

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

**MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DE DIFERENTES
REGIÕES DA CórNEA DE CÃES (*Canis familiaris*) UTILIZANDO A
MICROSCOPIA ÓPTICA**

Elaboração: Paula Stieven Hünning

Pós-graduanda da Faculdade de Veterinária da UFRGS

PORTO ALEGRE

2015

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

**MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DE DIFERENTES
REGIÕES DA CÓRNEA DE CÃES (*Canis familiaris*) UTILIZANDO A
MICROSCOPIA ÓPTICA**

Autora: Paula Stieven Hünning

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em Ciências
Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e
Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Stieven Hünning, Paula
Morfologia das células do endotélio de
diferentes regiões da córnea de cães (*Canis
familiaris*) utilizando a microscopia óptica / Paula
Stieven Hünning. -- 2015.
70 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

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

1. Morfologia . 2. Endotélio da córnea de cães. 3.
Vermelho de alizarina. I. Antonio Tadeu Pigatto,
João, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e esposo

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, João Antonio Tadeu Pigatto, pelos ensinamentos, dedicação, incentivos e paciência, possibilitando que este trabalho se concretizasse. Pelo exemplo de profissionalismo, de orientação e amor à Oftalmologia.

Ao professor André Caríssimi por ceder o equipamento para a realização das imagens e companhia.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço aos meus colegas a parceria, a troca de experiências e a boa e divertida convivência com a equipe de pós-graduação e das estagiárias do Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFRGS.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao meu velho cão amado, Bobi, pelos bons momentos de distração e carinho;

Às minhas gatas rebeldes, Miona e Safi, e aos gatos mansos da casa, chamados Hola Que Tal e sua irmã Bien;

À banca que gentilmente disponibilizou o seu tempo para avaliar este trabalho.

... Toda a gratidão, afetuosamente resumo com um verdadeiro: **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

A preservação da integridade funcional do endotélio da córnea após procedimentos cirúrgicos intraoculares é preconizada para a manutenção da sua transparência. Dessa maneira, o conhecimento e a avaliação da forma do endotélio nas diferentes regiões da córnea é de suma importância, pois os estudos a respeito da córnea de cães limitam-se a região central. Objetivou-se avaliar a forma das células endoteliais de cães (*Canis familiaris*) de diferentes regiões da córnea. Foram estudados 20 olhos hígidos de cães, machos ou fêmeas de diferentes faixas etárias, separados entre olhos direito e esquerdo. A morfologia do endotélio da córnea das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal foi avaliada após a coloração com o vermelho de alizarina. As imagens do endotélio foram obtidas usando um microscópio óptico. O percentual médio de células hexagonais na região central da córnea foi de $80,6 \pm 4,3\%$ para o olho esquerdo e de $78,8 \pm 4,7\%$ para o direito; na região superior foi de $78,5 \pm 4,4\%$ para o olho esquerdo e de $79,4 \pm 4,9\%$ para o direito; na região inferior foi de $80,2 \pm 6,0\%$ para o olho esquerdo e de $80,1 \pm 4,4\%$ para o direito; na região temporal foi de $79,7 \pm 5,0\%$ para o olho esquerdo e de $78 \pm 2,9\%$ para o olho direito e, na região nasal, foi de $79,5 \pm 5,7\%$ para o olho esquerdo e de $76,7 \pm 6,0\%$ para o direito. O percentual médio de células com cinco lados, na região central da córnea, olho esquerdo, foi $11,9 \pm 3,0\%$ e para o direito $13,2 \pm 3,8\%$; na região superior, no olho esquerdo, $13,6 \pm 1,8\%$ e para o direito, $13 \pm 4,1\%$; na região inferior foi de $11,7 \pm 3,1\%$ para o olho esquerdo e de $11,7 \pm 3,5\%$ para o direito; na região temporal, olho esquerdo, $11,9 \pm 3,8\%$ e para o direito $13,2 \pm 2,3\%$ e na região nasal, olho esquerdo, $12,6 \pm 13,1\%$ e, para o direito, $14,1 \pm 4,0\%$. O percentual médio de células com sete lados, na região central, olho esquerdo, foi $7,5 \pm 2,3\%$ e para o direito $8 \pm 2,2\%$; na região superior, no olho esquerdo, $7,9 \pm 4\%$ e para o direito, $7,6 \pm 2,3\%$; na região inferior foi de $7,9 \pm 3,4\%$ para o olho esquerdo e de $8,2 \pm 3,2\%$ para o direito; na região temporal, olho esquerdo, $8,4 \pm 2,0\%$, para o direito $8,8 \pm 1,3\%$ e na região nasal, olho esquerdo, $8,6 \pm 2,6\%$ e para o direito $9,2 \pm 2,9\%$. Os dados foram submetidos à análise de variância de fator duplo com medidas repetidas. Não houve diferença com relação a forma das células do endotélio nas diferentes regiões da córnea de cães.

Palavra-chaves: corneano, células endoteliais, vermelho de alizarina, canino.

ABSTRACT

*The preservation of the functional integrity of the corneal endothelium after intraocular surgical procedures is recommended to maintain its transparency. Thus, assessment and knowledge of corneal endothelial morphology in dog has great importance, because the studies are limited the central areas of the cornea of dogs. This study aimed to evaluate the endothelial cells shape of dogs (*Canis familiaris*) in to different corneal areas. Twenty healthy dogs eyes were studied, males and females of different age groups, separated between right and left eyes. The corneal endothelium morphology of the central, superior, inferior, temporal and nasal areas was assessed by alizarin red staining 0.2%. The endothelium images were obtained using an optic microscope. The average percentage of hexagonal cells in the central area of the cornea, was $80.6 \pm 4.3\%$ for the left eye and $78.8 \pm 4.7\%$ for the right; in the superior area was $78.5 \pm 4.4\%$ for the left eye and $79.4 \pm 4.9\%$ for the right; in the inferior area was $80.2 \pm 6.0\%$ for the left eye and $80.1 \pm 4.4\%$ for the right; in the temporal area was $79.7 \pm 5.0\%$ for the left eye and $78 \pm 2.9\%$ for the right eye and nasal area was $79.5 \pm 5.7\%$ for the left eye and $76.7 \pm 6.0\%$ for the right. The average percentage of cells with five sides, in the central area of the cornea, left eye, was $11.9 \pm 3.0\%$ and to the right $13.2 \pm 3.8\%$; in the superior area in the left eye, $13.6 \pm 1.8\%$ and to the right, $13 \pm 4.1\%$; in the inferior area was $11.7 \pm 3.1\%$ for the left eye and $11.7 \pm 3.5\%$ for the right; in the temporal area, left eye, $11.9 \pm 3.8\%$ and to the right $13.2 \pm 2.3\%$; in the nasal area, left eye, $12.6 \pm 3.1\%$ and $14.1 \pm 4.0\%$ right. The average percentage of cells with seven sides, central, left eye, was $7.5 \pm 2.3\%$ and to the right $8 \pm 2.2\%$; in the superior area in the left eye, $7.9 \pm 4\%$ and to the right, $7.6 \pm 2.3\%$; in the inferior area was $7.9 \pm 3.4\%$ for the left eye and $8.2 \pm 3.2\%$ for the right; in the temporal area, left eye, $8.4 \pm 2.0\%$ and $8.8 \pm 1.3\%$ right; in the nasal area, left eye, $8.6 \pm 2.6\%$ and to the right $9.2 \pm 2.9\%$. The data were subjected to two-way analysis of variance. There was no difference in endothelial cells shape in the different corneal areas of dog.*

Key words: *corneal, endothelial cells, alizarin red, canine.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Desenho esquemático representando as regiões do endotélio da córnea dos olhos direito e esquerdo de cães. 39
- Figura 2 -** Fotomicrografia óptica da região central do endotélio da córnea hígida de cão corado com vermelho de alizarina. Observou-se hexagonalidade média na região central de $78,8 \pm 4,7\%$. Aumento 40X. 42
- Figura 3 -** Fotomicrografia óptica das regiões superior e temporal do endotélio da córnea hígida de cão corado com vermelho de alizarina. Observou-se hexagonalidade média na região superior de $78,5 \pm 4,4\%$ e, na região temporal, de $78 \pm 2,9\%$. Aumento 40X. 42
- Figura 4 -** Fotomicrografia óptica das regiões inferior e nasal do endotélio da córnea hígida de cão corado com vermelho de alizarina. Observou-se hexagonalidade média na região inferior de $80,1 \pm 4,4\%$ e, na região nasal, de $76,7 \pm 6,0\%$. Aumento 40X. 42

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Morfologia das células endoteliais (valor médio expresso em percentual) das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal com sua respectiva localização (OD = olho direito, OE = olho esquerdo).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Morfologia das células endoteliais (valor médio e desvio padrão, expressos em percentual) das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal com sua respectiva localização.	43
------------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Anatomofisiologia da Córnea	13
2.1.1	Endotélio Corneano.....	14
2.1.2	Fisiologia do Endotélio Corneano.....	20
2.2	Reparação Endotelial da Córnea	21
2.2.1	Reparação Endotelial da Córnea em Resposta a Trauma.....	23
2.2.2	Efeitos de Procedimentos Cirúrgicos Intraoculares no Endotélio Corneano.....	24
2.3	Métodos de Avaliação do Endotélio Corneano	26
2.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
2.3.2	Microscopia Especular	28
2.3.3	Microscopia Confocal.....	30
2.3.4	Microscópio Óptico e o Corante Vermelho de Alizarina.....	31
3	ARTIGO	35
3.1	Morfologia das células do endotélio de diferentes regiões da córnea de cães (<i>Canis familiaris</i>) obtida utilizando a microscopia óptica	35
	Abstract	36
	INTRODUÇÃO	37
	MATERIAIS E MÉTODOS	38
	RESULTADOS	41
	DISCUSSÃO	44
	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que constituem a superfície posterior da córnea (SVEDBERGH; BILL, 1972; JOHNSTON et al., 1979; TUFT; COSTER, 1990). Em sua maioria, as células endoteliais apresentam forma hexagonal, ocasionalmente pentagonal, podendo ter quatro, sete e até oito lados (SVEDBERGH; BILL, 1972; PIGATTO, 2004; PIGATTO et al., 2006). Sendo assim o seu aspecto anatômico normal é um indicador da saúde endotelial (ABIB, 2000; MÓDIS et al., 2002).

O endotélio tem como função manter a integridade da córnea. Assim, as células endoteliais limitam a entrada de água e de solutos oriundos da câmara anterior para o estroma corneano, mantendo sua transparência e a sua desidratação (WARING et al., 1982; LANDSHMAN et al., 1989; TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000).

Constantemente, o endotélio está sujeito a mudanças na sua forma com perda de suas células devido a traumas, radiação, formação de imunocomplexos, alterações fisiológicas decorrentes da idade e de cirurgias intraoculares (WARING et al., 1982; TUFT; COSTER, 1990; PRASAD, 1998; ZHU et al., 2006; WALKOW et al., 2000, HOFFMAN et al., 2009; CHIURCIU et al., 2010). Após injúria corneana, as células endoteliais sobreviventes preenchem as lacunas resultantes, aumentando em tamanho, com perda da regularidade e forma. Muitas vezes isso culmina no comprometimento funcional do endotélio (WARING et al., 1982; AABERG et al., 1984; TUFT; COSTER, 1990, SANCTIS et al., 2006) e com edema de córnea seguido pela perda parcial ou completa da transparência, podendo ser irreversível (LANDSHMAN et al., 1988; ABIB, 2000).

As respostas endoteliais a diversas injúrias ou procedimentos cirúrgicos intraoculares, incluindo os transplantes penetrante e posterior de córnea e a remoção da catarata, variam com a espécie acometida (MELLES et al., 1998; ABIB, 2000; McDONNELL, et al., 2003; PIGATTO et al., 2005; ZHU et al., 2006; SCHELLINI et al., 2007; WASILEWSKI et al., 2010).

Várias técnicas têm sido empregadas para a avaliação da forma e da área celular do endotélio corneano, incluindo métodos de investigação clínica *in vivo*, como a microscopia especular de contato e não contato, e a microscopia confocal (ICHIJIMA et

al., 1993; ABIB, 2000; CANAVAGH et al., 2000; MÓDIS et al., 2002; JALBERT et al., 2003; KARFINAK et al., 2007; LEDBETTER; SCARLETT, 2009; BERCHT et al., 2015). Os estudos *in vitro* e *ex vivo*, especialmente, utilizam a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia óptica com o uso dos corantes vitais (SVEDBERGH; BILL, 1972; TAYLOR; HUNT, 1981; DOUGHTY, 1989; MEANS et al., 1995; COLLIN; COLLIN, 1998; MANNIS et al., 1998; WERNER et al., 1998; ANDREW et al., 1999; PIGATTO et al., 2005; PIGATTO et al., 2009; SCHELLINI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009).

Diferentes corantes vitais podem ser utilizados na avaliação do endotélio corneal (SPENCE; PEYMAN, 1976; TAYLOR; HUNT, 1981; SPERLING, 1977; RODRIGUES et al., 2009). Dentre eles, o vermelho de alizarina é utilizado para corar os espaços intercelulares permitindo a visibilização das bordas das células viáveis e não viáveis. Concomitantemente o azul de tripano cora o núcleo demarcando as células endoteliais desvitalizadas (SPERLING, 1977; SAAD et al., 2008; PARK et al., 2012).

Em estudos de toxicidade aos fármacos, de preservação de córneas doadoras, de coleta de botões corneais para transplantes penetrantes e posteriores e de cicatrização corneana, os corantes vitais são utilizados para avaliar as alterações endoteliais (SPENCE; PEYMAN, 1976; MEANS et al., 1995; DOUGHTY, 1989; MELLES et al., 1998; ANDREW et al., 1999; MANNIS et al., 1998; WERNER et al., 1998; WIFFEN; HODGE; BOURNE, 2004; WASILEWSKI et al., 2010; Zhu et al., 2006; SCHELLINI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; BEN-ELIAHU et al., 2011).

O conhecimento dos parâmetros morfológicos e morfométricos é importante para a avaliação da integridade e da função do endotélio da córnea. A coloração com o vermelho de alizarina, valendo-se da microscopia óptica, é um método rápido, simples e barato para a obtenção de imagens do endotélio de humanos e animais (SPENCE; PEYMAN, 1976; TAYLOR; HUNT, 1981; GEROSKI; EDELHAUSER, 1989; RODRIGUES et al., 2009; WASILEWSKI et al., 2010; AMANN et al., 2003; FAGANELLO, 2014).

A forma celular dessas espécies tem sido estudado. No entanto, nos animais as avaliações normalmente limitam-se somente à análise na região central da córnea. Objetiva-se avaliar a forma das células endoteliais de cães (*Canis familiaris*) de diferentes regiões da córnea hígida, valendo-se da coloração de vermelho de alizarina e da microscopia óptica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomofisiologia da Córnea

A córnea é a extensão transparente da esclera e faz parte da túnica fibrosa do bulbo do olho. A transição entre a esclera opaca e a córnea ocorre abruptamente na junção corneoescleral também conhecida como limbo (BANKS, 1992).

Localizada na porção anterior do bulbo do olho, a córnea tem como função a refração da luz e a proteção das estruturas intraoculares. Em cães e em algumas espécies de animais, a córnea é formada por cinco camadas, incluindo o filme lacrimal pré-corneano, o epitélio, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (SLATTER, 2005).

Nos caninos, a córnea tem um raio de curvatura muito maior do que o da esclera, pois ela compõe uma parte menor da parede do bulbo do olho. (GETTY, 1986). A córnea transparente ocupa um sexto do bulbo do olho, com diâmetro médio de 12,5mm a 17mm, dependendo da raça e tamanho do cão. Raramente é maior de 1mm a diferença entre os meridianos longitudinal e vertical, e o último sempre é menor (BISTNER, 1977).

Gilger et al. (1991), em seu estudo com paquimetria ultrassônica, revelaram que a espessura central média da córnea é de 409 a 743 μ m em cães, enquanto que a espessura periférica superior e a espessura periférica temporal da córnea atingem valores médios de 464 a 800 μ m e 468 a 784 μ m, respectivamente.

A córnea é um tecido avascular, que recebe nutrição através de processos de difusão do plexo venoso perilimbal e, também, em menor escala, do humor aquoso e do filme lacrimal pré-corneal (BANKS, 1992). É ricamente suprida por nervos sensoriais derivados da ramificação do quinto nervo craniano (SLATTER, 2005).

No limbo existem vasos sanguíneos que assumem importante papel nos processos inflamatórios, na nutrição da córnea e na cicatrização corneal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O metabolismo da glicose fornece a maior parte da requisição energética dos tecidos corneanos. Cerca de dois terços são metabolizados pela rota de Embden-

Meyerhof e pelo ciclo de Krebs e o terço restante pela via de hexose monofosfato (SLATTER, 2005).

A transparência corneana deve-se à ausência de vasos sanguíneos, linfáticos e de pigmento; superfície epitelial não queratinizada; fibras nervosas amielínicas; controle do estado de deturgescência e disposição regular e altamente organizada das fibras colágenas (SLATTER, 2005).

O endotélio e o epitélio controlam o conteúdo aquoso da córnea. Ao estabelecer que o estroma corneano apresenta uma marcada afinidade pela água, é importante manter o epitélio e o endotélio intactos; caso contrário, ocorrerá edema e perda da transparência corneal (MISHIMA, 1982; LANDSHAMAN et al., 1988; TUFT; COSTER, 1990). O edema pode ser resultado de alterações no endotélio provenientes de doenças degenerativas ou seguidas de cirurgias intraoculares ou relacionadas ao avanço da idade e a uveítes (LANDSHAMAN et al., 1989; TUFT; COSTER, 1990; ABIB; BARRETO, 2001; PIGATTO, 2004).

2.1.1 Endotélio Corneano

O endotélio da córnea é formado por uma monocamada de células poligonais uniformes em forma e em tamanho (DOUGHTY, 1998; BOTEON, 2000; SLATTER, 2005). Sua face anterior é voltada para a membrana de Descemet e a face posterior voltada para a câmara anterior em contato com o humor aquoso (DOUGHTY, 1989; BOTEON, 2000). Lateralmente, continua como endotélio trabeculado escleral. Esse mosaico celular foi descrito por Vogt, pela primeira vez, em 1920, por meio da biomicroscopia com lâmpada de fenda (BOTEON, 2000).

As células endoteliais apresentam forma hexagonal, em sua maioria, e ainda encontram-se células com quatro, cinco, sete e oito lados (RAO et al., 1982; TUFT; COSTER, 1990; DOUGHTY, 1998; PIGATTO et al., 2005a). Dessa maneira, o padrão hexagonal de 65 a 75%, em córneas normais de humanos, forma uma estrutura regular e estável com mínima variação no tamanho celular (AABERG, 1984; RAO et al., 1982; DOUGHTY, 1998).

A membrana celular do endotélio tem uma face posterior formada por

microvilosidades e uma face anterior voltada à membrana de Descemet. Essas faces estão relacionadas com a presença de vesículas pinocíticas, contendo substâncias que serão utilizadas pelas células estromais da córnea (BOTEON, 2000). As aberturas das vesículas pinocíticas são encontradas sobre a superfície de cada célula endotelial e apresentam diâmetro médio de $0,1\mu\text{m}$ (TUFT; COSTER, 1990).

Prince (1964) descreveu o endotélio da córnea de coelhos como uma monocamada de células uniformes, desprovida de membrana basal, com núcleo alongado, largo e em forma de rim. Seu citoplasma apresenta grânulos de pigmento, provavelmente melanina, fagocitada da úvea e organelas intracitoplasmáticas (TUFT; COSTER, 1990).

Posteriormente, em caninos adultos, foi descrito por meio de microscopia especular, uma monocamada de células endoteliais com padrão uniforme. No centro da córnea, observaram que a célula endotelial apresenta um diâmetro de 15 a $20\mu\text{m}$ (STAPLETON; PEIFFER, 1979; SAILSTAD; PEIFFER, 1981) e espessura corneana de $0,62 \pm 0,047\text{mm}$ (STAPLETON; PEIFFER, 1979).

Com relação às dimensões das células endoteliais, há diferenças de acordo com as espécies. Nos felinos, a célula endotelial apresenta o diâmetro de 15 a $20\mu\text{m}$ e espessura corneana de $0,56\text{mm} \pm 0,06\text{mm}$ (SAILSTAD; PEIFFER, 1981; PEIFFER et al., 1981). Virtanen et al., (1984), por meio da microscopia especular, descreveram a célula endotelial de coelhos normais apresentando o diâmetro médio de $20,5 \pm 2,2\mu\text{m}$ e área média de $3.35,1 \pm 71,1\mu\text{m}^2$. Comparativamente, nos humanos a célula endotelial apresenta dimensões de 18 a $20\mu\text{m}$ na largura, 4 a $6\mu\text{m}$ na espessura e núcleo com $7\mu\text{m}$ de diâmetro (BOTEON, 2000; TUFT; COSTER, 1990).

Utilizando a microscopia especular, foi possível estabelecer a densidade endotelial em humanos e em várias espécies de animais, permitindo o registro da população de células endoteliais por mm^2 em várias delas (STAPLETON; PEIFFER, 1979; STAATZ; Van HORN, 1980; GWIN et al., 1982; BAHN, 1986; BAROODY et al., 1987; ABIB, 2000; AMANN et al., 2003; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2006; FRANZEN et al., 2010; FREITAS, 2012; BERCHT et al., 2015).

Nos cães adultos jovens foi estabelecida a densidade endotelial média de 2.800 células/ mm^2 por meio da microscopia especular (STAPLETON; PEIFFER, 1979; BEFANIS; PEIFFER; BROWN, 1981). Com o uso da microscopia especular de contato,

Pigatto et al. (2006) observaram densidade endotelial 2.555 ± 240 células/mm² na região central da córnea de cães adultos de diferentes raças. Paralelamente, nos gatos adultos jovens, observaram-se a média de 2.418 ± 151 células/mm² (BOURNE, 1994). No entanto, Franzen et al. (2010) estabeleceram a densidade endotelial em gatos de diferentes faixas etárias. Os autores encontraram densidade compreendida entre 4.482 ± 572 células/mm² e 2.873 células/mm². Os coelhos, apresentaram densidade média de 2.998 ± 326 células/mm² (SAILSTAD; PEIFFER, 1981).

Em humanos recém-nascidos, a densidade endotelial é de 3.500 a 4.000 células/mm². Entretanto, com o avanço da idade, a população de células endoteliais diminui para 1.400 a 2.500 células/mm² (BOTEON, 2000). Em diferentes espécies, a densidade endotelial também sofre alteração durante o envelhecimento (GWIN et al., 1982; BOTEON, 2000, ABIB; BARRETO, 2001; FRANZEN et al., 2010; BERCHT et al., 2015). Os macacos, ratos, gatos, cães e coelhos adultos mantiveram uma média de 2.500 células/mm² (STAATZ; Van HORN, 1980; BAROODY et al., 1987; BAHN, 1986; TUFT; COSTER, 1990; FRANZEN et al., 2010). Bahn et al. (1986) e Bercht et al. (2015) descreveram que durante o desenvolvimentos pós-natal até a vida adulta de humanos e de animais, incluindo o cão, o gato, a vaca, o cervo, o suíno, o coelho, a chinchila e o homem, ocorre uma aumento no tamanho da córnea e um rápido declínio na densidade endotelial com concomitante aumento da área celular média. Posteriormente, esse declínio se mantém ao longo da vida de forma linear e gradual (BAHN et al., 1986; ABIB; BARRETO, 2001).

A densidade endotelial pode sofrer alteração segundo a região estudada. Em humanos, um estudo com o uso do corante vermelho de alizarina demonstrou que na região periférica e paracentral há uma aumento da densidade endotelial se comparada à região central (2.993 ± 229 células/mm², 2.887 ± 213 células/mm² e 2.739 ± 224 células/mm², respectivamente). A região superior periférica com 3.166 ± 272 células/mm² seria a área com maior número de células endoteliais (AMANN et al., 2003). Em contrapartida, ao se comparar o endotélio de ratos e de camundongos como o de humanos, utilizando a mesma metodologia descrita, observou-se que o inverso ocorre. Os ratos apresentaram densidade endotelial na região central de 2.601 ± 280 células/mm²; na paracentral de 2.506 ± 231 células/mm² e, na periférica, 2.196 ± 280 células/mm². Os camundongos demonstraram na região central 2.715 ± 84 células/mm²; na paracentral 2.592 ± 158 células/mm² e, na periférica, 2.426 ± 199 células/mm². Desse

modo, ratos e camundongos não servem como modelos experimentais para humanos (YANNI et al., 2003). Nos suínos, por meio da microscopia eletrônica de varredura, observou-se na região central média de $7.625,2 \pm 998,2$ células/mm² e, na periferia, $7.909,7 \pm 776,3$ células/mm². Nessa espécie os autores descreveram diferença estatística entre as regiões (TAMAYO-ARANGO et al., 2009).

Em outras espécies, como os caninos, não foi demonstrada diferença entre as regiões periféricas e centrais. Utilizando olhos enucleados de cães (02 a 84 meses de idade), por meio da microscopia eletrônica de varredura, observou-se densidade endotelial na região central de 7.190 ± 3.334 células/mm² e, na periferia, 7.379 ± 3.184 células/mm² (RODRIGUES et al., 2006). Em avestruzes, usando a microscopia eletrônica de varredura, a densidade endotelial na região central foi de 3.717 ± 324 células/mm² e, na periferia, de 3.731 ± 358 células/mm² (PIGATTO et al., 2005).

Com uso da microscopia especular de contato, foi descrito em chinchilas densidade na área central de 2.709 ± 743 células/mm² e, na periférica, 2.756 ± 810 células/mm² (BERCHT et al., 2015).

No que concerne à morfologia do mosaico endotelial das diferentes espécies animais estudadas, a maioria das células apresentam seis lados. Na região central da córnea hígida de coelhos, foram visibilizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura, células hexagonais (75%), células pentagonais (14%) e heptagonais (11%) (PIGATTO et al., 2005a). Corroborando, Matsuda et al. (1985) observaram, pela microscopia especular, hexagonalidade de 73%. Em indivíduos da espécie humana, o percentual de células hexagonais apresenta-se em torno de 70% (YEE et al., 1985b; SCHULTZ et al., 1986), enquanto que, pela microscopia especular, observou-se em humanos e primatas hexagonalidade de $77 \pm 7\%$ e $76,6 \pm 6\%$, respectivamente (JACKSON et al., 1995). Ainda, em felinos domésticos, encontrou-se hexagonalidade de $80 \pm 8,5\%$ utilizando a microscopia especular (HUANG et al., 1989; BOURNE et al., 1994); diferentemente Franzen et al. (2010) relataram média de 66% em indivíduos adultos. Em chinchilas de dois a quatro meses de idade foi descrito pleomorfismo de 70,05%; com 48 meses de idade, de 65,18% e, com 10 anos de idade, de 62,28% (BERCHT et al., 2015).

Nos primatas (*Macaca fascicularis*) a avaliação morfológica e morfométrica do endotélio da córnea central foi realizada usando a microscopia especular de contato. Os autores demonstraram que não houve diferença no pleomorfismo de macacos com

idades de dois, três, quatro, cinco e sete anos e entre os olhos direito e esquerdo (MORITÁ, 1994).

Os suínos, da mesma forma, tiveram seu endotélio estudado. A dificuldade em se obter córneas humanas para pesquisas fez com que essa espécie fosse frequentemente utilizada, pois as mesmas apresentam similitude. Tamayo-Arango et al. (2009), avaliando o endotélio de suínos, estabeleceram, por meio da microscopia eletrônica de varredura, que a maioria das células eram hexagonais ($61,7 \pm 8,5\%$ para a região central e $53,2 \pm 7,0\%$ para a região periférica), com presença de células pentagonais ($21,3 \pm 5,8\%$ e $28,9 \pm 5,1\%$ para o centro e periferia, respectivamente) e células heptagonais ($11,0 \pm 6,4\%$ para o centro e $18,1 \pm 4,8\%$ para a periferia). Demonstraram que houve diferença estatística entre a córnea central e periférica para as células de seis e sete lados.

Além desses mamíferos, o endotélio de bovinos e de equinos foram avaliados. Os bovinos adultos apresentaram $73,3 \pm 4,7\%$ de células com seis lados (DOUGHTY et al., 1997). Nos equinos, em estudo usando corante vital para a análise de diferentes regiões da córnea, obteve-se a média de células hexagonais na região superior da córnea de $57,78 \pm 3,14\%$, na região inferior foi de $58,62 \pm 6,413\%$, na região temporal foi de $56,14 \pm 6,749\%$, na região nasal foi de $56,88 \pm 6,296\%$ e na região central foi de $55,43 \pm 4,464\%$. O percentual de células com menos de seis lados foi $22,72 \pm 3,04\%$ para a região central, $20,81 \pm 3,534\%$ para a região superior, $20,14 \pm 3,82\%$ para a região inferior, $21,66 \pm 4,04\%$ para a região temporal e $21,60 \pm 3,04\%$ para a região nasal. O percentual de células com mais de seis lados foi de $21,85 \pm 3,99\%$ para a região central, $21,31 \pm 3,81\%$ para a região superior, $21,24 \pm 4,08\%$ para a região inferior, $22,2 \pm 4,88\%$ para a região temporal e $21,52 \pm 4,71\%$ para a região nasal. Com relação à morfologia não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões da córnea analisadas (FAGANELLO, 2014).

Os répteis também demonstram valores semelhantes aos mamíferos. Dessa maneira, identificou-se nos jacarés, por meio da microscopia eletrônica de varredura, presença de células de seis lados (78%), de células de quatro lados (2%), de cinco lados (13,2%), de sete lados (5,8%) e de oito lados (1%) (PIGATTO et al., 2004). Em peixes foi proposto que o endotélio tem padrão irregular com predominância de células hexagonais e pentagonais (COLLIN; COLLIN, 2000).

A córnea das aves também despertou interesse e seu endotélio foi estudado. Por

meio da microscopia eletrônica de varredura, a região central da córnea de avestruzes revelou células hexagonais (75%), pentagonais (14%) e heptagonais (11%). Em pinguins, nas regiões central e periférica, observaram-se uma média de 80% de células hexagonais, de 14,2% de pentagonais e de 5,8% de heptagonais (PIGATTO et al., 2005b). Em 2012, Freitas, por meio da microscopia especular da região central da córnea de galinhas domésticas, descreveu dados semelhantes, demonstrando que aves com 30, 45 e 60 dias de idade não apresentam diferença na hexagonalidade (74,5%, 71,5% e 73,9%, respectivamente) e entre os olhos direito e esquerdo. A morfologia do endotélio da córnea das aves se mostrou similar aos mamíferos e répteis.

Os dados são semelhantes entre as espécies com percentual de hexagonalidade entre 65 a 80% de hexagonalidade entre um olho e o seu contralateral, não havendo diferença entre os sexos (GWIN et al., 1982; YEE et al., 1985a; YEE et al., 1985b; HUANG et al., 1989; JACKSON et al., 1995; ABIB; BARRETO, 2001; TAMAYO-ARANGO et al., 2009; PIGATTO et al., 2005a; FRANZEN et al., 2010; FAGANELLO et al., 2014; BERCHT et al., 2015).

Com relação aos aspectos estruturais da superfície da célula endotelial, essa é plana e achatada, com exceção da presença dos cílios, microvilosidades e interdigitações (GALLAGHER, 1980; SCHUTTEN; Van HORN, 1980; GWIN et al., 1982; BOTEON, 2000; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO, et al., 2005; PIGATTO et al., 2009; BERCHT et al., 2015).

Os cílios são encontrados na superfície posterior da célula endotelial, centralizados e direcionados para a câmara anterior do olho (GALLAGHER, 1980; COLLIN; COLLIN, 1998; COLLIN; COLLIN, 2000). Essas estruturas foram observadas em mamíferos incluindo os humanos, macacos e coelhos e, também, em aves e peixes (COLLIN; COLLIN, 1998; COLLIN; COLLIN, 2000). Cada célula endotelial apresenta um cílio único, observado por meio da microscopia eletrônica de varredura, com média de $3,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de comprimento em coelhos (GALLAGHER, 1980). Sua função ainda não está estabelecida. Em humanos, parece não estar associada à motilidade e foi sugerido que não ocorra capacidade de mitose, porque este não sofre regeneração (COLLIN; COLLIN, 2000). Outras funções incluem quimiorrecepção, osmorregulação e/ou detecção de pressão (GALLAGHER, 1980).

As microvilosidades, encontradas na membrana celular posterior, são estruturas que aumentam a superfície posterior das células endoteliais. Em humanos, foram

quantificadas 20 a 30 microvilosidades por célula, medindo 0,1 a 0,2 μ m de largura por 0,5 a 0,6 μ m de altura (BOTEON, 2000). Em coelhos, verificou-se a presença de uma média de 63 microvilosidades por célula endotelial por meio da microscopia eletrônica de varredura (DOUGHTY, 1998).

As interdigitações são tortuosos prolongamentos da membrana lateral das células endoteliais, aumentando a superfície de contato entre elas. As interdigitações podem estar associadas à função de bomba ativa dessas células (OJEDA et al., 2001).

As membranas laterais da célula endotelial são unidas por complexos juncionais. Esses complexos são divididos em *zonula occludens*, a qual une as células do terço posterior próxima à câmara anterior, e em *macula occludens* e *macula adherens*, as quais se encontram nos dois terços anteriores das membranas laterais, sendo raras. A *macula adherens* foi denominada anteriormente de desmossoma (BOTEON, 2000). Hirsch et al. (1986) descreveram a presença de dois tipos de junções intercelulares no endotélio de coelhos. A primeira, de localização mais dorsal, denominada de apical e a segunda, logo abaixo dela, chamada de lateral.

2.1.2 Fisiologia do Endotélio Corneano

A córnea humana apresenta 75 a 80% de conteúdo aquoso. O equilíbrio osmótico dá-se pela diferença da concentração de íons entre as suas camadas, sendo mantido pela integridade das membranas celulares e, principalmente, pelo endotélio (BANKS, 1992; NASSARALLA, 2000).

O endotélio apresenta grande atividade metabólica devido à presença de inúmeras organelas. Dentre elas, inúmeras mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia (ATP) e retículos endoplasmáticos lisos e rugosos bem desenvolvidos. O metabolismo da córnea ocorre por simples difusão através de capilares perilímbicos ou são oriundos do humor aquoso e do filme lacrimal pré-corneano (MISHIMA, 1982).

A manutenção da transparência e espessura da córnea é decorrente da presença de dois mecanismos que permitem estabelecer o estado relativo de deturgescência da córnea. Os mecanismos são a função de barreira e a bomba ativa de fluidos (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985a; TUFT; COSTER 1990). Se a função endotelial é inadequada, a

água difunde para o interior do estroma, desorganizando as fibras de colágeno, e a córnea perde transparência e torna-se mais espessa (WARING, 1982), aumentando a sua espessura (MISHIMA, 1982; RAO et al., 1982).

A função barreira é dada pela presença dos complexos juncionais, também denominados de junções *gap*, localizados no espaço intercelular. Os complexos mantêm as células endoteliais unidas e impedem a permeabilidade de solutos para o espaço intracelular (TUFT; COSTER 1990; MISHIMA, 1982).

As interdigitações também auxiliam na manutenção da hidratação corneana. No pós-operatório, uma córnea com grande variação na morfologia pode apresentar pobres interdigitações, as quais permitem a entrada de água para dentro do estroma, corroborando para o aumento da espessura corneal (RAO et al., 1982).

A bomba ativa de fluidos funciona removendo líquido do estroma corneano para a câmara anterior, através do transporte ativo de íons de bicarbonato, sódio e potássio (YEE et al., 1985a; SLATTER, 2005). O requerimento de energia para esse transporte necessita da quebra da glicose via glicólise e via ciclo do ácido tricarboxílico, gerando ATP (trifosfato de adenosina) necessário para a atividade da bomba (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985a).

2.2 Reparação Endotelial da Córnea

Em humanos e felinos a reparação ocorre essencialmente por hipertrofia e migração celular, sendo mínima a atividade mitótica do endotélio da córnea (LAULE et al., 1978; JACKSON; GARDINER; ARCHER, 1995). Ao contrário, em coelhos a reparação endotelial acontece por hipertrofia e por migração das células endoteliais, acompanhadas por significativa mitose celular (WEIMAR; SQUIRES; KNOX, 1980).

Inúmeras pesquisas, valendo-se da microscopia especular, da microscopia óptica com uso de corantes vitais e da microscopia eletrônica de varredura, avaliaram a reparação endotelial em diversas espécies animais (REHANY et al., 2000; SAILSTAD; PEIFFER, 1981; HOFFMAN et al., 2009).

Estudos sobre o endotélio corneano foram realizados em humanos, camundongos, macacos, gatos, peixes, equinos, cães, coelhos, pinguins, jacarés,

avestruzes, ratos, suínos, galinhas e chinchilas, entre outros (BOURNE; KAUFMAN, 1976; SVEDBERGH; BILL, 1972; Van HORN et al., 1977; GWIN et al., 1982; MacCALLUM et al., 1983; COLLIN; COLLIN, 2000; ANDREW et al., 2001; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; SEYHMUS et al., 2006; TAMAYO ARANGO et al., 2009; FREITAS, 2012; BERCHT et. al, 2015). Diversas são as causas de perda endotelial, como: envelhecimento, inflamações intraoculares, traumas, hipertensão intraocular e procedimentos cirúrgicos intraoculares, toxicidade a fármacos intracamerulares e diabetes mellitus (CHENG et al., 1985; REHANY et al., 2000; BROOKS et al., 1987; INOMATA; SMELSER, 1969; SCHELLINI et al., 2007; Mc DONNELL, et al., 2003; PRIYA; SARADA; NIHAL, 2010).

Assim, verificou-se que com o avanço da idade, em humanos, felinos e em outras espécies, a densidade endotelial diminuía e as células remanescentes alteravam-se em forma e em tamanho (GWIN et al., 1982; Van HORN et al., 1977; LAULE et al., 1978; MacCALLUM et al., 1983). As células endoteliais hipertrofiam e migram, a fim de ocupar o espaço deixado pela perda celular ao longo da vida (TUFT; COSTER, 1990; NASSARALA, 2000). Ao longo da vida, na espécie canina, a reparação endotelial também decorre da hipertrofia das células remanescentes, as quais alteram sua morfologia. O endotélio passa a apresentar grande contingente de células com tamanho aumentado e com a forma hexagonal alterado (GWIN et al., 1982).

MacCallum et al. (1983) demonstraram, em estudo com microscopia especular e eletrônica de varredura, pleomorfismo intenso e células, em menor tamanho, no endotélio de felinos jovens. A presença de mitose, nessa espécie, um mês após o nascimento, supõe-se que ocorra devido ao crescimento da córnea em filhotes. Na vida adulta desses felinos, o padrão de hexagonalidade torna-se vigente, assim como ocorre em coelhos adultos (Von SALLMANN; CARACAGGIO; GRIMES, 1961). Em cães, estudos corroboram, demonstrando por meio da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia óptica que, com o avançar da idade, ocorre aumento do polimegetismo e do pleomorfismo, com declínio não linear da densidade endotelial. (RODRIGUES et al., 2006). Esses achados convergem com os relatados na literatura onde humanos, suínos e bovinos apresentam uma redução fisiológica e acentuada da densidade endotelial do nascimento aos primeiros anos de vida, decorrente do aumento do diâmetro corneano (MacCALLUM et al., 1983; ABIB, 2000; HUANG et al., 1989;

FRANZEN et al., 2010; BERCHT et al., 2015).

2.2.1 Reparação Endotelial da Córnea em Resposta a Trauma

Em indivíduos adultos a capacidade regenerativa já foi estudada em várias espécies, demonstrando que a reparação ocorre por hipertrofia e migração das células remanescente. Em coelhos, observa-se ainda alta atividade mitótica favorável ao processo de cicatrização. Em humanos e felinos jovens, verifica-se alguma atividade mitótica, porém ela é insuficiente para reparar o endotélio lesado. Assim, ocorre a hipertrofia e migração celular (BAHN, et al., 1986; BOURNE et al., 1994; HOFFER, 1979; HUANG, NELSON; BOURNE, 1989; LAING et al., 1983; LANDSHMAN et al., 1988; TREFFERS, 1982). As investigações quanto à capacidade regenerativa do endotélio corneano são controversas (GWIN et al., 1982; PIGATTO, 2004).

Descreve-se que após lesão endotelial, as células próximas ao local lesado tornam-se hipertrofiadas e migram para recobrir a área desnuda de células endoteliais (HIRSCH et al., 1976; WEIMAR; SQUIRES; KNOX, 1980; OLSEN; DAVANGER, 1984; MATSUDA et al., 1985; TUFT; COSTER, 1990). Para a migração, as células rompem suas junções intercelulares e desenvolvem pseudópodos para se movimentarem em média de 0,5 a 1mm por dia em direção à lesão (BEFANIS; PEIFFER; BROWN, 1981; MATSUDA et al., 1985; TUFT; COSTER, 1990). Quando as células encontram-se no centro da lesão, ocorre um estímulo inibitório pelo contato celular, cessando a migração (TUFT; COSTER, 1990) e os complexos juncionais são refeitos, (HIRSCH et al., 1976; MISHIMA et al., 1982), retomando o padrão de mosaico endotelial (YEE et al., 1985a). Esse processo resulta em aumento no tamanho celular endotelial, diminuição da densidade endotelial (MISHIMA, 1982) e declínio no percentual de células com forma hexagonal (LAING et al., 1976; MATSUDA et al., 1985; RAO et al., 1982).

Concomitante à migração e hipertrofia, em indivíduos muito jovens da espécie canina, felina e humana, ocorre mitose das células endoteliais da margem da lesão na tentativa de recobrir a membrana de Descemet exposta (Van HORN et al., 1977; TREFFERS, 1982; BEFANIS; PEIFFER; BROWN, 1981). Estudos utilizando a

microscopia eletrônica de varredura demonstraram essa afirmativa. Coelhos e gatos tiveram 10 e 50% da superfície corneana lesada por congelamento, onde ocorreu a perda das células endoteliais. Nos coelhos, essa área afetada foi recoberta por células endoteliais em cinco dias e, aos dez dias, observava-se densidade endotelial semelhante à anterior da lesão. Nos gatos, a regeneração foi mais tardia, com presença de alongamento e migração endotelial (Van HORN et al., 1977). Olsen e Davanger (1984) observaram, em córneas de coelhos jovens, que após 21 dias da lesão por congelamento, houve o restabelecimento do padrão hexagonal do endotélio, porém as células tornaram-se mais desiguais e menos regulares que o normal. Dos estudos supracitados com a espécie lagomorfa, os pesquisadores concluíram que a reparação endotelial ocorreu por divisão mitótica e hipertrofia das células remanescentes.

À microscopia especular realizada em humanos, macacos, gatos e coelhos observou-se presença de células, com tamanho em torno de duas vezes maior que uma célula endotelial normal, a qual apresenta aproximadamente $300\mu\text{m}^2$. Essas células, denominadas de células gigantes, são encontradas em córneas normais de coelhos e apenas em córneas traumatizadas das espécies humana, primata e felina, sendo visíveis a partir de 48 horas após lesão endotelial. A presença das células gigantes sugere ser uma resposta compensatória à ausência de mitose nessas espécies, demonstrando hipertrofia celular associada a uma menor densidade e a um maior pleomorfismo celular (JACKSON; GARDINER; ARCHER, 1995).

Os efeitos sobre a cicatrização, como a idade do animal e o nível de inflamação intraocular podem reduzir a replicação das células endoteliais. Um estudo em coelhos revelou redução de 50% da regeneração em adultos se comparados aos jovens. Os animais idosos sintetizam, mais lentamente e em menor quantidade, proteínas gênicas necessárias para a mitose (STAATZ; Van HORN, 1980).

2.2.2 Efeitos de Procedimentos Cirúrgicos Intraoculares no Endotélio Corneano

A membrana basal do endotélio encontra-se aderida à membrana de Descemet, mas não se verificam hemidesmossomas, complexos juncionais típicos da associação da membrana celular com a lâmina basal (TUFT; COSTER, 1990). A ausência dessas

estruturas permite que as células endoteliais sejam facilmente separadas da membrana de Descemet, principalmente no curso de intervenções cirúrgicas intraoculares (WARING et al., 1982).

A cirurgia de remoção da catarata leva a mudanças na densidade endotelial, na morfologia endotelial e na espessura da córnea (INABA et al., 1985; CHENG et al., 1985; SCHULTZ et al., 1986; RAVALICO, BOTTERI; BACCARA, 2003; LICHTINGER et al., 2011). Dentre as alterações morfológicas observa-se diminuição no percentual de células hexagonais, aumento no número de células hipertrofiadas e no coeficiente de variação do tamanho celular, caracterizando a perda endotelial com diminuição da densidade celular. Essas alterações são localizadas, principalmente, na porção superior da córnea devido ao acesso e à manipulação cirúrgica da remoção da catarata (SCHULTZ et al., 1986; PIGATTO, 2004).

Os estudos avaliando a perda endotelial após facoemulsificação demonstraram uma perda endotelial em torno de 10,5% para casos de catarata madura em humanos (STUMPF; NOSÉ, 2006). Em cães, após 60 dias da facoemulsificação utilizando a técnica de fratura *stop and chop*, observou-se por meio da microscopia especular perda endotelial em torno de 23,7% (CHIURCIU et al., 2010).

Em outro estudo, cães portadores de cataratas imatura e madura, com três a sete anos, foram submetidos à facoemulsificação observando-se, pela microscopia especular, que não houve diminuição significativa na densidade celular nos momentos pós-operatórios propostos (7, 14, 21, 30, 45 e 60 dias). Quanto à área celular, também não houve diferença significativa antes e após a cirurgia. Em relação à média da hexagonalidade das células, houve diminuição significativa após a cirurgia, retornando às médias basais pré-operatórias aos 60 dias, indicando que as células se apresentaram disformes imediatamente à cirurgia. Entretanto, foram capazes de retomar sua forma ao longo do tempo. O coeficiente de variação da área celular apresentou-se aumentado ao longo do pós-cirúrgico, mas também normalizou as médias basais decorridos 60 dias (NAGATSUYU et al., 2014).

A correlação positiva entre a perda endotelial e o tempo de ultrassom, utilizado nas cirurgias de facoemulsificação são achados de pesquisas que apontam a energia ultrassônica como um fator lesivo ao endotélio corneano (WALKON et al., 2000; STUMPF; NOSÉ, 2006; CHO et al., 2010).

Em cães as perdas celulares foram avaliadas, por meio da microscopia eletrônica

de varredura, ao se comparar as técnicas manuais de facoemulsificação e extração extracapsular. Esse estudo verificou maior perda celular na região superior da córnea, seguida pela central e inferior, com maior relevância para a técnica extracapsular. Isso se deve à maior incisão, localizada na região superior e ao contato da lente com o endotélio, durante a sua remoção. A facoemulsificação propiciou a manutenção do padrão regular do mosaico endotelial, e pequena perda endotelial nas regiões central e inferior. Na região superior, próximo à incisão, constatou-se maior perda celular (PIGATTO, 2004).

Os estudos relacionados à perda endotelial cirúrgica também foram realizados em gatos e coelhos (GWIN et al., 1982, PIGATTO, 2004). Nos humanos, os estudos se detiveram principalmente ao uso da microscopia especular por ser *in vivo* e não invasivo, demonstrando, após cirurgia de catarata em olhos normais, uma perda endotelial média de 10 a 20%, independente da técnica de remoção (VALLE et al., 1998) e uma perda crônica progressiva anual de 2,5% durante 10 anos de pós-cirúrgico aproximadamente (BOURNE, NELSON, HODGE, 1994). Comparativamente, em olhos não operados, observou-se uma perda endotelial em torno de 0,9 a 1% por ano (BOURNE et al., 2004). Atualmente, os melhoramentos tecnológicos e as novas técnicas para a remoção da catarata propiciam menores perdas endoteliais registradas em torno de 3,2% a 23,2% (RAVALICO; BOTERI; BACCARA, 2003; RICHARD et al., 2008).

No entanto, a densidade endotelial ainda deve ser estimada devido ao risco inerente ao procedimento, podendo levar à descompensação endotelial e à perda da transparência corneana.

2.3 Métodos de Avaliação do Endotélio Corneano

Em 1920, Vogt foi o precursor na observação do endotélio da córnea, utilizando a biomicroscopia com lâmpada de fenda, pela técnica de iluminação direta focal com grande magnificação. Este exame oferece insuficiente magnificação e o movimento do olho examinado compromete a avaliação (JURKUNAS; COLBY, 2005). Em 1982, Mishima avaliou o endotélio corneal por meio da paquimetria, da microscopia especular

e da fluorometria.

Na avaliação morfológica e morfométrica do endotélio corneano de humanos e de animais, são empregados vários métodos de investigação clínica como a microscopia especular e a microscopia confocal (GWIN et al., 1982; COLLIN; COLLIN, 1998; ICHIJIMA et al., 1993; ABIB, 2000; CANAVAGH et al., 2000; JALBERT et al., 2003; PIGATTO et al., 2006; KAFARNIK et al., 2007; PIGATTO et al., 2008; LEDBETTER; SCARLETT, 2009). Os estudos *in vitro* e *ex vivo* utilizam, normalmente, a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia óptica com a coloração vital (SVEDBERGH; BILL, 1972; TAYLOR; HUNT, 1981; DOUGHTY, 1989; MEANS et al., 1995; COLLIN; COLLIN, 1998; MANNIS et al., 1998; WERNER et al., 1998; PIGATTO et al., 2005; PIGATTO et al., 2009; SCHELLINI et al., 2007; YANNI et al., 2003; RODRIGUES et al., 2009).

Esses métodos permitem analisar, sobretudo, a densidade endotelial, o tamanho e a forma das células do endotélio (DOUGHTY; DILTY, 1994; ABIB, 2000; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008). O polimegetismo é o termo utilizado para denotar as diferenças no tamanho das células endoteliais com forma hexagonal preservado. O pleomorfismo é dado como a variação da forma hexagonal das células endoteliais da córnea. Esses índices são importantes indicadores do estado funcional do endotélio corneano (ABIB, 2000; McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008; PIGATTO et al., 2008).

2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura é o método de avaliação mais comumente utilizado para obter informações sobre a ultraestrutura endotelial (OJEDA, et al., 2001). A sua resolução permite avaliar detalhes da ultraestrutura do padrão celular, como por exemplo, a superfície das microvilosidades, os cílios e a abertura de vesículas pinocíticas (DOUGHTY, 2006; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). A técnica consiste, como primeiro passo para a preparação das amostras, na sua fixação, normalmente, com glutaraldeído. Após o período de fixação, é realizada a desidratação com solução de álcool etílico em séries crescentes para posterior secagem em secador

de ponto crítico. Como último passo, a metalização da amostra é feita para serem microeletrofotografadas no microscópio eletrônico de varredura (DOUGHTY et al., 1995; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Estudos relacionados à morfologia corneana (OJEDA, et al., 2001), à toxicidade de fármacos intracamerulares (ALP et al., 2000; HOLLEY et al., 2002; LIOU, CHIU; WANG, 2004; SEYHMUS et al., 2006), à eficácia de meios de preservação da córnea (ARNDT; REESE; KOSTLIN, 2001) e à avaliação das superfícies de estruturas, como o epitélio (OJEDA, et al., 2001) e o endotélio de diferentes espécies, têm sido realizados por meio da microscopia eletrônica de varredura (COLLIN; COLLIN, 2000; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; RODRIGUES et al, 2006; PIGATTO et al., 2009; TAMAYO-ARANGO et al., 2009).

Binder, Akers e Zavala (1979), valendo-se da microscopia eletrônica de varredura, observaram densidade celular endotelial significativamente maior quando comparada à encontrada pela microscopia especular. Durante a etapa de preparo celular para a microscopia eletrônica de varredura, a amostra pode sofrer graus variados de retração. Em estudo com córneas de coelhos, verificou-se ocorrência de até 50% de retração celular, levando a uma diminuição da área celular e aumento na densidade endotelial (BINDER; AKERS; ZAVALA 1979; SCHUTTEN; Van HORN, 1980; DOUGHTY, BERGMANSON; BLOCKER, 1997; PIGATTO, 2004). Com isso, os valores da densidade endotelial obtidos não podem ser correlacionados aos dados advindos da microscopia especular (SCHUTTEN; Van HORN, 1980, MISHIMA, 1982; DOUGHTY; SPITERI; DILTS, 1997; DOUGHTY, 2006).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, Pigatto et al. (2005), em estudo com coelhos normais, visibilizaram células hexagonais, pentagonais e heptagonais.

2.3.2 Microscopia Especular

A microscopia especular pode ser realizada utilizando os microscópios de contato e não contato. (LAING et al., 1983; ABIB, 2000; McCAREY et al., 2008).

A microscopia de contato requer a utilização de colírio anestésico, pois a objetiva permanece em contato com o epitélio da córnea, proporcionando a sua aplanção. Isso

permite o reflexo especular para a obtenção da imagem com até 800 células endoteliais (TUFT; COSTER, 1990; McCAREY et al., 2008).

A microscopia de não contato é considerada de fácil execução, rápida e com menor possibilidade de lesão corneana, não necessitando o uso de colírios. Esses equipamentos utilizam uma tecnologia de focalização automática. O reflexo especular é menor, pois não ocorre aplanagem da curvatura corneana, sendo obtidas imagens com maior número de células endoteliais (TUFT; COSTER, 1990; McCAREY et al., 2008).

Os microscópios especulares podem ser classificados quanto ao modo de análise dos dados incluindo os não-automatizados, os semiautomatizados e os automatizados. Nos microscópios não-automatizados a avaliação endotelial fica a cargo do operador. Nos semiautomatizados são oferecidos recursos para análise endotelial, porém é necessário que o operador interaja com o *software* e a imagem endotelial captada. Os automatizados oferecem recursos informatizados para a análise do mosaico endotelial, havendo mínima necessidade de interação do operador com o equipamento. Os equipamentos semiautomatizados foram considerados mais precisos pelos autores (ABIB, 2000; JURKUNAS; COUBY, 2005).

A análise da densidade endotelial celular, realizada normalmente por diferentes *softwares* contidos nos microscópios especulares, pode ser dividida em: método do retículo fixo ou variável, método da marcação dos centros celulares, método de comparação e método da marcação dos cantos celulares (ABIB, 2000; McCAREY et al., 2008).

Em pacientes humanos submetidos à facectomia, a microscopia especular revelou um padrão endotelial diferente na região da córnea periférica em relação à central. Portanto, concluiu-se que a microscopia especular não deve ficar confinada à região central, com risco de produzir resultados que não representem o mosaico endotelial (RAO et al, 1978; McCAREY et al., 2008).

Pigatto et al. (2008) realizaram a análise morfológica, por meio da microscopia especular de contato, do endotélio central e periférico da córnea de cães, machos e fêmeas, com seis anos. O estudo mostrou padrão uniforme do mosaico endotelial com predominância de células hexagonais, mantendo similitude com a morfologia do endotélio humano.

2.3.3 Microscopia Confocal

Em 1957, Marvin Minsky criou o microscópio confocal, tendo o seu uso prático realizado por David Maurice em 1974 (JALBERT et al., 2003; KAFARNIK et al., 2007).

A microscopia confocal é uma importante ferramenta para o diagnóstico clínico *in vivo* e para estudos experimentais *ex vivo* de todas as camadas, células e fibras nervosas da córnea de humanos e de animais. É uma técnica rápida, segura e não invasiva (JALBERT, et al., 2003; KAFARNIK et al., 2007; LEDBETTER; SCARLETT, 2009; REICHARD et al., 2010).

A técnica permite, por meio de grande magnificação e excelente resolução, imagens em tempo real das camadas, das células e das fibras nervosas da córnea, bem como permite visibilizar a presença de corpos estranhos, de micro-organismos e de depósitos corneais. Ademais, avaliar qualitativamente e quantitativamente tecidos normais, detectar alterações patológicas mesmo antes da manifestação clínica da doença e acompanhar pré e pós-operatórios de ceratectomias e processos cicatriciais (KLAIS et al., 2003; JALBERT, et al., 2003; VICTOR et al., 2006; KAFARNIK et al., 2007; LEDBETTER; SCARLETT, 2009; LEDBETTER et al., 2014; REICHARD et al., 2010).

O princípio da microscopia confocal consiste na presença de feixes de iluminação e de observação que são focados no mesmo plano da córnea e de duas fendas que são inseridas nos planos de imagem de cada feixe. Esse arranjo óptico é denominado de confocal, pois ele suprime a luz refletida de fora do campo de observação e somente reflete a luz originada do plano de foco. Assim ocorre a formação da imagem. Ajustes ópticos permitem imagens de diferentes profundidades da estrutura estudada. A ponta da objetiva entra em contato com a córnea. Para a proteção do seu epitélio, um gel refrativo é utilizado (KLAIS et al., 2003).

Kafarnik et al., em 2007, descreveram pela primeira vez a microscopia confocal *in vivo* em cães, gatos e aves. O estudo demonstrou as camadas da córnea, a sua espessura, a sua inervação e densidade endotelial. Nos caninos com menos de um ano de idade, obtiveram uma média de 3.641 ± 752 células/mm², para os cães com mais de um ano de idade, média de 2.851 ± 634 células/mm². Nos felinos com menos de um ano

de idade, a densidade endotelial média foi de 3.038 ± 666 células/mm²; para aqueles com mais de um ano de idade, a média foi de 2.520 ± 452 células/mm². Também demonstraram haver redução na densidade endotelial nas espécies estudadas ao longo da vida. Quanto à espessura corneana, não houve diferença estatística entre os cães e os felinos. Nas aves, foram verificadas inúmeras diferenças estruturais na córnea.

Ledbetter e Scarlett (2009) demonstraram por meio da microscopia confocal *in vivo* que equinos apresentam na região da córnea densidade endotelial média de 3002 células/mm² e espessura central de 835µm. Imagens em nível celular do epitélio, do estroma, do endotélio, do limbo e da inervação da córnea foram analisadas.

Reichard et al. (2010) compararam a anatomia da córnea de diferentes espécies, incluindo os cães, os gatos, os coelhos, os ratos, os camundongos e as ovelhas. Os autores verificaram que a morfometria e morfologia são similares entre as espécies, exceto para os ovinos.

O diagnóstico pela microscopia confocal é difícil, mesmo quando o exame e sua interpretação sejam realizados por um operador experiente; podendo, algumas vezes, ser inconclusivo (VICTOR et al., 2006).

2.3.4 Microscopia Óptica e os Corantes Vitais

Os primeiros microscópios de luz ou microscópios ópticos surgiram no século XVII, inovações atribuídas ao holandês Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) e ao inglês Robert Hooke (1635-1703). Leeuwenhoek criou os microscópios com uma única lente, os quais chegavam a aumentos de mais de 200 vezes. Esses microscópios com uma lente só são chamados de microscópios simples, e a imagem fornecida não é boa. Hooke construiu seu microscópio com duas lentes: uma delas era a ocular e a outra, a objetiva. Esses microscópios são chamados microscópios compostos, e a imagem fornecida é melhor que a do microscópio simples (MONTANARI, 2013).

A maioria dos tecidos é incolor, o que torna difícil sua observação ao microscópio óptico. Devido a isso foram introduzidos métodos para a coloração dos tecidos, de modo a tornar seus componentes visíveis e destacados uns dos outros. A coloração é feita usando-se geralmente misturas de substâncias químicas denominadas

corantes. A maioria dos corantes utilizados comportam-se como ácidos ou bases e tendem a formar ligações salinas com radicais ionizáveis presentes nos tecidos (SANTOS JÚNIOR, 2001; MONTANARI, 2013).

Para o estudo do endotélio da córnea, a qual é um tecido transparente, os corantes vitais são utilizados. Esses são assim denominados por terem a função de corar as células ou os tecidos vitalizados. Esses permitem, ao microscópio óptico, a visibilização das estruturas sem as alterar, danificar ou matar (SANTOS JÚNIOR, 2001). Quando o corante é utilizado em organismos vivos, pode-se chamar de corante intravital; quando a aplicação deste é realizada em tecidos ou órgãos frescos removidos do corpo pode-se chamar de coloração supravital (RODRIGUES et al., 2009).

O corante vital tem sido utilizado em várias especialidades incluindo a Oncologia, a Gastroenterologia e a Oftalmologia como método de diagnóstico e em técnicas cirúrgicas (RODRIGUES et al., 2009).

Recentemente, o uso desses corantes surgiu como adjuvantes importantes e eficazes, pois melhoram a visibilização de tecidos oculares durante procedimentos cirúrgicos (RODRIGUES et al., 2009). Em cirurgias de catarata para a coloração da cápsula anterior do cristalino, em cirurgias de transplante de córnea posterior para a coloração dos botões endoteliais e em cirurgias vitreoretinianas. Para avaliar as alterações e danos endoteliais os corantes vitais são utilizados em estudos de toxicidade aos fármacos e de cicatrização corneana, de preservação de córneas doadoras, de coleta de botões corneais para transplantes penetrantes e posteriores (SPENCE; PEYMAN, 1976; MEANS et al., 1995; MANNIS et al., 1998; MELLES et al., 1998; WERNER et al., 1998; DOUGHTY, 1989; ANDREW et al., 1999; ZHU et al. 2006; RODRIGUES et al., 2009; WASILEWSKI et al., 2010; BEN-ELIAHU et al., 2011).

Os corantes vitais mais utilizados são o nitrato de prata, o rosa bengala, o azul tripano, a hematoxilina e o vermelho de alizarina (SPERLING, 1977; TAYLOR; HUNT, 1981; TREFFERS, 1982).

Os métodos histológicos associados aos corantes vitais são utilizados para avaliar a viabilidade, os graus de dano à superfície celular e a morfologia endotelial (SPERLING, 1977; DOUGHTY, 1989; RUIZ, MEDRANO; ALIÓ, 1991). As técnicas histológicas podem fornecer dados importantes em casos de córneas edemaciadas, cuja análise não é possível com a microscopia especular (GEROSKI; EDELHAUSER, 1989). Sperling, em 1977, descreveu a técnica de coloração com corante vital vermelho

de alizarina e azul tripano para a avaliação da integridade endotelial.

A alizarina é um corante de pigmento vermelho derivado originalmente da raiz da garança, da espécie *Rúbia Tinctorum* (SANTOS JÚNIOR, 2001; RODRIGUES et al., 2009). A palavra alizarina deriva do árabe *al-usara*, significando suco. O 1,2 dihidroxiantraquinona-3 sulfonato de sódio, também denominado de vermelho de alizarina, ou Carmina alizarina, ou, ainda, alizarina S, pertence ao grupo dos corantes hidroxiantraquinona e é comercialmente distribuído na forma de pó cristalino monossódico, monohidratado, de coloração amarelo alaranjado e é facilmente solúvel em água e etanol resultando em uma solução vermelha com pH básico (SANTOS JÚNIOR, 2001).

O vermelho de alizarina é um corante intercelular que cora a membrana de Descemet (IGNÁCIO et al., 2005) e é útil para demarcar os bordos de células viáveis e não viáveis (RODRIGUES et al., 2009). O azul de tripano é comumente utilizado, juntamente com o vermelho de alizarina, para avaliar o núcleo que permanece corado de azul, as bordas celulares do endotélio e áreas com ausência de células endoteliais coradas de vermelho (SPERLING 1977; TAYLOR; HUNT, 1981).

A dupla coloração com corantes vitais, utilizando azul de tripano e vermelho de alizarina é o método mais comum de determinar células viáveis e não viáveis nas áreas não vistas por microscopia especular. Esta técnica *in vitro* foi usada para determinar dano agudo e morte celulares por manipulações cirúrgicas em laboratório. Estudos sobre coloração vital das células endoteliais foram feitos com a avaliação fotográfica para analisar quantitativamente e qualitativamente a perda de células (SAAD et al., 2008; BRUINSMA et al., 2013; RUGGERI et al., 2014).

Para a realização de técnicas histológicas, existe a necessidade da excisão da córnea e sua imersão em soluções de coloração. Isso induz a variações nos níveis de hidratação e, por conseguinte, a riscos de distorção das células endoteliais. A imagem resultante das células endoteliais dependerá da seletividade topográfica do método de coloração utilizado. Na microscopia especular *in situ*, calcula-se que a área celular endotelial média é reduzida em torno de 30% por meio das técnicas de coloração (GEROSKI; EDELHAUSER, 1989).

Geroski e Edelhauser (1989) compararam parâmetros morfométricos obtidos a partir das técnicas de coloração vital e microscopia especular de indivíduos da espécie humana e lagomorfa. Foi observado considerável retração na área celular do endotélio

da córnea de coelhos (14%), mantendo inalterada a porcentagem de células hexagonais. Nas células endoteliais humanas, não foram observadas diferenças significativas no tamanho ou na forma celular.

Portanto, a coloração vermelho de alizarina, valendo-se da microscopia óptica, é um método rápido, simples e barato de se obter imagens da morfologia do endotélio de humanos e animais (PEYMAN; SPENCE, 1977; TAYLOR; HUNT, 1981; GEROSKI; EDELHAUSER, 1989; ANDREW et al., 1999; RODRIGUES et al., 2006; WASILEWSKI et al., 2010). Sobretudo, tem importantíssima aplicabilidade em inúmeros estudos na Oftalmologia, os quais permitem a essa ciência cotejar, especialmente, dados sobre a morfologia e morfometria normal de diferentes espécies animais; registrar e observar alterações endoteliais frente ao uso de fármacos intraoculares; processos cicatriciais e aperfeiçoamentos de técnicas cirúrgicas para transplantes de córnea penetrantes e posteriores; conservação de botões corneais; técnicas cirúrgicas para remoção de catarata; assim como permite a investigação do endotélio em sua totalidade e de córneas opacas ou edemaciadas (SPENCE; PEYMAN, 1976; MEANS et al., 1995; MANNIS et al., 1998; MELLES et al., 1998; WERNER et al., 1998; DOUGHTY, 1989; ANDREW et al., 1999; WIFFEN; HODGE; BOURNE, 2000; LIOU et al., 2004; AMANN et al., 2003; ZHU et al. 2006; SAAD et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; WASILEWSKI et al., 2010; BEN-ELIAHU et al., 2011; FAGANELLO, 2012; BRUINSMA et al., 2013; YANNI et al. 2015).

3 ARTIGO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista *Veterinary Ophthalmology* (ISSN 1463-5216) e será versado para o Inglês no momento da sua submissão.

3.1 Morfologia das células do endotélio de diferentes regiões da córnea de cães (*Canis familiaris*) utilizando vermelho de alizarina e microscopia óptica

Morphology of endothelial cells from different areas of the cornea of dogs (*Canis familiaris*) using alizarin red and optical microscopy

P.S. Hünning*, J.A.T. Pigatto*.

* Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

Objetivo Avaliar a forma das células endoteliais de cães (*Canis familiaris*) de diferentes regiões da córnea hígida, valendo-se da coloração de vermelho de alizarina e da microscopia óptica.

Materiais e métodos Foram estudados 20 olhos hígidos de cães, machos ou fêmeas, sendo esses separados igualmente entre olhos direito e esquerdo. A morfologia do endotélio da córnea das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal foram avaliadas por meio da coloração vermelho de alizarina 0,2%. As fotomicrografias do endotélio corado foram obtidas por um microscópio óptico. De cada região foram analisadas 100 células endoteliais. Os dados obtidos foram comparados entre as regiões e entre os olhos direito e esquerdo através da análise de variância de fator duplo com medidas repetidas.

Resultados O percentual médio de células hexagonais na região central da córnea foi de 80,6 ±4,3% para o olho esquerdo e de 78,8 ±4,7% para o direito; na região superior foi de 78,5 ±4,4% para o olho esquerdo e de 79,4 ±4,9% para o direito; na região inferior foi de 80,2 ±6,0% para o olho esquerdo e de 80,1 ±4,4% para o direito; na região

temporal foi de $79,7 \pm 5,0\%$ para o olho esquerdo e de $78 \pm 2,9\%$ para o olho direito e, na região nasal, foi de $79,5 \pm 5,7\%$ para o olho esquerdo e de $76,7 \pm 6,0\%$ para o direito. O percentual médio de células com cinco lados, na região central da córnea; no olho esquerdo, foi $11,9 \pm 3,0\%$ e, para o direito, $13,2 \pm 3,8\%$; na região superior, no olho esquerdo, $13,6 \pm 1,8\%$ e, para o direito, $13 \pm 4,1\%$; na região inferior, foi de $11,7 \pm 3,1\%$ para o olho esquerdo e de $11,7 \pm 3,5\%$ para o direito; na região temporal, olho esquerdo, $11,9 \pm 3,8\%$ e, para o direito, $13,2 \pm 2,3\%$; na região nasal, olho esquerdo, $12,6 \pm 13,1\%$ e, para o direito $14,1 \pm 4,0\%$. O percentual médio de células com sete lados, na região central, olho esquerdo, foi $7,5 \pm 2,3\%$ e, para o direito, $8 \pm 2,2\%$; na região superior, no olho esquerdo, $7,9 \pm 4\%$ e, para o direito, $7,6 \pm 2,3\%$; na região inferior foi de $7,9 \pm 3,4\%$ para o olho esquerdo e de $8,2 \pm 3,2\%$ para o direito; na região temporal, olho esquerdo, $8,4 \pm 2,0\%$ e, para o direito, $8,8 \pm 1,3\%$; na região nasal, olho esquerdo, $8,6 \pm 2,6\%$ e, para o direito, $9,2 \pm 2,9\%$. Com base nos resultados apresentados não houve diferença estatística entre as regiões estudadas.

Conclusão Em todas as regiões estudadas não houve diferença com relação a forma das células do endotélio da córnea de cães.

Abstract

Objectives The purpose of this study was to evaluate the shape of endothelial cells from different areas of the cornea of dogs (*Canis familiaris*).

Materials and methods Twenty healthy dogs eyes were studied, males and females, separated between right and left eyes. The corneal endothelium morphology of the central, superior, inferior, temporal and nasal areas was assessed by alizarin red staining 0.2%. The endothelium images were obtained using an optic microscope. One hundred endothelial cells were analyzed in to different corneal areas. Data were compared between areas and between the right and left eyes by analysis of factor double of variance with repeats measures.

Results The average percentage of hexagonal cells in the central region of the cornea, was $80.6 \pm 4.3\%$ for the left eye and $78.8 \pm 4.7\%$ for the right; in the superior area was $78.5 \pm 4.4\%$ for the left eye and $79.4 \pm 4.9\%$ for the right; in the inferior area was $80.2 \pm 6.0\%$ for the left eye and $80.1 \pm 4.4\%$ for the right; in the temporal area was $79.7 \pm 5.0\%$ for the left eye and $78 \pm 2.9\%$ for the right eye and nasal area was $79.5 \pm 5.7\%$ for

the left eye and $76,7 \pm 6.0\%$ for the right. The average percentage of cells with five sides, in the central area of the cornea, left eye, was $11.9 \pm 3.0\%$ and to the right $13.2 \pm 3.8\%$; in the superior area in the left eye, $13.6 \pm 1.8\%$ and to the right, $13 \pm 4.1\%$; in the inferior area was $11.7 \pm 3.1\%$ for the left eye and $11.7 \pm 3.5\%$ for the right; in the temporal area, left eye, $11.9 \pm 3.8\%$ and to the right $13.2 \pm 2.3\%$; in the nasal area, left eye, $12.6 \pm 3.1\%$ and $14.1 \pm 4.0\%$ right. The average percentage of cells with seven sides, central, left eye, was $7.5 \pm 2.3\%$ and to the right $8 \pm 2.2\%$; in the superior area in the left eye, $7.9 \pm 4\%$ and to the right, $7.6 \pm 2.3\%$; in the inferior area was $7.9 \pm 3.4\%$ for the left eye and $8.2 \pm 3.2\%$ for the right; in the temporal area, left eye, $8.4 \pm 2.0\%$ and $8.8 \pm 1.3\%$ right; in the nasal area, left eye, $8.6 \pm 2.6\%$ and to the right $9.2 \pm 2.9\%$. Based on the presented results there was no difference in endothelial cells shape in the different corneal areas of dogs.

Conclusion. In all studied corneal areas there was no significant difference regarding to endothelial cell morphology.

INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que constituem a superfície posterior da córnea.¹⁻¹¹ Em sua maioria as células endoteliais apresentam forma hexagonal^{1,10,11} e seu aspecto anatômico normal é um indicador da saúde endotelial.^{9,12-13} Elas têm como função manter a integridade da córnea. Assim, as células endoteliais limitam a entrada de água e de solutos oriundos da câmara anterior para o estroma corneano, mantendo a sua transparência e a sua desidratação.^{5,7}

Portanto, a manutenção da integridade do endotélio e, por sua vez, o seu estudo, é de grande importância. Para a sua avaliação morfológica e morfométrica, métodos de investigação clínica são empregados como a microscopia especular e a confocal.^{9,13-18} Dos métodos de estudos *in vitro* e *ex vivo*, especialmente utiliza-se a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia óptica com o uso dos corantes vitais.^{1,6,19-28}

Esses métodos de estudo permitem analisar, principalmente, a estimativa da densidade endotelial, o tamanho e a forma das células do endotélio. O polimegetismo é o termo utilizado para denotar as diferenças no tamanho das células endoteliais com

forma hexagonal preservado. O pleomorfismo é dado como a variação da forma hexagonal das células endoteliais da córnea. Esses índices são importantes indicadores do estado funcional do endotélio corneano.^{9,29}

Para essa avaliação qualitativa e quantitativa do endotélio da córnea pode-se empregar em pesquisas *in vitro* e *ex vivo* o corante vital vermelho de alizarina. Esse é utilizado para corar os espaços intercelulares pois permite a visibilização das bordas das células viáveis e não viáveis. Outro método utilizado para determinar morte celular ou lesões nas áreas não vistas pela microscopia especular é através da dupla coloração com corantes vitais, utilizando o azul de tripano e o vermelho de alizarina.^{19,30,31}

O uso desses corantes vitais permite realizar importantes estudos sobre as alterações endoteliais provocadas por toxicidade a fármacos, pela cicatrização corneana, pela preservação de córneas doadoras, pela coleta de botões corneais para transplantes penetrantes e posteriores, entre outras funções.^{24,32-41}

A coloração vermelho de alizarina, valendo-se da microscopia óptica, é um método rápido, simples e barato para a obtenção de imagens da morfologia do endotélio de humanos e animais^{19,32,34,38,42,43} por isso será detalhada nesta pesquisa. É importante o conhecimento dos parâmetros de normalidade endoteliais nas diferentes regiões da córnea para que os procedimentos cirúrgicos, especialmente os intraoculares, possam ser realizados com maior segurança. O padrão morfológico do endotélio foi estabelecido em humanos e em algumas espécies de animais. Em humanos, no que diz respeito às regiões da córnea, os estudos são controversos. Nos animais, as pesquisas limitam-se à análise somente da região central.^{11,18,19,24-26,25,35,44-48}

Logo, não foram encontrados na literatura estudos relacionados à morfologia de diferentes regiões do endotélio de cães. Assim, nesta pesquisa, objetiva-se avaliar a morfologia das células endoteliais de diferentes regiões da córnea hígida de cães (*Canis familiaris*) valendo-se da coloração de vermelho de alizarina e da microscopia óptica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 20 olhos de dez cães obtidos no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi conduzida conforme as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e foi

aprovada pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Todos os olhos foram submetidos a biomicroscopia com lâmpada de fenda (*Portable Slit lamp*, Kowa SL 15, Nagoya, Japão) e prova da fluoresceína (Prova da Fluoresceína *strips*, Ophthalmos, São Paulo, Brasil) para incluir somente olhos hígidos.

Em até 6 horas *pos mortem*, foi realizada a enucleação subconjuntival e os mesmos foram mantidos em câmara úmida até a coleta das córneas. Uma sutura com fio náilon 4-0 foi realizada na região perilimbal do olho às 12 horas para orientação das regiões da córnea.

A coleta das córneas foi realizada por peritomia límbica em 360°. A esclera foi delaminada a aproximadamente 2 a 3mm do limbo, com lâmina bisturi n° 23 e excisada com auxílio de tesoura Goldmann Fox curva. Após, a córnea com sua face endotelial voltada para cima, foi cuidadosamente transferida para uma lâmina de vidro. Para a preparação da córnea utilizou-se a técnica *flat mounting*. Seccionou-se com cortes radiais a córnea e a margem escleral utilizando lâmina de bisturi n° 23. Criaram-se quatro quadrantes, mantendo o centro da córnea intacto. Assim, a córnea permaneceu plana à lâmina de vidro e designaram-se as regiões a serem estudadas (**Figura 1**).

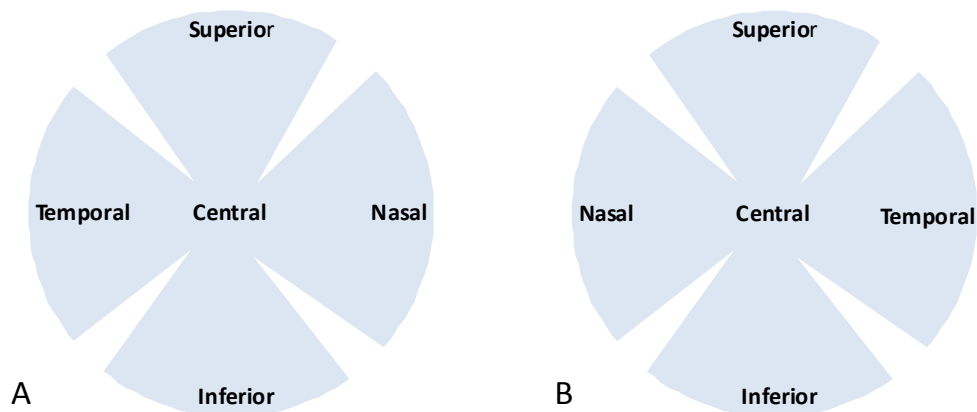


Figura 1 - Desenho esquemático representando as regiões do endotélio da córnea. (A) Olho direito. (B) Olho esquerdo.

Posteriormente foi realizada a coloração com vermelho de alizarina diluído a 0,2% (*Alizarin Red S*, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A preparação do corante consistiu da homogeneização de 0,2g da substância vermelho de alizarina, na forma de

pó, em 100ml de solução salina a 0,9%, por meio de um agitador magnético durante duas horas. Ajustou-se o pH para 4,2 utilizando-se hidróxido de amônia diluído (0,1% da substância em solução salina isotônica) efetuando-se o controle com um phmetro digital portátil (PH-100B, Phtek, Curitiba, Brasil). O corante foi conservado a temperatura ambiente em frasco de cor âmbar e tampa com pipeta dosadora.

A técnica da coloração foi realizada instilando-se quatro gotas do corante para recobrir toda a superfície endotelial da córnea, impedindo a formação de bolhas de ar entre a córnea e o corante. Aguardou-se 90 segundos para a impregnação do corante, o qual foi removido irrigando a amostra com solução salina a 0,9%, em frasco de 250ml, acoplada a um adaptador para lavagem. Instilaram-se três jatos suaves da solução sobre a córnea. Esta foi fixada a lâmina de vidro pela margem escleral, com o auxílio de uma pinça de Adson delicada sem dente, para evitar o deslocamento e perda da amostra.

Após a coloração, foram realizados de modo aleatório as fotomicrografias das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal das córneas para o olho direito e esquerdo. Para isso utilizou-se um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com iluminação halógena, acoplado a um sistema de captura de imagem (EO-0813C, Edmund Optics, EUA).

Foram utilizados aumentos de 4 e 40 vezes. As regiões superior, inferior, temporal e nasal foram avaliadas a aproximadamente de 1 a 3 mm do limbo e a região central correspondeu ao centro da córnea. Foram obtidas três imagens de cada região.

Para auxiliar no processamento das imagens, foi utilizado o *Microsoft Paint*. Observou-se diretamente o número de lados de 100 células endoteliais, através da análise das células circunvizinhas. À medida que a forma celular era definida, efetuava-se a contagem, a célula era identificada e uma planilha de dados era preenchida. Caso não fosse possível visualizar 100 células endoteliais em uma única imagem, outras da mesma região eram utilizadas. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo avaliador.

Os dados obtidos foram comparados entre as regiões e entre os olhos direito e esquerdo através da análise de variância de fator duplo com medidas repetidas (ANOVA) para um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Das 20 córneas estudadas, a porcentagem média de células hexagonais, na região central da córnea, foi de $80,6 \pm 4,3\%$ para o olho esquerdo e de $78,8 \pm 4,7\%$ para o

direito; na região superior foi de $78,5 \pm 4,4\%$ para o olho esquerdo e de $79,4 \pm 4,9\%$ para o direito; na região inferior foi de $80,2 \pm 6,0\%$ para o olho esquerdo e de $80,1 \pm 4,4\%$ para o direito; na região temporal foi de $79,7 \pm 5,0\%$ para o olho esquerdo e de $78 \pm 2,9\%$ para o olho direito e, na região nasal, foi de $79,5 \pm 5,7\%$ para o olho esquerdo e de $76,7 \pm 6,0\%$ para o direito (**Figuras 2-4**).

O percentual de células com cinco lados, na região central da córnea, olho esquerdo, foi $11,9 \pm 3,0\%$ e, para o direito, $13,2 \pm 3,8\%$; na região superior, no olho esquerdo $13,6 \pm 1,8\%$ e, para o direito, $13 \pm 4,1\%$; na região inferior foi de $11,7 \pm 3,1\%$ para o olho esquerdo e de $11,7 \pm 3,5\%$ para o direito; na região temporal, olho esquerdo, $11,9 \pm 3,8\%$ e, para o direito, $13,2 \pm 2,3\%$ e na região nasal, olho esquerdo, $12,6 \pm 13,1\%$ e, para o direito, $14,1 \pm 4,0\%$.

O percentual de células com sete lados, na região central, olho esquerdo, foi $7,5 \pm 2,3\%$ e, para o direito, $8 \pm 2,2\%$; na região superior, no olho esquerdo, $7,9 \pm 4\%$ e, para o direito, $7,6 \pm 2,3\%$; na região inferior foi de $7,9 \pm 3,4\%$ para o olho esquerdo e de $8,2 \pm 3,2\%$ para o direito; na região temporal, olho esquerdo, $8,4 \pm 2,0\%$ e, para o direito, $8,8 \pm 1,3\%$ e na região nasal, olho esquerdo, $8,6 \pm 2,6\%$ e, para o direito, $9,2 \pm 2,9\%$.

Analisando-se as regiões central e periférica, observou-se que a maioria das células eram hexagonais ($79,7 \pm 4,5\%$ para a região central e $79 \pm 4,9\%$ para a região periférica), com presença de células pentagonais ($12,6 \pm 3,4\%$ e $12,7 \pm 3,3\%$ para o centro e periferia, respectivamente) e células heptagonais ($7,8 \pm 2,2\%$ para o centro e $8,3 \pm 2,7\%$ para a periferia).

Ao analisar a morfologia de todas as células, desconsiderando-se as regiões da córnea e o lado direito e esquerdo, obteve-se média e desvio padrão de $79,31 \pm 4,81\%$ para células hexagonais, $12,69 \pm 3,25\%$ para células com cinco lados e $8,21 \pm 2,64\%$ para células com sete lados.

A comparação entre o percentual médio da morfologia endotelial das diversas regiões do endotélio da córnea, relacionada aos olhos direito e esquerdo, pode ser vista no **Gráfico 1**. A média, para cada coluna, foi obtida a partir de uma amostra de 100 células de cada olho. A **Tabela 1** informa a média e os percentuais de desvio padrão para cada caso. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de fator duplo com medidas repetidas (ANOVA) e nível de significância de 5%.

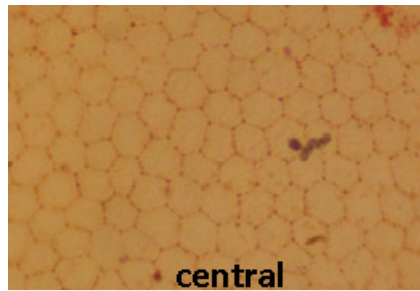


Figura 2 - Fotomicrografia óptica da região central do endotélio da córnea hígida de cão corado com vermelho de alizarina. Observou-se hexagonalidade média na

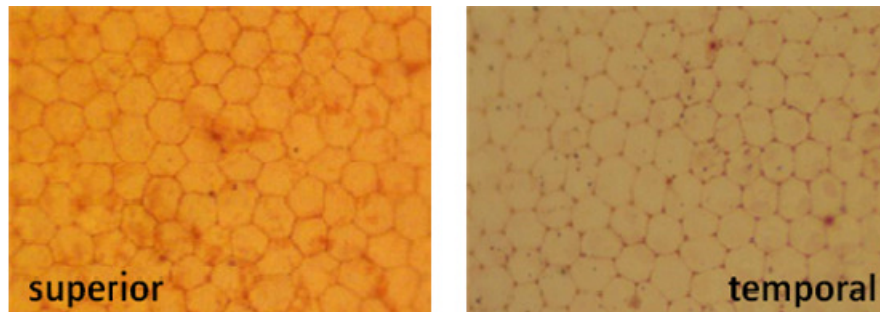


Figura 3- Fotomicrografia óptica das regiões superior e temporal do endotélio da córnea hígida de cão corado com vermelho de alizarina. Observou-se hexagonalidade média na região superior de $78,5 \pm 4,4\%$ e na região temporal de $78 \pm 2,9\%$. Aumento 40X.

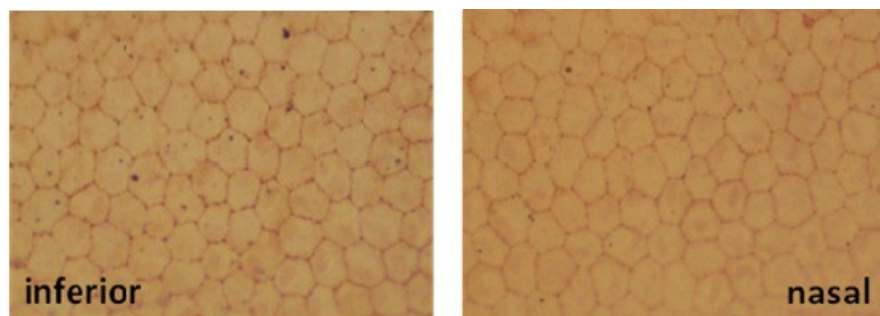


Figura 4- Fotomicrografia óptica das regiões inferior e nasal do endotélio da córnea hígida de cão corado com vermelho de alizarina. Observou-se hexagonalidade média na região inferior de $80,1 \pm 4,4\%$ e na região nasal de $76,7 \pm 6,0\%$. Aumento 40X.

Gráfico 1 – Morfologia das células do endotélio da córnea de cães (valor médio expresso em percentual) das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal com sua respectiva localização (OD = olho direito, OE = olho esquerdo).

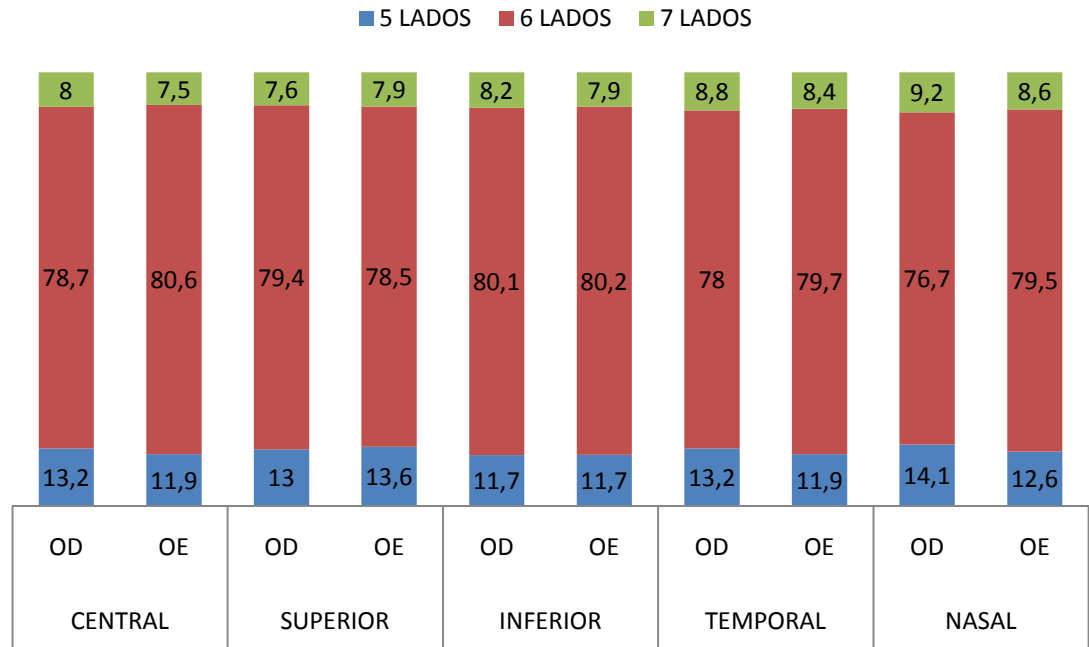


Tabela 1 -Morfologia das células do endotélio da córnea de cães (valor médio e desvio padrão, expressos em percentual), das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal com sua respectiva localização ($p < 0,05\%$).

OLHO	REGIÃO	MÉDIA \pm σ (%)					
		5 LADOS		6 LADOS		7 LADOS	
DIREITO	CENTRAL	13,2	\pm 3,8	78,8	\pm 4,7	8	\pm 2,2
	SUPERIOR	13	\pm 4,1	79,4	\pm 4,9	7,6	\pm 2,3
	INFERIOR	11,7	\pm 3,5	80,1	\pm 4,4	8,2	\pm 3,2
	TEMPORAL	13,2	\pm 2,3	78	\pm 2,9	8,8	\pm 1,3
	NASAL	14,1	\pm 4,0	76,7	\pm 6,0	9,2	\pm 2,9
ESQUERDO	CENTRAL	11,9	\pm 3,0	80,6	\pm 4,3	7,5	\pm 2,3
	SUPERIOR	13,6	\pm 1,8	78,5	\pm 4,4	7,9	\pm 4,0
	INFERIOR	11,7	\pm 3,1	80,2	\pm 6,0	7,9	\pm 3,4
	TEMPORAL	11,9	\pm 3,8	79,7	\pm 5,0	8,4	\pm 2,0
	NASAL	12,6	\pm 3,1	79,5	\pm 5,7	8,6	\pm 2,6

Com a coloração vermelho de alizarina e uso da microscopia óptica foi possível obter imagens em todas as amostras analisadas, documentar e estudar a forma das células do endotélio das diferentes regiões da córnea. O endotélio de cães com córneas

hígidas é composto por células poligonais de padrão regular, com predomínio da forma hexagonal nas regiões central e periféricas. Além disso, observou-se que não existe diferença significativa na forma celular do endotélio das diferentes regiões da córnea hígida de cães.

DISCUSSÃO

A forma e o tamanho das células do endotélio da córnea são os melhores indicadores da sua função e da sua integridade do que somente a análise da densidade endotelial.^{49,50} A manutenção da transparência da córnea depende do seu estado relativo de desidratação, mantido por processos metabólicos ativos que ocorrem no endotélio. Para isso a preservação da integridade funcional do endotélio da córnea após procedimentos cirúrgicos intraoculares é preconizada.⁵¹⁻⁵³ Nesse sentido, o conhecimento dos parâmetros endoteliais nas diferentes regiões da córnea é importante para que procedimentos cirúrgicos intraoculares possam ser monitorados com maior segurança.

Entre as técnicas mais empregadas para análise endotelial encontram-se *in vivo* a microscopia especular e a confocal e, *in vitro* ou *ex vivo*, a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia óptica com o uso de corantes vitais.^{9,11,12,14-19,21,24,27-29,40,54,55}

Dada a metodologia empregada, a coloração vital com vermelho de alizarina, valendo-se da microscopia óptica, é um método rápido, simples e barato para obtenção de imagens para a avaliação morfológica e morfométrica do endotélio de humanos e animais *in vitro* ou *ex vivo*.^{19,24,32,36,38,42,40,43,48} No presente estudo, a análise do endotélio da córnea hígida de cães utilizando o vermelho de alizarina a 0,2% permitiu a identificação dos contornos celulares com nitidez. Utilizou-se a técnica de coloração descrita por Taylor e Hunt (1981)¹⁹ e a microscopia óptica para a captura das imagens. Experimentos prévios com o uso do vermelho de alizarina em concentrações e em tempo de exposição diferentes foram realizados. Andrew et al. (1999)³⁴ avaliaram botões corneais de cães conservados em dois meios de preservação para córnea utilizando a técnica descrita por Taylor e Hunt (1981)¹⁹ e obtiveram, de maneira rápida, a visibilização das membranas celulares do endotélio, diferenciando as células viáveis e as não viáveis. Wasilewski et al. (2010)³⁸ estudaram nas córneas de coelhos o dano

endotelial induzido por uma técnica de separação da membrana de Descemet utilizando a coloração vermelho de alizarina a 0,2% exposta por 02 minutos. Park et al. (2012)⁵⁶ utilizaram nas córneas de cadáveres humanos, o vermelho de alizarina a 0,5% e a 1% durante exposição de 60 e 90 segundos, comparando a técnica de cobrir o endotélio com gotas e de imergir a córnea no corante vital. Esses autores observaram melhor nitidez dos bordos celulares imergindo a córnea na alizarina vermelha a 0,5% durante 90 segundos.

A dupla coloração com corantes vitais, utilizando azul de tripano 0,25% e vermelho de alizarina 0,2% é o método mais comum de determinar células viáveis e não viáveis em áreas em que não foi possível identificar células com a microscopia especular. Essa técnica *in vitro* foi usada para determinar dano agudo e morte celulares por manipulações cirúrgicas em laboratório. Estudos sobre coloração vital das células endoteliais foram feitos com a avaliação fotográfica para analisar a perda celular.^{31,41,57} O azul tripano penetra as membranas celulares danificadas corando o seu núcleo de azul; o vermelho de alizarina cora os bordos das células endoteliais e as áreas de perda celular onde a membrana de Descemet está exposta. Entretanto, objetivou-se neste estudo a avaliação da morfologia da córnea normal de cães, não sendo necessária a associação do corante azul tripano na coloração.^{19,32} O vermelho de alizarina, com sua capacidade de corar espaços intercelulares, permitiu a identificação e a contagem do número de lados das células do endotélio da córnea de cães.

Para a obtenção de dados reprodutíveis e confiáveis, o número de células a serem contadas não está estabelecido. Alguns autores recomendam que sejam contadas pelo menos 30 células, outros citam 50, 75 e 100 células por imagem.^{51-53,58} Binder et al. (1979)⁴⁴ sugeriram contar o máximo de células possíveis em três diferentes imagens do centro e da periferia realizando-se a média dessas imagens. Contudo, Abib et al. (2012)⁵⁹ afirmaram que cada processo de amostragem tem um erro intrínseco. Um grande número de células contadas gera um erro amostral pequeno. Teoricamente, se todas as células fossem contadas, o erro seria zero. Porém, a análise de toda a superfície endotelial não é possível. Assim, a análise qualitativa, com auxílio de *software*, propicia uma melhor aproximação da exatidão dos resultados, uma vez que possibilita o processamento de um grande número de células.⁵⁷ Na intenção de reduzir erros de amostragem e de análises, optou-se pela contagem manual de 100 células endoteliais de cada região estudada. Essa metodologia já foi empregada em estudos anteriores.^{59,60}

No que concerne aos estudos *in vitro* e *ex vivo*, em que a microscopia especular é empregada para a avaliação do endotélio da córnea de animais e humanos, vários fatores podem contribuir para os erros amostrais. A coleta de imagens sem definição dos bordos celulares leva à distorção da densidade endotelial, do coeficiente de variação e do percentual de células hexagonais.^{12,60} Os erros de detecção de contorno, mesmo que em poucas células dentro de uma amostra, geram resultados não confiáveis para uma análise qualitativa. Uma correção manual de bordas pode ser requerida gerando grande trabalho.⁵⁷ Além disso, áreas próximas ao limbo não poderão ser analisadas e em estudos de dano endotelial essas serão ignoradas.³¹ Entre estas considerações, podem ser incluídas a dificuldade na captura de imagens da córnea periférica, a incapacidade de obtenção de imagens em córneas edemaciadas, a necessidade de operador treinado e com experiência para fotografar e analisar as imagens e, por fim, o alto custo da aparelhagem.^{12,31,60} Em contrapartida, a coloração vermelho de alizarina, valendo-se da microscopia óptica, é um método que obtém imagens da morfologia do endotélio de qualquer região da córnea nas diferentes espécies, além do estudo de córneas opacas ou edemaciadas.^{19,32,34,38,42}

Com a coloração vermelho de alizarina e uso da microscopia óptica, foi possível analisar, documentar e estudar a forma das células do endotélio das diferentes regiões da córnea. No entanto, no que diz respeito à densidade endotelial, devido à retração tecidual, os dados não são fidedignos visto não ser possível a contagem das células. Geroski e Edelhauser (1989)⁴² sugeriram cuidado ao comparar os dados morfométricos *in vivo* e *in situ*, pois em seu estudo com córneas de coelhos e humanos comparando os resultados da microscopia especular e a coloração vital, ocorreu considerável retração na área celular (14%) do endotélio da córnea de coelhos corados com vermelho de alizarina, levando a uma densidade endotelial aumentada e a uma redução na variação do tamanho celular. A morfologia expressa pelo percentual de células hexagonais manteve-se inalterada.

A enucleação subconjuntival e a manutenção dos olhos em câmara úmida permitiram a realização dos exames, sem interferir na transparência das amostras de córnea, preservando sua estrutura endotelial. Esse método já foi utilizado em outros estudos e mostrou-se eficaz.^{8,34,61-63}

A utilização de olhos cadáveres em até seis horas após o óbito foi uma alternativa viável e permitiu a análise e a obtenção de imagens em todas as córneas.

Essa metodologia também já foi empregada com excelentes resultados em estudos anteriores.^{25,51,58,61,62} A técnica de *flat mounting* permitiu manter a córnea lisa e plana, evitando danos ao endotélio, embora algumas distorções sejam inevitáveis para o processamento e a análise celular.^{64,65} Deste modo, a técnica permitiu a coloração com corante vital e captura das imagens em todas as córneas examinadas. Por sua vez, foram realizadas as fotomicrografias e a visualização com nitidez das bordas celulares por meio da coloração do vermelho de alizarina e uso do microscópio óptico.

Os estudos envolvendo diferentes espécies de vertebrados revelaram um padrão uniforme e regular do mosaico endotelial, onde há predominância de células com forma hexagonal e presença em menor proporção de células com cinco e sete lados. Nos caninos adultos observaram-se, por meio da microscopia especular, células com seis lados (68%), cinco lados (17%), sete lados (11%), quatro lados (2%) e oito lados (2%), não havendo diferença entre a região central e periférica superior, entre os olhos direito e esquerdo²⁹. Entretanto, neste estudo, onde cinco regiões foram analisadas, observaram-se, por meio da coloração vermelho de alizarina, médias totais de 79,31 ±4,81% para células hexagonais, 12,64 ±3,25% para células com cinco lados e 8,21 ±2,64% para células com sete lados. Na análise de variância de fator duplo com medidas repetidas, não foi observada diferença entre as regiões da córnea avaliadas, para um nível de significância de 5%.

Em 1982, Gwin et al.⁵⁴ avaliaram por meio da microscopia especular de contato, as regiões central e periférica de córneas de cães saudáveis de diferentes raças e idades (quatro meses a 11 anos de idade). Nesse estudo, os autores reportaram que o endotélio é uma monocamada de células uniformes em forma e em tamanho. No entanto, não obtiveram informações sobre o percentual de células hexagonais. Rodrigues et al. (2006)⁴⁸, também concluíram que não houve diferença quanto ao pleomorfismo e polimegetismo entre as regiões central e periférica. No presente estudo foram analisadas de forma a contar e a comparar o número de lados das células endoteliais de quatro regiões da periferia (nasal, temporal, inferior e superior) e do centro da córnea hígida de cães. Não se observou diferença entre o pleomorfismo.

Na região central da córnea hígida de coelhos foram visualizadas, por meio da microscopia eletrônica de varredura, células hexagonais (75%), células pentagonais (14%) e heptagonais (11%).²⁵ Corroborando, Matsuda et al. (1985)⁶⁶ observaram, pela microscopia especular, hexagonalidade de 73%. Ainda, em felinos domésticos, os quais

apresentam limitada capacidade mitótica, encontrou-se hexagonalidade de $80 \pm 8,5\%$ utilizando a microscopia especular^{52,67}. Diferentemente, Franzen et al. (2010)⁶¹ relataram média de 66% em indivíduos adultos. Em chinchilas de dois a quatro meses de idade foi descrito pleomorfismo de 70,05%, com 48 meses de idade de 65,18% e com dez anos de idade, de 62,28%.¹⁸ Além desses mamíferos, os bovinos adultos apresentam $73,3 \pm 4,7\%$ de células com seis lados.⁶²

Os répteis também demonstram valores semelhantes aos mamíferos. Dessa maneira, identificou-se por meio da microscopia eletrônica de varredura presença de células de seis lados (78%), com células de quatro lados (2%), de cinco lados (13,2%), de sete lados (5,8%) e oito lados (1%)⁶⁸. Em peixes foi proposto que o endotélio tem padrão irregular com predominância de células hexagonais e pentagonais.⁶⁹

O endotélio das aves também foi estudado por meio da microscopia eletrônica de varredura, sendo similar aos dos mamíferos e répteis. Nesses estudos da região central da córnea, o avestruz apresentou células hexagonais (75%), pentagonais (14%) e heptagonais (11%)²⁶. Em pinguins, na região central e periférica, observaram-se uma média de 80% de células hexagonais, de 14,2% de pentagonais e de 5,8% de heptagonais.⁶³ Em 2012, Freitas⁵⁵, por meio da microscopia especular da região central da córnea de galinhas domésticas, descreveu dados semelhantes, demonstrando que aves com 30, 45 e 60 dias de idade não apresentam diferença na hexagonalidade (74,5%, 71,5% e 73,9%, respectivamente) e entre os olhos direito e esquerdo.

Em macacos, foi realizada a avaliação morfológica e morfométrica do endotélio da córnea central através da microscopia especular de contato. Os autores demonstraram que não houve diferença no pleomorfismo de macacos com idades de dois, três, quatro, cinco e sete anos e entre os olhos direito e esquerdo⁴⁷.

Tamayo-Arango et al. (2009)⁷⁰, avaliando o endotélio de suínos, estabeleceram por meio da microscopia eletrônica de varredura, que a maioria das células eram hexagonais ($61,7 \pm 8,5\%$ para a região central e $53,2 \pm 7,0\%$ para a região periférica), com presença de células pentagonais ($21,3 \pm 5,8\%$ e $28,9 \pm 5,1\%$ para o centro e periferia, respectivamente) e células heptagonais ($11,0 \pm 6,4\%$ para o centro e $18,1 \pm 4,8\%$ para a periferia). Ademais, demonstraram haver diferença estatística entre a córnea central e periférica para as células de seis e sete lados. Neste estudo em cães, usando corante vital, observaram-se médias para células hexagonais de $79,7 \pm 4,5\%$ para a região central e $79 \pm 4,9\%$ para a região periférica. Para células pentagonais ocorreu

um percentual de $12,6 \pm 3,4\%$ para o centro e $12,7 \pm 3,3\%$ na periferia, sendo que as células heptagonais apresentaram médias de $7,8 \pm 2,2\%$ para o centro e de $8,3 \pm 2,7\%$ para a periferia. Não foram constatadas diferenças estatísticas entre as regiões central e periférica.

Outro estudo de mesma metodologia proposta foi realizado com corante vermelho de alizarina, e se utilizou olhos de equinos adultos para analisar as diferentes regiões da córnea dessa espécie. Obteve-se média de células hexagonais na região superior da córnea de $57,78 \pm 3,14\%$, na região inferior foi de $58,62 \pm 6,413\%$, na região temporal foi de $56,14 \pm 6,749\%$, na região nasal foi de $56,88 \pm 6,296\%$ e na região central foi de $55,43 \pm 4,464\%$. O percentual de células com menos de seis lados foi de $22,72 \pm 3,04\%$ para a região central, $20,81 \pm 3,534\%$ para a região superior, $20,14 \pm 3,82\%$ para a região inferior, $21,66 \pm 4,04\%$ para a região temporal e $21,60 \pm 3,04\%$ para a região nasal. O percentual de células com mais de seis lados foi de $21,85 \pm 3,99\%$ para a região central, $21,31 \pm 3,81\%$ para a região superior, $21,24 \pm 4,08\%$ para a região inferior, $22,2 \pm 4,88\%$ para a região temporal e $21,52 \pm 4,71\%$ para a região nasal.⁴⁰ Ao se comparar espécies diferentes, os dados obtidos em equinos demonstraram que existe menor percentual de células com seis lados do que em cães, como demonstrado neste estudo. Além disso, em ambas as espécies não foram observadas diferenças entre as regiões analisadas.

Em indivíduos da espécie humana, o percentual de células hexagonais apresenta-se em torno de 70% .^{45,50} À microscopia especular, observou-se em humanos e em primatas hexagonalidade de $77 \pm 7\%$ e $76,6 \pm 6\%$, respectivamente⁶⁸. Comparativamente, o vermelho de alizarina foi utilizado como método de estudo em córneas humanas para se designar o percentual de células com seis lados na região periférica e central. Os resultados obtidos foram de $62 \pm 7\%$ para a região central e $55 \pm 10\%$ para a região periférica.⁴⁸ Constatou-se que não houve diferença estatística entre as regiões, como foi demonstrado neste estudo com córneas de cães.

Os dados são similares nas espécies com percentual de hexagonalidade de 65 a 80% de hexagonalidade entre um olho e o seu contralateral.^{25,45,67,68,71} Neste estudo o parâmetro sexo não foi considerado uma variável, pois em humanos, macacos, cães, suínos e chinchilas, as pesquisas até hoje não observaram diferenças nos parâmetros endoteliais entre machos e fêmeas.^{8,9,28,47,18,61,70}

O pleomorfismo e o polimegetismo das células endoteliais são indicadores da

reserva funcional. A manutenção da transparência e espessura da córnea é decorrente da presença de dois mecanismos que permitem estabelecer o estado relativo de deturgescência da córnea. Os mecanismos são a função de barreira e a bomba ativa de fluidos.^{4,8,9,71} Se a função endotelial é inadequada, a água difunde para o interior do estroma, desorganizando as fibras de colágeno, opacificando a córnea⁵ e aumentando a espessura corneal.^{4,72} Neste estudo, não foram observadas diferenças no pleomorfismo das diferentes regiões da córnea hídida de cães.

E diante das diversas injúrias ou procedimentos cirúrgicos intraoculares, os quais incluem os transplantes de córnea penetrante e posterior e as técnicas de facectomia extra e a intracapsular, ocorrem alterações no mosaico endotelial que variam com a espécie acometida.^{9,33,38,73,74} Nos caninos, o processo regenerativo ocorre por migração das células endoteliais da borda da lesão para recobrir a membrana de Descemet, bem como pela hipertrofia celular, assumindo assim, uma morfologia endotelial irregular. De acordo com estudo realizado em cães, no qual 90% do endotélio foi destruído, a reparação ocorre em seis semanas. Ao contrário em coelhos, onde ocorre concomitantemente significativa atividade mitótica, a reparação de 90% do endotélio pode ocorrer em dez dias.⁷⁵

Por fim, outros estudos por meio da microscopia especular já avaliaram, nas regiões superior, central e periférica da córnea, as alterações endoteliais após sua incisão em cirurgias de catarata. Demonstrou-se maior perda celular, alteração na área e nas formas celulares da região superior. Isso se deveu à localização da incisão, à maior manipulação do material cirúrgico, ao contato dos fragmentos lenticulares e ao implante de lentes nas cirurgias intra e extracapsulares.^{52,58,76,77,78}

Devido a isso, o estudo dos parâmetros de morfologia normal antes de se recorrer às cirurgias intraoculares é de extrema importância para melhor se definir o risco de descompensação endotelial.²⁹

CONCLUSÃO

Em todas as regiões estudadas não houve diferença com relação a forma das células do endotélio da córnea de cães. Desse modo, somente a análise da região central é suficiente para a estimativa da forma das células endoteliais das regiões periféricas da córnea de cães. Os valores obtidos com relação à morfologia da região central

representam todo o mosaico endotelial e podem ser extrapolados para as regiões periféricas.

REFERÊNCIAS

- 1.Svedbergh B, Bill A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmologica* 1972; 50(3): 321-236.
- 2.Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD *et al.* Origins of avian ocular and periocular tissues. *Experimental Eye Research* 1979; 29(1): 27-43.
- 3.Laing RA, Neubaumer L, Leibowitz HM *et al.* Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. *Archives of Ophthalmology* 1983; 101: 1712-1715.
- 4.Mishima, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *American Journal of Ophthalmology* 1982; 93(1): 1-29.
- 5.Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF *et al.* The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982; 89: 531-590.
- 6.Doughty MJ. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: A review of techniques and their application. *Optometry and Vision Science* 1989; 66: 626-642.
- 7.Landshman N, Solomon A, Belkin M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. *Archives of Ophthalmology* 1989; 107(12): 1804-1808.
- 8.Tuft S, Coster D. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4(3): 389-424.
- 9.Abib FC. *Microscopia especular de córnea: Manual e atlas*. Rio de Janeiro, Rio Med. Livros, 2000.
- 10.Pigatto JAT, Andrade MC, Laus JL *et al.* Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Veterinary Ophthalmology* 2004; 7(3): 205-208.
- 11.Pigatto JAT, Abib FC, Pereira GT *et al.* Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2006; 43(4): 476-480.
- 12.Abib FC, Holzchuch RMD, Schaefer A *et al.* The endothelial sample size in corneal

- specular microscopy clinical examinations. *Cornea* 2012; 31(5): 546-550.
13. Módis Jr L, Langenbucher A, Seitz B. Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. *Cornea* 2001; 20(7): 711-714.
 14. Canavagh HD, El-Algha MS, Petroll WM *et al.* Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea* 2000; 19(5): 712-722.
 15. Jalbert I, Stapleton F, Papas E *et al.* *In vivo* confocal microscopy of the human cornea. *British Journal of Ophthalmology* 2003; 87(2): 225-236.
 16. Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. *In vivo* confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Veterinary Ophthalmology* 2007; 10(4): 222-230.
 17. Ledbetter EC, Scarlett JM. *In vivo* confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Veterinary Ophthalmology* 2009; 12(1): 57-64.
 18. Bercht BS, Albuquerque L, Araújo ACP *et al.* Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchilas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. *Veterinary Ophthalmology* 2015; 18(1): 137-142.
 19. Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: Importance of pH for the dye – lake reaction. *British Journal of Ophthalmology* 1981; 65(12): 815-819.
 20. Means TL, Geroski DH, Hadley A *et al.* Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Archives of Ophthalmology* 1995; 113: 805-809.
 21. Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry* 1998; 81: 245-254.
 22. Mannis MJ, Sweet EH, Lewis RA. The fluorouracil on the corneal endothelium. *Archives of Ophthalmology* 1998; 106(6): 816-823.
 23. Werner LP, Legeais JM, Obsler C *et al.* Toxicity of xylocaine to rabbit corneal endothelium. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 1998; 24: 1371-1376.
 24. Yanni, S. Chuckpaiwong V, Holley G *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in the rat and mouse. *Science Net*, 2003.
 25. Pigatto JAT, Abib FC, Pizzeti JC *et al.* Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005a; 33: 41-45.
 26. Pigatto JAT, Franzen A, Pereira FQ *et al.* Scanning electron microscopy of the

- corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural* 2009; 39(3): 926-929.
- 27.Schellini SA, Creppe MC, Gregório EA *et al.* Lidocaine effects on corneal endothelial cells ultrastructure. *Veterinary Ophthalmology* 2007; 10: 239-244.
- 28.Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM *et al.* The use of vital dyes in ocular surgery. *Survey of Ophthalmology*, 2009; 54(5): 576-617.
- 29.Pigatto JAT, Cerva C, Freire C *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2008; 28: 427-430.
- 30.Sperling S. Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypan blue. *Acta Ophthalmologica* 1997; 55: 573-580.
- 31.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: 818–824.
- 32.Spence DJ, Peyman A. A new technique for the vital staining of the corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology* 1976; 15(12): 1000-1002.
- 33.Melles GR, Egink FA, Lander F *et al.* A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 1998; 17: 618-626.
- 34.Andrew SE, Samuelson DA, Lewis PA *et al.* Comparison of Optisol-GS and neomycin polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. *Veterinary Ophthalmology* 1999; 2: 155–161.
- 35.Wiffen SJ, Hodge DO, Bourne WM. The effect of contact lens wear on the central and peripheral corneal endothelium. *Cornea* 2000; 19: 47–51.
- 36.Amann J, Holley GP, Lee SBM *et al.* Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *American Journal of Ophthalmology* 2003; 135(5): 584-90.
- 37.Liou SW, Chiu MD, Wang IJ. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 2004; 30: 1351-1356.
- 38.Wasilewski D, Siqueira AL, Rife L *et al.* Técnica de separação da membrana de Descemet para transplante de células endoteliais da córnea: Estudo experimental em coelhos. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2010; 73: 22-27.

39. Ben-Eliahu S, Tal K, Mielten A *et al.* Protective effect of different ophthalmic viscosurgical devices on corneal endothelium during severe phacoemulsification model in rabbits. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging* 2011; 42(2): 152-156.
40. Faganello C. *Morfologia celular endotelial de diferentes regiões da córnea de equinos (Equus caballus) com a coloração vermelho de alizarina.* 2014. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.
41. Bruinsma M, Lie JT, Groeneveld-van B *et al.* Are polymegathism, pleomorphism, and “poor swelling” valid discard parameters in immediate postmortem evaluation of human donor corneal endothelium? *Cornea* 2013; 32(3): 285-289.
42. Geroski DH, Edelhauser HF. Morphometric analysis of the corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1989; 30(2): 254-259.
43. Zhu Z, Rife F, Yiu S *et al.* Technique for preparation of the corneal endothelium-descemet membrane complex for transplantation. *Cornea* 2006; 25(6): 705-708.
44. Binder P, Akers P, Zavala E. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmology* 1979; 86(10): 1831-1847.
45. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO *et al.* Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Current Eye Research* 1985; 4: 671-678.
46. Sailstad DM, Peiffer RL. Specular microscopic observation of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Laboratory Animals* 1981; 15: 393-395.
47. Moritá H, Shimomura K, Sakura Y. Specular microscopy of corneal endothelial cells in Cynomolgus monkeys. *Journal Veterinary of Medical Science* 1994; 56(4): 763-764.
48. Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9(2): 101-107.
49. Doughty M J, Dilts MD. Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer-application to corneal endothelium. *Tissue and Cell* 1994; 26: 621-636.
50. Schultz RO, Glasser BD, Matsuda M *et al.* Response of the corneal endothelium to cataract surgery. *Archives of Ophthalmology* 1986; 104: 1164-1169.
51. Mencucci R, Ambrosini S, Ponchietti C *et al.* Ultrasound thermal damage to rabbit corneas after stimulated phacoemulsification. *Journal of Cataract and Refractive*

Surgery 2005; 31: 2180-2186.

52. Bourne WM, Nelson LR, Buller CR *et al.* Long-term observation on morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1994; 35: 891-899.

53. Valle D, Benítez JM, Castillo A *et al.* Endothelial damage with cataract surgery techniques. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 1998; 24: 951-955.

54. Gwin R, Lerner I, Warren J *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1982; 22(2): 267-271.

55. Freitas LVRP. *Avaliação do endotélio da córnea de galinhas (Gallus gallus domesticus) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular*. 2012. 56 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

56. Park S, Fong AG, Zhang C *et al.* Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea* 2012; 31(12): 1476-1479.

57. Ruggeri A, Scarpa F, De Luca M *et al.* A system for the automatic estimation of morphometric parameters of corneal endothelium in alizarine red-stained images. *British Journal of Ophthalmology* 2010; 94: 643-647.

58. Suzuki HE, Takahashi K, Shiwa T *et al.* Functional evaluation of corneal endothelium by mensurement of corneal volume alteration and cell density after phacoemulsification. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2007; 33: 2077-2082.

59. Aaberg TM. Correlation between corneal endothelial morphology and function. *American Journal of Ophthalmology* 1984; 98(4): 510-512.

60. Mccarey BE, Edelhauser HF, Lynn M. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive produces, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea* 2008; 27: 1-16.

61. Franzen A, Pigatto JAT, Abid F *et al.* Use of microscope specular to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cats. *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13(4): 222-226.

62. Doughty MJ, Bergmanson JP, 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: 533-547.

63. Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM *et al.* Corneal endothelium of the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *Journal of Zoo and Wild Life Medicine* 2005; 36(4): 702-705.
64. O'day DM, Daniel G, Sherrard ES. Preparation of full-thickness flat mounts of rabbit cornea. *British Journal of Ophthalmology* 1973; 57:650-653.
65. Claesson M, Elder MJ, Larkin DF. A method for separation and staining of flat mounts of human corneal endothelium. *Acta Ophthalmologica Scandinava* 1997; 75(2): 131-133.
66. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF *et al.* Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1985; 26:443-449.
67. Huang PT, Nelson LR, Bourne WM. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1989; 30(8): 1794-1801.
68. Jackson AJ, Gardiner T, Archer DB. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. *Ophthalmic and Physiological Optics* 1995; 15(4): 305-310.
69. Collin SP, Collin HB. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. *Cornea* 2000; 19: 218-230.
70. Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artori SM, Laus JL *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural* 2009; 39(1): 117-122.
71. Yee RW, Geroski DH, Matsuda M *et al.* Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function and morphology in wound repair. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1985; 46: 1191-1201.
72. Rao G, Lohman LE, Aquavella A *et al.* Cell size-shape relationships in corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1982; 22(2): 271-274.
73. Pigatto JAT. *Extração extracapsular do cristalino, comparativamente à facoemulsificação, com enfoque nas repercussões endoteliais corneanas em cães (Canis familiaris - Linnaeus, 1758)*. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004
74. McDonnell PJ, Taban M, Sarayba M *et al.* Dynamic Morphology of Clear Corneal

Cataract Incisions. *Ophthalmology* 2003; 110: 2342-2348.

75.Befanis PJ, Peiffer R.L, Brown D. Endothelial repair of the canine cornea. *American Journal Veterinary Research* 1981; 42: 590-595.

76.Ravalico G, Botteri E, Baccara F. Long-term endothelial changes after implatation of anterior chamber intraocular lenses in cataract surgery. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2003; 29: 1918-1923.

77.Rao B, Zhang J, Taban M *et al.* Imaging and investigating the effects of incision angle of clear corneal cataract surgery with optical coherence tomography. *Optometry Express* 2003; 11: 3254-3261.

78.Glasser DB, Matsuda M, Gager WE *et al.* Corneal endothelial morphology after anterior chamber lens implantation. *Archives of Ophthalmology* 1985; 103: 1347-1349.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coloração vermelho de alizarina associada à microscopia óptica permitiu documentar e analisar a forma das células do endotélio nas diferentes regiões da córnea de cães.

Os estudos da região central podem refletir com exatidão as regiões periféricas de córneas híidas de cães com relação à avaliação qualitativa expressa pelo pleomorfismo.

Com a metodologia utilizada será possível estabelecer os parâmetros morfológicos de diferentes espécies. Ademais, a mesma poderá ser empregada em estudos relacionados à toxicidade de fármacos e a procedimentos cirúrgicos intraoculares.

REFERÊNCIAS

- AABERG, T. M. Correlation between corneal endothelial morphology and function. **American Journal of Ophthalmology**, v. 98, n. 4, p. 510-512, 1984.
- ABIB, F. C. In: **Microscopia especular de córnea: Manual e atlas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000. p.140.
- ABIB, F. C.; BARRETO, J. R. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 27, p. 1574-78, 2001.
- ABIB, F. C. et al. The endothelial sample size in corneal specular microscopy clinical examinations. **Cornea**, v. 31, n. 5, p. 546-550, 2012.
- ALMEIDA, A. C. R. V. **Avaliação clínica e pela microscopia eletrônica de varredura do adesivo de fibrina, comparativamente ao fio de sutura na oclusão da incisão de córnea: estudo experimental**. 2009. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- ALP, B. N. et al. The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. **Cornea**, v. 19, n. 4, p. 546-550, 2000.
- AMANN, J. et al. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. **American Journal of Ophthalmology**, v. 135, n. 5, 2003.
- ANDREW, S. E. et al. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 479-482, 2001.
- ANDREW, S. E.; SAMUELSON, D. A.; LEWIS, P. A. et al. Comparison of Optisol-GS and neomycin polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 155-161, 1999.
- ARNDT, C.; REESE, S.; KOSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 3, p. 175-182, 2001.
- BAHN, C. F. et al. Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 27, p. 44-51, 1986.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.
- BAROODY, R. A. et al. Ocular development and aging. Corneal endothelial changes in cats and in free-racing and caged rhesus. **Experimental Eye Research**, v. 45, n. 4, p. 607-622, 1987.

- BEFANIS, P. J.; PEIFFER, R. L.; BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 4, p. 590-595, 1981.
- BEN-ELIAHU, S.; TAL K.; MILSTEIN A. et al. Protective effect of different ophthalmic viscosurgical devices on corneal endothelium during severe phacoemulsification model in rabbits. **Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging**, v. 42, n. 2, p. 152-156, 2011.
- BERCHT, B. S.; ALBUQUERQUE L.; ARAUJO A. C. et al. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 1, p. 137-142, 2015.
- BINDER, P. S.; AKERS, P.; ZAVALA, E. Y. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. **Ophthalmology**, v. 86, n. 10, p. 1831-1847, 1979.
- BISTNER, S. I.; AGUIRRE, G.; BATIR, G. **Atlas of Veterinary Ophthalmic Surgery**. Toronto: Saunders Company, 1977.
- BOTEON, J. E. Histologia do Endotélio Corneano. In: ABIB, F. C. **Microscopia Especular de Córnea: Manual e Atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000. cap.1, p. 3-5.
- BOURNE, W. H.; KAUFMAN, H. E. Endothelial damage associated with intraocular lens. **American Journal of Ophthalmology**, v. 81, p. 482-485, 1976.
- BOURNE, W. M. et al. Long-term observation on morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 35, n. 3, p. 891-899, 1994.
- BOURNE, W.; NELSON, B. A.; HODGE, M. S. Continued endothelial cell loss ten years after lens implantation. **Ophthalmology**, v. 101, n. 6, p. 1014-1023, 1994.
- BOURNE et al. Effect of cataract surgery on the corneal endothelium. Modern phacoemulsification compared with extracapsular cataract surgery. **Ophthalmology**, v. 11, n. 4, p. 679-685, 2004.
- BROOKS, A. M. V. Progressive corneal endothelial cell changes in anterior segment disease. **Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology**, v. 15, p. 71-78, 1987.
- BRUINSMA, M. et al. Are polymegethism, pleomorphism, and “poor swelling” valid discard parameters in immediate postmortem evaluation of human donor corneal endothelium? **Cornea**, v. 32, n. 3, p. 285-289, 2013.
- CANAVAGH, H. D. et al. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. **Cornea**, v. 19, n. 5, p. 712-722, 2000.

- CHENG, H. et al. Precision of cell density estimates and endothelial cell loss with age. **Archives of Ophthalmology**, v. 103, p. 1478-1482, 1985.
- CHIURCIU, J. L.V. et al. Uso de viscoelásticos na facoemulsificação em cães portadores de catarata: efeitos sobre a pressão intraocular, a morfologia das células endoteliais e a espessura corneana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 570-577, 2010.
- CHO, Y. K.; CHANG, H. S.; KIM, M. S. Risk Factors for endothelial cell loss after phacoemulsification: comparison in different anterior chamber depth groups. **Korean Journal of Ophthalmology**, v. 24, n. 1, p. 10-15, 2010.
- CLAESSON, M.; ELDER, M. J.; LARKIN, D. F. A method for separation and staining of flat mounts of human corneal endothelium. **Acta Ophthalmologica Scandinava**, v. 75, n. 2, p. 131-133, 1997.
- COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. **Cornea**, v. 19, n. 2, p. 218-230, 2000.
- COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v.81, n. 6, p. 245-254, 1998.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2007, 60 p.
- DOUGHTY, M. J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: A review of techniques and their application. **Optometry and Vision Science**, v. 66, n. 9, p. 626-642, 1989.
- DOUGHTY, M. J. Correction cell density measurements for tissue hydration changes in scanning electron microscopy - application to the rabbit corneal endothelium. **Tissue and Cell**, v. 27, n. 2, p. 207-220, 1995.
- DOUGHTY, M. J. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium *ex vivo*. **Tissue and Cell**, v. 30, p. 634-643, 1998.
- DOUGHTY, M. J. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy - a comparison of two different methods of corneal fixation. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 127-135, 2006.
- 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 and Cell**, v. 29, n. 5, p. 533-547, 1997.
- DOUGHTY, M. J.; DILTS, M. D. Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer - application to corneal endothelium. **Tissue and Cell**, v. 26, p.

621-636, 1994.

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

EDELHAUSER, H. F. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. **Cornea**, v. 19, n. 3, p. 263-273, 2000.

FADEL, P. Técnicas cirúrgicas - Incisões In: FREITAS, L.L. **Cristalino e Catarata: Diagnóstico e Tratamento**. 1.ed. São Paulo: Santos, 2004. cap. 9, p. 85-88.

FAGANELLO, C. **Morfologia celular endotelial de diferentes regiões da córnea de equinos (*Equus caballus*) com a coloração vermelha de alizarina**. 2014. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

FRANZEN, A. et al. Use of microscope specular to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n.4 , p. 222-226, 2010.

FREITAS, L.V. R. P. **Avaliação do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular**. 2012. 56 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

GALLAGHER, B. C. Primary cilia of the corneal endothelium. **The American Journal of Anatomy**, v. 159, n. 4, p. 475-484, 1980.

GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Morphometric analysis of the corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 30, n. 2, p. 254-259, 1989.

GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.1, 1134p.

GILGER, B. et al. Canine corneal thickness Measured by ultrasonic pachymetry. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1570-72, 1991.

GILGER, B. C. Phacoemulsification. Technology and fundamentals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, n. 5, p. 1131-1134, 1997.

GLASSER, D. B. et al. Corneal endothelial morphology after anterior chamber lens implantation. **Archives of Ophthalmology**, v. 103, p. 1347-1349, 1985.

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**, v. 22, n. 2, p. 267-271, 1982.

HIRSCH, M. et al. Formation of intercellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v. 23, n. 4, p. 385-397, 1976.

HOFFER, K. J. Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. **American Journal of Ophthalmology**, v. 87, n. 2, p. 252-253, 1979.

HOFFMANN, A. et al. Light electron microscopic evaluation of canine corneal endothelium following CO₂ photokeratotomy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12 (Supl 1), p. 28-34, 2009.

HOLLEY, G. P. et al. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability: an *in vitro* study. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 28, n. 6, p.1027-1033, 2002.

HUANG, P. T.; NELSON, L. R.; BOURNE, W. M. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 30, n. 8, p. 1794-1801, 1989.

ICHIJIMA, H. et al. *In vivo* confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit cornea. **Cornea**, v. 12, n. 5, p. 369-378, 1993.

IGNÁCIO, T. S. et al. A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 2, p. 325-330, 2005.

INABA, M. et al. Regional specular microscopy of endothelial cell loss after intracapsular cataract extraction: a preliminary report. **Acta Ophthalmologica**, v. 63, p. 232-235, 1985.

INOMATA, H.; SMELSER, G. K. Fine structural alterations of corneal endothelium during experimental uveitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 9, n. 4, p. 272-285, 1969.

JACKSON, A. J.; GARDINER, T.; ARCHER, D. B. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 15, n. 4, p. 305-310, 1995.

JALBERT, I. et al. *In vivo* confocal microscopy of the human cornea. **British Journal of Ophthalmology**, v. 87, n. 2, p. 225-236, 2003.

JOHNSTON, M. C. et al. Origins of avian ocular and periocular tissues. **Experimental Eye Research**, v. 29, n.1, p. 27-43, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

JURKUNAS, U.; COLBY, K. Evaluation of the Corneal Endothelium. **Techniques in Ophthalmology**, v. 3, p. 19-26, 2005.

- KAFARNIK, C., FRITSCHKE, J.; REESE, S. *In vivo* confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 222-230, 2007.
- KLAIS, M. C. M.; BÜHREN, J.; KOHNEN, T. Comparison of endothelial cell count using confocal and contact specular microscopy. **Archives of Ophthalmology**, v. 97, p. 1714-1719, 1979.
- LAING, R. A. et al. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. **Archives of Ophthalmology**, v. 101, n. 11, p. 1712-1715, 1983.
- LANDSHMAN, N. et al. Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 29, p. 1100-1109, 1988.
- LANDSHMAN, N.; SOLOMON A.; BELKIN M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. **Archives of Ophthalmology**, v. 107, n. 12, p. 1804-1808, 1989.
- LAULE, A. et al. Endothelial cell population changes of human cornea during life. **Archives of Ophthalmology**, v. 96, n. 11, p. 2031-2035, 1978.
- LEDBETTER, E. C.; SCARLETT, J. M. *In vivo* confocal microscopy of the normal equine cornea e limbus. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 1, p. 57-64, 2009.
- LEDBETTER, E. C.; IRBY, N. L.; SCHAEFER, D. M. *In vivo* confocal microscopy of corneal microscopic foreign bodies in horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2014.
- LICHTINGER, M. D. et al. Corneal endothelial safety after ultraviolet light treatment of the light-adjustable intraocular lens. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 37, p. 324-327, 2011.
- LIU, S. W.; CHIU, M. D.; WANG, I. J. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 30, p. 1351-1356, 2004.
- MacCALLUM, D. K. et al. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 24, p. 247-250, 1983.
- MANNIS, M. J.; SWEET, E. H.; LEWIS, R. A. The fluorouracil on the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v. 106, n. 6, p. 816-823, 1998.
- MATSUDA, M. et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 26, n. 4, p. 443-449, 1985.

- McCAREY, B. E.; EDELHAUSER, H. F.; LYNN, M. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive produces, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. **Cornea**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2008.
- McDONNELL, P. J. et al. Dynamic morphology of clear corneal cataract incisions. **Ophthalmology**, v. 110, p. 2342-2348, 2003.
- MEANS, T. L. et al. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. **Archives of Ophthalmology**, v.113, p. 805-809, 1995.
- MELLES, G. R. et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. **Cornea**, v. 17, p. 618-626, 1998.
- MENCUCCI, R. et al. Ultrasound thermal damage to rabbit corneas after stimulated phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 31, p. 2180-2186, 2005.
- MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. **American Journal of Ophthalmology**, v. 93, n. 1, p. 1-29, 1982.
- MÓDIS, L. J. R.; LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and noncontact specular microscopy. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 28, n. 10, p. 1763-1769, 2002.
- MONTANARI, T. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas**. 2.d. Porto Alegre: Ed. do autor, 2013. Acesso em: 20 de jan de 2015. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto/>
- MORITÁ H.; SHIMOMURA, K.; SAKURA, Y. Specular microscopy of corneal endothelial cells in Cynomologus monkeys. **Journal Veterinary of Medicine Science**, v. 56, n. 4, p. 763-764, 1994.
- NAGATSUYU, C. et al. Non contact specular microscopy in aphakic and pseudoaphakic dogs. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 682-687, 2014.
- NASSARALLA, B. A. Fisiologia do endotélio corneano. In: ABIB, F. C. **Microscopia Especular de Córnea: Manual e Atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000. cap. 2, p. 7-17.
- O'DAY, D. M.; DANIEL; G.; SHERRARD, E. S. Preparation of full-thickness flat mounts of rabbit cornea. **British Journal of Ophthalmology**, v. 57, p. 650-653, 1973.
- OJEDA, J. L. et al. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM. **Journal of Anatomy**, v. 199, n. 5, p. 567-576, 2001.
- OLSEN, E. G.; DAVANGER, M. The healing of rabbit corneal endothelium. **Acta Ophthalmologica. (Copenh)**, v. 62, n. 5, p. 796-807, 1984.

- PARK, S. et al. Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. **Cornea**, v. 31, n. 12, p. 1476-1479, 2012.
- PEIFFER, R. L.; DE VANZO, R. J.; COHEN, K. L. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 5, p. 854-855, 1981.
- PIGATTO, J.A.T. **Extração extracapsular do cristalino, comparativamente à facoemulsificação, com enfoque nas repercussões endoteliais corneanas em cães (*Canis familiaris* - Linnaeus, 1758)**. 2004. 112 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 3, p. 205-208, 2004.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 41-45, 2005a.
- PIGATTO, J. A. T. et al. Corneal endothelium of the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. **Journal of Zoo and Wild Life Medicine**, v. 36, n. 4, p. 702-705, 2005b.
- PIGATTO, J. A.T. et al. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 476-480, 2006.
- PIGATTO, J. A. T. et al. Avanços e benefícios da facoemulsificação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Supl 2), p. 248-249, 2007.
- PIGATTO, J. A. T. et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 427-430, 2008.
- PIGATTO, J. A. T. et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 926-929, 2009.
- PRASAD, S. Phacoemulsification learning curve: Experience of two junior trainee ophthalmologists. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 24, p. 73-77, 1998.
- PRINCE, J. H. Cornea Trabecular Region, and Sclera. In: PRINCE, J.H. **The Rabbit in Eye Research**. Illinois USA: Publisher, 1964. p. 86-139.
- PRIYA, T. M.; SARADA, D.; NIHAL, T. Endothelial cell loss and central corneal thickness in patients with and without Diabetes after manual small incision cataract surgery. **Cornea**, v. 00, n. 0, p.1-5, 2010.

RAO, B. et al. Imaging and investigating the effects of incision angle of clear corneal cataract surgery with optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 11, n. 24, p. 3254-3261, 2003.

RAO, G. et al. Cell size-shape relationships in corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 22, n. 2, p. 271-274, 1982.

RAVALICO, G.; BOTTERI, E.; BACCARA, F. Long-term endothelial changes after implantation of anterior chamber intraocular lenses in cataract surgery. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 29, p. 1918-1923, 2003.

REHANY, U. et al. Ultrastructural changes in corneas of diabetic patients. An electron-microscopy study. **Cornea**, v. 19, n. 4, p. 534-538, 2000.

REICHARD, M. et al. Comparative *in vivo* confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. **Current Eye Research**, v. 35, n. 12, p. 1072-1080, 2010.

RICHARD, J. et al. Corneal endothelial cell loss after cataract extraction by using ultrasound phacoemulsification versus a fluid-based system. **Cornea**, v. 27, n. 1, p. 17-21, 2008.

RODRIGUES, E. B. et al. The use of vital dyes in ocular surgery. **Survey of Ophthalmology**, v. 54, n. 5, p. 576-617, 2009.

RODRIGUES, G. N. et al. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2006.

RUGGERI, A. et al. A system for the automatic estimation of morphometric parameters of corneal endothelium in alizarine red-stained images. **British Journal of Ophthalmology**, v. 94, p. 643-647, 2010.

RUIZ, J. M.; MEDRANO, M.; ALIÓ, J. L. An improved method of vital staining of the corneal endothelium. **Ophthalmic Research**, v. 23, p. 23-27, 1991.

SAAD, H. A. et al. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and adobe photoshop software. **Cornea**, v. 27, p. 818-824, 2008.

SAILSTAD, D. M.; PEIFFER, R. L. Specular microscopic observation of the corneal endothelium in the normal rabbit. **Laboratory Animals**, v. 15, p. 393-395, 1981.

SANCTIS, U. et al. Corneal endothelial evaluation with 2 noncontact specular microscopes and their semiautomated methods of analysis. **Cornea**, v. 25, n. 5, p. 501-506, 2006.

SANTOS JÚNIOR, A. F. **Potencialidades do vermelho de alizarina S impregnado em resinas para separação e pré-concentração de Cu, Zn e Mn em matrizes salinas**. 2001. 92 p. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Química da

Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 2001.

SCHULTZ, R. O. et al. Response of the corneal endothelium to caratact surgery. **Archives of Ophthalmology**, v. 104, p. 1164-1169, 1986.

SCHELLINI, S. A. et al. Lidocaine effects on corneal endothelial cells ultrastructure. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 239-244, 2007.

SCHUTTEN, W. H.; Van HORN, D. L. Corneal endothelial cell shrinkage after critical point drying. **Annals of Ophthalmology**, v.12, n.10, p.1165-1167, 1980.

SEYHMUS, A. et al. Effects of trypan blue on corneal endothelium and anterior lens capsule in albino Wistar rats: an investigator-masked, controlled, two-period, experimental study. **Current Therapeutic Research**, v. 6, p. 366-377, 2006.

SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p. 283-338.

SPENCE, D.J.; PEYMAN, A. A new technique for the vital staining of the corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology**, v. 15, n. 12, p. 1000-1002, 1976.

SPERLING, S. Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypan blue. **Acta Ophthalmologica**, v. 55, p. 573-580, 1977.

STAATZ, W. D.; VAN HORN, D. L. The effects of aging and inflammation on corneal endothelial wound healing in rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 19, n. 8, p. 983-986, 1980.

STAPLETON, S.; PEIFFER R. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. **American of Journal Veterinary Research**, v. 40, p. 1803-1804, 1979.

STUMPF, S.; NOSÉ, W. Estudo do endotélio corneano em cirurgias de cataratas duras: extração extracapsular planejada da catarata e facoemulsificação. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 4, p. 491-496, 2006.

SUZUKI, H. et al. Functional evaluation of corneal endothelium by mensurement of corneal volume alteration and cell density after phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 33, p. 2077-2082, 2007.

SVEDBERGH, B.; BILL, A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica. (Copenh)**, v. 50, n. 3, p. 321-336, 1972.

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

TAYLOR, M. J.; HUNT, C. J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue

and alizarin red S: Importance of pH for the dye – lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v. 65, n. 12, p. 815-819, 1981.

TREFFERS, W. F. Human corneal endothelial wound repair. *In vitro* and *in vivo*. **Ophthalmology**, v. 6, n. 89, p. 605-615, 1982.

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

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

Van HORN, D. L. et al. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 16, n. 7, p. 597-613, 1977.

VICTOR, G.; ALVES, M. R.; NOSÉ, W. Microscopia confocal *in vivo* no diagnóstico de ceratite fúngica: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 69, n. 3, 2006.

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

Von SALLMANN, L.; CARACAGGIO, L. L.; GRIMES, P. **American Journal of Ophthalmology**, n. 1, p. 955, 1961.

WAISWOL, M. Técnicas cirúrgicas – Incisões. In: FREITAS, L. L. **Cristalino e Catarata: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Santos, 2004. cap. 9, p. 83-85.

WALKOW, T.; ANDERS, N.; KLEBE, S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: Relation to preoperative and intraoperative parameters. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 26, p. 727-732, 2000.

WARING, G. O. et al. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. **Ophthalmology**, v. 89, p. 531-590, 1982.

WASILEWSKI, D. et al. Técnica de separação da membrana de Descemet para transplante de células endoteliais da córnea: Estudo experimental em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 1, p. 22-27, 2010.

WEIMAR, V.; SQUIRES, E. L.; KNOX, J. L. Acceleration of healing of rabbit endothelium by mesodermal growth factor. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 19, n. 4, p. 350-361, 1980.

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

WIFFEN, S. J.; HODGE, D. O.; BOURNE, W. M. The effect of contact lens wear on the central and peripheral corneal endothelium. **Cornea**, v.19, p. 47-51, 2000.

YANNI, S. et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in the rat ad mouse. **Science Net**, 2003. Disponível em:
<http://www.cse.emory.edu/sciencenet/undergrad/SURE/Posters/2003_yanni.html.
>Acessoem: 22 jan. 2015.

YEE, R. W. et al. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function and morphology in wound repair. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 9, p. 1191-1201, 1985a.

YEE, R. W. et al. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. **Current Eye Research**, v. 4, n. 6, p. 671-678, 1985b.

ZHU, Z. et al. Technique for preparation of the corneal endothelium-descemet membrane complex for transplation. **Cornea**, v.25, n. 6, p. 705-708, 2006.