; TERZARIOL *et al.*, 2016; ANDRADE, 2016).

O processamento do material a ser estudado é de suma importância para obtenção de imagens de boa qualidade e resultados satisfatórios. Independentemente da técnica utilizada para avaliação do endotélio da córnea, o mesmo deve ser avaliado ou fixado para posterior avaliação em até seis horas após a morte (FARIAS *et al.*, 2007).

As soluções de fixação possuem cerca de três vezes a osmolaridade dos tecidos fluidos humanos normais e, por consequência, as amostras fixadas sofrem retração durante este processo (DOUGHTY; BERGMANSON; BLOCKER, 1997). O glutaraldeído é o fixador recomendado para a maioria dos tecidos animais e vegetais que serão avaliados sob microscopia eletrônica (CASTRO, 2002). Doughty, Bergmanson e Blocker, (1997) compararam o glutaraldeído como agente único e associado ao formaldeído para fixação de amostras corneanas e observaram que o glutaraldeído

mantém as células com área celular maior do que quando associado ao formaldeído. Em amostras de córneas de coelhos, Virtanen *et al.* (1984) observaram 39,2% de retração com uso de glutaraldeído a 2,5%. Em córneas saudáveis de suínos avaliadas por MEV, a densidade celular média foi 43,9% maior que a reportada na mesma espécie com uso de microscopia especular, o que demonstra o efeito da retração celular durante o processamento das amostras (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

Empregando a MEV, é necessário desidratar gradualmente as amostras. Os agentes desidratantes mais usados são o etanol e a acetona. Após esta desidratação inicial, a acetona é substituída por gás carbônico liquefeito, que é lentamente aquecido até chegar ao ponto crítico, momento em que passa da fase líquida para a gasosa. A associação de temperatura e pressão do ponto crítico do CO₂ torna as amostras completamente desidratadas (CASTRO, 2002).

Para avaliação com microscópio eletrônico, as amostras desidratadas são coladas em porta amostras com cola condutora ou fita adesiva e em seguida uma camada de ouro ou carbono é utilizada para cobrir as amostras. A espessura desta camada deve ser suficientemente fina para não influir na resolução da imagem e suficientemente espessa para garantir uma boa condutibilidade. As amostras preparadas são altamente higroscópicas, razão pela qual devem ser conservadas em dessecador ou imediatamente fotografadas no microscópio eletrônico (CASTRO, 2002).

No microscópio eletrônico de varredura utiliza-se um feixe de elétrons no lugar dos fótons empregados nos microscópios ópticos convencionais. A tensão de aceleração, medida em kV, é relativa à velocidade dos elétrons. Quando a tensão de aceleração aumenta, a profundidade de penetração dos elétrons incidentes também aumenta, logo, para se observar estruturas de superfície deve-se optar por utilizar baixa tensão de aceleração (JEOL, 2009).

A área a ser analisada é irradiada por um fino feixe de elétrons que, ao atingir a superfície da amostra, são espalhados dentro dela e gradualmente perdem sua energia. Na medida em que o feixe de elétrons varre a amostra, a energia perdida é liberada da amostra de diferentes formas, dependendo do tipo de interação entre o elétron primário e os átomos do material analisado (DEDAVID, GOMES; MACHADO, 2007; MALISKA; JEOL, 2009).

A imagem formada resulta da amplificação dos sinais obtidos desta interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e dos

elétrons retroespalhados. Os elétrons secundários são de baixa energia, fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; MALISKA). Os elétrons retroespalhados tem energia mais alta que os elétrons secundários e avaliam regiões mais profundas (JEOL, 2009). A interação do feixe de elétrons com a amostra gera elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores e convertidas em um sinal de vídeo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista *Veterinary Ophthalmology* (ISSN 1463-5224) e será traduzido para o inglês ao ser submetido.

3.1 Artigo: Morfologia e morfometria das células do endotélio da córnea de equinos utilizando a microscopia eletrônica de varredura

G. M. R. Silva*, J. A. T. Pigatto*.

* *Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

Resumo

Objetivo: Descrever a morfologia do endotélio nas regiões central e periférica superior da córnea saudável de equinos, medir a área média das células pentagonais, hexagonais e heptagonais presentes nas regiões avaliadas, calcular o polimegatismo de cada tipo celular e correlacionar estes parâmetros entre os diferentes formatos celulares.

Animais estudados: Dez equinos, machos ou fêmeas, de diferentes idades, provenientes de um abatedouro licenciado.

Procedimentos: Imagens da superfície posterior do endotélio da córnea foram obtidas com uso de microscopia eletrônica de varredura. A morfologia do endotélio de diferentes regiões da córnea foi avaliada. Além disso, foi correlacionada a variabilidade do tamanho celular médio com a morfologia endotelial. A análise estatística foi conduzida usando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (Post-Hoc), com nível de significância de 5%.

Resultados: As amostras avaliadas foram compostas em sua maioria por células hexagonais (60,5%), pentagonais (21,4%) e heptagonais (16,9%), células com quatro, oito ou nove lados compuseram 1,3%. A área celular média das células pentagonais foi

203,58 μm^2 , das hexagonais foi 223,84 μm^2 e nas heptagonais foi 270,54 μm^2 . O polimegatismo encontrado foi de 16% nas células pentagonais e hexagonais e de 20% nas heptagonais.

Conclusões: A morfologia das células endoteliais de equinos saudáveis não diferiu entre as regiões central e periférica superior da córnea, sugerindo que a região central é representativa da região periférica. As células com sete lados apresentaram polimegatismo maior em relação às células de seis e de cinco lados.

Palavras-chave: equinos, endotélio da córnea, morfologia, polimegatismo, microscopia eletrônica de varredura.

Introdução

A córnea dos equinos é formada por epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio.¹ O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais, predominantemente hexagonais. Quando ocorre perda celular, a regeneração endotelial ocorre pelo alargamento das células adjacentes à lesão, o que muda gradativamente as características morfológicas do endotélio. Esta camada é responsável pela manutenção da transparência corneana através da regulação da hidratação estromal. Assim, uma redução excessiva na quantidade de células leva à falência endotelial devido à perda de sua função, que resulta em edema de córnea, aumento da opacidade corneana e perda ou redução na acuidade visual.²⁻⁵ O conhecimento e a avaliação detalhada das características celulares endoteliais permite maior precisão na descrição da viabilidade endotelial. Com isso, é possível que procedimentos cirúrgicos intraoculares possam ser realizados com maior segurança e que tecidos de melhor qualidade possam ser selecionados para transplantes de córnea, minimizando o risco de falência endotelial.

Entre os parâmetros normalmente empregados para avaliação endotelial encontram-se a densidade celular, o pleomorfismo e o polimegatismo.⁶⁻¹⁵ Tais parâmetros podem ser obtidos com uso de microscopia óptica, microscopia especular de contato e não contato, microscopia confocal, tomografia de coerência óptica e microscopia eletrônica de varredura.^{5,12,16-22} A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada em estudos da morfologia, morfometria e ultraestrutura da superfície posterior das células do endotélio saudável da córnea de diferentes espécies.^{11,23,24} Esta técnica também foi eficiente para a avaliação dos efeitos de medicamentos e procedimentos cirúrgicos no endotélio da córnea.²⁵⁻²⁷

O endotélio corneano saudável de equinos foi avaliado por microscopia especular de não contato,⁹ microscopia confocal⁵ e microscopia óptica.²¹ No entanto, ao se recorrer à literatura não foram encontrados estudos empregando a MEV na avaliação do endotélio da córnea de equinos saudáveis. Estudos correlacionando a variabilidade do tamanho celular com a morfologia endotelial somente foram encontrados em coelhos.⁸ Objetivou-se avaliar a morfologia das regiões central e periférica superior da córnea saudável de equinos utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Além disso, correlacionar a área celular média com a morfologia endotelial nas regiões avaliadas.

Materiais e Métodos

Foram estudadas 20 córneas de 10 equinos (*Equus caballus*), de ambos os sexos, com idade acima de quinze anos, provenientes de um abatedouro comercial licenciado (Frigorífico Foresta Ltda, São Gabriel, RS, Brasil). O experimento foi realizado de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e aprovado pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Imediatamente após o abate, ambos os olhos de sessenta animais foram submetidos ao exame oftálmico, que incluiu oftalmoscopia direta e prova da fluoresceína

(Fluoresceína sódica 1%, Allergan®). Os bulbos oculares que apresentaram evidência de doença ocular como edema de córnea, laceração corneana e úlcera de córnea foram excluídos. Em sequência, foi realizada enucleação e os bulbos oculares mantidos em câmara úmida até a coleta das córneas. Os botões corneoesclerais foram confeccionados realizando-se secção em 360° a 3 mm do limbo e fixados em glutaraldeído a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pH 7,5 durante sessenta dias.

O preparo e a análise das amostras foram realizados junto ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS. Dois botões corneais foram coletados de cada botão corneoescleral, uma espécime da região central e outra da região periférica superior, com auxílio de um trépano de 6 mm. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato e desidratadas de forma progressiva em álcool 30, 50, 70, 80, 90 e 100%, álcool 50% com acetona 50% e, finalmente, acetona 100%, sendo mantidas nas soluções pelo período de 15 minutos. Posteriormente foram submetidas à secagem em ponto crítico com dióxido de carbono líquido. As amostras foram fixadas em *stubs* com fita adesiva e metalizadas com ouro-paládio. As superfícies endoteliais posteriores foram examinadas com microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL, Tokyo, Japan) operando a 15 kV. De cada amostra foram obtidas cinco eletromicrografias com aumentos de 950 a 1.600 vezes.

Para a análise morfológica, foram analisadas cinquenta células endoteliais de cada região da córnea. A área celular das células com cinco, seis e sete lados foi obtida empregando-se o *software* ImageJ® (ImageJ 1.51k). O coeficiente de variação de células com cinco, seis e sete lados foi calculado e os parâmetros avaliados foram comparados entre os diferentes formatos celulares. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo examinador. A análise estatística foi conduzida usando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (Post-Hoc) considerando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

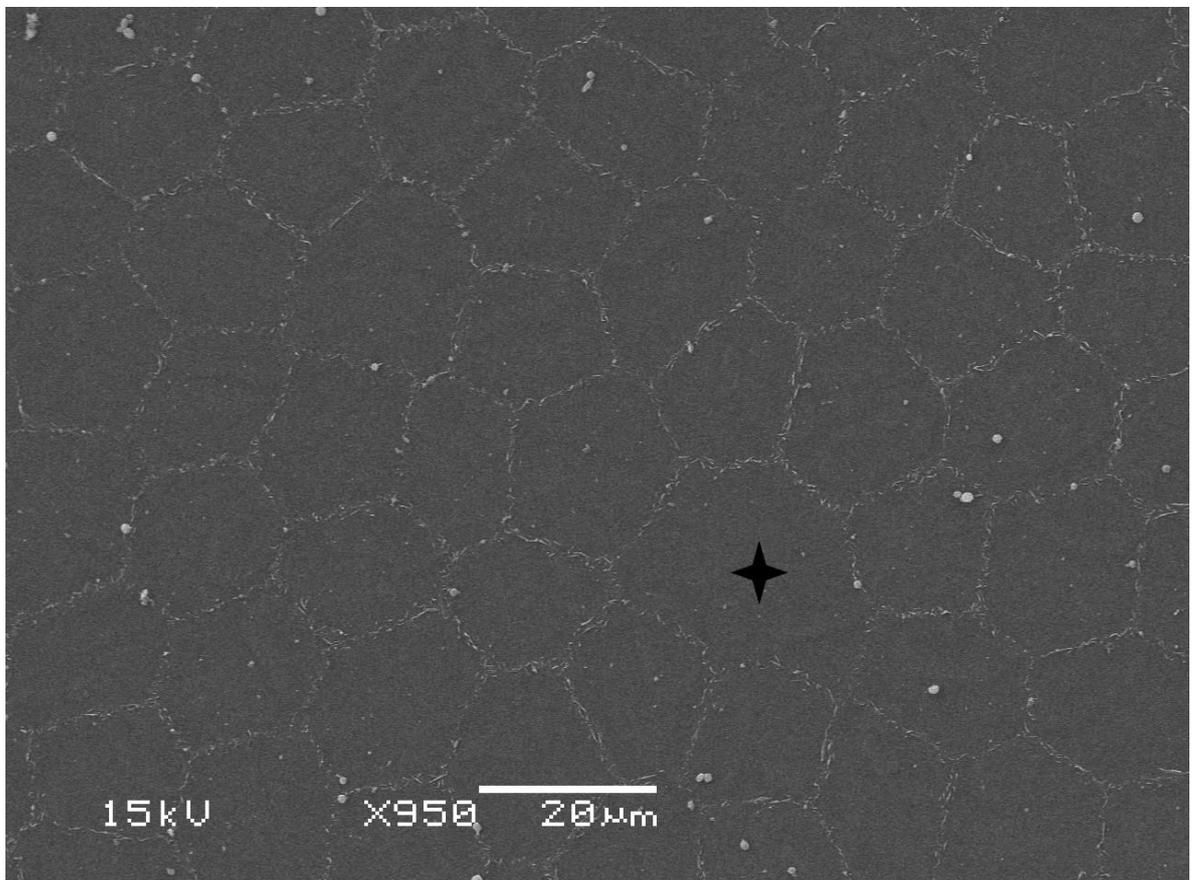
Resultados

Dentre os sessenta animais avaliados, dez apresentaram ambos os olhos dentro dos critérios de inclusão para o desenvolvimento da pesquisa proposta. A taxa de descarte dos bulbos oculares no presente estudo foi de 83,3%.

De todas as amostras analisadas, o percentual médio de células hexagonais foi de 60,5%, seguido por 21,4% de células pentagonais e 16,9% de células heptagonais. Células com quatro, oito ou nove lados compuseram 1,3%.

Na região central, foram encontradas 58,8% hexagonais, seguidas de 22,6% de células pentagonais, 17,1% heptagonais e 1,4% de células com quatro, oito ou nove lados (Figura 1).

Figura 1: Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio da córnea de um equino. A estrela encontra-se no interior de uma célula com nove lados.



Na região periférica superior (Figura 2), 62,1% das células eram hexagonais, 20,2% pentagonais, 16,6% heptagonais e 1,1% de células com quatro ou oito lados. A porcentagem de células pentagonais, hexagonais e heptagonais não diferiu estatisticamente entre as regiões central e periférica superior, entre os olhos direitos e esquerdos, tampouco entre os sexos. Os percentuais de células penta, hexa e heptagonais nas regiões central e periférica superior dos olhos direitos e esquerdos e os valores de P entre eles estão representados na Tabela 1.

Figura 2: Eletromicrografia de varredura da região periférica superior do endotélio da córnea de um equino. A quantidade de lados de cada célula avaliada na região está indicada por números arábicos.

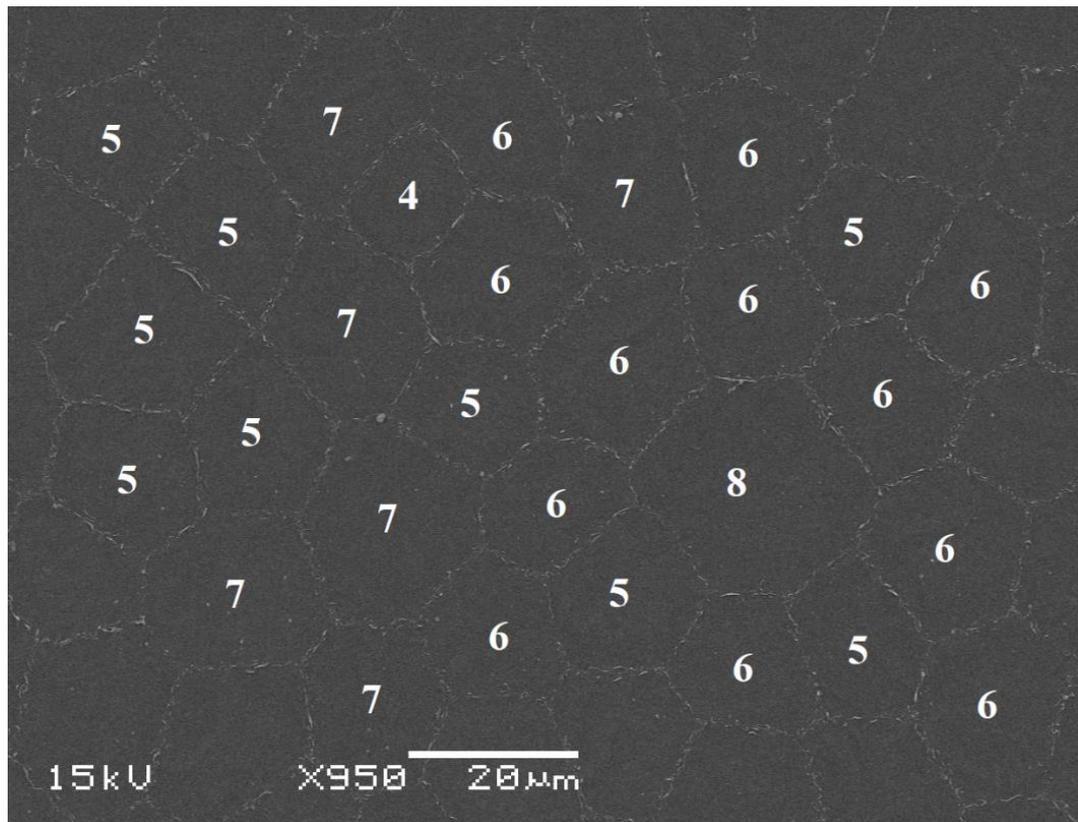


Tabela 1. Percentual de células pentagonais, hexagonais e heptagonais nas regiões central e periférica superior da córnea dos olhos direitos e esquerdos de equinos e valores de P entre os grupos amostrais.

n° de lados	Olho Direito		Olho Esquerdo		P			
	RC(%)	RPS(%)	RC(%)	RPS(%)	RCxRPS	RCxRPF	ODxOE	ODxOE
5 lados	22,6	21,1	22,7	19,4	0.625	0.444	0.882	0.653
6 lados	60,4	60,3	57,1	63,8	0.814	0.514	0.283	0.823
7 lados	15,2	17,6	19,1	15,6	0.368	0.467	0.079	0.647

RC: Região central; RPS: Região periférica superior; OD: Olho direito; OE: Olho esquerdo. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Não houve diferença significativa na porcentagem de células pentagonais, hexagonais e heptagonais nas regiões central e periférica superior, tampouco entre os olhos direitos e esquerdos.

Os valores de área celular média de todas as amostras analisadas, a área celular média das células pentagonais, hexagonais e heptagonais nas regiões central e periférica superior estão descritas na Tabela 2.

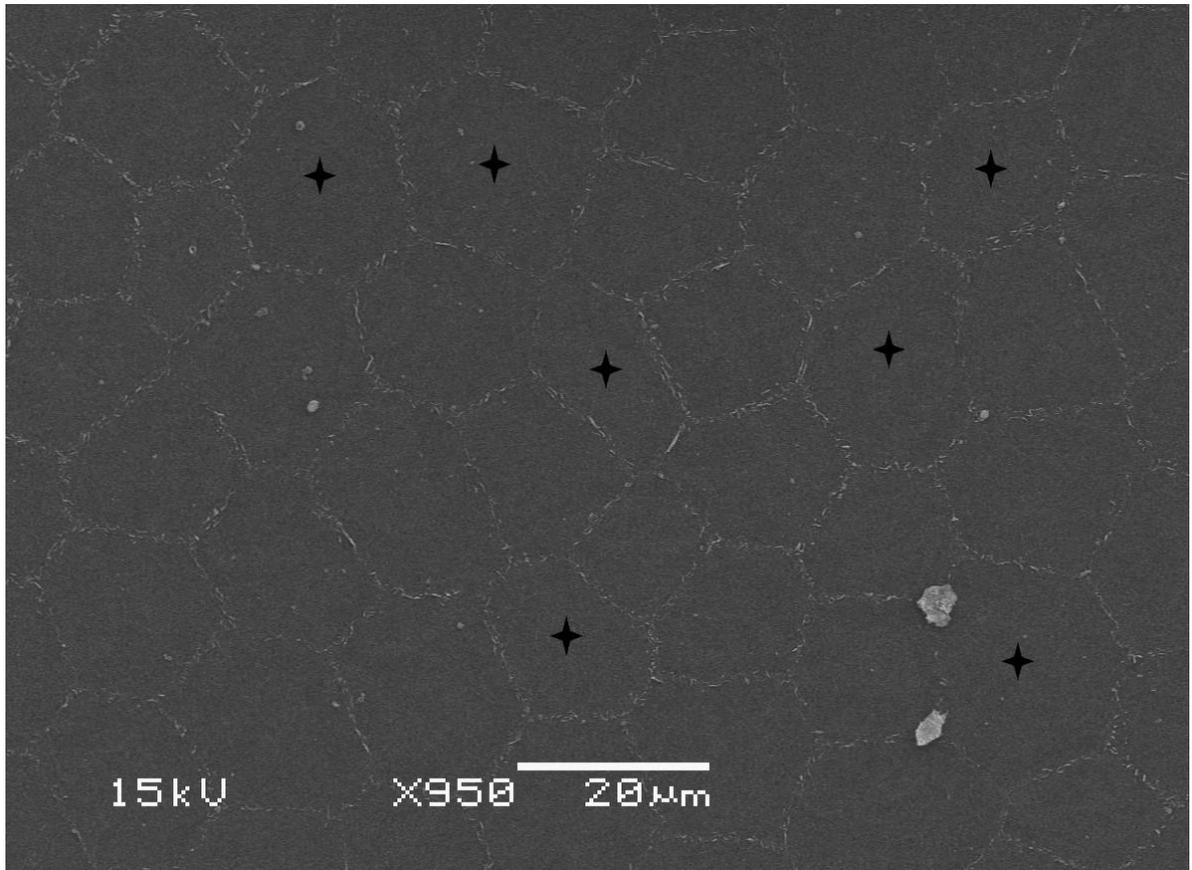
Tabela 2. Área celular média das células pentagonais, hexagonais e heptagonais nas regiões central e periférica superior da córnea de equinos e valores de P entre os grupos amostrais.

	Células Pentagonais	Células Hexagonais	Células Heptagonais
Área Celular Média (SD)	203,58 μm^2 (\pm 33,59 μm^2)	223,84 μm^2 (\pm 36,68 μm^2)	270,54 μm^2 (\pm 54,29 μm^2)
Variação Área Celular	130,21 - 327,67 μm^2	127,24 - 309,8 μm^2	180,84 - 448,81 μm^2
Área Celular Média Região Central (SD)	210,77 μm^2 (\pm 31,53 μm^2)	216,12 μm^2 (\pm 37,09 μm^2)	261,76 μm^2 (\pm 55,29 μm^2)
Área Celular Média Região Periférica Superior (SD)	196,39 μm^2 (\pm 34,35 μm^2)	231,56 μm^2 (\pm 34,95 μm^2)	279,32 μm^2 (\pm 52,37 μm^2)
p	0.536	0.454	0.306

Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Não houve diferença estatística entre as regiões central e periférica superior para a área celular média das células penta, hexa e heptagonais. A área média das células pentagonais, hexagonais e heptagonais avaliadas foram significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Desconsiderando-se as regiões corneanas, o polimegatismo celular encontrado foi de 16% nas células pentagonais e hexagonais e de 20% nas heptagonais (Figura 3). O coeficiente de variação das células pentagonais associadas às células hexagonais foi de 17%, da associação das células hexagonais com as células heptagonais foi de 20,9% e entre as células heptagonais e pentagonais foi de 23,6%.

Figura 3: Eletromicrografia de varredura do endotélio da córnea de um equino. As estrelas indicam células com sete lados de diferentes tamanhos.



Discussão

A integridade do endotélio é essencial para manter a função e a viabilidade da córnea, que depende de um estado de relativa desidratação estromal.³ Os parâmetros morfológicos e morfométricos são importantes preditores de saúde endotelial,³⁰ logo, avaliar tais parâmetros é importante para o diagnóstico e para o manejo de diversas alterações oculares.

Inúmeros avanços foram obtidos nas pesquisas relacionadas ao endotélio da córnea. Os parâmetros endoteliais, bem como a sua ultraestrutura, foram estabelecidos em algumas espécies, incluindo jacarés, tartarugas, coelhos, pinguins, avestruzes, suínos, entre outras.^{10-12,23,31} O presente estudo foi realizado em equinos, pois embora

transplantes de córnea endoteliais sejam realizados nesta espécie,^{32,33} os estudos acerca do endotélio da córnea de cavalos são escassos.^{5,9,21}

No presente estudo, a coleta *post-mortem* das amostras em um abatedouro licenciado permitiu realizar o experimento sem ferir de nenhuma forma o bem-estar dos animais participantes, em contra partida, houve uma alta taxa de descarte de bulbos oculares devido a lesões decorrentes da manipulação na linha de abate. O emprego de olhos provenientes de abatedouro permitiu análise e obtenção de imagens em todas as amostras.

Estudos prévios relatam que as amostras permanecem viáveis se avaliadas ou fixadas em até seis horas *post-mortem*.^{9,19,24,34} A presente pesquisa foi realizada com tempos de fixação que variaram de 30 minutos a 6 horas e todas as amostras permaneceram viáveis neste intervalo de tempo. Esta metodologia foi empregada em estudos prévios com excelentes resultados.^{11,12,18,31}

O endotélio da córnea pode ser avaliado com uso das microscopias óptica, eletrônica de varredura, confocal, especular de contato e de não contato e tomografia de coerência óptica. Estudos prévios descreveram o endotélio corneano saudável de equinos através de microscopia especular de não contato,⁹ microscopia confocal⁵ e microscopia óptica com coloração vital.²¹ A técnica de coloração vital do endotélio da córnea proposta por Taylor e Hunt³⁵ tem sido empregada com bons resultados,^{21,36} no entanto, as imagens são obtidas em aumentos menores e não permitem avaliação minuciosa, tampouco a visualização da ultraestrutura celular. No presente estudo, fez-se a opção pela MEV pois a análise endotelial pode ser realizada com maior amplificação, possibilitando estudo preciso do formato celular e também análise da área de cada célula individualmente. Não existe um consenso em relação ao número de células para serem analisadas.³⁷⁻³⁹ No presente estudo, foram avaliadas 100 células de cada formato.

O polimorfismo visualizado no mosaico endotelial é um parâmetro frequentemente avaliado em estudos da viabilidade desta camada corneana e um alto percentual de células hexagonais é considerado indicativo de saúde endotelial.^{28,40} Em estudo morfológico das células endoteliais de equinos, Faganello *et al.*²¹ descreveram o polimorfismo presente no mosaico endotelial, composto em sua maioria por células hexagonais (57,6%), seguido por células pentagonais (20,7%), heptagonais (19,5%) e octagonais (2,3%). No presente estudo as células hexagonais também compuseram a maior parte do mosaico endotelial, seguidas pelas células penta e heptagonais, mas células octagonais foram raramente visualizadas e acrescidas das células com quatro e nove lados, compuseram 1,3% das células visualizadas.

Em estudo realizado com suínos¹², foi observada diferença estatística entre o percentual de células hexagonais da região central e região periférica, mas tal estudo não especifica qual região periférica foi avaliada. Nas pesquisas realizadas em humanos,⁴¹ o endotélio foi avaliado quanto à densidade nas regiões central e nos quadrantes periféricos da córnea; dentre as regiões periféricas, a região superior teve o maior incremento de células por milímetro quadrado, com aumento de cerca de 16% em comparação com a região central. Com base nestas pesquisas, o pleomorfismo foi avaliado nas regiões central e periférica superior da córnea de ambos os olhos dos animais utilizados neste estudo, com objetivo de que, caso existissem, fossem encontradas diferenças entre as regiões corneanas avaliadas.

Os resultados obtidos no presente estudo inferem que não houve diferença significativa no pleomorfismo endotelial entre as regiões central e periférica superior. Em pesquisas anteriores também foram comparadas as regiões central e periférica da córnea.^{6,12-14,17,18,31,42,43} Em equinos,²¹ foram encontrados 55,4%, 57,8%, 58,6%, 56,1% e 56,9% de células hexagonais nas regiões central, superior, inferior, temporal e nasal, respectivamente. Células com menos de seis lados compuseram na área central 22,7%, na

área superior 20,8%, na área inferior 20,1%, na área temporal 21,7% e na área nasal 21,6%. Em relação às células com mais de seis lados, a porcentagem média encontrada foi de 21,9% no centro, 21,3% na área superior, 21,2% na área inferior, 22,2% na área temporal e 21,5% na área nasal. Não foram encontradas diferenças significativas entre as regiões avaliadas. Em humanos, a região central da córnea foi comparada às regiões periféricas através de valores de densidade celular, não sendo visualizada diferença estatística entre as regiões endoteliais em córneas saudáveis.^{40,42,43} Resultados semelhantes foram encontrados em cães: Pigatto *et al.*⁴⁴ avaliaram o endotélio saudável desta espécie e os resultados não diferiram significativamente entre as regiões avaliadas. Já em suínos, as células hexagonais representaram 61,7% da região central e 53,2% da região periférica, células com cinco lados formaram 21,3% e 28,9% do centro e da periferia, respectivamente, e as células heptagonais compuseram 11% da região central e 18,1% da região periférica. Neste estudo, as porcentagens de células hexagonais e heptagonais foram estatisticamente diferentes entre a córnea central e periférica.¹²

No presente estudo não foi observada diferença significativa na porcentagem de células hexa, penta e heptagonais entre machos e fêmeas e entre os olhos direitos e esquerdos dos animais avaliados, semelhante ao que foi descrito em equinos, suínos, gatos e chinchilas.^{12,15,19,21} Já em estudo realizado por Kochar *et al.*,⁴⁵ foram avaliados 4 grupos de pessoas: adultos jovens (25 ± 5 anos), jovens idosos (60 ± 5 anos), adultos submetidos a cirurgia de catarata (50 a 60 anos) e pacientes recentemente diagnosticados com glaucoma. Neste trabalho foi encontrada diferença significativa entre os sexos, uma vez que no grupo de adultos jovens os homens tinham o endotélio mais hexagonal do que as mulheres ($p=0.042$). Entretanto, a porcentagem de células penta e heptagonais não foi relatada e nos demais grupos não houve diferença significativa entre os sexos.

A avaliação de características morfométricas em estudos com uso da microscopia eletrônica de varredura é prejudicada, visto que a etapa de desidratação necessária ao

processamento das amostras resulta em retração das mesmas. Espera-se de 11 a 39% de retração nas amostras corneanas submetidas à fixação com glutaraldeído.^{25,30,46} Tal retração que ocorre nas amostras corneanas não inviabiliza o uso da microscopia eletrônica para sua avaliação, mas demanda cuidado ao interpretar os resultados obtidos, principalmente em se tratando de alterações de tamanho. No presente estudo foram utilizados os valores de área celular para comparar as células penta, hexa e heptagonais entre elas e nas diferentes regiões da córnea. Desta forma, a retração celular ocorrida devido à fixação com glutaraldeído e a desidratação no processamento das amostras para a microscopia eletrônica de varredura não inviabilizou a análise dos resultados, bem como em estudos anteriores.^{12,24}

Os valores de área média das células avaliadas não diferiram entre as regiões da córnea. Desconsiderando-se as regiões corneanas, os valores médios de área das células pentagonais, hexagonais e heptagonais avaliadas foram significativamente diferentes, sendo que as células pentagonais foram as menores e as maiores foram as heptagonais. Resultados semelhantes foram descritos em coelhos.⁸

Além dos parâmetros normalmente empregados na análise endotelial, a relação entre o formato e a área celular média tem sido proposta.^{8,47} No entanto, estes estudos limitam-se a espécie humana^{50,51} e em coelhos.⁸ Doughty³⁰ recomenda que o coeficiente de variação seja calculado para cada tipo morfológico de célula.

No presente estudo, o polimegatismo foi avaliado em grupos com células de cinco, seis e sete lados. Este parâmetro mede a variação do tamanho das células avaliadas, quanto mais próximo do zero, mais uniformes são as células em relação ao seu tamanho.²⁹ Em estudo realizado em pinguins por Pigatto *et al.*,³¹ foi descrita uma relação inversa entre o polimegatismo e a hexagonalidade endotelial. Da mesma forma, O'Neal e Polse²⁹ discorreram a respeito do coeficiente de variação da área celular, sendo este inversamente proporcional à taxa de recuperação corneana. Tais dados estão de acordo

com o sugerido por Bergmanson⁷, de que durante a reparação celular as laterais da célula tendem a se reorganizar para formar um ângulo que progressivamente aproxima-se do plano corneano em vez de ser aproximadamente perpendicular à córnea. Assim, os lados adotam uma posição oblíqua, permitindo uma sobreposição celular e aumento do polimegatismo. No presente estudo, o coeficiente de variação foi maior nas células heptagonais; da mesma forma, quando o coeficiente de variação foi calculado unindo os grupos de células pentagonais, hexagonais e heptagonais em duplas, os pares com as células heptagonais tiveram um coeficiente de variação maior. Resultados semelhantes foram descritos por Rao *et al.*,⁵¹ no endotélio corneano saudável de humanos, a quantidade de células heptagonais visualizadas teve forte correlação positiva com o polimegatismo da região avaliada. Levando-se em consideração as pesquisas anteriores e os resultados do presente estudo, sugere-se que quando ocorre remodelamento do mosaico endotelial, o aumento do coeficiente de variação é fortemente influenciado pelo aumento das células heptagonais.

Conclusões

De acordo com as condições experimentais propostas, foi possível concluir que a morfologia das células endoteliais de equinos saudáveis não diferiu entre as regiões central e periférica superior da córnea. As células com sete lados tem polimegatismo maior que as células com seis e cinco lados.

Referências

1. Nautscher N, Bauer A, Steffl M, Amselgruber WM. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. *Vet Ophthalmol.* 2016; 19(4): 297–304. doi: 10.1111/vop.12298.
2. Mishima S. Clinical Investigations on the Corneal Endothelium. *Am J Ophth.* 1982; 93: 1-29.

3. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye*. 1990; 4: 389-424.
4. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*. 2003; 22:359-389.
5. Ledbetter EC, Scarlett JM. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Vet Ophthalmol*. 2009; 12(1): 57–64. doi: 10.1111/j.1463-5224.2009.00730.x.
6. Gwin RM, Lerner I, Warren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1982; 22(2): 267-271.
7. Bergmanson JPG. Histopathological analysis of corneal endothelial polymegethism. *Cornea*. 1992; 11(2): 133-142.
8. Doughty MJ, Dilts DM. Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer - application to corneal endothelium. *Tissue Cell*, 1994; 26(4): 621-626.
9. Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *Am J Vet Res*. 2001; 62(4): 479-482.
10. Pigatto JAT, Andrade MC, Laus JL, *et al*. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Vet Ophthalmol*. 2004; 7(3): 205-208. doi: 10.1111/j.1463-5224.2004.04025.x
11. Pigatto JAT, Franzen AA, Pereira FQ, *et al*. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Cienc Rural*. 2009; 39(3): 926-929.
12. Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artonia SM, Laus JL, Mendes-Vicentini FA, Pigatto JA, Abib FC. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Cienc Rural*. 2009; 39(1): 117-122.
13. Bercht BS, Albuquerque L, Araujo ACP, Pigatto JAT. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Vet Ophthalmol*. 2015; 18(1): 137-142. doi: 10.1111/vop.12236.
14. Coyo N, Peña MT, Costa D, Ríos J, Lacerda R, Leiva M. Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. *Vet Ophthalmol*. 2015; 1-6 doi: 10.1111/vop.12308.
15. Brambatti G, Albuquerque L, Vargas EVB, Neumann CF, Pigatto JAT. Corneal endothelial cell density and morphology in rabbits' eyes using contact specular microscopy. *Cienc Rural*. 2017; 47(12): 1-5. doi:10.1590/0103-8478cr20170027.
16. Wilson RS, Roper-Hall MJ. Effect of age on the endothelial cell count in the normal eye. *Br J Ophthalmol*. 1982; 66: 513-515.
17. Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *Am J Vet Res*. 2002; 63(3): 326-329.
18. Pigatto JAT, Abib FC, Pizzeti JC, Laus JL, Santos JM, Barros PSM. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci Vet*. 2005; 33(1): 41-45.

19. Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Vet Ophthalmol*. 2010; 13(4): 222–226.
20. Albuquerque L, Freitas LVR, Pigatto JAT. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. *Semin Cienc Agrar*. 2015; 36(6): 4199-4206. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4199.
21. Faganello CS, Silva VRM, Andrade MCC, Carissimi AS, Pigatto JAT. Morphology of endothelial cells from different regions of the equine cornea. *Cienc Rural*. 2016; 46(12): 2223-2228. doi: 10.1590/0103-8478cr20160216.
22. Kitazawa K, Yokota I, Sotozono C, Kinoshita S. Measurement of Corneal Endothelial Surface Area Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography in Normal Subjects. *Cornea*, 2016; 35(9): 1229-1233. doi: 10.1097/ICO.0000000000000963.
23. Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clin Exp Optom*. 1998; 81(6): 245-254.
24. Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Rigueiro MP, Smith RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet Ophthalmol*. 2006; 9(2): 101-107. doi: 10.1111/j.1463-5224.2006.00427.x
25. Doughty MJ, Bergmanson JPG, Blocker Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. *Tissue Cell*. 1997; 29(5): 533-547.
26. Eggeling P, Pleyer U, Hartmann C, Rieck PW. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. *J Cataract Refract Surg*. 2000; 26: 1403-1408.
27. Terzariol M, Hünning PS, Brambatti G, Albuquerque L, Neumann C, Pigatto JAT. Effects of intracameral brilliant blue on the corneal endothelium of swine: in vitro study. *Pesqui Vet Bras*. 2016; 36(8): 775-780. doi: 10.1590/S0100-736X2016000800016.
28. Abib FC, Barreto J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *J Cataract Refract Surg*. 2001; 27: 1574-1578.
29. O'Neal MPV, Polse KA. Decreased endothelial pump function with aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27: 457-463.
30. Doughty MJ. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application. *Optom Vis Sci*. 1989; 66(9): 626-642.
31. Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM, et al. Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Zoo Wildl Med*. 2005; 36(4): 702-705.
32. Brooks DE, Plummer CE, Kallberg ME *et al*. Corneal transplantation for inflammatory keratopathies in the horse: visual outcome in 206 cases (1993-2007). *Vet Ophthalmol*. 2008; 11(2): 123-133. doi: 10.1111/j.1463-5224.2008.00611.x.
33. McMullen RJ Jr, Gilger BC, Michau TM. Modified lamellar keratoplasties for the treatment of deep stromal abscesses in horses. *Vet Ophthalmol*. 2015; 18(5): 393-403. doi: 10.1111/vop.12227.

34. Farias RJM, Kubokawa KM, Schirmer M, Sousa LB. Avaliação de córneas doadoras em lâmpada de fenda e microscopia especular durante o período de armazenamento. *Arq Bras Oftalmol.* 2007; 70(1): 79-83. doi: 10.1590/S0004-27492007000100015
35. Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol.* 1981; 65(12): 815-819.
36. Saad HA, Terry MA, Shamie N *et al.* An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. *Cornea.* 2008; 27(7): 818-824. doi: 10.1097/ICO.0b013e3181705ca2.
37. Doughty MJ, Müller A, Zaman ML. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. *Cornea.* 2000; 19(2).
38. Oliveira F, Oliveira MAC, Muccioli C. Corneal specular microscopy in infectious and noninfectious uveitis. *Arq Bras Oftalmol.* 2009; 72(4). doi: 10.1590/S0004-27492009000400006
39. Abib FC, Holzchuc R, Hida R, Holzchuc N. A proposal for indices of reliability for endothelial exams with specular microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(1).
40. Müller A, Craig JP, Grupcheva CN, McGhee CNJ. The effects of corneal parameters on the assessment of endothelial cell density in the elderly eye. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:325-330. doi:10.1136/bjo.2003.019315.
41. Amann J, Holley GP, Lee S-B, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol.* 2003; 135: 584-590.
42. Blackwell WL, Gravenstein N, Kaufman HE. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. *Am J Ophthalmol.* 1977; 84: 473-476.
43. Hoffer KJ. Vertical endothelial cell disparity. *Am J Ophthalmol.* 1979; 87: 344-349.
44. Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesqui Vet Bras.* 2008; 28(9): 427-430. doi: 10.1590/S0100-736X2008000900006
45. Kochar A, Bhargava P, Agarwal P, Maurya L. Comparison of corneal endothelial cell parameters in four different groups by specular microscope. *Int Journal of Medical Science and Public Health.* 2016; 5(9): 1863-1868. doi: 10.5455/ijmsph.2016.18112015364.
46. Virtanen J, Uusitalo H, Palkama A, Kaufman H. The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and morphology in scanning electron microscopy. *Acta Ophthalmol.* 1984; 62(4): 577-585.
47. Nurzynska K, Piorkowski A. The correlation analysis of the shape parameters for endothelial image characterization. *Image Anal Stereol.* 2016; 35(3). doi: 10.5566/ias.1554
48. Gronkowska-Serafin J, Piorkowski A. Corneal endothelial grid structure factor based on coefficient of variation of the cell sides lengths In: *Advances in Intelligent Systems and Computing: Image Processing and Communications Challenges 5.* Springer; 2014:13-19.

49. Piorkowski A, Mazurek P, Gronkowska-Serafin J. Comparison of assessment regularity methods dedicated to isotropic cells structures analysis. In: *Advances in Intelligent Systems and Computing: Image Processing and Communications Challenges 6*. Springer; 2015:169-178.
50. Piorkowski A, Nurzynska K, Boldak C, Reska D, Gronkowska-Serafin J. Selected aspects of corneal endothelial segmentation quality. *J Med Info & Techn.* 2015; 24.
51. Rao GN, Lohman LE, Aquaella JV. Cell size-shape relationship in corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982; 22(2): 271-274.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível capturar imagens com alta resolução para avaliação da morfologia e mensuração da área celular de amostras de endotélio corneano de equinos. Além disso, foi possível correlacionar a área com o formato celular.

A morfologia celular predominante nas células endoteliais de córneas saudáveis de equinos foi a hexagonal e os valores morfológicos obtidos não diferiram entre as regiões central e periférica superior da córnea, sugerindo que a região central pode ser extrapolada para a região periférica.

O coeficiente de variação encontrado entre as células com sete lados foi maior que o polimegatismo das células com cinco e seis lados.

REFERÊNCIAS

- ABIB, F. C. **Microscopia Especular de Córnea**. Manual e Atlas. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- ABIB, F. C.; BARRETO, JR. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, New York, v.27, p.1574-1578, Oct. 2001.
- ALBUQUERQUE, L.; FREITAS, L. V. R. P.; PIGATTO, J. A. T. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 4199-4206, Dec. 2015.
- AMANN, J.; HOLLEY, G. P.; EDELHAUSER, H. F. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 135, n. 5, p. 584-590, May. 2003.
- ANDRADE, M. C. C. **Avaliação do endotélio corneano de equinos após exposição ao corante azul brilhante 0,05% - estudo *in vitro***. 2016. 45 f. Tese (Doutorado em Medicina Animal - Equinos) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- ANDREW, S. E. *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 62, n. 4, p. 479-482, Apr. 2001.
- ANDREW, S. E.; WILLIS, A. M.; ANDERSON, D. E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 63, n. 3, p. 326-329, Mar. 2002.
- BERCHT, B. S. *et al.* Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 137-142, Jan. 2015.
- BERGMANSON, J. P. G. Histopathological analysis of corneal endothelial polymegethism. **Cornea**, New York, v. 11, n. 2, p. 133-142. Mar. 1992.
- BLACKWELL, W. L.; GRAVENSTEIN, N.; KAUFMAN, H. E. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 84, n. 4, p. 473-476, Oct. 1977.
- BOTEON, J. E. Histologia do endotélio corneano. *In*: ABIB, F. C. **Microscopia Especular de Córnea: Manuel e Atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med Livros e Revinterl, 2000. p. 3-5.
- BOURNE, W. M.; McLAREN, J. W. Clinical responses of the corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, London, v. 78, n. 3, p. 561-572, Mar. 2004.
- BRAMBATTI, G. *et al.* Corneal endothelial cell density and morphology in rabbits' eyes using contact specular microscopy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 12, p. 1-5. 2017.

CASTRO, L. A. S. **Documentos 93 Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. Disponível em: <www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744135/1/documento93.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2017.

CLODE, A. B. Diseases and surgery of the cornea. *In*: GILGER, B. C. **Equine Ophthalmology**. 2nd ed. Maryland Heights: Elsevier, 2011. p. 181-266.

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

COYO, N. *et al.* Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 367-372, Sep. 2015.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. Disponível em: <www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2017

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, v. 37, n. 3, p. 588-598, Mar. 2011.

DÍAZ-VALLE, D. *et al.* Endothelial damage with cataract surgery techniques. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, v. 24, n. 7, p. 951-955, July. 1998.

DOUGHTY, M. J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application. **Optometry and Vision Science**, Baltimore, v. 66, n. 9, p. 626-642, Sep. 1989.

DOUGHTY, M. J. The cornea and corneal endothelium in the aged rabbit. **Optometry and Vision Science**, Baltimore, v. 71, n. 12, p. 809-818, Dec. 1994.

DOUGHTY, M. J.; BERGMANSON, J. P.; BLOCKER, Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. **Tissue Cell**, Edinburgh, v. 29, n. 5, p. 533-547, Oct. 1997.

DUBIELZIG, R. R. *et al.* **Veterinary Ocular Pathology: a comparative review**. Elsevier, 2010.

EGGELING, P. *et al.* Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, v. 26, n. 6, p. 1403-1408, Sept. 2000.

FAGANELLO, C. S. *et al.* Morphology of endothelial cells from different regions of the equine cornea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 12, p. 2223-2228, Dez. 2016.

- FARIAS, R. J. M. *et al.* Avaliação de córneas doadoras em lâmpada de fenda e microscopia especular durante o período de armazenamento. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 79-83, Jan./Fev. 2007.
- FRANZEN, A. A. *et al.* Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 222–226, July 2010.
- GALLAGHER, B. C. Primary cilia of corneal endothelium. **The American Journal of Anatomy**, New York, v. 159, n. 4, p. 475-484, Dec. 1980.
- GEROSKI, D. H. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. **Ophthalmology**, Rochester, v. 92, n.6, p. 759-763, June. 1985.
- GILGER, B. C. Equine Ophthalmology. *In*: GELLAT, K. N.; GILGER, C. G.; KERN, T. J. **Veterinary Ophthalmology**. 5rd ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2013. p. 1560-1610.
- GWIN, R. M. *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 22, n. 2, p. 267-271, Feb. 1982.
- HOFFER, K. J. Vertical endothelial cell disparity. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 87, n. 3, p. 344-349, Mar. 1979.
- HÜNNING, P. S. **Morfologia das células do endotélio de diferentes regiões da córnea de cães (*Canis familiaris*) utilizando a microscopia óptica**. 2015. 70 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- JEOL. **Scanning electron microscope A to Z: Basic knowledge for using the SEM**. 2009. Disponível em: <www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem_atoz_all.pdf> Acesso em: 26 dez. 2017.
- JOYCE, N. C. Proliferative capacity of corneal endothelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 359-389, May 2003.
- KITAZAWA, K.; YOKOTA, I.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. Measurement of Corneal Endothelial Surface Area Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography in Normal Subjects. **Cornea**, New York, v. 35, n. 9, p. 1229-1233, Sep. 2016.
- KOCHAR, A. *et al.* Comparison of corneal endothelial cell parameters in four different groups by specular microscope. **International Journal of Medical Science and Public Health**, v. 5, n. 9, p. 1863-1868, 2016.
- LAING, R. A. Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental Eye Research**, London, v. 22, n. 6, p. 587-594, June. 1976.
- 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, July. 1988.

LEDBETTER, E.C.; SCARLETT, J.M. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.12, s.1, p. 57–64, Nov./Dec. 2009.

MALISKA, A.M. Microscopia eletrônica de varredura. **Apostila, Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em:** <www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2017.

MAURICE, D. M. The location of the fluid pump in the cornea. **The Journal of Physiology**, London, v. 221, n. 1, p. 43-54, Feb. 1972.

MEYER, L. A.; UBELS, J. L.; EDELHAUSER, H. F. Corneal endothelial morphology in the rat. Effects of aging, diabetes, and topical aldose reductase inhibitor treatment. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 29, n. 6, p. 940-948, June. 1988.

MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. **Ophthalmology**, Rochester, v. 89, n.6, p. 525-530, June. 1982.

MÜLLER, A. *et al.* The effects of corneal parameters on the assessment of endothelial cell density in the elderly eye. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 88, p. 325-330. Mar. 2004.

NAGATSUYU, C. E. *et al.* Non-contact specular microscopy in aphakic and pseudophakic dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 4, p. 682-687. April. 2014.

NAUTSCHER, N. *et al.* Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. **Veterinary Ophthalmology, Oxford**, v.19, n.4, p. 297-304, July. 2016.

NURZYNSKA, K.; PIORKOWSKI, A. The correlation analysis of the shape parameters for endothelial image characterization. **Image Analysis & Stereology**. v. 35, n.3, p. 149-158, 2016.

O'NEAL, M. P. V., POLSE, K. A. Decreased endothelial pump function with aging. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 27, n. 4, p. 457-463, Apr. 1986.

PADUA, I. R. M. *et al.* Effects of intracameral ascorbic acid on the corneal endothelium of dogs undergoing phacoemulsification. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 151-159, Mar. 2018.

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Morphometric analysis of the corneal endothelium of yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 205-208, May/June 2004.

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, 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, Dec. 2005b.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 476-480, 2006.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 9, p. 427-430, Sept. 2008.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 926-92, May/June. 2009.
- PIORKOWSKI, A. *et al.* Selected aspects of corneal endothelial segmentation quality. **Journal of Medical Informatics & Technologies**, v. 24, p. 155-164, 2015.
- RAMSEY, D. T.; HAUPTMAN, J. G.; PETERSEN-JONES, S. M. Corneal thickness, intraocular pressure, and optical corneal diameter in Rocky Mountain Horses with cornea globosa or clinically normal corneas. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 60, n. 11, p. 1317-1321, Oct. 1999.
- RODRIGUES, G. N. *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 101-107, Mar./Apr. 2006.
- SAAD, H. A. *et al.* An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye stain and Adobe Photoshop software. **Cornea**, New York, v. 27, n. 7, p. 818-824, Aug. 2008.
- SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. *In*: GELLAT, K. N.; GILGER, C. G.; KERN, T. J. **Veterinary Ophthalmology**. 5th ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2013. p. 39-170.
- SCHULTZ, R. O. *et al.* Response of the corneal endothelium to cataract surgery. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 104, n. 8, p. 1164-1169, Aug. 1986.
- TAMAYO-ARANGO, L. J. *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 117-122, Jan./Feb. 2009.
- TERZARIOL, M. *et al.* Effects of intracameral brilliant blue on the corneal endothelium of swine: *in vitro* study. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 8, p. 775-780, Aug. 2016.
- TUFT, S. J.; COSTER, D. J. The corneal endothelium. **Eye**, London, v. 4, n. 3, p. 389-424, May. 1990.
- VAN DER WOERDT, A. *et al.* Effect of auriculopalpebral nerve block and intravenous administration of xylazine on intraocular pressure and corneal thickness in horses.

American Journal of Veterinary Research, Chicago, v. 56, n. 2, p. 155-158, Feb. 1995.

VIRTANEN, J. *et al.* The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and morphology in scanning electron microscopy. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 62, n. 4, p. 577-585, Aug. 1984.

WILLIAMS, K. K. *et al.* Correlation of histologic corneal endothelial cell counts with specular microscopic cell density. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 110, n. 8, p. 1146-1149, Aug. 1992.

WILSON, R. S.; ROPER-HALL, M. J. Effect of age on the endothelial cell count in the normal eye. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 66, n. 8, p. 513-515, Aug. 1982.

YEE, R. W. *et al.* Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 26, n. 9, p. 1191-1201, Sept. 1985.