

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE BOVINOS (*Bos taurus*)
UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR DE CONTATO - ESTUDO *EX VIVO***

MARIANE GALLICCHIO AZEVEDO

PORTO ALEGRE

2023

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE BOVINOS (*Bos taurus*) UTILIZANDO
A MICROSCOPIA ESPECULAR DE CONTATO - ESTUDO *EX VIVO***

Autor: Mariane Gallicchio Azevedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

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

**PORTO ALEGRE
2023**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Azevedo, Mariane Gallicchio
AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE BOVINOS (*Bos taurus*) UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR DE CONTATO - ESTUDO EX VIVO / Mariane Gallicchio Azevedo. -- 2023.
55 f.
Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Endotélio Corneano. 2. Morfologia Endotelial .
3. Bovinos. I. Tadeu Pigatto, João Antonio, orient.
II. Título.

Mariane Gallicchio Azevedo

AValiação DO ENDOTÉLIO DA CórNEA DE BOVINOS (*Bos taurus*) UTILIZANDO A
MICROSCOPIA ESPECULAR DE CONTATO - ESTUDO *EX VIVO*

Aprovada em 16 de março de 2023.

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck
Membro da Comissão

Prof. Dr. André Silva Carissimi
Membro da Comissão

Dr^a. Marcele de Souza Muccilo
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir usufruir de todas as oportunidades com saúde. Aos meus pais Carmela e Otávio agradeço pelo apoio e amor incondicional durante todas as etapas da minha vida. Ao meu namorado Bruno pelo suporte durante esta etapa. A minha irmã Camila e aos meus afilhados. Gratidão eterna à minha família, sem vocês nada disso seria possível.

Às pessoas queridas que partiram, Vó Maria, Tia Nica e Elóra me sinto abençoada por ter compartilhado a vida com vocês, carregarei vocês sempre no meu coração. Tenho certeza que estariam orgulhosas dessa conquista, ela também é para vocês.

Professor Pigatto, serei eternamente grata pela confiança e pela oportunidade de participar de um setor de excelência que é o Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFRGS. Obrigado pela dedicação ao trabalho com tanta verdade e entusiasmo, és minha inspiração. Agradeço a tua orientação que supera o âmbito acadêmico, levarei teus ensinamentos sempre em meu coração e eles guiarão minha jornada profissional. Obrigado por acreditar em mim.

À minha amiga e companheira de profissão Alessandra, obrigada pela nossa parceria e sintonia, trilhar esse caminho contigo foi incrível, vou levar nossa amizade para a vida.

À Natália, presente que o SOV-UFRGS me deu, obrigada por cruzar o meu caminho e por estar ao meu lado demonstrando suporte e cumplicidade, tu é especial para mim, conta sempre comigo.

À Maiara obrigada pela amizade e por me mostrar o lado positivo das coisas e por sempre estar disposta a ajudar ao próximo, tua empatia me encanta.

Agradeço à toda equipe do Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, pós-graduandas, estagiários e anestesistas pela troca de experiências, auxílio e companheirismo na rotina de atendimentos. Vocês tornaram os dias de atendimentos e cirurgias mais felizes!

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Veterinária, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e ao Hospital de Clínicas Veterinárias pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À CAPES pela concessão de recurso para pesquisa. Ao Frigorífico Angus agradeço a receptividade da equipe e gentileza pela doação do material utilizado neste estudo.

Aos animais, meus pacientes amados, agradeço por serem luz na vida das pessoas e no

mundo, por amor a vocês que iniciei meu caminho na Medicina Veterinária e é por vocês que buscarei sempre meu aperfeiçoamento e conhecimento.

Agradeço de coração a todos amigos e colegas de profissão que contribuíram ao meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Objetivo: O endotélio constitui a camada posterior da córnea, é formado por uma camada única de células poligonais em um padrão mosaico organizado, sendo essa estrutura fundamental para manter a córnea transparente. Devido às variações nos parâmetros endoteliais da córnea entre as diferentes espécies o conhecimento dos parâmetros normais de cada espécie é fundamental. Objetivou-se avaliar o endotélio da córnea de bovinos utilizando o microscópio especular de contato. **Procedimentos:** Foram avaliados 20 bulbos oculares de 10 bovinos (*Bos taurus*), machos, com a idade de 24 meses da raça brangus. A microscopia especular de contato foi realizada na área central da córnea. **Resultados:** A densidade celular média na área central foi de 1277,0 células/mm² e a porcentagem de células hexagonais foi de 74,3 %. Não foram observadas diferenças na densidade celular endotelial e na hexagonalidade entre os olhos esquerdo e direito. **Conclusão:** Com a microscopia especular de contato foi possível analisar e mensurar os parâmetros endoteliais da córnea de bovinos. Os dados obtidos servirão de referência para análise do endotélio da córnea de bovinos.

Palavras-chave: Endotélio corneano. Morfologia. Bovinos.

ABSTRACT

Objective: *The corneal endothelium is the posterior layer of the cornea, consisting of a single layer of polygonal cells in an organized mosaic pattern, which is essential for maintaining corneal transparency. Due to variations in corneal endothelial parameters among different species, knowledge of the normal parameters of each species is crucial. The objective of this study was to evaluate the corneal endothelium of bovines using a contact specular microscope.* **Procedures:** *Twenty eyeballs from 10 male Brangus bovines (*Bos taurus*), aged 24 months, were evaluated. Contact specular microscopy was performed on the central area of the cornea.* **Results:** *The mean cell density in the central area was 1277,0 cells/mm² and the percentage of hexagonal cells was 74.3%. No differences in endothelial cell density and hexagonality were observed between the left and right eyes.* **Conclusion:** *Contact specular allowed for the analysis and measurement of corneal endothelial parameters in bovines. The obtained data will serve as a reference for the analysis of corneal endothelium in bovines.*

Key words: *Corneal endothelium. Morphology. Bovines.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Posicionamento da objetiva do microscópio especular de contato na área central da córnea de um bovino..... 33
- Figura 2** -Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um bovino obtida com microscópio especular de contato..... 34
- Figura 3** - Fotomicrografia especular da região central do endotélio corneano de um bovino com densidade de 1232 células/mm²..... 34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Densidade celular média (células/mm²) e morfologia das células do endotélio da córnea de bovinos obtidos com microscópio especular de contato..... 35
- Tabela 2** - Valores comparativos da densidade celular média (células/mm²) e da morfologia das células do endotélio da córnea de bovinos obtidos com microscópio especular de contato..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% : Por cento

µm: Micrômetro

Células/mm²: Células por milímetro quadrado

CV: Coeficiente de variação

DEC: Densidade endotelial central

DP: Desvio padrão

Dr.: Doutor

Et al.,: E outros

OD: Olho direito

OE: Olho esquerdo

Mm: milímetros

Mm²: milímetro quadrado

MmHg: milímetro de mercúrio

MEC: Microscopia especular de contato

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 Anatomofisiologia Corneana | 15 |
| 2.2 Regeneração Corneana | 17 |
| 2.3 Endotélio da Córnea | 18 |
| 3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO | 21 |
| 3.1 Biomicroscopia com Lâmpada de Fenda, Paquimetria e Fluorofotometria | 21 |
| 3.2 Microscopia Confocal | 22 |
| 3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura | 23 |
| 3.4 Microscopia Óptica com o uso de Corantes Vitais | 24 |
| 3.5 Microscopia Especular | 25 |
| 3.6 Parâmetros de Avaliação Endotelial | 26 |
| 4 ARTIGO | 28 |
| RESUMO | 29 |
| ABSTRACT | 30 |
| INTRODUÇÃO | 31 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| RESULTADOS | 34 |
| DISCUSSÃO E CONCLUSÃO | 36 |
| REFERÊNCIAS | 40 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 45 |
| REFERÊNCIAS | 46 |

1 INTRODUÇÃO

A córnea é uma estrutura avascular, lisa e convexa que juntamente com a esclera, constitui a túnica fibrosa externa do globo ocular. A composição de colágeno confere resistência mecânica ao tecido e proteção das estruturas intraoculares. O principal papel fisiológico da córnea é captar luz externa e contribuir para focalização na retina. A transparência e o poder de refração são características essenciais para esta função. Na maioria das espécies é constituída por epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (NISHIDA; SAIKA; MORISHIGE, 2022).

O endotélio constitui a camada posterior da córnea, é formado por uma camada única de células poligonais num padrão mosaico organizado e encontra-se em contato direto com o humor aquoso (TUFT; COSTNER, 1990). Na córnea hígida da maioria das espécies o padrão morfológico endotelial predominante é hexagonal. No entanto, são encontradas células de quatro, cinco, sete e oito lados (PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). As células endoteliais possuem organelas citoplasmáticas abundantes, sugerindo uma alta atividade metabólica, além de junções interdigitais e bombas de fluido ativo responsáveis pela função de barreira que garante manutenção da espessura e deturgescência da córnea. A capacidade de regeneração endotelial é limitada na maioria das espécies (PIGATTO *et al.*, 2006; NISHIDA; SAIKA; MORISHIGE, 2022). Estudos demonstraram que na espécie humana existe um valor de densidade celular endotelial mínima entre 500 e 800 células/mm² para a manutenção da integridade corneana (ANDREW; WILLI; ANDERSON, 2002; COYO *et al.*, 2018).

Na maioria dos mamíferos a senilidade resulta em uma diminuição progressiva na densidade celular bem como na redução do padrão morfológico hexagonal. Em algumas espécies ocorre diminuição da densidade endotelial central, onde um rápido declínio de densidade celular ocorre nos primeiros meses de vida e correlaciona-se com o desenvolvimento do bulbo ocular e maturação corneana (BAHN *et al.*, 1986; COYO *et al.*, 2018; BRAMBATTI *et al.*, 2017).

O endotélio é responsável pela manutenção da transparência corneana, a descompensação endotelial ocorre em densidades entre 300-500 células/mm² (ABIB, 2000). Além de alterações fisiológicas, procedimentos cirúrgicos, lesões traumáticas e inflamatórias poderão desencadear alterações do padrão morfológico endotelial. A perda endotelial é compensada pela hipertrofia de células endoteliais remanescentes e como consequência da alteração do arranjo anatômico celular observamos graus distintos de edema corneano, comprometendo a acuidade visual (TUFT;

COSTNER, 1990; ABIB; BARRETO, 2001; NISHIDA; SAIKA; MORISHIGE, 2022).

Métodos de avaliação clínica endotelial através de microscopia especular e confocal determinam parâmetros quantitativos e morfológicos importantes na identificação de patologias de córnea, planejamento cirúrgico e viabiliza o transplante de córnea, desempenhando um papel significativo na segurança e eficácia de estudos e procedimentos de segmento anterior e posterior da córnea.

Os principais parâmetros analisados para avaliação do endotélio são: densidade celular, área celular média e coeficiente de variação celular ou pleomorfismo (ABIB, 2000; BENETZ; LESS, 2018). Os parâmetros endoteliais já foram determinados em algumas espécies incluindo humanos, lagomorfos, alpacas, lhamas, cabras, equinos, aves, suínos, cães, felinos, entre outras (ABIB; BARRETO, 2001; PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010; COYO *et al.*, 2018; CHAURASIA; VANATHI, 2021). No entanto, são escassos os estudos científicos oftalmológicos relacionados aos parâmetros endoteliais da espécie bovina. Devido às variações nos parâmetros endoteliais da córnea entre as diferentes espécies o conhecimento dos parâmetros normais de cada espécie é fundamental.

O exame oftalmológico de bovinos deve ser realizado mediante contenção adequada do animal, para garantir um exame completo detalhado e segurança do examinador. A contenção química e bloqueio aurículo palpebral podem ser recomendados e úteis para avaliação clínica dos animais, entretanto, podem induzir perdas gestacionais nos ruminantes (MARTINS, 2021). Os olhos de bovinos são localizados lateralmente proporcionando amplo campo de visão (MARTINS, 2021). A produção lacrimal de bovinos foi relatada como sendo entre 25 e 35 mm/min (WIESER *et al.*, 2013) e a pressão intraocular varia de 15,2 mmHg a 23mmHg (TOFFLEMIRE *et al.*, 2015; PECHE; EULE, 2018). A ocorrência de alterações do bulbo ocular e cegueira nessa espécie aumentou nos últimos tempos provavelmente devido ao incremento da criação de bovinos, no entanto, indivíduos afetados são normalmente descartados sem passar por avaliação oftalmológica (MARTINS, 2021; WEBB; CULLEN, 2021). Anormalidades oculares como catarata, displasia retiniana, dermóide, neurite óptica, glaucoma, persistência da artéria hialóide e microftalmia, assim como alterações de posição e movimento do globo ocular na espécie bovina podem estar associadas tanto à herança genética quanto à agentes infecciosos sistêmicos, origem neoplásica destas alterações também deve ser investigada (BRAUN *et al.*, 2019; MORAIS *et al.*, 2019; MARTINS, 2021). Ceratites ulcerativas podem estar associadas a traumas, agentes

infecciosos e conformações palpebrais (MARTINS, 2021). Braun e colaboradores (2019), identificaram o sequenciamento genético completo do genótipo (CPAMD8:g.5995966C>T) empregado para detectar mutações em genes aspirantes ao fenótipo de catarata congênita bilateral Morganiana em bezerros Holandeses (BRAUN *et al.*, 2019).

O bem estar e a produtividade dos animais são parâmetros diretamente afetados quando a saúde ocular dos animais está comprometida, levando à perda de peso, sofrimento do animal, condenação de carcaças e baixo rendimento durante o tratamento (MARTINS,2021). Devido à ampla natureza etiológica de afecções oculares em bovinos, são necessários exames oftálmológicos efetivos para auxílio no diagnóstico, monitoração cirúrgica e tratamento de afecções oculares nesta espécie (MARTINS, 2021; WEBB; CULLEN, 2021).

Objetiva-se com o presente estudo avaliar o endotélio da córnea e determinar a densidade e morfologia endotelial da córnea de bovinos (*Bos taurus*) utilizando a microscopia especular de contato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomofisiologia Corneana

A córnea é uma estrutura avascular, lisa e convexa que juntamente com a esclera, constitui a túnica fibrosa externa do globo ocular. A zona limbal representa a área de transição entre a córnea e a esclera, região altamente vascularizada e rica em células-tronco pluripotentes (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). A luz que incide através da córnea lisa e transparente é transformada em energia elétrica e química ao atingir a retina. Os sinais obtidos são analisados por meio da transmissão ao cérebro pelo nervo óptico e são percebidos como uma imagem (KURT *et al.*, 2021).

A composição de colágeno confere resistência mecânica ao tecido e proteção das estruturas intraoculares. O principal papel fisiológico da córnea é sua propriedade óptica, portanto, transparência, curvatura e poder de refração são características essenciais para esta função (NISHIDA; SAIKA; MORISHIGE, 2022). A superfície ocular é recoberta pelo filme lacrimal, responsável pela lubrificação, nutrição, defesa mecânica e imunológica da córnea (MAGGS, 2018).

Por se tratar de um tecido avascular, a nutrição da córnea se desenvolve através de eventos bioquímicos onde nutrientes, principalmente derivados do metabolismo da glicose, são transformados em energia, os metabólitos envolvidos são oriundos dos capilares perilímbicos ou provenientes do filme lacrimal (NASSARALLA, 2000). A inervação sensorial corneana é feita pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo, onde originam-se um grande número de nervos ciliares longos e curtos, seus receptores sensoriais estão localizados no epitélio e estroma anterior, que contribuem para o alto grau de sensibilidade da córnea favorecendo assim a proteção desta estrutura (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Fatores anatômicos como ausência de vasos, epitélio estratificado não queratinizado, estado de desturgescência e organização das lamelas de colágeno, conferem característica de transparência ao tecido. Na maioria das espécies a córnea é constituída por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Além de ser constituída por três tipos celulares principais, células epiteliais, ceratócitos estromais e células endoteliais, a córnea conta com uma população heterogênea de células acessórias e componentes de matriz extracelular envolvidas na homeostase (JIRSOVA *et al.*, 2017).

O epitélio representa cerca de 10% da espessura total da córnea, é do tipo estratificado, escamoso e não queratinizado, constituído por cinco a seis camadas de células epiteliais poliédricas, duas a três camadas de células planas poligonais, duas a três camadas de células alares e duas camadas de células basais colunares assentadas à membrana basal, promovendo adesão ao estroma anterior. Junções complexas intercelulares estão presentes no epitélio corneano, promovendo barreira efetiva contra o filme lacrimal e agentes infecciosos (JIRSOVA *et al.*, 2017; NISHIDA; SAIKA; MORISHIGE, 2022; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

O estroma é a camada mais resistente da córnea, ocupa cerca de 90% da espessura corneana, é composto por lamelas de colágeno organizados paralelamente entre si, ceratócitos e componentes da matriz extracelular. A principal função estromal é garantir arranjo uniforme e disposição paralela das fibrilas de colágeno, conferindo forma à córnea, hidratação fisiológica e portanto, transparência tecidual. O componente principal do estroma é o colágeno, sendo os tipos mais abundantes colágeno tipo I que confere resistência à tração tecidual, tipo V que através da interação com o colágeno tipo I regula a espessura das fibrilas e o colágeno tipo III cuja quantidade aumenta com a idade, processo cicatricial e inflamações (JIRSOVA *et al.*, 2017).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio, composta por colágeno tipo IV, V, VI e VIII, laminina e fibronectina, é uma membrana fina e elástica que não se regenera. Fornece suporte à uma rede hexagonal que trabalha contra a pressão do humor aquoso (JIRSOVA *et al.*, 2017).

A camada posterior da córnea é denominada endotélio, formado por uma única camada de células poligonais organizadas em um mosaico uniforme com predomínio de formato hexagonal (ABIB, 2000; NISHIDA; SAIKA; MORISHIGE, 2022). As células endoteliais possuem um grande número de organelas citoplasmáticas, principalmente mitocôndrias, sugerindo uma alta atividade metabólica, dessa forma estão diretamente envolvidas na manutenção da desidratação estromal e transparência corneana (JIRSOVA *et al.*, 2017).

Em córneas híidas o padrão morfológico de células endoteliais hexagonais são de aproximadamente de 70-80 %, no entanto, danos endoteliais podem gerar decréscimo nos valores de hexagonalidade e incremento do valor da variabilidade de área celular (ABIB,2000). As células endoteliais possuem um grande número de organelas citoplasmáticas indicando sua alta taxa metabólica. Além disso possui função principal de manter o estado de deturgescência corneano devido à presença de ligações interdigitais complexas e bombas de fluido ativo que promovem

função de barreira ao contato com humor aquoso, evitando a descompensação da córnea (ABIB, 2000).

Um estudo foi realizado onde 315 olhos saudáveis de bovinos provenientes de abatedouro foram analisados em até 3 horas *post mortem*. Os olhos foram analisados através de inspeção visual e microscopia eletrônica de varredura. A espessura corneana foi $1015 \pm 104 \mu\text{m}$, todas as córneas tinham formato elíptico, o diâmetro horizontal corneano foi de 29,3 mm e o vertical foi de 23,9 mm. O diâmetro horizontal da córnea foi maior em córneas mais espessas, mas independente da espessura, estas córneas apresentaram uniformidade na espessura corneana do centro à periferia. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o endotélio corneano era um mosaico de células poligonais, com cerca de $67 \pm 2,7\% \mu\text{m}$ com padrão morfológico hexagonal ((DOUGHTY; PETROU; MacMILLAN; 1995).

Kurt e colaboradores (2021), estabeleceram os valores fisiológicos de referência para a espessura central da córnea e alterações relacionadas à idade que repercutem neste parâmetro. Para avaliação corneana foi utilizado aparelho de paquimetria ultrassonográfico que avaliou olhos hígidos de 50 bovinos. Neste estudo o valor médio da espessura da córnea de bovinos foi de 799,44 μm (variando de 425 μm a 960 μm), houve correlação positiva em relação a idade e espessura corneana, conforme relatado em outras espécies (KURT *et al.*, 2021).

A espessura corneana pode variar de acordo com a espécie e a raça animal, além de estar associada à alterações relacionadas à idade em humanos e animais. Tem sido relatado que existe um aumento da espessura corneana devido à hidratação estromal, isso significa que este parâmetro pode ser utilizado como um índice de dano endotelial (TUFT; COSTER, 1990; MAGGS, 2018; HOEHN *et al.*, 2018).

2.2 Regeneração Corneana

A resposta cicatricial corneana é um processo complexo devido à característica avascular desta estrutura, que envolve uma sequência de eventos celulares e varia conforme a camada da córnea que está envolvida. O epitélio liso, estroma transparente e endotélio funcional são essenciais para a formação da visão, portanto, o sistema de defesa do tecido procura reestabelecer sua estrutura fisiológica e anatômica (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

O processo de cicatrização do epitélio é caracterizado pela migração, proliferação e

diferenciação celular (MILLER, 2001). A injúria epitelial induz a migração das células remanescentes adjacentes a lesão através de deslizamento para a área defeituosa. As células epiteliais estão em renovação contínua para manter o equilíbrio dinâmico da estrutura através da proliferação e diferenciação de células epiteliais basais, o processo de regeneração epitelial ocorre de 7-14 dias, reestabelecendo sua função e estrutura. A zona limbal é provedora de células tronco cuja finalidade é suprir células perdidas no tecido normal ou danificado para manutenção da homeostase epitelial. A regulação do processo de cicatrização epitelial é mediada pelo sistema nervoso, ativação do sistema fibronectina-integrina, regulação de enzimas proteolíticas, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

A homeostase estrutural e bioquímica do estroma é mantida pelo equilíbrio da síntese e degradação dos componentes da matriz extracelular regulada pelos ceratócitos, caracterizados pela intensa atividade metabólica e proliferativa. Em resposta à quebra da barreira epitelial, inicia-se a morte programada de ceratócitos, processo no qual são liberados mediadores inflamatórios, polimorfonucleares e fatores de crescimento que transformam ceratócitos em miofibroblastos, responsáveis pela produção de metaloproteinases, glicosaminoglicanos, fatores de crescimento e leva a uma produção desorganizada de colágeno, comprometendo a transparência tecidual (NETTO *et al.*, 2005).

A membrana de Descemet está sob constante pressão e ao sofrer um trauma, tende a retrair e enovelar graças à sua característica elástica. Como consequência ao trauma, o humor aquoso penetra no estroma, gerando edema de córnea. Esta estrutura não se regenera, dessa forma, após o trauma, células endoteliais hipertrofiam e recobrem a área de ruptura (EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015). A capacidade regenerativa do endotélio é limitada, quando ocorre dano e morte celular a substituição da função endotelial se dá pela migração centrípeta de células adjacentes à lesão. (EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015).

2.3 Endotélio da Córnea

O endotélio constitui a camada posterior da córnea, na embriogênese deriva da crista neural e é formado por uma camada única de células poligonais num padrão mosaico organizado e encontra-se em contato direto com o humor aquoso (TUFT; COSTER, 1990). A membrana de Descemet é uma estrutura acelular composta de colágeno tipo IV, VIII, fibronectina e laminina, de

característica elástica funciona como membrana basal do endotélio corneano, é produzida durante a vida do indivíduo, tornando-se mais espessa conforme o envelhecimento (ARNALICH-MONTIEL, 2019; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). As células endoteliais são planas e poligonais, com predomínio da forma hexagonal (TUFT; COSTNER, 1990; BOTEON; 2002).

Estudos identificaram também células de endotélio hígido possuindo quatro, cinco, sete e oito lados (PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017). As células endoteliais apresentam microvilosidades e junções interdigitais complexas, que contribuem para o aumento da superfície de contato intercelular, promovendo barreira semipermeável ao humor aquoso (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). A elevada taxa metabólica do endotélio é evidenciada pelo grande número de organelas citoplasmáticas (JOYCE, 2003; NASSARALLA, 2000).

A função fisiológica do endotélio é garantir o estado de deturgescência corneana através da manutenção do equilíbrio osmótico, transporte ativo de íons e passivo de líquidos realizado pelas bombas de sódio e potássio ligados à membrana. Estudos sugerem que, além de bombas de sódio e potássio, proteínas de membrana identificadas como aquaporinas (AQP1) exercem função de canais seletivos de água (JOYCE, 2003; ARNALICH-MONTIEL, 2019; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

A regeneração endotelial é limitada na maioria das espécies, não ocorre replicação *in vivo* para substituir células mortas ou lesionadas (JOYCE, 2005). A falta de atividade mitótica para reparação desta estrutura gera uma diminuição gradual na densidade celular ao longo da vida, com perda celular média de 0,6% ao ano (BOURNE *et al.*, 1997). Lesões e perdas endoteliais comprometem a função de barreira e podem levar à descompensação do endotélio, desencadeando edema corneano devido à diversos fatores como: procedimentos cirúrgicos, traumas, doenças endoteliais, glaucoma, e lesões inflamatórias (JOYCE, 2005).

O processo de reparação se reestabelece pela migração e hipertrofia celular que gera aumento da célula endotelial e alteração do padrão morfológico hexagonal denominado pleomorfismo (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021). Bahn e colaboradores (1986), demonstraram em estudo através de microscopia especular comparativa de córneas imaturas e adultas de diferentes espécies como humanos, felinos, bovinos, veados, porcos e coelhos, que a contagem de células endoteliais centrais diminui rapidamente

durante os primeiros meses de vida e isso é explicado pelo crescimento e desenvolvimento corneano. A contagem de células endoteliais centrais dessas espécies adultas são semelhantes entre si (2.500 céls/mm²) apesar de uma ampla variação no tamanho da córnea. Essa densidade celular em adultos é atingida pela hipertrofia celular ou mitose celular irrestrita, no caso de coelhos. A córnea humana apresenta perda significativa endotelial de cerca de 45% que ocorre no início do desenvolvimento pós natal, após este período a taxa de declínio continua, mas em um ritmo mais lento (BAHN *et al.*, 1986).

3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO

Na avaliação clínica endotelial de diferentes espécies são empregadas técnicas *in vivo* como biomicroscopia com lâmpada de fenda, paquimetria, microscopia confocal e especular. Além disso, métodos de avaliação do endotélio *ex vivo* utilizam técnicas como a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia óptica com corantes vitais (ABIB, 2000; JUKURNAS; COLBY, 2005; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; SAAD *et al.*, 2008; CHAURASIA; VANATHI, 2021). Os métodos de avaliação endotelial possuem vantagens e desvantagens evidentes que auxiliam na escolha para uma adequada aplicabilidade clínica ou experimental (JUKURNAS; COLBY, 2005).

As técnicas que avaliam o segmento posterior da córnea determinam parâmetros quantitativos e qualitativos relacionados às células endoteliais, com o objetivo de estimar a função do endotélio corneano (ABIB, 2000; McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008; PIGATTO *et al.*, 2008). Portanto, as análises morfológicas e quantitativas são variáveis que desempenham um papel significativo para o estadiamento de doenças de córnea, planejamento cirúrgico, promover banco de doação de córneas, além de avaliar segurança e eficácia de fármacos e obter dados confiáveis, precisos e reproduzíveis (BENETZ; LASS, 2018).

3.1 Biomicroscopia com Lâmpada de Fenda, Paquimetria e Fluorofotometria

A biomicroscopia é um método prático e rápido de triagem para a avaliação endotelial e que não necessita de treinamento técnico para sua realização. É possível identificar alterações e perdas endoteliais, irregularidades em Descemet, identificar depósitos endoteliais como precipitados ceráticos ou presença de pigmentos como sangue. O exame é realizado através da projeção de um feixe de luz em fenda que inicia do lado temporal e move-se em direção à periferia, a ampliação pode ser ajustada para identificação máxima de estruturas celulares. No entanto, esta avaliação é limitada na resolução da estrutura endotelial, pois impede o fornecimento de detalhes finos na presença de edema ou cicatriz corneana, pela dispersão da luz por estruturas circundantes. Nessa técnica a área avaliada é pequena, a magnificação é limitada e o movimento do bulbo ocular dificulta a avaliação em animais (ABIB, 2000; JUKURNAS; COLBY, 2005).

A paquimetria relaciona a espessura corneana com o risco de descompensação endotelial.

Embora não haja correlação direta entre densidade endotelial e espessura central da córnea, esta comporta-se como um indicador da função endotelial. O aumento da espessura central corneana é um fator de risco iminente para descompensação endotelial. Existem dois tipos de paquímetros: ultrassônico e óptico, suas medições complementam os parâmetros quantitativos e qualitativos, mas em Oftalmologia Veterinária seu uso é limitado à pesquisa (JUKURNAS; COLBY, 2005; HOEHN *et al.*, 2018).

A permeabilidade à fluoresceína pela fluorofotometria avalia a função de barreira do endotélio corneano através da instilação de fluoresceína tópica, seguido da medição de sua concentração na câmara anterior por meio de um fluorofotômetro, seu uso é limitado aos centros de pesquisa (JUKURNAS; COLBY, 2005).

3.2 Microscopia Confocal

Esta técnica permite a avaliação *in vivo* de estruturas oculares principalmente a córnea, onde são detalhadas as camadas da córnea, espessura corneana, inervação corneana e densidade de células endoteliais em diversas espécies como humanos, cães, felinos, aves e equinos de forma precisa e não invasiva. Entretanto, para aplicação clínica deste exame é necessário a avaliação dos animais mediante anestesia geral (KAFARNIK *et al.*, 2007; LEDBETTER; SCARLETT, 2009).

O princípio deste método consiste em feixes de luz focalizados no mesmo plano da córnea, na qual duas fendas estão inseridas no plano da imagem e feixe de observação. Este arranjo óptico é denominado de confocal porque limita o plano ao foco da luz e reduz interferências fora do foco de iluminação, formando assim a imagem (KLAIS; BUHREN; KOHNEN, 2003).

O uso da microscopia confocal proporciona maior resolução, ampliação e contraste de imagem (axial e lateral), permite avaliação das camadas corneanas em tempo real, além de ser efetiva na análise de córneas edemaciadas. Esta técnica propicia o diagnóstico precoce de distrofias endoteliais, auxilia no diagnóstico de patógenos e detecção de corpos estranhos, parâmetros quantitativos e qualitativos endoteliais determinados nessa técnica demonstram ser confiáveis e reprodutíveis, a microscopia confocal serve também como acompanhamento pré e pós ceratoplastias. Entretanto, seu alto custo restringe sua aplicabilidade na rotina clínica (KLAIS; BUHREN; KOHNEN, 2003; JUKURNAS; COLBY, 2005).

Lwigale em 1999 demonstrou através da microscopia confocal, características diferentes do

núcleo de células de cada camada corneana em bovinos. O padrão morfológico endotelial foi hexagonal e arranjo organizado disposto em uma monocamada na superfície posterior da córnea. Neste estudo, as células endoteliais apresentaram núcleos lobulados dispostos regularmente, característica nuclear diferente da encontrada em humanos e em galinhas (LWIGALE, 1999).

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura consiste em um método *ex vivo* que utiliza lentes eletromagnéticas e através da emissão de um feixe de elétrons sobre a amostra analisada alcança imagens detalhadas e de alta resolução que compreende textura, profundidade, contraste e dimensões dos materiais biológicos. Este método tem sido utilizado para determinar padrões morfológicos e quantitativos do endotélio corneano em diferentes espécies além de possibilitar estudos de toxicidade endotelial à fármacos (VIRTANEN *et al.*, 1984; COLLIN ; COLLIN, 1998; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Pigatto e colaboradores analisaram, através da microscopia de varredura do endotélio da córnea, parâmetros endoteliais para diferentes espécies, incluindo avestruz, coelho, pinguim e jacaré onde a conclusão destes estudos foi que o endotélio corneano é semelhante entre as diferentes espécies. Os estudos com coelhos e jacarés identificaram também, presença de microvilosidades na superfície celular, demonstrando similaridade desta espécie com outras já estudadas (PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2009). A microscopia eletrônica de varredura já foi utilizada também para avaliar toxicidade endotelial induzido por aplicação intracameral de azul brilhante em concentração de 0,05% em suínos. O estudo demonstrou que esta substância não foi nociva ao endotélio corneano, tornando-se uma opção para coloração de cápsula anterior em facoemulsificações (TERZARIOL *et al.*, 2016).

Tamayo-arango e colaboradores (2009), realizaram um estudo pioneiro que determinou a morfologia e a morfometria do endotélio corneano de suínos mestiços utilizando a MEV. A superfície do endotélio demonstrou predomínio do padrão hexagonal, o núcleo mostrou-se arredondado e a presença de cílios, microvilosidades e vesículas foram detectadas nas células da região periférica da córnea. O coeficiente de variação celular foi considerado menor na área central quando comparado à área periférica e a densidade celular média foi maior em relação aos dados obtidos pela microscopia espelular (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

O preparo de amostras para a avaliação da MEV podem gerar artefatos durante as fases do

seu processamento, graças à retração dos tecidos moles durante a fixação, desidratação e ponto crítico. O glutaraldeído sem sacarose demonstrou melhor preservação de superfície e mostrou menor encolhimento de amostra. Estudo utilizando fixador de alta osmolaridade, revelou retração macroscópica de até 40% e distorção do mosaico endotelial, citoplasma e organelas das células endoteliais quando comparado ao glutaraldeído (VIRTANEN *et al.*,1984; DOUGHTY; BERGMANSON; BLOCKER, 1997).

3.4 Microscopia Óptica com o uso de Corantes Vitais

Este método consiste em uma avaliação da integridade endotelial *ex vivo* eficiente, rápida e de baixo custo, através da utilização de compostos químicos que se ligam aos tecidos e células vivas, denominados corantes vitais (TAYLOR; HUNT, 1981). Em medicina, eles estão envolvidos em técnicas diagnósticas e adjuvantes cirúrgicos. Ademais, estes compostos também são utilizados para avaliação de toxicidade de fármacos, demonstrando dano endotelial agudo relacionado ao benzilato de atracúrio (GUIMARÃES *et al.*,2019). São empregados corantes como o azul tripano em concentrações variáveis (0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%) e vermelho de alizarina em diluições de 0,5% a 1%, submetidos à uma variável de tempo de impregnação do corante (PARK *et al.*,2012).

O corante azul de tripano é utilizado para avaliar a viabilidade de células endoteliais, impregna no núcleo de células lesionadas ou mortas, bem como áreas da Membrana de Descemet que encontram-se descelerizadas. Na concentração de 0,001% a 0,1% não mostrou toxicidade endotelial. O vermelho de alizarina é um corante intercelular que delimita a membrana das células endoteliais hígidas ou danificadas. O protocolo de associação destes dois corantes associados à avaliação fotográfica, permite a quantificação do dano celular através da análise da morfologia celular, avaliação do núcleo celular e delimitação de áreas de ausência endotelial (SAAD *et al.*,2008; RODRIGUES *et al.*,2009; PARK *et al.*,2012).

Park e colaboradores (2012), concluíram que o protocolo de coloração ao cobrir o endotélio com azul tripano a 0,4% por 60 segundos, seguido de lavagem com solução salina balanceada, imersão do tecido em vermelho de alizarina a 0,5%, preparado em solução tamponada de fosfato (pH entre 4,0 a 6,0) por 90 segundos seguido de lavagem por solução salina balanceada e avaliação por microscopia óptica, demonstrou coloração consistente de células endoteliais. Determinando um protocolo reprodutível para avaliação de células endoteliais da córnea de humanos.

Faganello e colaboradores (2016), avaliaram a morfologia de células endoteliais da região central e periférica da córnea de equinos, utilizando o corante vermelho de alizarina a 2%, com pH ajustado à 4,2, mantido sobre o endotélio por dois minutos, seguido de lavagem com solução salina, análise com microscópio óptico e fotografia. Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre as regiões avaliadas em relação à morfologia endotelial e o padrão hexagonal foi predominante nesta espécie.

3.5 Microscopia Especular

Esta técnica de avaliação consiste em um método não invasivo *in vivo* e *ex vivo* fidedigno para análise endotelial, no qual compreende a reflexão de um feixe de luz que incide sobre o endotélio, que por se tratar de uma superfície regular, reflete de forma especular uma imagem endotelial magnificada que utiliza análise computadorizada para obtenção dos dados endoteliais. Este método de avaliação possui boa reprodutibilidade e repetibilidade na determinação de densidade endotelial, espessura central corneana e área celular média em córneas humanas, é utilizado também para avaliar procedimentos cirúrgicos, determinar potencial de toxicidade endotelial a fármacos e avaliar processo de reparação tecidual (OLLIVIER *et al.*, 2003; McCAREY *et al.*, 2008). Existem dois tipos de microscópio especular: de não contato, que não exige contato da parte óptica da objetiva do aparelho com a córnea analisada e o de contato onde a lente objetiva aplanar a córnea. Os aparelhos diferem quanto ao modelo de análise dos dados e podem ser classificados como não automatizado, semiautomatizado e automatizado, onde as imagens são produzidas e a morfologia da célula endotelial é analisada através de um software do aparelho (ABIB, 2000). Para avaliação endotelial em microscopia especular são utilizados métodos de marcação do centro celular, método de comparação, método de quadro fixo ou variável e o método de canto, independente da técnica, a precisão depende da qualidade da imagem endotelial para a identificação celular (ABIB, 2000; McCAREY *et al.*, 2008).

Estudos validaram, através da comparação de contagem das células endoteliais obtidas pela microscopia confocal e especular de olhos normais, que as medições endoteliais de ambos os métodos de avaliação são análogos (KLAIS; BUHREN; KOHNEN, 2003). Estudo com objetivo de comparar a concordância da análise de um microscópio especular de contato e de não contato na avaliação endotelial e diferenças entre regiões centrais e periféricas de olhos hígidos foi

realizado (LEE *et al.*, 2019). Os parâmetros analisados foram densidade celular, percentual de células hexagonais e o coeficiente de variação. A conclusão deste estudo foi que os métodos de avaliação não divergiram na obtenção dos parâmetros endoteliais, bem como não houve diferença significativa na densidade celular endotelial central e periférica nas córneas analisadas (LEE *et al.*, 2019).

Ollivier e colaboradores (2003), relataram efeitos deletérios do aumento de pressão intraocular (PIO) no endotélio de macacos *Rhesus*. Na pesquisa foi utilizada um aparelho de paquimetria ultrassônica e microscópio especular de não contato, onde relacionou a espessura corneana, densidade endotelial e área endotelial com hipertensão intraocular induzida por laser de argônio. A hipertensão ocular crônica não aumentou significamente a espessura corneana, mas induziu perda significativa nas células endoteliais e aumento da área celular endotelial quando comparada aos olhos normotensos (OLLIVIER *et al.*,2003).

Coyo e colaboradores (2018), determinaram a densidade, morfologia e morfometria endotelial corneana de corujas através da microscopia especular de não contato. Parâmetros como densidade endotelial, área celular média, índice de polimegatismo e pleomorfismo foram estabelecidos para a espécie bem como o efeito do envelhecimento sobre estes parâmetros foram relatados. Os autores concluíram que as corujas apresentam um endotélio uniforme em tamanho celular e não observaram diferença significativa relacionado aos parâmetros estudados entre os grupos estudados (COYO *et al.*, 2018).

Os parâmetros endoteliais da córnea de frangos saudáveis de diferentes idades foram determinados através da microscopia especular de contato. Foram correlacionadas as alterações nos parâmetros endoteliais com o envelhecimento. Os autores concluíram que houve diminuição da densidade endotelial, aumento da área celular e aumento do pleomorfismo com o avanço da idade (ALBUQUERQUE; FREITAS; PIGATTO, 2015).

3.6 Parâmetros de Avaliação Endotelial

O endotélio corneano está diretamente envolvido na manutenção da espessura e homeostase metabólica da córnea e consiste na camada mais importante para funcionalidade deste tecido. A avaliação do endotélio corneano é baseada na estimativa de densidade celular, área celular, polimegatismo e pleomorfismo (ABIB, 2000; JIRSOVA *et al.*, 2017; CHAURASIA; VANATHI,

2021).

A densidade celular endotelial é expressa pela quantidade de células endoteliais contidas num milímetro quadrado (células/mm²). A área celular consiste no tamanho médio da célula endotelial em micrômetros (μm). O polimegatismo equivale ao coeficiente de variação da área celular e o pleomorfismo compreende o coeficiente de variação da hexagonalidade endotelial (JIRSOVA *et al.*, 2017; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

McCarey (2008) e colaboradores relataram que danos ao endotélio corneano promovem a cicatrização em um processo de alargamento celular e espalhamento para redefinir uma camada contínua de células na superfície posterior da córnea. A perda de células endoteliais, induzida por doença, trauma ou toxicidade química pode ser documentada pela microscopia especular através do aumento da área da superfície celular e diminuição da densidade celular endotelial. A forma celular mais eficiente para cobrir uma área é a hexagonal e em uma córnea saudável, é esperado cerca de 60% de células endoteliais com padrão hexagonal. A análise morfológica endotelial inclui principalmente a área celular, densidade celular, polimegatismo e pleomorfismo. O polimegatismo é um coeficiente que descreve a variação da área celular, então a medida que a área celular média aumenta a estimativa de densidade endotelial diminui. Portanto, aumento de polimegatismo diminui a precisão da área média celular (McCAREY *et al.*, 2008).

Ocorre uma diminuição gradual das células endoteliais com o avanço da idade, em humanos foi relatado que a densidade endotelial diminui da periferia para o centro (ABIB, 2000). Estes parâmetros podem sofrer alterações mediante a alterações fisiológicas como o envelhecimento, alterações inflamatórias de natureza clínica ou cirúrgica e traumas. (ABIB, 2000; JIRSOVA *et al.*, 2017). A mensuração destes parâmetros em diferentes espécies contribui para avaliação da qualidade da superfície endotelial, diagnóstico de doenças corneanas, acompanhamento e aprimoramento de ceratoplastias, formação de bancos de córnea para fomentar transplantes corneanos (CHAURASIA;VANATHI, 2021).

4 ARTIGO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista *Veterinary Ophthalmology* (ISSN 1463-5224) e será traduzido para o inglês no momento da sua submissão.

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE BOVINOS
(*Bos taurus*) UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR DE CONTATO - ESTUDO
*EX VIVO***

Mariane Gallicchio Azevedo¹, Natália Pons Méndez¹, João Antonio Tadeu Pigatto¹

¹Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

RESUMO

Objetivo: O endotélio constitui a camada posterior da córnea, é formado por uma camada única de células poligonais em um padrão mosaico organizado, sendo essa estrutura fundamental para manter a córnea transparente. Devido às variações nos parâmetros endoteliais da córnea entre as diferentes espécies o conhecimento dos parâmetros normais de cada espécie é fundamental. Objetivou-se avaliar o endotélio da córnea de bovinos utilizando o microscópio especular de contato. **Procedimentos:** Foram avaliados 20 bulbos oculares de 10 bovinos (*Bos taurus*) da raça brangus, machos com idade de 24 meses. A microscopia especular de contato foi realizada na área central da córnea e os parâmetros analisados foram a densidade celular e a morfologia endotelial. **Resultados:** A densidade celular média na área central foi de 1277,0 células/mm² e a porcentagem de células hexagonais foi de 74,3 %. Não foram observadas diferenças na densidade celular endotelial e na hexagonalidade entre os olhos esquerdo e direito. **Conclusão:** Com a microscopia especular de contato foi possível analisar e mensurar os parâmetros endoteliais da córnea de bovinos. Os dados obtidos servirão de referência para análise do endotélio da córnea de bovinos.

Palavras-Chave: Endotélio Corneano. Morfologia. Bovinos.

ABSTRACT

Objective: *The corneal endothelium is the posterior layer of the cornea, consisting of a single layer of polygonal cells in an organized mosaic pattern, which is essential for maintaining corneal transparency. Due to variations in corneal endothelial parameters among different species, knowledge of the normal parameters of each species is crucial. The objective of this study was to evaluate the corneal endothelium of bovines using a contact specular microscope* **Procedures:** *Twenty eyeballs from 10 male Brangus bovines (*Bos taurus*), aged 24 months, were evaluated. Contact specular microscopy was performed on the central area of the cornea and the analyzed parameters were cell density and endothelial morphology.* **Results:** *The mean cell density in the central area was 1277,0 cells/mm² and the percentage of hexagonal cells was 74.3%. No differences in endothelial cell density and hexagonality were observed between the left and right eyes.* **Conclusion:** *Contact specular microscopy allowed for the analysis and measurement of corneal endothelial parameters in bovines. The obtained data will serve as a reference for the analysis of corneal endothelium in bovines.*

Key words: *Corneal endothelium. Morphology. Bovines*

INTRODUÇÃO

O endotélio constitui a camada posterior da córnea, na embriogênese deriva da crista neural e é formado por uma camada única de células poligonais dispostas em mosaico organizado, na maioria das espécies o padrão morfológico endotelial predominante é hexagonal (BAHN *et al.*, 1986; TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000; JOYCE, 2003). O endotélio possui como principal função a manutenção da transparência corneana através da regulação da hidratação estromal por meio da função de barreira endotelial (TUFT; COSTER, 1990; MIMURA; YAMAGAMI; AMANO, 2013).

A reparação endotelial é limitada na maioria das espécies, quando as células endoteliais sofrem quaisquer tipo de dano, células adjacentes migram em direção à lesão, hipertrofiam e reestabelecem sua função. Acredita-se que a densidade celular mínima necessária para manutenção funcional do endotélio corneano seja 500 células/mm² (ZAVALA *et al.*, 2013). A densidade endotelial sofre influência e decai mediante a fatores relacionados ao envelhecimento, traumas cirúrgicos ou inflamatórios e doenças endoteliais. Em casos de perdas endoteliais significativas, onde as células remanescentes não restauram sua função, ocorre a descompensação endotelial ocasionando edema corneano e *déficit* visual (TUFT; COSTNER, 1990; ABIB; BARRETO, 2001; SPINOZZI *et al.*, 2021).

A avaliação endotelial através da microscopia especular fornece uma análise clínica não invasiva, precisa e confiável de parâmetros quantitativos e qualitativos do endotélio corneano. Portanto, esta técnica é também empregada para fins de pesquisa na avaliação de toxicidade de fármacos intraoculares e procedimentos cirúrgicos de córnea (ABIB, 2000; SANCTIS *et al.*, 2006; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; BENETZ; LASS, 2018; COYO *et al.*, 2018; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

Os parâmetros endoteliais já foram determinados em algumas espécies incluindo humanos, lagomorfos, alpacas, lhamas, cabras, equinos, aves, suínos, cães e felinos, entre outras (ABIB; BARRETO, 2001; PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010; COYO *et al.*, 2018; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

Devido às variações nos parâmetros endoteliais da córnea entre as diferentes espécies, o conhecimento dos parâmetros normais de cada espécie é fundamental. Além disso, o conhecimento dos parâmetros endoteliais é um pré-requisito para o reconhecimento de alterações patológicas relacionadas a essa camada da córnea. No entanto, são escassos os estudos científicos

oftalmológicos relacionados aos parâmetros endoteliais da espécie bovina. Apenas um estudo foi detectado envolvendo determinação de densidade endotelial central da córnea de bovinos, contudo a mensuração da DEC média foi superestimada para esta espécie (BAHN *et al.*, 1986).

Objetiva-se com o presente estudo analisar e quantificar os parâmetros do endotélio da córnea de bovinos (*Bos taurus*) utilizando a microscopia especular de contato.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido de acordo com a Resolução Normativa Nº 55/22 que atualiza o texto da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais e de Ensino ou de Pesquisa Científica que considera os princípios de substituição e redução de modelos animais, a fim de envolver o menor número de animais necessário para alcançar objetivos científicos.

Foram estudados 20 bulbos oculares de 10 bovinos da Raça Brangus, machos, com idade de 24 meses selecionados em abatedouro inspecionado pela Divisão de Inspeção de Origem Animal, localizado no município de Westfalia no Rio Grande do Sul, Brasil. O material biológico foi doado pelo Frigorífico Angus. O processo de remoção do bulbo ocular foi executado através da técnica de enucleação subconjuntival, realizada imediatamente após o abate dos animais. Os olhos foram identificados e acondicionados em câmara úmida até o momento da análise, utilizando o microscópio especular.

Todos os bulbos oculares foram submetidos ao exame oftálmico que contemplou biomicroscopia com lâmpada de fenda (Portable Slit Lamp SL-15, KOWA) e teste de fluoresceína (Fluoresceína Sódica 1%, Allergan), foram selecionados somente olhos hígidos. As análises foram realizadas em até quatro horas após o abate.

Para a avaliação endotelial foi utilizado o microscópio especular de contato (Celmax Medical Service®). Para a análise endotelial foi empregado o método semiautomatizado com a marcação do centro celular. As avaliações foram realizadas em sua totalidade pelo mesmo examinador. Os olhos após serem retirados da câmara úmida, foram posicionados em um suporte adaptado ao microscópio especular de contato e lubrificados com colírio oftálmico (Lacri, Carboximetilcelulose 5mg/ml).

A lente objetiva do microscópio especular foi posicionada na região central da córnea formando um ângulo de 90° entre a estrutura avaliada e o aparelho (Figura 1).

Figura 1 - Posicionamento da objetiva do microscópio especular de contato na área central da córnea de um bovino.



Fonte: a própria autora, 2023.

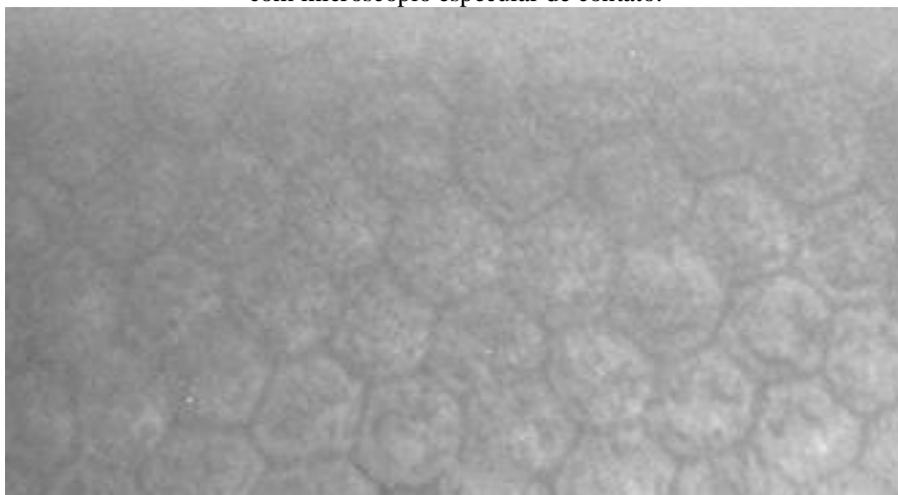
Foi obtida uma micrografia e em cada imagem foram analisadas 30 células endoteliais. A densidade celular foi determinada através da utilização do Software Celmax® de forma semiautomatizada. A morfologia endotelial foi obtida através da avaliação manual do número de lados de cada célula. Os valores obtidos foram a média de cada parâmetro identificado.

As variáveis quantitativas foram analisadas mediante digitação de dados no programa Excel que posteriormente foram exportados para o programa IBM* SPSS v. 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para análise estatística. A densidade e o percentual de células poligonais foram descritas pela média e o intervalo de confiança de 95%. A comparação entre os olhos foi realizada pelo teste t de *Student* para amostras pareadas. Nível de significância de 5% foi considerado para as comparações estabelecidas.

RESULTADOS

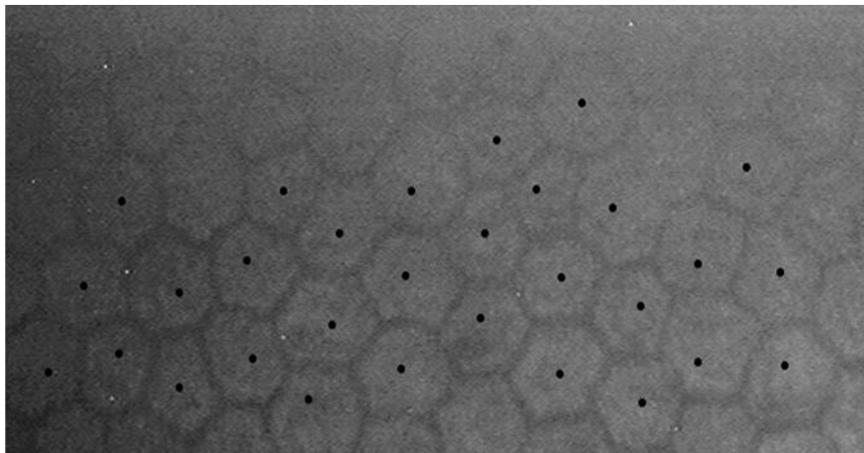
Com o microscópio especular de contato foi possível avaliar o endotélio corneano de bovinos e obter imagens nítidas de todos os olhos analisados. Foram observadas um padrão regular e contínuo de células poligonais justapostas e com bordas nítidas na região central do endotélio corneal bovino (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um bovino obtida com microscópio especular de contato.



Fonte: a própria autora, 2023.

Figura 3 - Fotomicrografia especular da região central do endotélio corneano de um bovino com densidade de 1232 células/mm².



Fonte: a própria autora, 2023.

A densidade endotelial média da área central (DEC) foi de 1277,0 células/mm². O percentual médio de células pentagonais da região central de endotélio foi de 14,7% para células pentagonais, 74,3% para células hexagonais e 10% para células heptagonais. No presente estudo foram encontradas células de quatro (4) lados e oito (8) lados. Contudo, devido ao pequeno número encontrado na amostragem, a estimativa da média e o intervalo de confiança não foram contabilizados (Tabela 1).

Não houve diferença significativa entre os parâmetros morfológicos das células endoteliais quando comparados o olho direito com o olho esquerdo. Não houve diferença estatisticamente significativa para a variável DEC ($p=0,491$) quando comparado olho direito ao esquerdo (Tabela 2). Estes dados estão apresentados nas tabelas a seguir:

Tabela 1 - Densidade celular média (células/mm²) e morfologia das células do endotélio da córnea de bovinos obtidos com microscópio especular de contato.

| Variáveis | Média (IC95%) |
|------------------------------------|------------------------|
| Densidade endotelial central (DEC) | 1277,0 (1238,3-1315,6) |
| % células 5 lados | 14,7 (12,0-17,4) |
| % células 6 lados | 74,3 (69,7-78,9) |
| % células 7 lados | 10,0 (7,8-12,2) |

Dados apresentados pela média e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 2 - Valores comparativos da densidade celular média (células/mm²) e da morfologia das células do endotélio da córnea de bovinos obtidos com microscópio especular de contato.

| Variáveis | Direito | Esquerdo | P |
|-------------------|------------------------|------------------------|--------|
| | Média (IC95%) | Média (IC95%) | |
| Densidade | 1271,6 (1216,9-1326,9) | 1282,0 (1216,3-1347,7) | 0,0491 |
| % células 5 lados | 14,3 (9,4-19,2) | 15,0 (11,6-18,4) | 0,809 |
| % células 6 lados | 75,7 (67,8-83,5) | 73,0 (66,7-79,3) | 0,574 |
| % células 7 lados | 9,0 (6,0-12,0) | 11,0 (7,3-14,7) | 0,405 |

Dados apresentados pela média e intervalo de confiança de 95% e comparado pelo teste t de *Student* para amostras pareadas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os parâmetros endoteliais já foram determinados em alguma espécie, incluindo humanos (ABIB; BARRETO, 2001), jacaré (PIGATTO *et al.*, 2004), avestruz (PIGATTO *et al.*, 2009), chinchilas (BERCHT, 2013), galinhas (ALBUQUERQUE; FREITAS; PIGATTO, 2015), coelhos (BRAMBATTI, 2013), cães (PIGATTO *et al.*, 2006; KOBASHIGAWA, 2014), ovinos (BRANDÃO *et al.*, 2006 ; COYO *et al.*, 2015) caprinos (COYO *et al.*, 2018), cães (PIGATTO *et al.*, 2004; HÜNNING *et al.*, 2015), marmosets (MORITA; SHIMOMURA, 1995), equinos (ANDREW *et al.*, 2001; FAGANELLO, 2014), corujas (COYO *et al.*, 2018), lhamas e alpacas (ANDREW *et al.*, 2001), pinguins de Magalhães (PIGATTO *et al.*, 2005) e suínos (VARGAS *et al.*, 2022), entre outros. No entanto, são escassos os estudos científicos oftalmológicos relacionados aos parâmetros endoteliais da espécie bovina. Em virtude das diferenças nos parâmetros endoteliais da córnea entre as espécies é importante o conhecimento dos parâmetros normais de cada espécie. Somente após a obtenção desses valores de referência será possível o reconhecimento de alterações patológicas relacionadas a essa camada da córnea e a realização de procedimentos cirúrgicos com maior segurança.

A necessidade de estabelecer parâmetros endoteliais da córnea de bovinos motivaram a realização dessa pesquisa. No presente estudo, foram avaliados olhos provenientes de descarte de abatedouro de bovinos. Essa metodologia foi factível e para o desenvolvimento da pesquisa científica sem a necessidade da eutanásia de modelos experimentais para este fim. Em estudos anteriores realizados em até seis horas *post mortem* foi possível observar que a integridade endotelial era mantida (ANDREW *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2008, BERTCH *et al.*, 2013; FAGANELLO *et al.*, 2014). Apesar do presente estudo ter sido realizado em olhos obtidos após a enucleação como não ocorreram alterações endoteliais decorrentes de preparo para análise os resultados obtidos poderão ser usados como referência e comparados com dados futuros obtidos em animais vivos. Diferentemente das microscopias ópticas e eletrônica de varredura não ocorre alteração devido a retração celular durante o preparo das córneas. O microscópio especular tem sido empregado tanto para analisar córneas de animais vivos quanto para avaliação de olhos enucleados (ANDREW *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE; FREITAS; PIGATTO, 2015; BERTCH *et al.*, 2013).

A córnea de bovinos possui características já referenciadas na literatura, onde a espessura

corneana é de $1015 \pm 104 \mu\text{m}$, o diâmetro corneano horizontal foi de $29.8 \pm 1.3 \text{ mm}$ e $23.9 \pm 1.5 \text{ mm}$ o diâmetro vertical. O endotélio corneano bovino mostrou-se como um arranjo organizado de células poligonais de tamanho uniforme das quais $67,1 \pm 2,7\%$ demonstraram morfologia hexagonal. Lwigale (1999), estudando córneas de bovinos, constatou núcleos das células endoteliais com padrão morfológico lobulado dispostos regularmente (DOUGHTY; PETROU; MacMILLAN, 1995; LWIGALE, 1999).

A microscopia especular é o método padrão de avaliação endotelial utilizado em humanos e em animais (PRICE; CHANG, 1981; ABIB, 2000; KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003; PIGATTO *et al.*, 2006; JIRSOVA *et al.*, 2017; COYO *et al.*, 2019). A metodologia é não invasiva e fidedigna para avaliação do endotélio da córnea. A estrutura endotelial normal e patológica em condições clínicas ou experimentais pode ser analisada e os parâmetros quantificados e estabelecidos (ABIB, 2000; BENETZ; LASS, 2018; CHAURASIA; VANATHI, 2021). Com isso, podem ser feitas avaliação de doenças endoteliais, processo de cicatrização e envelhecimento do endotélio, ceratoplastias e no estudo de toxicidade de fármacos intracamerais, auxiliando assim no diagnóstico e tratamento de distúrbios corneanos e promovendo o aperfeiçoamento de técnicas cirúrgicas em diferentes espécies (COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2006; ALBUQUERQUE; FREITAS; PIGATTO, 2015; BENETZ; LASS, 2018; COYO *et al.*, 2019; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

No presente estudo, com a MEC foi possível analisar e determinar os parâmetros do endotélio da córnea de bovinos. Uma das limitações da microscopia especular é a dificuldade na obtenção de imagens de áreas edemaciadas da córnea (DOUGHTY; BERGMANSON; BLOCKER, 1997; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN; 2008). Nesse experimento, em todos os olhos enucleados, foi possível analisar e fotografar o endotélio corneano, pois apenas olhos saudáveis foram incluídos e examinados.

Os métodos empregados para a quantificação dos parâmetros endoteliais são diversos, dentre os principais retículo fixo e variável, método centro a centro, método do canto, método de comparação. Independente do método do *software* a precisão da avaliação depende da qualidade e nitidez da fotomicroscopia especular obtida (CHAURASIA, VANATHI, 2021). Para determinar a densidade endotelial central, no presente estudo, foi utilizado o método de marcação de centro pelo *software* do equipamento utilizado. A delimitação de número de células varia conforme o estudo, a recomendação mínima de contagem celular é de 30 células para máxima acurácia da área

analisada (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; BINDER; AKERS; ZAVALA, 1979). Nesse experimento foram selecionadas e analisadas 30 células endoteliais de cada córnea avaliada.

A análise endotelial inclui principalmente os parâmetros de densidade celular (células/mm²), área celular, polimegatismo (coeficiente de variação celular) e pleomorfismo (índice de hexagonalidade) (ABIB, 2000; CHAURASIA; VANATHI, 2021). No presente estudo foi determinada a densidade celular e o percentual de células hexagonais do endotélio da córnea. Somente parâmetros da área central foram analisados na presente pesquisa. A análise de regiões periféricas foi comprometida pelo tempo transcorrido entre o abate dos animais e o momento da análise das amostras. Além disso, o tamanho do bulbo ocular de bovinos dificultou a obtenção de imagens periféricas nítidas.

Apesar de não terem sido analisadas as regiões periféricas, estudos anteriores demonstraram que não existe diferença significativa nos parâmetros endoteliais quando comparadas as regiões periféricas com a região central (MCCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; BERCHT *et al.*, 2015; FAGANELLO *et al.*, 2016; BRAMBATTI *et al.*, 2017; HUNNING *et al.*, 2015; VARGAS *et al.*, 2022). Com base nisso, normalmente os dados obtidos na região central podem ser extrapolados para as regiões periféricas.

Somente um estudo foi encontrado onde foi empregada análise do endotélio da córnea de bovinos com microscopia especular (BAHN *et al.*, 1986). Nesse estudo, os autores avaliaram a densidade central de córnea de bovinos em faixa etária adulta e juvenil e encontraram densidade endotelial média de 2500 células/mm², demonstrando semelhança entre a DEC de cães, gatos, coelhos e humanos apesar da diferença do tamanho corneano. Todavia, o número de células endoteliais por córnea de bovinos neste estudo foi estimado pelo cálculo da multiplicação da área da superfície endotelial pela densidade endotelial central, determinada por microscopia especular. Este cálculo de mensuração endotelial é provavelmente mais preciso para córneas esféricas (cães, felinos e coelhos) reproduzindo erros amostrais significativos (cerca de 23%) quando aplicado à córnea elíptica de bovinos, superestimando a densidade endotelial desta espécie (BAHN *et al.*, 1986). No entanto, o presente estudo validou que a DEC média de bovinos adultos foi de 1277,0 células/mm².

Não houve diferença significativa entre a densidade endotelial central entre olhos direito e esquerdo. Nesse trabalho o padrão morfológico predominante foi o hexagonal 74,3% (69,7-78,9), não houve diferença significativa entre as análises morfológicas endoteliais do bulbo ocular direito

e esquerdo, validando outras pesquisas em diferentes espécies (BERTCH *et al.*, 2013; BRAMBATTI *et al.*, 2017; ALBUQUERQUE; FREITAS, PIGATTO, 2015; COYO *et al.*, 2018; VARGAS *et al.*, 2022). Neste estudo apenas córneas de bovinos machos foram analisadas, o sexo não foi uma variável considerada nesta pesquisa. Estudos anteriores mostraram que em córneas saudáveis, não há diferença nos parâmetros endoteliais entre animais machos ou fêmeas estudados (TUFT; COSTER, 1990; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010; BRAMBATTI *et al.*, 2017).

Estudos experimentais avaliaram propriedades de células endoteliais bovinas, demonstrando capacidade proliferativa deste tecido *in vitro*. Pesquisadores sugerem que modelo de cultura de células endoteliais preserva a capacidade de bombeamento de fluidos, onde a taxa de bombeamento celular endotelial foi quantificada pela primeira vez, constituindo um modelo experimental que futuramente pode contribuir para o desenvolvimento de métodos de transplante corneano (NARULA *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 2010). Estudos demonstraram manutenção de capacidade de transporte de fluídos de células endoteliais de bovinos mesmo após preparo amostral como congelamento, esterilização e tempo de análise transcorrido sete horas do momento do abate, análise permitiu identificar presença de aquaporinas (AQP-1) tipo 1 na base apical e basolateral das células endoteliais, que favorecem a manutenção de deturgescência da córnea (WEN *et al.*, 2001). Autores sugeriram presença de entactina nas células endoteliais de bovinos e humanos, proteína da membrana basal que se liga ao colágeno tipo IV, que é responsável pelo processo de reparação corneana e migração de células endoteliais (KATZ *et al.*, 1994).

Um estudo relatou o transplante heterólogo *in vivo* em córneas de gatos, os quais tiveram a camada endotelial removida e substituída por células endoteliais da córnea de bovinos previamente preservadas em meio de cultura. A integridade celular foi analisada a partir do uso do corante vermelho de alizarina, o qual demonstrou a alta capacidade de reorganização e formação de monocamada do enxerto endotelial de bovinos na córnea de gatos dentro de oito dias, mantendo a transparência corneana durante meses após experiência. Os resultados, portanto, mostraram que células do endotélio da córnea de bovinos mantidas em cultivo permanecem funcionais, projetando uma alternativa ao xenotransplante (GOSPODAROWICZ, GREENBURG; ALVARADO, 1979).

Outro estudo demonstrou que o endotélio corneano de bovinos serviu como modelo experimental e teve sucesso de replicação *ex vivo* mediante suplementação de fatores de crescimento, sob controle de temperatura, em meio de cultivo de plasma humano. O meio de cultura

suplementado garantiu a manutenção da transparência corneana e a morfologia hexagonal. Portanto, considerando a limitada capacidade de regeneração do endotélio da córnea, este estudo traz boas perspectivas para que, no futuro, haja maior interesse em elucidar os parâmetros da córnea de bovinos. Dessa forma, o endotélio da córnea de bovinos, se mantido em adequado substrato, pode servir como alternativa para o xenotransplante (CHOU; BURNOUF; WANG, 2014). Considerando as propriedades endoteliais citadas anteriormente, sugere-se a espécie bovina como modelo experimental para transplantes corneanos, entretanto são escassos os estudos envolvendo a morfologia endotelial nesta espécie.

Com a microscopia especular de contato foi possível analisar e mensurar os parâmetros endoteliais da córnea de bovinos. Os dados obtidos servirão de referência para análise do endotélio da córnea de bovinos.

REFERÊNCIAS

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 JR, Jackson. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 27, n. 10, p. 1574-1578, 2001.

ALBUQUERQUE, L.; FREITAS, L.V.R.P; PIGATTO, J.A.T. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. **Semina: Ciências Agrárias**. v.36, n.6, p.4199- 4206,2015.

ANDREW, S.E. *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eye of euthanized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 479-482. 2001.

ANDREW, S. E. *et al.* Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, n. 3, p. 155-161, 1999.

BENETZ, B. A.; LASS, J. H. Specular microscopy. **Cornea**, v. 37, p. S7-S8, 2018.

BERCHT, B. S. **Avaliação do endotélio da córnea de chinchilas (*Chinchilla lanigera*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular**. 2012.p. 46 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

BAHN, C. F. *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative**

Ophthalmology & Visual Science, v. 27, n. 1, p. 44-51, 1986.

BINDER, P. S.; AKERS, P.; ZAVALA, E. Y. Densidade de células endoteliais determinada por microscopia especular e microscopia eletrônica de varredura. **Oftalmologia**, v. 86, n. 10, p. 1831-1847, 1979.

BRAMBATTI, G. **Avaliação do endotélio da córnea de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular**. 2013. p. 41 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

BRANDAO, C. V. S. *et al.* Thickness and density of corneal endothelial cells in ovines. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 16, 2006.

BRASIL.RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 55, de 5 de outubro de 2022. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, v. 192, n. 1, p. 10, 2022.

CHAURASIA S., VANATHI M. Specular microscopy in clinical practice. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 3, p. 517-524, 2021.

CHOU, M.; BURNOUF, T.; WANG, T. Ex vivo expansion of bovine corneal endothelial cells in xeno-free medium supplemented with platelet releasate. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99145, 2014.

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.

COYO, N. *et al.* Corneal thickness, endothelial cell density, and morphological and morphometric features of corneal endothelial cells in goats. **American Journal of Veterinary Research**. Barcelona, Spain, v. 79, n. 10, p. 1087-1092, Oct. 2018a.

COYO, N. *et al.* Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. **Veterinary Ophthalmology**. Barcelona, Spain, p. 1-6, 2015.

COYO, N. *et al.* Endothelial cell density and characterization of corneal endothelial cells in the Tawny Owl (*Strix aluco*) using specular microscopy. **Veterinary Ophthalmology**. Barcelona, Spain, p. 1-6, 2018b.

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

DOUGHTY, M. J.; PETROU, S.; MACMILLAN, H. Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. **Canadian Journal of Zoology**. Waterloo, Canada, v. 73, p. 2159-2165, 1995.

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.

FAGANELLO, C. S. **Morfologia celular endotelial de diferentes regiões da córnea de equinos (*Equus caballus*) após coloração com vermelho de alizarina**. 2014. p. 38 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

FRANZEN, A.; PIGATTO, J. A. T, ABIB, F. *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.

GOSPODAROWSICZ, D.; GREENBURG, G.; ALVARADO, J. Transplantation of Cultured Bovine Corneal Endothelial Cells to Species With Nonregenerative Endothelium: The Cat as an Experimental Model. **Archives Ophthalmology**, v. 97, n. 11, p. 2163–2169, 1979.

HUANG, L. *et al.* A hierarchy of endothelial colony-forming cell activity displayed by bovine corneal endothelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 51, n. 8, p. 3943–3949, 2010.

HÜNNING, P. S. **Morfologia das células do endotélio de diferentes regiões da córnea de cães (*Canis familiaris*) utilizando vermelho de alizarina e microscopia óptica** 2015. p. 62 (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

JIRSOVA, K. *et al.* Various Approaches to the Microscopic Assessment of the Cornea, Visualization and Image Analysis of the Corneal Endothelium. In: JIRSOVA, K. **Light and Specular Microscopy of the Cornea**. 1 ed. Springer International Publishing, 2017. p. 59-71.

KATZ, A. *et al.* Entactin/Nidogen: Synthesis by bovine corneal endothelial cells and distribution in the human cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. Jerusalem, Israel, v. 35, n. 2, p. 495-502, Feb. 1994.

KLAIS, C. MC; BÜHREN, J.; KOHNEN, T. Comparison of endothelial cell count using confocal and contact specular microscopy. **Ophthalmologica**, v. 217, n. 2, p. 99-103, 2003.

KOBASHIGAWA, K. K. *et al.* Parâmetros oftalmológicos em cães adultos Shih Tzu. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1280-1285, 2015.

LAING, R. A., SANDSTROM, M. M., LEIBOWITZ, H. M. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. **Archives of Ophthalmology**, v. 97, n. 9, p. 1714-1719, 1979.

LWIGALE, P. Y. Nuclear morphologies of bovine corneal cells as visualized by confocal microscopy. **Cells tissues organs**, v. 165, n. 2, p. 104-112, 1999.

- 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.
- McCAREY, B.E, EDELHAUSER, H.F, LYNN, M.J. Review of corneal endothelial specular microscopy for fda clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular drugs and solutions. **Cornea**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2008.
- MILLER, W. W. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 16, n. 1, p. 51-57, 2001.
- MIMURA, T., YAMAGAMI, S., AMANO, S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. **In Progress in Retinal and Eye Research**, v. 35, p. 1–17, 2013.
- MORITA, H.; SHIMOMURA, K. Specular microscopy of the corneal endothelial cells in common marmosets. **The Journal of Veterinary Medical Science**. Kawasaki, Japan, v. 58, n. 3, p. 277-279, 1996.
- NARULA, P. *et al.* Fluid transport across cultured bovine corneal endothelial cell monolayers. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 262, n. 1, p. C98-C103, 1992.
- NISHIDA, T; SAIKA, S.; MORISHIGE, N. Cornea and Sclera: Anatomy and Physiology. In: MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. **Cornea**. 5 ed. Elsevier, 2022. p. 33-54.
- PIGATTO, J. AT *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, 2004a.
- 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 de Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004b.
- PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C.; PEREIRA, G.T. *et al.* Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 476-480, 2006.
- PIGATTO, J. A.T *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 427-430, 2008.
- PIGATTO, J.A.T.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M. *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, 2005.

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.

PRICE, N. C.; CHENG, H. Microscopia especular de contato e sem contato. **British Journal of Ophthalmology**, v. 65, n. 8, p. 568-574, 1981.

SPINOZZI, D. *et al.* New developments in corneal endothelial cell replacement. **Acta Ophthalmologica**, v. 99, n. 7, p. 712-729, 2021.

TAMAYO-ARANGO, L.J.; BARALDI-ARTONI, S.M.; LAUS, J.L. *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.

TOFFLEMIRE, K.L.; WHITLEY, E.M.; GOULD, S.A. *et al.* Schirmer tear test I and rebound tonometry findings in healthy calves. **Veterinary Ophthalmology.**, v.18, p.147-151, 2015.

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

VARGAS, E.V.B. *et al.* **Avaliação do endotélio da córnea de suínos (*Sus scrofa domesticus*) utilizando a microscopia especular.** 2022. p.44 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

WEN, Q. *et al.* Immunocytochemical localization of aquaporin-1 in bovine corneal endothelial cells and keratocytes. **Experimental biology and medicine**, v. 226, n. 5, p. 463-467, 2001.

ZAVALA, J. *et al.* Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. **Eye**, v. 27, n. 5, p. 579-588, 2013.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microscopia especular de contato viabilizou a avaliação e a documentação de parâmetros do endotélio bovino. Os dados obtidos através deste estudo proporcionaram uma base mais ampla de conhecimento referente à densidade celular e a morfologia endotelial e servirão como critérios para avaliação do endotélio da córnea de bovinos. Com relação a morfologia endotelial observou-se predomínio de células hexagonais.

REFERÊNCIAS

- 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 JR, J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 27, n. 10, p. 1574-1578, 2001.
- ALBUQUERQUE, L.; FREITAS, L.V.R.P; PIGATTO, J.A.T. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. **Semina: Ciências Agrárias**. v.36, n.6, p.4199- 4206,2015.
- ANDRADE, M.C.C. *et al.* Evaluation of equine corneal endothelium after exposure to 0.05% brilliant blue – an in vitro study. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 1, n. 4, p. 1158-1164, 2019.
- ANDREW, S.E. *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eye of euthanized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 479-482. 2001.
- ANDREW, S. E. *et al.* Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, n. 3, p. 155-161, 1999.
- ANDREW, S. E.; WILLIS, A. M.; ANDERSON, D. E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 3, p. 326-329, 2002.
- BENETZ, B. A.; LASS, J. H. Specular microscopy. **Cornea**, v. 37, p. S7-S8, 2018.
- BERCHT, B. S. **Avaliação do endotélio da córnea de chinchilas (*Chinchilla lanigera*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular**. 2012.p. 46 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- BAHN, C. F. *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 27, n. 1, p. 44-51, 1986.
- BINDER, P. S.; AKERS, P.; ZAVALA, E. Y. Densidade de células endoteliais determinada por microscopia especular e microscopia eletrônica de varredura. **Oftalmologia**, v. 86, n. 10, p. 1831-1847, 1979.

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. M.; NELSON, L. R.; HODGE, D. O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 3, p. 779-782, 1997.

BRAMBATTI, G. **Avaliação do endotélio da córnea de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular**. 2013. p. 41 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

BRANDAO, C. V. S. *et al.* Thickness and density of corneal endothelial cells in ovines. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 16, 2006.

BRAUN, M. *et al.* Study of congenital Morgagnian cataracts in Holstein calves. **Plos one**, v. 14, n. 12, p. e0226823, 2019.

CHAURASIA S, VANATHI M. Specular microscopy in clinical practice. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.69, n.3, p. 517-524, 2021.

CHOU, M.; BURNOUF, T.; WANG, T. Ex vivo expansion of bovine corneal endothelial cells in xeno-free medium supplemented with platelet releasate. **Plos one**, v. 9, n. 6, p. e99145, 2014.

CLEROT, L. L. *et al.* Morphology of endothelial cells from different regions of the swine cornea. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 1-6, 2019.

COLLIN, S.P, COLLIN, H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v.8, n.6, p. 245-254, 1998.

COYO, N. *et al.* Corneal thickness, endothelial cell density, and morphological and morphometric features of corneal endothelial cells in goats. **American Journal of Veterinary Research**. Barcelona, Spain, v. 79, n. 10, p. 1087-1092, Oct. 2018a.

COYO, N. *et al.* Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. **Veterinary Ophthalmology**. Barcelona, Spain, p. 1-6, 2015.

COYO, N. *et al.* Endothelial cell density and characterization of corneal endothelial cells in the Tawny Owl (*Strix aluco*) using specular microscopy. **Veterinary Ophthalmology**. Barcelona, Spain, p. 1-6, 2018b.

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

DOUGHTY, M. J.; PETROU, S.; MACMILLAN, H. Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. **Canadian Journal of Zoology**. Waterloo, Canada, v. 73, p.

2159-2165, 1995.

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. G.; 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.

EGHRARI, A. O.; RIAZUDDIN, S. A.; GOTTSCH, J. D. Overview of the cornea: structure, function, and development. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 134, p. 7-23, 2015.

FAGANELLO, C. S. **Morfologia celular endotelial de diferentes regiões da córnea de equinos (*Equus caballus*) após coloração com vermelho de alizarina**. 2014. p. 38 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

FRANZEN, A.; PIGATTO, J.A.T, ABIB, F. *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.

GUIMARÃES, C. B. *et al.* Effects of atracurium besylate on corneal endothelium of chickens: in vitro study. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 70-74, 2019.

GOSPODAROWSICZ, D.; GREENBURG, G.; ALVARADO, J. Transplantation of Cultured Bovine Corneal Endothelial Cells to Species With Nonregenerative Endothelium: The Cat as an Experimental Model. **Archives Ophthalmology**, v. 97, n. 11, p. 2163–2169, 1979.

HOEHN, A. L. *et al.* Comparison of ultrasonic pachymetry and Fourier-domain optical coherence tomography for measurement of corneal thickness in dogs with and without corneal disease. **The Veterinary Journal**, v. 242, p. 59-66, 2018.

HUANG, L. *et al.* A hierarchy of endothelial colony-forming cell activity displayed by bovine corneal endothelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 51(8), 3943–3949, 2010.

HÜNNING, P. S. **Morfologia das células do endotélio de diferentes regiões da córnea de cães (*Canis familiaris*) utilizando vermelho de alizarina e microscopia óptica** 2015. p. 62 (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

JIRSOVA, K. *et al.* Various Approaches to the Microscopic Assessment of the Cornea, Visualization and Image Analysis of the Corneal Endothelium. In: JIRSOVA, K. **Light and Specular Microscopy of the Cornea**. 1 ed. Springer International Publishing, 2017. p. 59-71.

JOYCE, N. C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. **Progress in retinal and eye research**, v. 22, n. 3, p. 359-389, 2003.

JOYCE, N. C. Cell cycle status in human corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v. 81, n. 6, p. 629-638, 2005.

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.

KATZ, A. *et al.* Entactin/Nidogen: Synthesis by bovine corneal endothelial cells and distribution in the human cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. Jerusalem, Israel, v. 35, n. 2, p. 495-502, Feb. 1994.

KLAIS, C. MC; BÜHREN, J.; KOHNEN, T. Comparison of endothelial cell count using confocal and contact specular microscopy. **Ophthalmologica**, v. 217, n. 2, p. 99-103, 2003.

KOBASHIGAWA, K. K. *et al.* Parâmetros oftalmológicos em cães adultos Shih Tzu. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1280-1285, 2015.

KURT, B. K. Central corneal thickness increases with age in cattle. **Large Animal Review**, v. 27, n. 4, p. 195-198, 2021.

LAING, R. A., SANDSTROM, M. M., LEIBOWITZ, H. M. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. **Archives of Ophthalmology**, v. 97, n. 9, p. 1714-1719, 1979.

LEE, J. *et al.* Central and peripheral corneal endothelial cell analysis with slit-scanning wide-field contact specular microscopy: Agreement with noncontact specular microscopy. **Cornea**, v. 38, n. 9, p. 1137-1141, 2019.

LWIGALE, P. Y. Nuclear morphologies of bovine corneal cells as visualized by confocal microscopy. **Cells tissues organs**, v. 165, n. 2, p. 104-112, 1999.

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.

MAGGS, D. J. Diseases of the cornea and sclera. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. Elsevier, p. 213-253, 2018.

McCAREY, B.E, EDELHAUSER, H.F, LYNN, M.J. Review of corneal endothelial specular microscopy for fda clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular

drugs and solutions. **Cornea**, v.27,n.1,p. 1-16, 2008.

MARTINS,B. Food and Fiber Animal Ophtalmology. In: Veterinary Ophthalmology (ed. Gelatt KN). John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, p. 1983-2021, 2021.

MEEKINS, J. M., RANKIN, A. J., SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. In: Veterinary Ophthalmology (ed. Gelatt KN). John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, p. 41-123, 2021.

MIMURA, T., YAMAGAMI, S., AMANO, S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. **In Progress in Retinal and Eye Research**, v. 35, p. 1–17, 2013.

MORAIS, T. L. *et al.* Evaluation of tear production, intraocular pressure, retinography and ocular biometry in bovine Nelore and Gir breeds. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 177-186, 2019.

MORITA, H.; SHIMOMURA, K. Specular microscopy of the corneal endothelial cells in common marmosets. **The Journal of Veterinary Medical Science**. Kawasaki, Japan, v. 58, n. 3, p. 277-279, 1996.

NARULA, PRAMOD *et al.* Fluid transport across cultured bovine corneal endothelial cell monolayers. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 262, n. 1, p. C98-C103, 1992.

MILLER, William W. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 16, n. 1, p. 51-57, 2001.

NISHIDA, T; SAIKA, S.; MORISHIGE, N. Cornea and Sclera: Anatomy and Physiology. In: MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. **Cornea**. 5 ed. Elsevier, 2022. p. 33-54.

OLLIVIER, F. J. *et al.* Corneal thickness and endothelial cell density measured by non-contact specular microscopy and pachymetry in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with laser-induced ocular hypertension. **Experimental Eye Research**, v. 76, n. 6, p. 671-677, 2003.

PARK, Sunju *et al.* Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. **Cornea**, v. 31, n. 12, p. 1476-1479, 2012.

PECHE, N.; EULE, J. C. Intraocular pressure measurements in cattle, sheep, and goats with 2 different types of tonometers. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 82, n. 3, p. 208-215, 2018.

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, 2004a.

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 de Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004b.

PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C.; PEREIRA, G.T. *et al.* Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.4, p. 476-480,2006.

PIGATTO, J. A.T *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 427-430, 2008.

PIGATTO, J. A.T *et al.* Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 4, p. 702-705, 2005.

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.

PRICE, N. C.; CHENG, H. Microscopia especular de contato e sem contato. **British Journal of Ophthalmology**, v. 65, n. 8, p. 568-574, 1981.

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, n. 7, p. 818-824, 2008.

SPINOZZI, D. *et al.* New developments in corneal endothelial cell replacement. **Acta Ophthalmologica**, v. 99, n. 7, p. 712-729, 2021.

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

TAYLOR, MICHAEL J.; HUNT, CHARLES 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.

TERZARIOL, M. *et al.* Effects of intracameral brilliant blue on the corneal endothelium of swine: in vitro study. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 775-780, 2016.

TOFFLEMIRE, K.L.; WHITLEY, E.M.; GOULD, S.A. *et al.* Schirmer tear test I and rebound tonometry findings in healthy calves. **Veterinary Ophthalmology**., v.18, p.147-151, 2015.

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

VARGAS, E.V.B. *et al.* **Avaliação do endotélio da córnea de suínos (*Sus scrofa domesticus*)**

utilizando a microscopia especular. 2022. p.44 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

VIEIRA NETTO, M. *et al.* Corneal wound healing response following different modalities of refractive surgical procedures. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 68, p. 140-149, 2005.

VIRTANEN, JUKKA *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.

WEN, Q. *et al.* Immunocytochemical localization of aquaporin-1 in bovine corneal endothelial cells and keratocytes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 5, p. 463-467, 2001.

WEBB, A.A; CULLEN, C.L. Ocular Manifestations of Systemic Disease. Part 4. Food Animals. In: **Veterinary Ophthalmology** (ed. Gelatt KN). John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, p. 2535-2569, 2021.

WIESER, B.; TICHY, A.; NELL, B. Correlation between corneal sensitivity and quantity of reflex tearing in cows, horses, goats, sheep, dogs, cats, rabbits, and guinea pigs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 16, n. 4, p. 251-262, 2013.

ZAVALA, J. *et al.* Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. **Eye**, v. 27, n. 5, p. 579-588, 2013.