

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

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO SUÍNO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA APÓS APLICAÇÃO DE AZUL BRILHANTE A 0,05% NA CÂMARA
ANTERIOR – ESTUDO *IN VITRO*

MARIANA TESSARIOLI

PORTO ALEGRE

2013

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO SUÍNO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA APÓS APLICAÇÃO DE AZUL BRILHANTE A 0,05% NA CÂMARA
ANTERIOR – ESTUDO *IN VITRO*

Autora: Mariana Tessarioli

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias na
área de Cirurgia Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2013

Mariana Tessarioli

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO SUÍNO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA APÓS APLICAÇÃO DE AZUL BRILHANTE A 0,05% NA CÂMARA
ANTERIOR – ESTUDO *IN VITRO*

Aprovada em 30/04/2013

Aprovada por:

Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

Orientador e Presidente da banca

Prof^a. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araújo

Membro da banca

Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck

Membro da banca

Prof. Dr. Luciano Porto Bellini

Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional. O apoio de vocês foi essencial em cada etapa da minha vida e formação profissional. Nunca conseguirei expressar em palavras meu amor e minha eterna gratidão a vocês. Eu tenho sorte por ter pais tão maravilhosos!

Ao meu marido Fabrício por estar ao meu lado sempre, por acreditar nos meus sonhos e não medir esforços para que chegássemos até aqui. Meu amor por você é eterno!

Aos meus irmãos (Eduardo e Fernando) e às minhas cunhadas (Jaine e Vanessa) pela amizade e carinho. A distância nunca será capaz de afastar uma família realmente unida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto pelos grandes ensinamentos, pela confiança e amizade. Com certeza estar sob sua orientação me fez uma profissional melhor!

Aos amigos do Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFRGS, em especial aos amigos Gustavo Brambatti, Fabiana Quartieiro, Paula Stieven Hünning e Flor Claros pela amizade, pelas trocas de idéias e informações, pelos diversos momentos memoráveis e por estarem sempre ao meu lado. Vocês estarão sempre no meu coração!

Aos residentes, mestrandos, doutorandos, estagiários e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

Aos queridos amigos que fiz na Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS durante a realização deste mestrado. Em especial a Mauren Nunes e Monaliza Cadori pelas incontáveis palavras amigas, amizade, apoio e incentivo.

Ao Sr. Paulo Vivcentini pela grande ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos que também atuam na área de oftalmologia veterinária, em especial à Adriana Lima Teixeira e Renata Squarzoni por me incentivarem a nunca desistir de me tornar uma profissional melhor. À vocês sou eternamente grata!

Aos meus familiares e amigos por entenderem novamente as minhas ausências por causa das minhas escolhas profissionais. Mesmo longe, estamos sempre perto!

À todos vocês, muito obrigada!

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO SUÍNO POR MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA APÓS APLICAÇÃO DE AZUL BRILHANTE A 0,05%
NA CÂMARA ANTERIOR – ESTUDO *IN VITRO***

Autora: Mariana Tessarioli

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto

RESUMO

Diversos corantes vitais vêm sendo estudados e utilizados para a facilitação da capsulotomia curvilínea contínua (CCC) nas cirurgias de catarata no homem e nos animais. Além de corar adequadamente a cápsula anterior da lente e favorecer um melhor desempenho do cirurgião durante a realização da CCC, os corantes vitais devem ser seguros quanto aos seus efeitos sobre as estruturas oculares, em especial ao endotélio corneano, quando empregados com esta finalidade. O azul brilhante é um corante vital já empregado em cirurgias oculares do segmento posterior para coloração da retina e atualmente estudado sobre seu potencial de utilização em cirurgias de catarata para coloração da cápsula anterior da lente. Com o objetivo de avaliar os efeitos do uso intracameral do azul brilhante 0,05% na ultra-estrutura do endotélio corneano de suínos, vinte córneas de suínos foram avaliadas divididas em dois grupos: córneas dos bulbos oculares direitos (grupo controle) e esquerdos (grupo experimental). Todos os bulbos oculares foram previamente avaliados por microscopia especular. No grupo experimental foi realizada injeção intracameral de 0,2ml do corante azul brilhante 0,05% (OPHTH-blue®) que permaneceu por um minuto antes de ser removido pela aplicação de solução salina balanceada. As córneas de ambos os grupos foram excisadas e avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Não houve diferença entre as imagens endoteliais obtidas em ambos os grupos. O uso intracameral do azul brilhante 0,05% não causou efeitos deletérios ao endotélio corneano dos suínos e pode, portanto, ser considerado uma escolha segura para a coloração da cápsula anterior da lente para cirurgias de catarata.

Palavras chaves: *Azul brilhante 0,05%, toxicidade, endotélio corneano, suínos.*

SWINE CORNEAL ENDOTHELIUM SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AFTER BRILLIANT BLUE 0.05% INTRACAMERAL USE – *IN VITRO* STUDY

Author: Mariana Tessarioli

Advisor: João Antonio Tadeu Pigatto

ABSTRACT

Several vital dyes have been studied and used to help the continuous curvilinear capsulotomy (CCC) in cataract surgery in men and animals. Besides staining the anterior capsule of the lens properly and providing the surgeons a better performance in the CCC, the vital dyes must be safe for their effects on ocular structures, particularly the corneal endothelium when used for this purpose. The brilliant blue is a vital dye already employed in the posterior segment eye surgeries for retinal staining and currently studied about its potential use in cataract surgeries to stain the anterior capsule of the lens. In order to evaluate the effects of the use of 0.05% intra-cameral brilliant blue in the ultra-structure of the corneal endothelium of pigs, twenty swine corneas were evaluated in two groups: right eye bulb corneas (control group) and left eye bulb corneas (experimental group). All eye bulbs were previously evaluated by specular microscopy. In the experimental group, a 0.2 ml intra-cameral injection of 0.05% brilliant blue dye (blue-OPHTH®) was given, which remained for a minute before being removed by the application of balanced salt solution. The corneas of both groups were excised and evaluated by scanning electron microscopy. There was no difference between the endothelial images obtained in both groups. The use of 0.05% intra-cameral brilliant blue caused no detrimental effects to the corneal endothelium of pigs and can therefore be considered a safe choice for staining the anterior capsule of the lens for cataract surgery.

Key words: *Brilliant blue 0.05%; toxicity; corneal endothelium; swine.*

LIST OF FIGURES

Figure 1 -	Specular micrograph of the normal corneal endothelium of a pig from experimental group.....	30
Figure 2 -	Image of experimental swine ocular bulb corneal endothelium (pig #9) in scanning electron microscope showing the interdigitations (red arrow), microvillus (green arrow), evident nucleus (yellow arrow). It is possible to note tight intercellular adhesion (2.000x amplified).....	31
Figure 3 -	Comparative swine corneal endothelium scanning electron microscope images from each control and experimental group, respectively (1.000x amplified).....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivos gerais	11
2.1	Objetivos específicos	11
3	REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1	O endotélio corneano	12
3.2	Efeitos da cirurgia de catarata sobre o endotélio corneano	14
3.3	A capsulotomia curvilínea contínua	16
3.4	O uso de corantes vitais na cirurgia de catarata	17
3.4.1	Fluoresceína.....	19
3.4.2	Violeta de Genciana.....	19
3.4.3	Sangue autólogo.....	20
3.4.4	Indocianina Verde.....	20
3.4.5	Azul de trypan.....	21
3.4.6	Azul brilhante.....	23
4	MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	24
5	ARTIGO: Effects of brilliant blue intracameral on corneal endothelium of swines – <i>In vitro</i> study	25
	<i>Abstract</i>	25
	<i>Introduction</i>	26
	<i>Materials and methods</i>	27
	<i>Results</i>	28
	<i>Discussion</i>	32
	<i>Conclusion</i>	36
	<i>Acknowledgments</i>	36
	<i>References</i>	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7	CONCLUSÕES	40
8	LISTA DE REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos fatores que podem causar lesões ao endotélio corneano estão o uso de medicações e a realização de procedimentos cirúrgicos intra-oculares (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Nos últimos anos a cirurgia de catarata evoluiu significativamente com o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e equipamentos, aumentando a obtenção de bons resultados deste procedimento em humanos e nos animais. Porém, para melhorar ainda mais os resultados da cirurgia é importante que o cirurgião de catarata utilize o mínimo de medicações possível, realize manobras delicadas, utilize incisões corneanas pequenas e diminua o tempo operatório (WILKIE & COLITZ, 2007).

A realização da capsulotomia curvilínea contínua (CCC) durante a cirurgia de catarata é considerada uma etapa crítica do procedimento, principalmente em cataratas brancas ou hiper maduras, que não apresentam o reflexo de fundo do olho (CHANG *et al.*, 2005; JACOBS *et al.*, 2006). Nesses casos, ocorre uma maior dificuldade na visibilização da cápsula anterior da lente, o que dificulta ainda mais esta etapa da cirurgia. Durante a CCC, um melhor controle do *flap* da cápsula anterior a ser excisada é muito importante e pode ser obtido quando há uma satisfatória visibilização da cápsula anterior da lente (MARBACK, *et al.*, 2001).

As técnicas que podem ser empregadas para facilitar a realização da CCC se baseiam em dois princípios. O primeiro consiste no uso de equipamentos e realizações de manobras que favoreçam a visibilização da cápsula anterior e facilitem a CCC, como a diminuição da luz da sala cirúrgica, a realização da cirurgia com grande magnificação, utilização de iluminação oblíqua do campo cirúrgico e o uso de viscoelástico de alta densidade. Além disso, a realização da capsulotomia por diatermia ou por uma incisão inicial triangular reversa, a capsulotomia realizada em duas etapas e a aspiração de cataratas liquefeitas também constituem manobras que podem ser empregadas. O segundo princípio para facilitação da CCC se baseia na utilização de corantes que favoreçam a visibilização da cápsula anterior em cataratas maduras (PANDEY, 2000; DADA *et al.*, 2004).

O uso de corantes vitais para facilitar a realização da CCC através da coloração da cápsula anterior do cristalino vem sendo atualmente bastante utilizado em cirurgias de cataratas maduras com discreta visibilização ou ausência do reflexo de fundo, assim como para o treinamento de cirurgiões em formação (SINGH *et al.*, 2003; JACOBS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Porém, os efeitos tóxicos de qualquer corante a ser utilizado em cirurgias intra-oculares devem ser avaliados antes da implementação de seu uso na rotina hospitalar (REMY *et al.*, 2008). Um corante ideal para facilitação da CCC deve corar satisfatoriamente a cápsula anterior do cristalino com o mínimo efeito de toxicidade tecidual (HISATOMI *et al.*, 2006).

Até o presente momento, diversos corantes vitais vêm sendo testados e utilizados para a coloração da cápsula anterior da lente e facilitação da CCC em cirurgias de catarata. Alguns estudos já abordaram o uso do corante azul brilhante a 0,05% para facilitação da CCC. Porém, este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos endoteliais, por microscopia eletrônica de varredura, do uso intracameral do azul de brilhante em bulbos oculares de suínos, considerados modelos experimentais para a cirurgia de catarata.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Utilizar, *in vitro*, o azul brilhante a 0,05% como corante vital para facilitar a realização da capsulotomia curvilínea contínua em bulbos oculares de suínos.

2.2 Objetivos específicos

Determinar por microscopia eletrônica de varredura quais os efeitos do azul brilhante no endotélio da córnea de suínos após a aplicação *in vitro* do azul brilhante a 0,05% na câmara anterior para facilitação da capsulotomia curvilínea contínua.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O endotélio corneano

O endotélio corneano consiste em uma camada única de células poligonais hexagonais, em sua maioria, que recobre a superfície posterior da córnea (RAO *et al.*, 1982; PIGATTO *et al.*, 2005; GUM, 2007; PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARAUJO *et al.*, 2009; FRAZEN, 2010). Está em contato anteriormente com a membrana de Descemet e posteriormente com o humor aquoso (TUFT & COSTER, 1990; PIGATTO *et al.*, 2005). Sua integridade e atividade metabólica são essenciais para a manutenção da transparência corneana em diversas espécies animais, sejam elas terrestres, aquáticas ou aéreas (COLLIN & COLLIN, 1998; TAMAYO-ARAUJO *et al.*, 2009).

As células endoteliais da maioria das espécies animais como nos cães, gatos, suínos, coelhos, chinchilas e no homem apresentam bordos irregulares com interdigitações e vilosidades na superfície celular (TUFT & COSTER, 1990; COLLIN & COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005; RIGON *et al.*, 2007; PIGATTO *et al.*, 2008). Acredita-se que a maioria das espécies também possua cílios na região central da superfície posterior das células endoteliais. Sua presença já foi descrita por diversos autores em células endoteliais do homem, outros primatas, suínos, pássaros e coelhos, porém, o processamento das amostras e o estresse fisiológico podem fazer com que os cílios se quebrem ou se retraiam, dificultando sua observação nas amostras endoteliais em estudo (COLLIN & COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005; TAMAYO-ARAUJO *et al.*, 2009).

Enquanto a presença das microvilosidades e interdigitações aumentam a superfície de contato celular e a adesão intercelular, a função dos cílios ainda não está bem estabelecida. Acredita-se que os cílios possam ter função de quimiorreceptores, osmorreguladores ou de detectores de pressão. Alguns autores associam também a presença de cílios à capacidade mitótica das células endoteliais, embora a mitose destas células ocorra apenas em algumas espécies como nos coelhos ou em alguma fase do desenvolvimento, como em animais jovens (COLLIN & COLLIN, 1998).

Por ser um dos meios refrativos mais importantes do bulbo ocular, a córnea deve permanecer transparente. Para que isso ocorra a ausência de vasos sanguíneos locais, um

organizado arranjo das fibras colágenas estromais e a manutenção do estado de deturgescência ou semidesidratação da córnea são fundamentais (GUM, 2007).

O estado de deturgescência da córnea depende de diversos fatores. Dentre eles destacam-se a manutenção da integridade do epitélio e do endotélio corneano, que provêm barreiras físicas que impedem o afluxo do filme lacrimal e do humor aquoso para as camadas mais internas da córnea (GUM, 2007). O endotélio é a camada da córnea com maior atividade metabólica e principalmente através de mecanismos de bombeamento ativo, pela presença de bombas de Na^+ e K^+ , expulsam a água do estroma corneano em direção a câmara anterior e mantém a córnea em um constante estado de deturgescência (TUFT & COSTER, 1990, COLLIN & COLLIN, 1998; GUM, 2007).

A atividade mitótica das células endoteliais ainda é controversa, embora diversos estudos apontem que na maioria dos animais e no homem, a ocorrência de mitoses das células endoteliais se restrinja apenas a indivíduos jovens (RAO *et al.*, 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; GUM, 2007). Com o avançar da idade ocorre, tanto no homem como nos animais, uma redução natural na contagem de células endoteliais, assim como uma maior ocorrência de polimorfismo e polimegatismo entre as células endoteliais (ERNER *et al.*, 1982; PIGATTO *et al.*, 2005; GUM, 2007; FRAZEN, 2010).

O homem ao nascer apresenta uma contagem aproximada de 5000 células endoteliais por mm^2 . Aos vinte anos essa contagem de células endoteliais sofre uma redução de aproximadamente 50%, chegando a uma contagem média de 2500 células por mm^2 . A partir daí, o endotélio corneano passa a perder cerca de 0,6% de células endoteliais anualmente (PARIKH & EDELHAUSER, 2003). Além da redução natural na densidade de células endoteliais, injúrias ao endotélio corneano decorrentes de procedimentos cirúrgicos e afecções oculares podem promover uma perda de células endoteliais ainda maior (RAO *et al.*, 1982; TUFT & COSTER 1990; PARIKH & EDELHAUSER, 2003; PIGATTO *et al.*, 2005; TAMAYO-ARAUJO *et al.*, 2009). Contagens de células endoteliais inferiores a 800 células por mm^2 no homem caracterizam córneas edematosas e com perda de transparência (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

Nos cães, a densidade de células endoteliais em um animal jovem é de aproximadamente 3000 células/ mm^2 , havendo uma redução de cinquenta por cento ou mais na contagem de células endoteliais por mm^2 nesses animais com o passar dos anos. O início da descompensação

endotelial nesta espécie ocorre quando as contagens celulares chegam entre 800 a 500 células por mm^2 (GUM, 2007).

A morfologia do endotélio corneano está diretamente relacionada ao seu funcionamento (RAO *et al.*, 1982). A redução natural ou induzida no número de células endoteliais leva a um aumento de tamanho celular e aumento da atividade metabólica das células remanescentes gerando também um maior polimorfismo e polimegatismo no endotélio corneano (ERNER *et al.*, 1982). A presença de uma maior quantidade de células poligonais diversas, com menor contagem de células endoteliais hexagonais, assim como a presença de células de maiores diâmetros indicam uma função metabólica endotelial deficiente, com menor quantidade de interdigitações e menor adesão celular, o que favorece uma maior entrada de líquido na córnea e maior espessura corneana (RAO *et al.*, 1982).

Portanto, considerando a perda progressiva e natural das células endoteliais com a idade e sua possível intensificação decorrente de diversos fatores, os cirurgiões devem priorizar uma manipulação delicada durante cirurgias intra-oculares, assim como optar pelo uso de soluções de irrigação, medicações e instrumentais que proporcionem mais segurança ao paciente, e promovam o mínimo dano possível às células endoteliais (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

3.2 Efeitos da cirurgia de catarata sobre o endotélio corneano

A cirurgia de catarata é uma área em constante desenvolvimento na oftalmologia (MOHAMMADPOUR *et al.*, 2012). O primeiro método de tratamento da catarata era realizado por meio do deslocamento da lente para a câmara posterior e foi introduzido na Índia. Este método foi utilizado por aproximadamente três mil anos, embora outros métodos de tratamento fossem testados nesta época. Em 1750, o cirurgião francês Jacques Daviel realizou a primeira técnica cirúrgica extra-capsular para a remoção da catarata, porém, devido às dificuldades desta técnica, iniciou-se a utilização da técnica de facectomia intra-capsular como o método cirúrgico de escolha para o tratamento da catarata, que teve muitos adeptos até o início da década de cinquenta (SOUZA *et al.*, 2006). Com o uso desta técnica, porém, havia uma maior possibilidade de ocorrência de complicações como perda vítrea, descolamento de retina, hemorragias e alto grau de astigmatismo pós-cirúrgico (MOHAMMADPOUR *et al.*, 2012).

A partir da década de cinquenta, com o início da utilização do microscópio cirúrgico juntamente com o desenvolvimento da técnica de facectomia extra-capsular e facoemulsificação por Kelman em 1965, assim como a implementação do uso de lentes intra-oculares, instalou-se uma nova era na cirurgia de catarata que provém até hoje um tempo de constantes mudanças e atualizações (SOUZA *et al.*, 2006).

Atualmente a maioria dos cirurgiões de catarata em todo o mundo utiliza a técnica de facectomia extracapsular programada ou facectomia extracapsular por facoemulsificação para o tratamento da catarata. Com o uso destas técnicas objetiva-se a manutenção da cápsula posterior da lente intacta e da remoção do núcleo e córtex da lente por uma “janela” na cápsula anterior da lente e uma menor taxa de complicações (WAZIRI-ERAMEH & EDEMA, 2006; MOHAMMADPOUR *et al.*, 2012).

Danos às células endoteliais durante cirurgias de catarata são inevitáveis. Por isso, a avaliação do endotélio corneano do paciente antes da cirurgia, assim como o reconhecimento dos fatores de risco relacionados a uma maior perda de células endoteliais são importantes para que os cirurgiões possam escolher a técnica ideal e tenham os cuidados necessários para evitar a ocorrência de descompensação endotelial após o procedimento (ISHIKAWA, 2002).

Embora a facoemulsificação seja atualmente a técnica de escolha para a cirurgia de catarata nos homens e nos animais, a descompensação corneana devido à perda de células endoteliais durante o procedimento é uma possível complicação (CHIURCIU *et al.*, 2010). Vários fatores podem afetar o endotélio corneano durante o procedimento, dentre eles a turbulência dos fluidos e fragmentos da lente, as bolhas de ar produzidas durante o procedimento, a energia ultrassônica utilizada e efeitos das soluções de irrigação utilizadas (KISS *et al.*, 2003).

Com a implementação da facoemulsificação, a cirurgia de catarata passou a ter uma maior taxa de sucesso, se tornou mais rápida, passou a causar menor desconforto pós-operatório e facilitou a implantação da lente intra-ocular. Atualmente na medicina veterinária, os animais que passam pela cirurgia podem ser submetidos ao implante de lente intra-ocular. Com a possibilidade de implantação da lente intra-ocular após o procedimento, os animais passam a ter uma visão praticamente normal, com melhor acuidade visual tanto para perto como para longe, ficando hipermetropes 14D com uma razoável visão de longe quando não submetidos à implantação da lente (KLEINER, 2007).

Cabe aos cirurgiões oftalmologistas estarem atentos, portanto, não apenas a todas as substâncias, medicações e instrumentos a serem utilizados em procedimentos intra-oculares, mas também aos procedimentos realizados para que complicações durante e após o procedimento possam ser evitadas (KATARIA, 2004).

3.3 A capsulotomia curvilínea contínua

Três fatores contribuíram sinergicamente para o desenvolvimento da cirurgia de catarata moderna: o progresso tecnológico; a implementação de novas técnicas cirúrgicas, principalmente com a abertura da cápsula anterior da lente por meio de uma incisão curvilínea contínua; e o desenvolvimento das lentes intra-oculares dobráveis (SOUZA *et al.*, 2006).

Nenhum passo da cirurgia de catarata realizada atualmente é tão importante quanto a CCC (BHATTACHARJEE *et al.*, 1999). A CCC ganhou notoriedade em todo o mundo devido às diversas vantagens decorrentes de sua realização e é atualmente a técnica de escolha para a abertura da cápsula anterior da lente para as cirurgias de catarata por facoemulsificação ou para as facectomias extracapsulares programadas (PANDEY *et al.*, 2000). A importância de uma CCC perfeitamente confeccionada é permitir uma manipulação segura dentro do saco capsular durante a cirurgia de catarata e facilitar a implantação da lente intra-ocular (MELLES, 1999; BHATTACHARJEE *et al.*, 1999).

Normalmente, cataratas brancas ou sem reflexo de fundo e cataratas intumescentes são desafios aos cirurgiões para a confecção de uma perfeita CCC (BHATTACHARJEE *et al.*, 1999). A CCC ideal deve ser realizada exatamente na região central da cápsula anterior da lente e possuir diâmetro discretamente menor (01 mm) que o diâmetro da lente intra-ocular a ser inserida no saco capsular. A CCC ideal permite que as manobras cirúrgicas sejam realizadas de maneira mais segura, desde a hidrodissecção até a remoção do conteúdo cortical e nuclear da lente, promovendo com isso uma menor ocorrência de opacificação da cápsula posterior da lente após a cirurgia (FRIEDMAN *et al.*, 2011). Além disso, a obtenção de uma CCC sem complicações é importante para diminuir os riscos da ocorrência de rasgos na cápsula anterior da lente durante o procedimento, assim como para permitir a colocação da lente no saco capsular após o procedimento (PANDEY *et al.*, 2000; WAZIRI-ERAMEH & EDEMA, 2006).

Na remoção de catarata em humanos o uso de corantes vitais para a facilitação da CCC é preconizado principalmente em cataratas brancas, sem reflexo de fundo de olho (MELLES *et al.*, 1999; AKMAN & ACOVA; 2003). Através do uso dos corantes, é possível uma melhor visibilização do *flap* da cápsula anterior durante a realização da CCC, aumentando a taxa de sucesso na sua confecção (MELLES *et al.*, 1999).

Para cataratas imaturas, o uso de corantes vitais é controverso. Alguns autores consideram o uso dos corantes nesses casos pouco efetivo para uma melhor visibilização do *flap* da cápsula anterior da lente, além de gerar um maior custo à cirurgia e expor desnecessariamente o endotélio corneano a uma substância química (AKMAN & ACOVA; 2003). Porém, além da facilitação do procedimento em cataratas brancas, em casos de opacidade corneana ou opacidade vítrea, o uso de corantes vitais, também é considerado importante para o aprendizado de cirurgiões em formação, tanto no aprendizado da técnica em cataratas brancas ou não (WAZIRI-ERAMEH & EDEMA, 2006).

Waziri-Erameh *et al.* (2006) descreveram um estudo com oito residentes em treinamento para a cirurgia de catarata. Os cirurgiões em treinamento foram divididos em dois grupos, um que utilizou e outro que não utilizou o corante azul de trypan para a facilitação da CCC *in vivo*. No grupo dos residentes que utilizaram o corante, 50% deles conseguiram realizar a CCC na primeira tentativa, 25% na segunda tentativa e 25% na terceira tentativa. Já no grupo de cirurgiões que não utilizaram o corante, 25% deles conseguiram realizar o procedimento na segunda tentativa, 25% na terceira tentativa e 50% não foram capazes de realizar a CCC nem mesmo depois da terceira tentativa. Para estes autores, o uso de corantes vitais para a coloração da cápsula anterior da lente no treinamento de cirurgiões pode reduzir a curva de aprendizado do procedimento.

3.4 O uso de corantes vitais na cirurgia de catarata

Corantes são diversas substâncias que se combinam a outras para promover coloração e quando utilizados em tecidos vivos recebem a denominação de corantes vitais. O uso de corantes vitais para facilitar a visibilização da cápsula anterior da lente e facilitação da CCC em cirurgias de catarata sem reflexo de fundo teve início em 1993 com o uso da fluoresceína e atualmente, devido à importância desta etapa na cirurgia de catarata, muitos estudos estão voltados ao uso de

corantes vitais para facilitação da CCC (MELLES *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000; ÜNLÜ *et al.*, 2000; YETIK *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2009).

O uso desses corantes vem sendo uma opção principalmente em cirurgias de cataratas em pacientes com cataratas brancas e ausência de reflexo de fundo, além de facilitar a CCC em crianças e em pacientes com opacidades corneanas. Além disso, o treinamento de cirurgiões em formação e a localização de uma área de ruptura da cápsula anterior durante o procedimento também são benefícios do uso dos corantes para a coloração da cápsula anterior da lente (PANDEY *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2005). Em cirurgias por facoemulsificação, o uso de corantes vitais para a facilitação da CCC promoveu uma redução de 28,3% para 3,85% na taxa de conversão dos procedimentos para facectomias extra-capsulares devido a falhas na confecção da CCC (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Diversos corantes vitais já foram utilizados para facilitação da CCC como a fluoresceína, indocianina verde, sangue autólogo, violeta genciana, azul de metileno e azul de trypan (MELLES *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000; ÜNLÜ *et al.*, 2000; YETIK *et al.*, 2002), porém, atualmente o corante mais utilizado para a facilitação da CCC é o azul de trypan (YETIK *et al.*, 2002). Apesar da maioria desses corantes corarem adequadamente a cápsula anterior da lente, concentrações elevadas da indocianina verde, azul de metileno e violeta de genciana apresentam toxicidade às células endoteliais. Já o azul de trypan e a fluoresceína são considerados mais seguros em diversas concentrações para este fim (CHANG *et al.*, 2005).

Chang *et al.* (2005) em estudo com bulbos oculares de coelhos, concluíram que as mínimas concentrações necessárias dos corantes indocianina verde, azul de metileno, violeta genciana, azul de trypan e fluoresceína para uma coloração efetiva da cápsula anterior da lente quando em contato por um minuto com os corantes foram de 0,25%; 0,1%; 0,01%; 0,1% e 1,25% respectivamente.

Dentre os diversos corantes já utilizados para a facilitação da CCC, apenas o uso do azul de trypan está aprovado para esta finalidade pela *Food and Drug Administration* - FDA (Administração de alimentos e fármacos) nos Estados Unidos (YETIK *et al.*, 2002; MOHAMMADPOUR *et al.*, 2012).

As principais características referentes aos corantes atualmente mais estudados e utilizados para a facilitação da CCC estão descritas a seguir:

3.4.1 Fluoresceína

A fluoresceína no ano de 1993 foi o primeiro corante utilizado para a coloração da cápsula anterior da lente (PANDEY *et al.*, 2000). As vantagens do uso da fluoresceína para a facilitação da CCC consistem na facilidade de sua obtenção e seu baixo custo (DADA *et al.*, 2004). Porém, devido ao seu baixo peso molecular, este corante vital pode promover não apenas a coloração da cápsula anterior da lente, como também da córnea e do vítreo, o que caracteriza uma desvantagem do seu uso para a facilitação da CCC (PANDEY *et al.*, 2000; DADA *et al.*, 2004).

Para a coloração da cápsula anterior da lente com fluoresceína, normalmente utiliza-se a solução de fluoresceína a 2%, obtida pela diluição de 1ml do corante de utilização intravenosa a 10% diluído em 4ml de solução salina balanceada (DADA *et al.*, 2004).

3.4.2 Violeta de Genciana

O corante violeta de genciana também denominado cristal violeta ou metil violeta é solúvel em água e utilizado principalmente em preparações histológicas e no tratamento de injúrias dermatológicas (RODRIGUES *et al.*, 2009). Atualmente alguns estudos vêm descrevendo também sua utilização para a coloração da cápsula anterior da lente e como corante marcador para córnea e conjuntiva (ÜNLÜ *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2009). É encontrado comercialmente na forma de cristais e deve ser dissolvido em água destilada para uso intracamaral (ÜNLÜ *et al.*, 2000).

Concentrações de 0,01% e 0,001% do corante foram testadas no homem e em ratos para uso intracamaral. Ambas as concentrações se mostraram efetivas para a coloração da cápsula anterior da lente, porém o corante a 0,01% promoveu uma melhor visibilização do *flap* durante a CCC que o corante a 0,001%, sem que houvesse diferença nos aspectos pós-operatórios relacionados a maior concentração do corante utilizado. Uma maior concentração do corante violeta genciana, associada ao corante azul de metileno foi associada a lesão endotelial e maior ocorrência de edema corneano, porém, acredita-se que a toxicidade deste corante seja concentração dependente, já que concentrações de 0,01 ou 0,001% não causaram alterações histopatológicas que demonstrem toxicidade (ÜNLÜ *et al.*, 2000).

O corante na concentração de 0,001% normalmente utilizado para a coloração da cápsula anterior da lente é obtido através da dissolução de 0,5g do corante comercialmente disponível em forma de cristais em 100ml de água destilada seguida da dissolução de 1ml desta solução em 4ml de solução salina balanceada e posterior dissolução de 1ml desta mistura em 9ml de solução salina balanceada seguida novamente pela dissolução de 1ml desta nova mistura em 9ml de solução salina balanceada (DADA *et al.*, 2004).

As vantagens do uso do corante de violeta genciana para a coloração da cápsula anterior da lente estão relacionadas ao seu baixo custo e obtenção de uma coloração homogênea da cápsula anterior, porém, seu processo de dissolução, a necessidade de esterilização do corante após seu preparo e a forte coloração do local de incisão da córnea constituem algumas das desvantagens do seu uso (DADA *et al.*, 2004).

3.4.3 Sangue autólogo

Uma das formas de obtenção do soro autólogo para a coloração da cápsula anterior da lente é através da centrifugação a 2000rpm de 2ml de sangue do paciente durante 2 minutos. Embora seu uso não promova uma coloração muito efetiva da cápsula anterior e não permita boa visibilização da estrutura durante o procedimento seu uso vem sendo considerado uma opção para a facilitação da CCC em cirurgias de catarata (DADA *et al.*, 2004).

3.4.4 Indocianina Verde

A indocianina verde é um corante vital que foi utilizado inicialmente na medicina para a avaliação da perfusão renal e para a realização de angiografia da retina (CHANG *et al.*, 2005). Desde o final dos anos 90 este corante também vem sendo bastante estudado para a facilitação da CCC. Atualmente é considerado um corante efetivo para promover uma boa visibilização da cápsula anterior da lente e seguro para uso intracameral, sem provocar danos às células endoteliais (PANDEY *et al.*, 2000; KATARIA, 2004). Além de seu uso em cirurgias de catarata, este corante também vem sendo utilizado na angiografia da retina e coloração da membrana limitante durante cirurgias de retina (KATARIA, 2004; CHANG *et al.*, 2005).

Embora a concentração mais utilizada deste corante para a coloração da cápsula anterior da lente seja a 0,5%, Chang *et al.*, (2005) verificaram que concentrações a 0,25% deste corante são suficientes e mais efetivas que as colorações obtidas pelo uso da fluoresceína 0,2% e pelo uso do azul de trypan a 0,1% para a coloração da cápsula anterior da lente em estudo experimental com coelhos (PANDEY *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2005).

Este corante vital é vendido liofilizado, e deve ser dissolvido em solução salina balanceada numa concentração de 0,5% para uso intracameral nas cirurgias de catarata (KATARIA, 2004). Para a obtenção do corante de indocianina verde a 0,5% deve-se proceder a dissolução de 25mg do corante liofilizado disponível comercialmente em 5ml da água para dissolução que acompanha o produto e depois adicionar à solução 4,5ml de solução salina balanceada (DADA *et al.*, 2004; KATARIA, 2004).

O custo elevado do corante de indocianina verde disponível comercialmente e a necessidade de sua diluição para uso intracameral são as desvantagens relacionadas ao uso deste corante. O uso da indocianina verde em cirurgias de catarata se torna viável apenas quando utilizado em um grupo de pacientes em cirurgias consecutivas já que o mesmo deve ser utilizado em até dez horas após dissolução (PANDEY *et al.*, 2000; DADA *et al.*, 2004). Além disso, Allen *et al.* (2006) descreveram um caso de toxicidade retiniana no homem em decorrência do extravasamento da indocianina verde a 0,5% para a câmara posterior durante a coloração da cápsula anterior da lente em um paciente de 37 anos, sendo este mais um fator de risco a ser considerado na escolha e uso com cautela do corante para a facilitação da CCC.

3.4.5 Azul de Trypan

O corante azul de trypan é uma substância hidrofílica com capacidade de corar células desvitalizadas que vem sendo atualmente utilizado em cirurgias de vitrectomia e cirurgias de catarata (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Foi utilizado inicialmente para a avaliação das células endoteliais de córneas e posteriormente para verificar a possibilidade de uso das córneas a serem transplantadas por corar fortemente o núcleo de células em degeneração e a camada de Descemet nas regiões de ausência de células endoteliais (SPENCE & PAYMAN, 1976; DOOREN *et al.*, 2004).

Melles e colaboradores em 1999 foram os primeiros pesquisadores que utilizaram o azul de trypan 0,1% para a coloração da cápsula anterior da lente e obtiveram uma satisfatória coloração da cápsula anterior da lente e nenhum efeito tóxico aparente do corante às estruturas oculares.

Marback *et al.* em 2001 descreveram o uso do azul de trypan 0,25% para a coloração da cápsula anterior da lente em seis olhos de seis pacientes que seriam submetidos à facoemulsificação. O corante nesta concentração se mostrou efetivo para a coloração da cápsula anterior dos pacientes e não provocou diferença significativa nos achados pós-operatórios desses pacientes comparados aos achados de rotina sem o uso de corantes por esses mesmos cirurgiões.

Nos estudos relacionados ao dano endotelial relacionado ao uso de corantes vitais para a facilitação da CCC durante a facoemulsificação, Dooren *et al.* (2002) compararam a densidade de células endoteliais de vinte e cinco pacientes submetidos à facoemulsificação de cataratas imaturas em ambos os olhos logo após e dez anos após o procedimento. Tanto o grupo de olhos que receberam o corante azul de trypan a 0,03% intracameral para coloração da cápsula anterior da lente, como o grupo dos bulbos oculares contralaterais, operados sem o uso do corante não tiveram diferença significativa na densidade de células endoteliais, paquimetria e porcentagem de células hexagonais logo após e dez anos após o procedimento, não havendo, portanto, uma perda celular relacionada ao uso do corante.

Diversas concentrações do corante são efetivas e seguras para uso intracameral e facilitação da CCC. Concentrações de 0,05%, 0,025%, 0,0125% e 0,00625% já foram testadas por Yetik *et al.* (2002) na tentativa de se obter a menor concentração necessária do corante para a coloração efetiva da cápsula anterior da lente, sendo todas efetivas, exceto o corante a 0,00625% que não permitiu uma boa visibilização da cápsula anterior.

Embora diversas concentrações do corante sejam consideradas eficientes para a coloração da cápsula anterior da lente, a concentração a 0,1% do corante é a mais utilizada nas cirurgias de catarata e está disponível comercialmente (MELLES *et al.*, 1999; DADA *et al.*, 2004).

Apesar do corante não provocar danos ao endotélio corneano, uma desvantagem quanto ao seu uso deve-se ao fato deste corante estar listado na relação de substâncias carcinogênica do índice Merck (YETIK *et al.*, 2002).

3.4.6 Azul brilhante

Devido aos diversos estudos recentes relacionados à aplicação do corante azul brilhante na oftalmologia, este corante foi aprovado para uso intraocular na Europa em 2007 (RODRIGUES *et al.*, 2009). Sua utilização vem sendo descrita em procedimentos de vítreo e retina e recentemente também na coloração da cápsula anterior da lente (HISATOMI *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Pesquisas recentes quanto ao uso do corante azul brilhante em bulbos oculares de suínos estudaram a possibilidade de seu uso para a coloração da cápsula anterior da lente em cirurgias de catarata e concluíram que a mínima concentração do corante efetiva para uma boa visibilização da cápsula anterior foi de 0,025%. Porém, ainda desconhece-se a seguridade do seu uso intracameral (HISATOMI *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Udaondo *et al.*, 2007, propuseram a utilização do corante azul brilhante para auxílio na curva de aprendizado de cirurgias de catarata em treinamento e utilizaram o corante a 0,83mg/mL por 10 segundos na câmara anterior com o objetivo de corar a cápsula anterior da lente e as regiões de incisões de córnea e facilitar a realização da CCC. Neste estudo, o corante foi considerado uma alternativa efetiva e segura para a coloração da cápsula anterior da lente e auxílio no aprendizado da técnica da CCC para cirurgias em treinamento por não promover reduções nas contagens de células endoteliais maiores que as reduções decorrentes de uma cirurgia de catarata sem o uso do corante ou com o uso do mesmo em menores concentrações.

Seu uso na concentração a 0,05%, disponível comercialmente também se mostrou efetivo na coloração da cápsula anterior da lente em estudo realizado por Udaondo (2007) e Rodrigues *et al.* (2010), porém, a avaliação por microscopia eletrônica de varredura dos efeitos tóxicos ao endotélio corneano deste corante nessa concentração ainda não foi estabelecido.

4 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Esta dissertação de mestrado foi escrita na forma de artigo científico conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A metodologia, os resultados obtidos, a discussão e a conclusão desta pesquisa foram escritos de acordo com as normas da revista internacional *Veterinary Ophthalmology* para a qual o artigo será submetido.

5 ARTIGO

Effects of brilliant blue intracameral on corneal endothelium of swines – *In vitro* study

Mariana Tessarioli*, Paula S. Hünning*, Gustavo Brambatti, Luciane de Albuquerque*, Carolina Neumann*, João A. T. Pigatto*

Abstract

Objectives: To investigate the ultrastructural changes in the corneal endothelium of pigs induced by intracameral 0.05% brilliant blue.

Material and Methods: Twenty swine corneas were separated into two groups, the right eye bulbs (control group) and the left eye bulbs (experimental group) of the same animal. All the eye bulbs were evaluated by specular microscopy. The cornea of the right eye bulbs were excised and in the left eye bulbs 0.2ml of 0.05% brilliant blue vital dye (OPHTH-blue®) were injected in the anterior chamber, where it remained for one minute. Then the anterior chamber was cleaned by balanced salt solution injection and the cornea was excised too. All the corneas were evaluated by scanning electron microscopy to evaluate the changes on the endothelium caused by the brilliant blue dye.

Results: There were no significative differences between the right corneal endothelium cells and the left corneal endothelium cells by scanning electron microscopy after intracameral use of the 0.05% brilliant blue dye.

Conclusion: The brilliant blue dye in the 0.05% concentration did not cause deleterious effects for the swine corneal endothelium after intracameral use and can be a choice for safe staining the anterior capsule of lens in cataract surgery.

Key words: *Brilliant blue 0.05%; toxicity; corneal endothelium; swine.*

INTRODUCTION

Continuous curvilinear capsulorhexis (CCC) is a critical step in cataract surgery, actually in white cataracts, when the red reflex is poor or absent^{1,2}. In these cases, one of the options to facilitate the visualizing of the anterior capsule is the use of vital dyes to stain the anterior capsule of the lens before making the capsulorhexis^{3,4}. The importance of having a better visualizing of the flap during the capsulorhexis is that it increases the surgery success, decreases the chance of anterior capsule tears during the phacoemulsification and ensures the safety in-the-bag implantation of the intraocular lens^{3,5}.

Another suggested use for vital dyes in cataract surgery is to help trainee cataract surgeons during CCC confection and reduce the learning curve for those students^{6,7}. However, the toxic effects of each vital dye have to be evaluated before the start of its use in the hospital routine⁸. An ideal vital dye to facilitate the CCC during cataract surgery needs to stain satisfactorily the anterior capsule of lens and cause the minimal toxic effects on the corneal endothelium⁹.

The fluorescein sodium solution was the first vital dye used to facilitate the capsulorhexis in 1993. From then on, several other vital dyes have been studied and used to stain the anterior capsule of the lens during cataract surgeries such as gentian violet, autologous blood, trypan blue, green indocyanine and brilliant blue^{10,3,11,12,1}.

The endothelium cell loss, due to cataract surgery, is inevitable. For that reason, the patient corneal endothelium evaluated before the surgery and the choice of safe techniques, instruments and irrigations solutions are very important to avoid a large corneal endothelium loss and endothelium decompensation after cataract surgery^{13,14}.

Some researches have studied the use of the brilliant blue vital dye to facilitate the CCC and have suggested that this is a safe dye to corneal endothelium^{9,7}. However, this is the first research to evaluate the endothelium effects of this dye through scanning electron microscopy in swine eyes.

MATERIALS AND METHODS

Twenty normal eye bulbs from ten Landrace pigs, aged one year old, males or females were studied. These eye bulbs were obtained from a licensed Brazilian commercial company (Avisui Abattoir) that breeds these animals for meat production. The eye bulbs were divided into two groups: the control group and the experimental group consisting respectively of the right eye bulbs and the left eye bulbs. All procedures were performed in compliance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement on the use of animals in ophthalmic and vision researches.

Eye bulbs were enucleated immediately after swine euthanatized and transported to the laboratory in moist chamber containing physiologic saline. Eye bulbs were mounted on an eyeball holder and examined using fluorescein test, biomicroscopy (Kowa, SL 15, Japan), and contact specular microscope (Celmax Medical Service, Brazil) with software for corneal endothelium analysis. Specular microscopy was performed on all eye bulbs in order to determine the conditions of the corneal endothelium and those with evidence of alteration being excluded.

Immediately after the specular microscopy, using surgical microscopy a clear corneal incision with a 15° knife was made on the left eye bulbs. One eye bulb received a 0.2ml intra-

cameral injection of 0.05% brilliant blue vital dye¹ and the fellow eye bulb served as a control. The vital dye remained in the left eye bulb in the anterior chambers for one minute and then was removed with a balanced saline salt solution² application.

The corneas and a 2.0 mm rim of sclera were excised, transferred to 2.5% glutaraldehyde in 0.1 sodium cacodylate buffer at pH 7.4 and stored for 24 hours at 4°C for fixation. The corneas were washed in cacodylate buffer and dehydrated through an increasing series of ethanol solutions. Thereafter, the specimens were submitted to critical point drying using liquid carbon dioxide. Corneas were placed on 10mm aluminum stubs with adhesive tape and sputter coated with gold-palladium. The posterior endothelial surfaces were examined and photographed using a scanning electron microscope (JEOL JSM 6060, Japan) operating at 15 kV.

The photomicrographs were scanned into the computer, and the percentage of cell loss was calculated by observing the surrounding areas with absence of endothelial cells. Image analysis were performed by a skilled observer who did not know the source of the photographs with image analyzer software (Leica, Quantimed 500 IW, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK). Ultrastructural characteristics were described using photomicrographs obtained at x1.000 to x3.500. Statistical data analysis would be conducted using the F test if the intercellular empty spaces were found in the endothelium samples. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The specular microscopy showed that normal swine corneal endothelium was characterized by a continuous monolayer of polygonal cells of uniform size and shape (Figure 1). Reproducible images were obtained from all eye bulbs. The main cell density obtained by the

¹ 0,05% Brilliant Blue - OPHT-BLUE®, Ophthalmos, São Paulo/SP, Brazil.

² Balanced saline salt solution - Ophthalmos, São Paulo/SP, Brazil.

contact specular microscope in control groups and experimental groups were 3136 cells/mm² and 3150cells/mm², respectively (Table 1). The parameters evaluated did not differ significantly between the right eye bulbs and the left eye bulbs from the same pig.

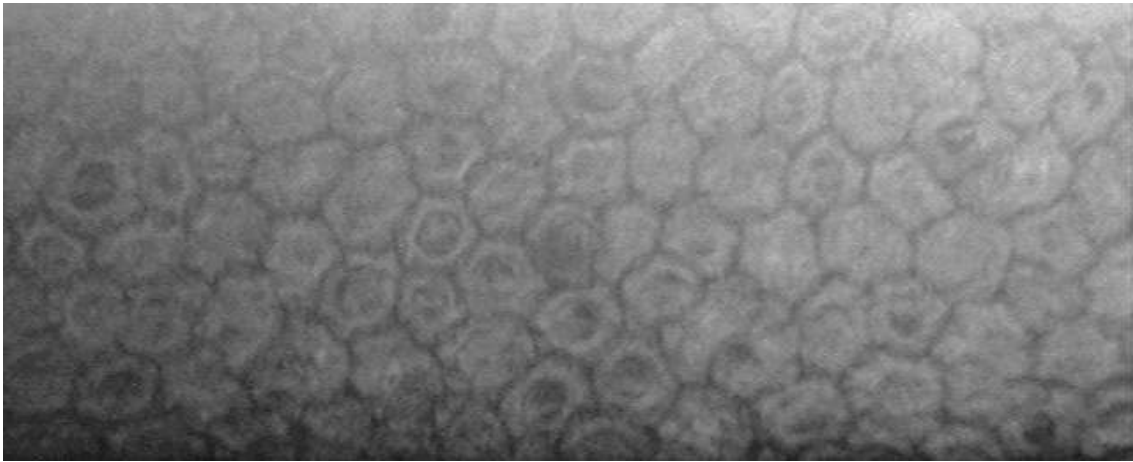


Figure 1 - Specular micrograph of the normal corneal endothelium of a pig from experimental group.

Table 1– Corneal cells endothelium density obtained from control and experimental group corneas by specular microscopy.

Ocular Bulb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average
ROB* (cells/mm ²)	3097	3185	3008	3078	3199	3761	3267	2352	3062	3355	3136
LOB** (cells/mm ²)	3381	2991	3778	3338	3156	2810	3902	2940	2342	2868	3150

(*ROB = right ocular bulb; **LOB = left ocular bulb).

The swine posterior corneal endothelium surface observed on SEM revealed a continuous layer of polygonal cells of uniform size and shape. The scanning electron microscopy images showed similar morphological endothelium characterized by both control and experimental corneas sample groups. All the samples had higher hexagonal cells counts, evident nucleus, presences of interdigitations, microvillus and absence of intercellular empty spaces. The

endothelial cells were interdigitated and adhered in the experimental group and the control group. (Figure 2). In the experimental group and the control group there were no areas with cell loss.

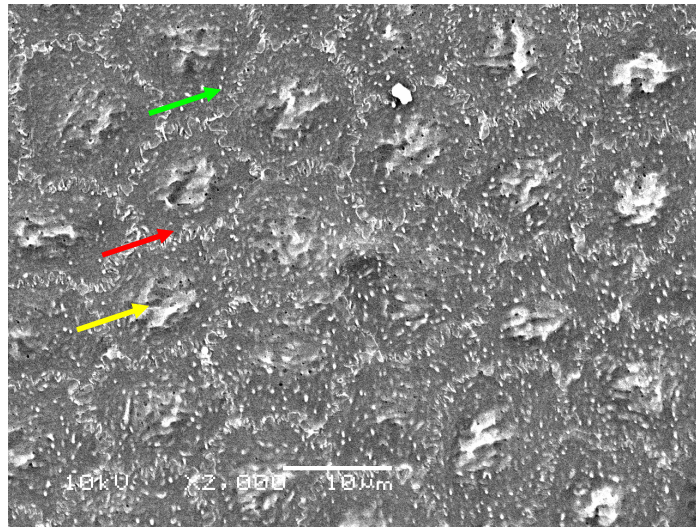


Figure 2 – Image of experimental swine ocular bulb corneal endothelium (pig #9) in scanning electron microscope showing the interdigitations (red arrow), microvillus (green arrow), evident nucleus (yellow arrow). It is possible to note tight intercellular adhesion (2.000x amplified).

The similarity of the control and experimental scanning electron microscope images obtained during the search are showed in the figure 3, that represents part of the sample images. No intercellular empty area was evident and the cellular morphology is similar to all the sample images.

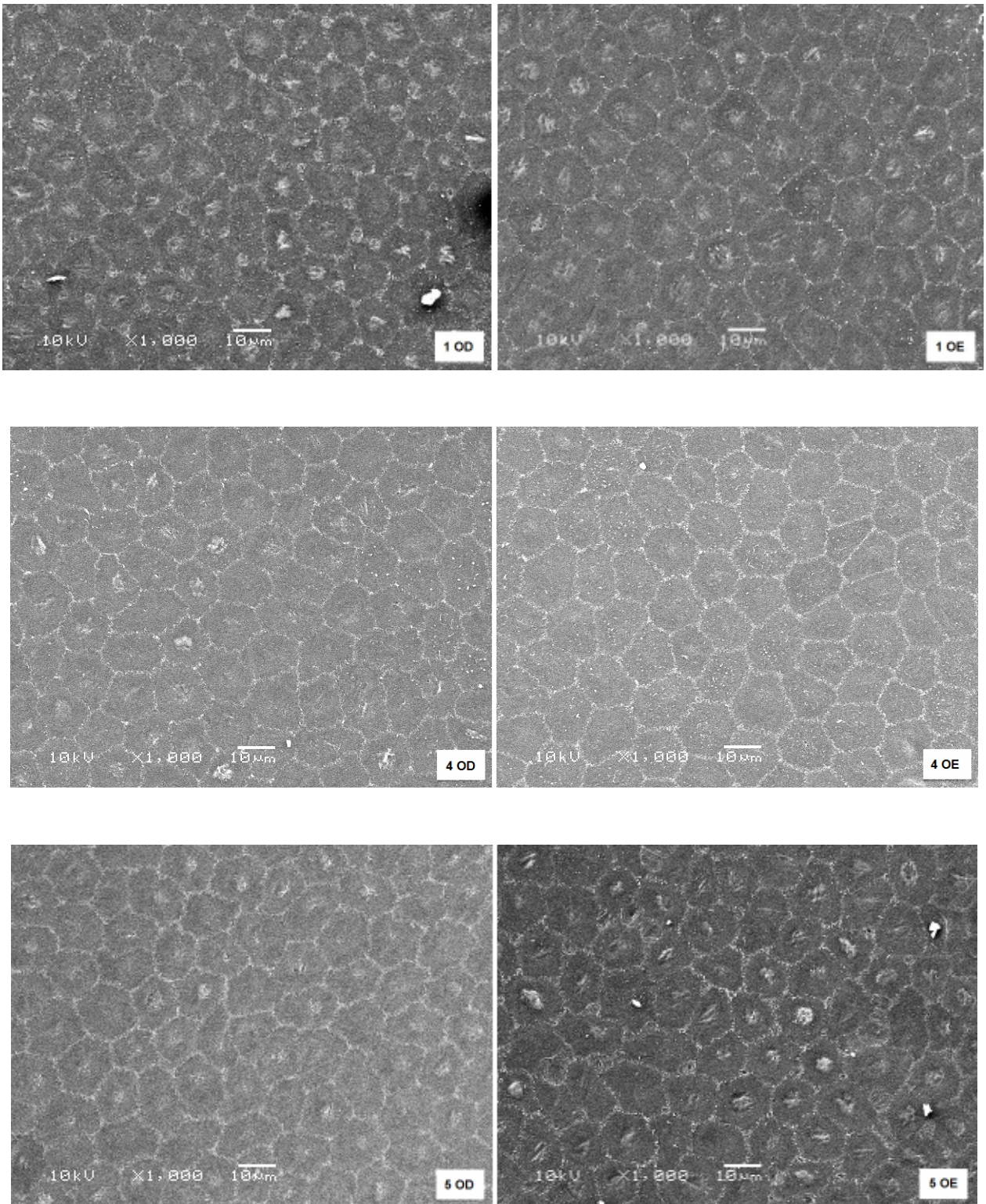


Figure 3 - Comparative swine corneal endothelium scanning electron microscope images from each control and experimental group, respectively (1.000x amplified).

DISCUSSION

The evaluation of the appearance of the corneal endothelium is almost universal nowadays in testing potential toxicity of ophthalmic solutions¹⁵. The brilliant blue vital dye has been considered safe and effective to facilitate the CCC in human white cataract surgery and in the training of cataracts surgeons^{9,7}.

To describe the corneal endothelial effects of its vital dye, this study evaluated the *in vitro* effects to the swine corneal endothelial cells by scanning electron microscopy.

The swine eyes are considered the experimental model for cataract surgeries¹⁶. The ocular bulbs and cornea sizes of pigs, their morphological endothelium characteristics, the facility to get them and their low sale prices are some of the most advantages of this choice in medicine and veterinary medicine¹⁷. Instead of all these reasons, the ocular models to this research were swine ocular bulbs. Furthermore, pigs were chosen as experimental animals because of the morphological similarities between them and human corneas^{16,17}.

In general, there are no significative differences between corneal endothelium parameters of both eye bulbs in the same animal and either between males and females^{18,19,16}. Both ocular bulbs from the same animal were used to get homogeneous samples with similar endothelium corneal. The parameters evaluated by specular microscopy did not differ significantly between the right eye bulb and the left eye bulb from the same pig.

The endothelium cellular membranes integrity for scanning electron microscopy evaluation depends on the adequate tissue preservation and fixation beyond the time after the death of the animal until the use of the tissue samples²⁰. In humans, corneal tissues for transplants must be used until six hours from the donor death and needs to be safely maintained to avoid endothelial damage^{21,22}. The swine corneas in this research were maintained in moist chamber less then six hours until glutaraldehyde fixation to avoid endothelium damage. According to

Pigatto *et al.* (2005) the scanning electron microscopy is one of the best choices to endothelium evaluation *in vitro* and the endothelium images obtained in this research were able to show all the endothelium cells compounds²³, except the endothelium cilia, which is normally the fragile structure in the processing tissues steps for scanning electron microscopy^{20,16}.

The swine corneal endothelium is compounded by polygonal cells, hexagonal in majority likely found in several other animal species and in men. Furthermore, the endothelial cells have interdigitations and microvillus^{24,20,23,25}. Humans and rabbits have twenty to thirty microvilli in the cell superficies, and these structures react to toxic substances changing their sizes²⁰. Both endothelium control and experimental groups presented almost the same morphological characters at scanning electron microscopy analyses, and the microvillus and interdigitation were evident in all sample images. The cilia in swine corneal endothelial cells are described by Tamayo-Arango *et al.* (2009), although in this research neither cell presented these structures¹⁶. The cilia absence or the presence of a few numbers of them in swine endothelium research is due to their fragility during the samples production^{20,16}.

To obtain better visibility of the lens capsule, capsular staining techniques²⁶ that had to be done using a biocompatible dye²⁷ were developed. The use of vital dyes in ophthalmology to facilitate the CCC is actually indicated in white cataracts, without fundus reflex⁵. The CCC technique can be used in planned extracapsular cataract extraction and in phacoemulsification to reduce the risks of tearing during the nucleus and cortex removal and intraocular lens implantation. Unsuccessful CCC increases the risk of posterior capsule rupture, vitreous loss, nucleus drop and intraocular lens displacement. Rodrigues *et al.* (2010), tested the anterior lens stain capacity of the brilliant blue in some concentrations and concluded that the concentration of 0.05% was enough to stain the anterior swine capsule of lens homogenously and promote the

observation of the flap portion (tissue being incised) during CCC, although its effects on corneal endothelium are not totally known²⁸.

Several techniques to stain the anterior capsules of lens have been used as the direct vital dye application in anterior chamber under an air bubble or not, dye application under viscoelastic substance in anterior chamber and subcapsular application^{3,12,27,29}. The last three techniques are indicated to reduce the possible toxic effects of the dye to corneal endothelium^{12,29}. In this research, the use of the brilliant blue intracameral without another substance or air bubble was done to produce direct contacts between the vital dye to the corneal endothelium.

The vital dyes that have been used to stain the anterior capsule of lens are trypan blue, fluorescein, green indocyanine, violet gentian, autologous blood and brilliant blue^{10,3,11,12,1}, although some of them are not considered safe or effective^{3,5}. Trypan blue and green indocyanine selectively stain dead endothelial cells and because the endothelial cells are alive in cataract surgery they do not obstruct the surgeon's view^{26,27}. Nowadays the trypan blue is the vital dye choice used to stain the anterior capsule of lens. Several researches demonstrated no toxic effects from the use of corneal endothelium and the effective in the staining of anterior capsule of lens¹². Both trypan blue and green indocyanine stain the anterior capsule of lens uniformly although XIAO *et al* (2004) considered the staining provided by trypan blue slightly superior²⁷. In this study, the brilliant blue was effectively to stain the anterior capsule of lens and did not provide endothelial cells pigmentation during the experiment, the same examined by Horiguchi *et al.*, (1998) and XIAO *et al.* (2004) that used trypan blue and green indocyanine to facilitate the CCC^{26,27}.

Despite positive points related to its use, the trypan blue is at the carcinogen substances Merck Indices and due to its long date effects, which are not still known, its use in pregnant and children must be avoided¹². The green indocyanine stains the anterior capsule of lens

satisfactorily and does not have toxic effects on the corneal endothelium, but its use has been associated to retinal toxicity in lens subluxation after cataract surgeries²⁹. Because of this, when choosing the vital dye to facilitate CCC during cataract surgeries, their posterior chamber toxic effect must be considered².

Scanning electron microscopy has been widely used to compare the endothelial ultra-structure of vertebrates, and evaluate the effects of medications, chemicals or surgical procedures on the endothelium⁹. The methodology used to assess endothelium a few seconds or minutes after injection of the dye has already been used by other authors^{30,12,24,7}. In the present study, the time of exposure of the corneal endothelium to dye was one minute. This time was chosen because it is normally the maximum time that the dye remains within the eye during cataract surgery².

An advantage of the brilliant blue to the trypan blue and green indocyanine to stain the anterior capsule of lens is that this vital dye has been showed less *in vitro* toxics effects to the corneal endothelial cells⁷. Eggeling *et al.* (2000) examined the *in vitro* potential damaging effects on the swine corneal endothelium of lidocaine in concentrations of 1%, 5%, and 10% trough scanning electron microscopy. The concentration of 1% did not cause any changes at corneal endothelium. In the groups of concentrations of 5% and 10% cell borders were hard to distinguish, single groups of two to three necrotic cells were scattered over the entire endothelium and some of them got a generally swollen aspect of the endothelium with no intact intercellular borders. Furthermore, extended areas of denuded Descemet's membrane impressed with remainders of detached cells were also seen in the last two groups³¹. In this research, the corneas treated with 0.05% brilliant blue showed a normal endothelium upon scanning electron microscopy as seen in the lidocaine 1% group studied by Eggeling *et al.* (2000)³¹. Endothelial cells in our experimental groups were hexagonal in majorly and presented well-defined cell borders and with the typical appearance of the normal cells structures, as the presence of the

nucleus, microvillus, intercellular adhesion and the presence of interdigitation showing no toxic effects of the brilliant blue in the concentration of 0.05% of corneal endothelium. Previous studies with similar methodology using scanning electron microscopy revealed morphological abnormalities in eyes injected with 2% lidocaine, it caused morphological abnormalities, such as decreased corneal endothelial cells with irregularities, damage to the cellular organelles with larger spaces between the endothelial cells, and fewer microvilli³¹.

CONCLUSION

The results of this research showed that the 0.05% brilliant blue vital dye does not damage swine endothelial cells after one minute injected intracamerally and suggested that this vital dye seems to be a safe choice to facilitate de CCC in cataract surgery.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study would not be possible without the cooperation of AVISUI (Santa Maria, RS, Brazil) that kindly cooperated by giving us the eye bulbs and the space for the first steps of the corneal processing.

REFERENCES

1. Chang, YS; Tseng; SY; Tseng, SH. Comparison of dyes for cataract surgery. Part 2: Efficacy of capsule staining in a rabbit model. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2005; 31: 799-804.
2. Jacobs, DS.; Cox,TA; Wagoner, MD; Ariyasu, RG; Karp, CL. Capsule Staining as an Adjunct to Cataract Surgery - A Report from the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2006; 113: 707–713.
3. Pandey, SK.; Werner, L; Escobar-Gomez, M; Roig-Melo, EA; Apple, DJ. Dye-enhanced cataract surgery - Part 1: Anterior capsule staining for capsulorrhexis in advanced/white cataract. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2000; 26: 1052–1059.

4. Dada, VK; Sharma, N; Sudan, R; Sethi, H; Dada, T; Pangtey, MS. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: Comparative clinical study. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2004; 30: 326–333.
5. Marback, EF; Freitas, LL; Fernanda Pelegrino Fernandes, FP; Branco, BC; Belfort Jr, R. Anterior capsule staining using 0.025% trypan blue in cataracts without red reflex. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 2001; 64: 333-335.
6. Waziri-Erameh, JM; Omoti, AE; Edema, MT. The value of Trypan blue dye I the training of ophthalmology resident doctors hands on capsulotomy. *Annals of Biomedicine Science* 2006 June & December; 5:1&2, 73-76.
7. Udaondo P; Díaz-Llopis M; Salom D; García-Delpech S; Cervera E. Brilliant blue G-assisted capsulorhexis: a good help for phacoemulsification surgeons in training. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmologia* 2007; 82: 471-472.
8. Remy, M; Thaler, S; Schumann, RG; May, CA; Fiedorowicz, M; Schuettauf, F; GrüTerich, M; Priglinger, SG; Nentwich, MM; Kampik, A; Haritoglou, C. An in vivo evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. *Brazilian Journal of Ophthalmology* 2008; 92: 1142–1147.
9. Hisatomi, T; Enaida, H;Matsumoto, H; Kagimoto,T; Ueno, A; Hata,Y; Kubota, T; Goto,Y; Ishibashi, T. Staining Ability and Biocompatibility of Brilliant Blue G. *Archives of Ophthalmology* 2006; 124: 514-519.
10. Melles, GRJ; Waard, PWT; Pameyer, JH; Beekhuis, WH. Trypan blue staining to visualize the capsulorhexis in catarata surgery. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 1999; 25: 7-9.
11. Ünlü, K; Askünger, A; Söker, S; Kilinç, N; Karaca, C; Erdinc, M. Gentian violet solution for staining the anterior capsule. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2000; 26: 1228-1232.
12. Yetik, H; Devranoglu K; Ozkan, S. Determining the lowest trypan blue concentration that satisfitorily stains the anterior capsule. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2002; 28: 988-991.
13. Ishikawa, A. Risk factors for reduced corneal endothelial cell density before cataract surgery. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2002; 28: 1982–1992.
14. Parikh, CH; Edelhauser, HF. Ocular surgical pharmacology: Corneal endothelial safety and toxicity. *Current Opinion in Ophthalmology* 2003 August; 14:14, 178-184.
15. Doughty, MJ. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: A review of techniques and their application. *Optometry & Vision Sacione* 1989; 66:9, 626-642.

16. Tamayo-Arango, LJ; Baraldi-Artoni, SM; Laus, JL; Mendes-Vicenti, FA; Pigatto, JAT; Boteon, FC. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural*, Santa Maria jan-fev 2009; 39:1, 117-122.
17. Proulx, S; Brunette, I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Experimental Eye Research* 2012; 95, 68-75.
18. Gum, GG; Gelatt, KN; Esson, DW. Physiology of the eye. In: Gelatt, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Blackwell Publishing, fourth edition, vol.1, 149-182p.
19. Rigon, GM; Hunning, PS; Presser, D; Pigatto, JAT; Araújo, ACP; Rodarte, AC; Sartori, AS. Morfologia das células do endotélio corneano de chinchila (*Chinchilla lanigera*) à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007; 35:2, 646-647.
20. Collin, SP; Collin, HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry* 1998; 8:6, 245-254.
21. Almeida Jr., GC; Watanabe, KP; Teixeira, MF; Cordeiro, JA. Influência da causa do óbito, idade do doador e tempo de preservação da córnea na contagem de células endoteliais num Banco de Olhos vinculado a um hospital escola. *Arquivos de Ciência da Saúde* 2007 Jul-Set, 14:3, 140-144.
22. 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. *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13:4, 222-226.
23. Pigatto, JAT; Abib, FC; Pizzeti, JC; Laus, JL; Santos, JM; Barros, PSM. Análise morfológica do endotélio de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005; 33:1, 41-45.
24. Tuft SJ; Coster, DJ. The Corneal Endothelium. *Eye* 1990; 4: 389-424.
25. Pigatto, JAT; Cerva, C; Freire, CD; Abib, FC; Bellini, LP; Barros, PSM; Laus, JL. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2008 Setembro; 8:9, 427-430.
26. Horiguchi, M; Miyake, K; Ohta, I; Ito, Y. Staining of the lens capsule for circular continuous capsulorhexis in eyes with white cataract. *Archives of Ophthalmology* 1998 Apr; 116: 535-537.
27. Xiao, Y; Wang, Y; Fu, Z; Hong, H. Staining the anterior lens capsule with indocyanine green or trypan blue for capsulorhexis in eyes with white cataract. *International Ophthalmology* 2004; 25: 273-276.

28. Rodrigues, EB, Costa, EF; Penha, FM; Melo, GB; Botto's, J; Dib, E; Furlani, B; Lima, VC; Maia, M; Meyer, CH; Höfling-Lima, AL; Farah, ME. The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. *Survey Of Ophthalmology* 2009 September–October; 54:5, 576-617.
29. Allen, RC; Russell, SR; Schluter, ML, Oetting, TA. Retained posterior segment indocyanine green dye after phacoemulsification. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2006 February; 32: 357-360.
30. Holley, GP; Alam A; Kiri, A; Edelhauser, H.F. 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*, 2002, June, 28:6,, 1027–1033.
31. Eggeling, P; Pleyer, U; Hartmann, C; Rieck, PW. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2000; 6: 1403–1408.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo observou-se que é possível utilizar a microscopia eletrônica de varredura para avaliar os efeitos *in vitro* da aplicação intracameral de corante azul brilhante a 0,05% no endotélio corneano de suínos.

7 CONCLUSÕES

O uso intracameral do corante azul brilhante a 0,05% nos bulbos oculares de suínos não provocou alterações morfológicas ao endotélio corneano e corou efetivamente a cápsula anterior da lente. Portanto, os resultados deste experimento sugerem este corante parece ser uma alternativa segura para a coloração da cápsula anterior da lente e facilitação da CCC em cirurgias de catarata.

8 REFERÊNCIAS

ALLEN, R.C.; RUSSELL, S.R.; SCHLUTER, M.L., OETTING, T.A. Retained posterior segment indocyanine green dye after phacoemulsification. **J Cataract Refract Surg**, v.32, February, 2006, p.357-360.

ALMEIDA JR., G.C.; WATANABE, K.P.; TEIXEIRA, M.F.; CORDEIRO, J.A. Influência da causa do óbito, idade do doador e tempo de preservação da córnea na contagem de células endoteliais num Banco de Olhos vinculado a um hospital escola. **Arq Ciênc Saúde**, Jul-Set, 14:3, 2007, p.140-144.

BART T.H. VAN; DOOREN, B.T.H; WAARD, P.W.T; NOUHUYS, H.P; BEEKHUIS, W.H.; MELLES, G.R.J. Correspondence: Corneal Endothelial Cell Density After Trypan Blue Capsule Staining in Cataract Surgery. **J Cataract Refract Surg**, v.28, April, 2002, 574-575p.

BHATTACHARJEE, K.; BHATTACHARJEE, H.; GOSWAMI, B.J.; SARMA, P. Capsulorhexis in intumescent cataract. **J Cataract Refract Surg**, v..25, 1999, p.1045–1047.

CHANG, YS; TSENG; SY; TSENG, SH. Comparison of dyes for cataract surgery. Part 2: Efficacy of capsule staining in a rabbit model. **J Cataract Refract Surg**, n.31, 2005, p. 799-804.

CHIRURCHIU, J.L.V.; BRANDÃO, C.V.S; A.C.L. RODRIGUES, A.C.L.; RANZANI, J.J.T.; FERREIRA, T.H.; PADOVANI, C.R. Uso de viscoelásticos na facoemulsificação em cães portadores de catarata: efeitos sobre a pressão intra-ocular, a morfologia das células endoteliais e a espessura corneana. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.3, June, 2010, p.570-577.

COLLIN, S.P.; COLLIN, H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clin Exp Optom**, n.8, v.6, 1998, p.245–254.

DADA, V.K.; SHARMA, N.; SUDAN, R.; SETHI, H.; DADA, T.; PANGTEY, M.S. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: Comparative clinical study. **J Cataract Refract Surg**, n.30; 2004; p.326–333.

DOOREN, B.T.H. VAN; BEEKHUIS, H.; PELS, E. Biocompatibility of trypan blue with human corneal cells. **Arch Ophthalmol**, v.122, 2004, p.736-742.

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

EGGELING, P.; PLEYER, U.; HARTMANN, C.; RIECK, P.W. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. **J Cataract Refract Surg**, v.6, 2000, p.1403–1408.

FRANZEN, A.A.; PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C.; ALBUQUERQUE, L.; LAUS, J.L. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.4, 2010, p.222–226.

FRIEDMAN, N.J.; PALANKER, D.V., SCHUELE, G.; ANDERSEN, D.; MARCELLINO, G.; SEIBEL, B.S.; BATLLE, J.; FELIZ, R.; TALAMO, J.H., BLUMENKRANZ, M.S.; CULBERTSON, W.W. Femtosecond laser capsulotomy. **J Cataract Refract Surg**, v.37, 2011, 1189–1198p.

GUM, G.G.; GUM, K.N.; ESSON, D.W. Physiology of the eye. In: GUM, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. Blackwell Publishing, fourth edition, 2007, vol.1, p.149-182.

HISATOMI, T.; ENAIDA,H.;MATSUMOTO, H.; KAGIMOTO,T.; UENO, A.; HATA,Y.; KUBOTA, T.; GOTO,Y.; ISHIBASHI, T. Staining Ability and Biocompatibility of Brilliant Blue G. **Arch Ophthalmol.**, n.124, 2006, p.514-519.

HORIGUCHI, M.; MIYAKE, K.; OHTA, I.; ITO, Y. Staining of the lens capsule for circular continuous capsulorhexis in eyes with white cataract. **Ach Ophthalmol**, v.116, apr, 1998, p.535-537.

- ISHIKAWA, A. Risk factors for reduced corneal endothelial cell density before cataract surgery. **J Cataract Refract Surg**, v.28, 2002; p.1982–1992.
- JACOBS, D. S.; COX, T.A.; WAGONER, M.D.; ARIYASU, R.G.; KARP, C.L. Capsule Staining as an Adjunct to Cataract Surgery - A Report from the American Academy of Ophthalmology. **Ophthalmology**, v.113, 2006, p.707–713.
- KATARIA, S. Corneal endothelial safety & toxicity with intra-ocular surgical agents. **Journal of the Bombay Ophthalmologists' Association**, v.13, n. 2, June, 2004, p.33-36.
- KISS, B.; FINDL, O.; MENAPACE, R., PETTERNEL, V.; WIRTITSCH, M.; LORANG, T.; PHD, GENGLER, M.; DREXLER, W. Corneal endothelial cell protection with a dispersive viscoelastic material and an irrigating solution during phacoemulsification - Low-cost versus expensive combination. **J Cataract Refract Surg**, v.29, 2003; p.733–740.
- KLEINER, J.A. Implante de lente intra-ocular acrílica dobrável de 41d em cães após facoemulsificação. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.35, 2007, p.623-625.
- MELLES, G.R.J.; WAARD, P.W.T.; PAMEYER, J.H.; BEEKHUIS, W.H. Trypan blue staining to visualize the capsulorhexis in catarata surgery. **J Cataract Refract Surg**, 1999, v.25, p.7-9.
- MOHAMMADPOUR, M.; ERFANIAN, R.; KARIMI, N. Capsulorhexis: Pearls and pitfalls. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v.26, 2012, p.33–40.
- MARBACK, EF; FREITAS, LL; FERNANDA PELEGRINO FERNANDES, FP; BRANCO, BC; BELFORT Jr, R. Anterior capsule staining using 0.025% trypan blue in cataracts without red reflex. **Arq Bras Oftalmol**, n.64, 2001, p.333-335.
- PANDEY, S.K.; WERNER, L.; ESCOBAR-GOMEZ, M.; ROIG-MELO, E.A.; APPLE, D.J. Dye-enhanced cataract surgery - Part 1: Anterior capsule staining for capsulorhexis in advanced/white cataract. **J Cataract Refract Surg**, 2000, v. 26, 1052–1059p.

PARIKH, C.H.; EDELHAUSER, H.F. Ocular surgical pharmacology: Corneal endothelial safety and toxicity. **Current Opinion in Ophthalmology**, August, v.14, i.14, 2003, 178-185p.

PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C.; PIZZETI, J.C.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; BARROS, P.S.M. Análise morfométrica do endotélio de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.33. v.1, 2005, p.41-45.

PIGATTO, J.A.T.; CERVA, C.; FREIRE, C.D.; ABIB, F.C.; BELLINI, L.P.; BARROS, P.S.M.; LAUS, J.L. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesq Vet. Bras**, n.8, v.9, Setembro, 2008, p.427-430.

PIGATTO, J.A.T.; FRANZEN, A.A.; PEREIRA, F.Q.; ALMEIDA, A.C.V.R.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; GUEDES, P.M.; BARROS, P.S.M. Scanning electronic microscopy of the corneal endothelium of ostich. **Ciência Rural**, Sanra Maria, v.39, n.3, mai-jun, 2009, p.926-929.

PROULX, S.; BRUNETTE, I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v.95, 2012, p.68-75.

RAO, G.N.; LOHMAN, L.E.; AQUAVELLA, J.V. Cell size-shape relationships in corneal endothelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.22, 1982, 271-274p.

REMY, M.; THALER, S.; SCHUMANN, R.G.; MAY, C.A.; M FIEDOROWICZ, M.; SCHUETTAUF, F.; GRU"TERICH, M.; S G PRIGLINGER, S.G.; NENTWICH, M.M.; KAMPIK, A.; HARITOGLOU, C. An in vivo evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. **Br. J. Ophthalmol**, n.92, 2008, p.1142-1147.

RIGON, G.M.; HUNNING, P.S.; PRESSER, D.; PIGATTO, J.A.T.; ARAÚJO, A.C.P.; RODARTE, A.C.; SARTORI, A.S. Morfologia das células do endotélio corneano de chinchila (*Chinchilla lanigera*) à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, supl.2, 2007, p.646-647.

RODRIGUES, E.B, COSTA, E.F.; PENHA, F.M.; MELO, G.B.; BOTTO' S, J.; DIB, E.; FURLANI, B.; LIMA, V.C.; MAIA, M.; MEYER, C.H.; HÖFLING-LIMA, A.L.; FARAH, M.E. The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. **Survey Of Ophthalmology**, v.54, n.5, September–October, 2009, p.576-617.

SOUZA, E.V.; RODRIGUES, M.L.V.; SOUZA, N.V. História da cirurgia da catarata. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.39, n.4, 2006, p.587-590.

SPENCE, D.J.; PEYMAN, G.A. A new technique for the vital staining of the corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology**, December, 1976, p.100-102.

TAMAYO-ARANGO, L.J.; BARALDI-ARTONI, S.M.; LAUS, J.L.; MENDES-VICENTI, F.A.; PIGATTO, J.A.T.; BOTEON; F.C. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, jan-fev, 2009, p.117-122.

TUFT S.J.; COSTER, D.J. The Corneal Endothelium. **Eye**, n.4, 1990, p.389-424.

UDAONDO P.; DÍAZ-LLOPIS M.; SALOM D.; GARCÍA-DELPECH S.; CERVERA E. Brilliant blue G-assisted capsulorhexis: a good help for phacoemulsification surgeons in training. **Arch Soc Esp Oftalmol**, v.82, 2007, p.471-472.

ÜNLÜ, K.; ASKÜNGER, A.; SÖKER, S.; KILINÇ, N.; KARACA, C.; ERDINC, M. Gentian violet solution for staining the anterior capsule. **J Cataract Refract Surg**, v.26, 2000, p1228-1232.

XIAO, Y.; Wang, Y. ;Fu, Z.; Hong, H. Staining the anterior lens capsule with indocyanine green or trypan blue for capsulorhexis in eyes with white cataract. **International Ophthalmology**, n.25, 2004, p.273-276.

YETIK, H.; DEVRANOGLU K.; OZKAN, S. Determining the lowest trypan blue concentration that satisfactorily stains the anterior capsule. **J Cataract Refract Surg**, n.28, 2002, p.988-991.

WAZIRI-ERAMEH, J.M.; OMOTI, A.E.; EDEMA, M.T. The value of Trypan blue dye I the training of ophthalmology resident doctors hands on capsulotomy. **Ann Biomed Sci**, v.5, n.1&2, June & December, 2006, p.73-76.

WILKIE, D.A.; COLITZ, C.M.H. Surgery of the canine lens. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. Blackwell Publishing, Fourth edition, Vol.2, Iowa - USA, 2007, p.888-931