

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

**MORFOLOGIA CELULAR ENDOTELIAL DE DIFERENTES REGIÕES
DA CÓRNEA DE EQUINOS (*Equus caballus*) COM A COLORAÇÃO
VERMELHO DE ALIZARINA**

Claudia Skilhan Faganello

PORTO ALEGRE

2014

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

**MORFOLOGIA CELULAR ENDOTELIAL DE DIFERENTES REGIÕES
DA CÓRNEA DE EQUINOS (*Equus caballus*) APÓS COLORAÇÃO COM
VERMELHO DE ALIZARINA**

Autor: Claudia Skilhan Faganello

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal -
Equinos.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Skilhan Faganello, Claudia
MORFOLOGIA CELULAR ENDOTELIAL DE DIFERENTES
REGIÕES DA CÔRNEA DE EQUINOS (Equus caballus) COM A
COLORAÇÃO VERMELHO DE ALIZARINA / claudia Skilhan
Faganello. -- 2014.
46 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. equinos. 2. morfologia. 3. endotélio da córnea.
I. Tadeu Pigatto, João Antonio , orient. II. Título.

Claudia Skilhan Faganello

**MORFOLOGIA CELULAR ENDOTELIAL DE DIFERENTES REGIÕES DA
CÓRNEA DE EQUINOS (*Equus caballus*) APÓS COLORAÇÃO COM
VERMELHO DE ALIZARINA**

Aprovado em

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi
Membro da Comissão

Prof. Dr. André Silva Carissimi
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio Kwitko
Membro da Comissão

Aos meus filhos, Thiago e ao Henrique.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar tudo o que tenho.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional. Ao Luciano, pelo companheirismo e apoio. Aos meus filhos Thiago e Henrique por entenderem porque a mamãe se ausentou em momentos importantes. Amo vocês acima de tudo.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a execução deste estudo ou que me acompanharam durante este período de formação, com compreensão e paciência, que permitiu o planejamento, a execução e conclusão desta Tese de Mestrado. Agradeço em especial:

Ao meu orientador, Prof. Pigatto, pessoa de grande humanismo, ensinou-me oftalmologia, pesquisa e que a busca do conhecimento deve ser contínua, do qual me orgulho de ter sido sua orientada.

Agradecimento a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a Faculdade de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal-Equinos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo de Costa Mattos pela disponibilização do microscópio óptico e máquina fotográfica adaptada para captura de imagens em microscópio óptico.

Agradeço a toda equipe do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS pela dedicação e vontade com que realizam os atendimentos, procedimentos cirúrgicos e projetos de pesquisa.

Agradeço as doutorandas Paula Steven Hünning, Maria Cristina Caldarte de Andrade, Fabiana Quartiero Pereira e a mestranda Vanessa Ruiz, pelo companheirismo sempre demonstrado, pelo conhecimento dividido e amizade.

A equipe do Frigorífico Foresta de São Gabriel - RS, pela receptividade e oportunidade de coletar o material.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, pela bolsa de estudos concedida.

Finalmente gostaria de agradecer sinceramente a banca examinadora, que disponibilizou o seu tempo para avaliar este trabalho de pesquisa.

RESUMO

Objetivo: O endotélio é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea, sendo fundamental na manutenção da transparência desta estrutura. Objetivou-se avaliar a morfologia de diferentes regiões da córnea de equinos após coloração com vermelho de alizarina utilizando a microscopia óptica. **Procedimentos:** Foram estudados 16 bulbos oculares de oito equinos, machos ou fêmeas, de diferentes faixas etárias. O endotélio da córnea foi corado com o corante vital vermelho de alizarina (Alizarin Red S, Sigma Aldrich), dissolvido previamente em solução isotônica (0,2g/100mL), com pH ajustado para 4,2 com ácido clorídrico, e após examinado com microscópio óptico e fotografado. Foi avaliada a morfologia endotelial das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal da córnea. De cada região da córnea, foram analisadas 100 células endoteliais. Foi realizada a análise de variância (ANOVA). **Resultados:** A porcentagem média de células hexagonais na região superior da córnea foi de $57,78 \pm 3,14$ %, na região inferior foi de $58,62 \pm 6,413$ %, na região temporal foi de $56,14 \pm 6,749$ %, na região nasal foi de $56,88 \pm 6,296$ %, na região central dos equinos foi de $55,43 \pm 4,464$ %. O percentual de células com menos de seis lados foi $22,72 \pm 3,04$ % para a região central, $20,81 \pm 3,534$ % para a região superior, $20,14 \pm 3,82$ % para a região inferior, $21,66 \pm 4,04$ % para a região temporal, $21,60 \pm 3,04$ % para a região nasal. O percentual de células com mais de seis lados foi de $21,85 \pm 3,99$ % para a região central, $21,31 \pm 3,81$ % para a região superior, $21,24 \pm 4,08$ % para a região inferior, $22,2 \pm 4,88$ % para a região temporal, $21,52 \pm 4,71$ % para a região nasal. Com relação à morfologia não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões da córnea avaliadas. **Conclusão:** A microscopia óptica e a coloração com vermelho de alizarina possibilitaram a análise e a documentação do endotélio da córnea de equinos. No que diz respeito à morfologia, não existem diferenças entre as regiões da córnea de equinos.

Descritores: equinos, morfologia, endotélio da córnea.

ABSTRACT

Objective: The endothelium is a single layer of flattened, interlocking polygonal cells lining the posterior surface of the cornea; its main function is to maintain the transparency of this structure. The objective was to evaluate the morphology of different regions of the equine cornea by optical microscopy after staining with alizarin red.

Procedures: 16 eye bulbs of eight horses, male or female, of different ages were studied. The corneal endothelium was stained with alizarin red vital dye (Alizarin Red S, Sigma Aldrich), previously dissolved in isotonic solution (0.2g / 100 mL) with pH adjusted to 4.2 with hydrochloric acid. The corneal endothelium was examined by optical microscope and photographed. Endothelial morphology of central, superior, inferior, temporal and nasal cornea was evaluated. One hundred endothelial cells of each cornea region were analyzed. Analysis of variance (ANOVA) was performed.

Results: The percentage of hexagonal cells in the upper region was $57,78 \pm 3,14$ %, in the lower region was $58,62 \pm 6,413$ %, in temporal region was $56,14 \pm 6,749$ %, in the nasal region was $56,88 \pm 6,296$ %, in the central region was $55,43 \pm 4,464$ %. The percentage of cells with less than six sides was $22,72 \pm 3,04$ % for the region central, $20,81 \pm 3,534$ % for the upper region, $20,14 \pm 3,82$ % for the lower region, $21,66 \pm 4,04$ % for the temporal region, $21,60 \pm 3,04$ % for the nasal region. The percentage of cells with more than six sides was $21,85 \pm 3,99$ % for the region central, $21,31 \pm 3,81$ % for the upper region, $21,24 \pm 4,08$ % for the lower region, $22,2 \pm 4,88$ % for the temporal region, $21,52 \pm 4,71$ % for the nasal region. Regarding to morphology there was no statistically significant difference between the regions of the evaluated corneas.

Conclusion: Optical microscopy and staining with Alizarin red enabled the analysis and documentation of the corneal endothelium of horses. There are no differences in endothelial cell morphology in different regions of the cornea of horses.

Keywords: horses, morphology, corneal endothelium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: por cento

&: e

μm^2 : micrômetros quadrados

μ : micrômetro

D: dioptrias

et al.: e outros

Células/ mm^2 : células por milímetro quadrado

CV: coeficiente de variação

DP: desvio padrão

Dr.: Doutor

OD: olho direito

OE: olho esquerdo

mg: miligramas

min: minuto

mm: milímetros

mm^2 : milímetro quadrado

MEV: microscopia eletrônica de varredura

p: probabilidade

Prof.: Professor

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Fotomicrografia do endotélio corneal normal de equino com a coloração vermelho de alizarina com aumento de 40 vezes. 28
- Figura 2 -** Fotomicrografia do endotélio corneal normal de equino com a coloração vermelho de alizarina. Nota-se endotélio íntegro com padrão regular de células poligonais e predomínio da forma hexagonal (55%) com aumento de 40 vezes. 29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	Anatomofisiologia da córnea	13
3.2	Endotélio corneano	14
3.2.1	Fisiologia endotelial	16
3.2.2	Reparação endotelial	16
3.3	Métodos de avaliação do endotélio corneano	19
3.3.1	Microscopia óptica e corantes vitais	21
4	ARTIGO: Morfologia celular endotelial de diferentes regiões da córnea de equinos (<i>Equus caballus</i>) após coloração com vermelho de alizarina	24
	Resumo	24
	Introdução	26
	Materiais e métodos	27
	Resultados	29
	Discussão e conclusão	29
	Referências	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea (TUFT & COSTER, 1990; McCAREY *et al.*, 2008). Na maioria dos vertebrados, o mosaico endotelial é formado por células com formato hexagonal, embora também possam ser encontradas células com quatro, cinco, sete e oito lados (SVEDBERGH & BILL, 1972; COLLIN & COLLIN, 1998, PIGATTO, 2004a).

O endotélio da córnea é derivado da crista neural durante o desenvolvimento embrionário (BAHN *et al.*, 1986; BOURNE, 2003). Desempenha um papel importante na regulação da hidratação do estroma e na manutenção da transparência da córnea. Esta função é executada por meio de bombas metabolicamente ativas no endotélio da córnea (ABIB, 2006; ABIB *et al.*, 2012).

Para análise morfométrica e morfológica da célula endotelial deve-se avaliar: a área celular \pm DP (mm^2), a densidade de células ($\text{células}/\text{mm}^2$), polimegatismo (coeficiente de variação, CV), e pleomorfismo (% de células de 6 lados). Estes parâmetros morfológicos são importantes na saúde da córnea (LAING *et al.*, 1976; GWIN *et al.*, 1982; PIGATTO *et al.*, 2004a; RUGGERI *et al.*, 2010). Os valores de referência em algumas espécies já foram estudados, incluindo: humanos (LAULE *et al.*, 1978; ABIB & BARRETO, 2001), suínos (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009), coelhos (SAILSTAD & PEIFFER, 1981; ALP *et al.*, 2000; OJEDA *et al.*, 2001), cães (GWIN *et al.*, 1982; RODRIGUES *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008), equinos (ANDREW *et al.*, 2001; LEDBETTER & SCARLETT, 2009), lhamas, alpacas (ANDREW *et al.*, 2002), gatos (PEIFFER *et al.*, 1981; FRANZEN, 2010), ovinos (BRANDÃO *et al.*, 2006), pingüins de Magalhães (PIGATTO *et al.*, 2005b) e jacarés do pantanal (PIGATTO *et al.*, 2004b).

Várias técnicas podem ser utilizadas com o objetivo de avaliar o endotélio da córnea, incluindo métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro*. Das técnicas preconizadas, a coloração por vermelho de alizarina é uma técnica *in vitro* de fácil e rápida execução, e de baixo custo (SPERLING, 1977; RUIZ, MEDRANO & ALÍO, 1991). O vermelho de alizarina é um corante intercelular que cora a membrana de Descemet (IGNACIO *et al.*, 2005) e pode aumentar a visibilidade do contorno celular e

assim permitir uma estimativa mais confiável dos parâmetros morfológicos (RODRIGUES *et al.*, 2009; RUGGERI *et al.*, 2010).

Estudos foram realizados utilizando a microscopia especular para análise do endotélio da córnea de equinos, avaliando somente a densidade endotelial (ANDREW *et al.*, 2001; LEDBETTER & SCARLETT, 2009). Com o advento de novas técnicas de avaliação endotelial, grandes avanços foram obtidos no que diz respeito à análise endotelial. No entanto, no que diz respeito à morfologia das células do endotélio da córnea de equinos não foram encontradas referências detalhadas a respeito do tema.

2 OBJETIVO

Avaliar a morfologia endotelial das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal do endotélio da córnea de equinos (*Equus caballus*), com o corante vital vermelho de alizarina, através de imagens obtidas por microscopia óptica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomofisiologia da córnea

A córnea é a extensão transparente da esclera e faz parte da túnica fibrosa do bulbo do olho. A transição entre a esclera opaca e a córnea transparente ocorre abruptamente na junção corneoescleral, também conhecida como limbo (BANKS, 1992). A função principal corneal é a refração dos raios luminosos (MURPHY *et al.*, 2012).

Histologicamente a córnea de equinos possui quatro camadas, incluindo o epitélio, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (MURPHY *et al.*, 2012). A nutrição da córnea é feita através de processos de difusão do plexo venoso perilimbal e também, em menor escala, do humor aquoso e filme lacrimal pré-corneal (BANKS, 1992).

A córnea é ricamente suprida por nervos sensoriais derivados da ramificação do quinto nervo craniano (SLATTER, 2005). No limbo existem vasos sanguíneos que assumem importante papel nos processos inflamatórios, na nutrição da córnea e na cicatrização corneal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A transparência corneana deve-se a ausência de vasos sanguíneos, linfáticos e de pigmento, sua superfície epitelial não é queratinizada, as fibras nervosas são amielínicas, o controle do estado de deturgescência realizado pelo endotélio e a disposição regular e altamente organizada das fibras colágenas no estroma (SLATTER, 2005).

A córnea em equinos apresenta um formato oval, com o diâmetro horizontal ligeiramente maior do que o diâmetro vertical. Normalmente, a córnea de equinos adultos mede em torno de 29,7 a 34,0 mm horizontalmente e 23,0 a 26,5 milímetros

verticalmente, e 20,5 a 26,6 milímetros horizontalmente e 19,5 a 24,0 milímetros verticalmente em cavalos mais jovens (ANDREW & WILLIS, 2005; CLODE, 2011). Em cavalos da raça Rocky Mountain, o diâmetro da córnea e sua espessura aumentam com a idade (RAMSEY *et al.*, 1999), enquanto que não foram observadas variações estatisticamente significativas na espessura da córnea com o avanço da idade, sexo, ou densidade de células endoteliais, em Mini Horse ou cavalos de outras raças (ANDREW *et al.*, 2001; PLUMMER *et al.*, 2003).

Em estudos usando a paquimetria ultrassônica em equinos foram encontrados uma espessura corneana central média de 770-893 microns (RAMSEY *et al.*, 1999; PLUMMER *et al.*, 2003; ANDREW *et al.*, 2001; MOCHAL *et al.*, 2010). Em comparação com outros mamíferos, a córnea equina é relativamente plana quando comparada a outras espécies, com uma curvatura média de $16,46 \pm 1,5$ D em cavalos adultos. Em cavalos da raça Rocky Mountain a curvatura média foi em torno de $20,59 \pm 1,72$ D (CLODE, 2011). A espessura corneana apresenta-se significativamente mais espessa nas regiões dorsal e ventral em relação à região central, medial e lateral. Potros com menos de um ano de idade apresentam 15,4 D, sendo de 1,06-6,14 D maior que a curvatura da córnea medida para cavalos adultos (TOWNSEND *et al.*, 2013).

3.2 Endotélio corneano

O endotélio constitui-se na estrutura mais posterior da córnea, sendo embriologicamente derivado da crista neural (JOHNSTON *et al.*, 1979; BAHN *et al.*, 1986; BOURNE, 2003). É uma monocamada de células poligonais uniformes em forma e tamanho, tendo a maioria formato hexagonal (RAO *et al.*, 1982; DOUGHTY, 1998) porém, podem ser encontradas células com quatro, cinco, sete e oito lados (TUFT & COSTER, 1990; DOUGHTY, 1998). Em humanos e leporinos a córnea saudável possui entre 65 e 75% das células com padrão hexagonal (RAO *et al.*, 1982; AABERG, 1984; DOUGHTY, 1998).

A membrana celular do endotélio tem uma face posterior formada por microvilosidades e uma face anterior voltada a membrana de Descemet. Estas faces possuem vesículas pinocíticas, contendo substancias que serão utilizadas pelas células estromais da córnea (TUFT & COSTER, 1990; BOTEON, 2000).

O endotélio da córnea, em sua superfície posterior, entra em contato com o humor aquoso, estando na face anterior em íntimo contato com a membrana de

Descemet. Lateralmente, continua como endotélio do trabeculado escleral (ABIB, 2000).

A superfície celular anterior do endotélio está em contato direto com a membrana de Descemet, não havendo complexos juncionais. Isto explica o fato das células endoteliais serem facilmente deslocadas por traumas mecânicos ou de forma proposital durante cirurgias intraoculares (TUFT & COSTER, 1990).

As microvilosidades, encontradas na membrana celular posterior, são estruturas que aumentam a superfície posterior das células endoteliais (BOTEON, 2000). As interdigitações são prolongamentos da membrana lateral das células endoteliais, responsáveis pelo aumentando da superfície de contato entre elas. As interdigitações podem estar associadas à função de bomba ativa destas células (OJEDA *et al.*, 2001). Ao longo das margens laterais das células endoteliais, há as junções celulares, tipo *zonula occludens*, a qual une as células do terço posterior próxima à câmara anterior, e em *macula occludens* e *macula adherens*, as quais se encontram nos dois terços anteriores das membranas laterais, porém são raras. A *macula adherens* foi denominada anteriormente de desmossoma (BOTEON, 2000).

O citoplasma da célula endotelial é rico em organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, bem como um desenvolvido aparato de golgi perinuclear. Isto sugere transporte ativo e produção de proteínas. As vesículas pinocíticas passam da membrana celular posterior para serem liberadas tanto no espaço celular lateral ou na membrana celular anterior (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990). A sua formação é dependente da temperatura e estão presumidamente ligadas com o transporte ativo de água e metabólitos. Os grânulos de pigmento podem aparecer no citoplasma, provavelmente provenientes da melanina fagocitada que fora liberada pelo estroma da íris ou pelo epitélio pigmentar (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990).

A técnica de microscopia especular permite avaliar a densidade endotelial e documentar as células do endotélio da córnea de humanos e animais (ABIB, 2000; PIGATTO *et al.*, 2006). Andrew e colaboradores (2001) avaliaram o endotélio da córnea de equinos utilizando a microscopia especular de não contato e obtiveram densidade endotelial média de 3155 células por milímetro quadrado, não apresentando variação significativa em relação ao sexo e em relação ao olho direito e esquerdo. No entanto não verificaram diminuição da densidade celular estatisticamente significativa com o avanço da idade. A densidade endotelial média na porção ventral da córnea de equinos foi de

2968 células por milímetro quadrado, sendo significativamente menor que a densidade média nas porções medial e lateral, com valores de 3259 células por milímetro quadrado e 3250 células por milímetro quadrado, respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa entre as regiões dorsal e central, com valores de 3086 e 3216 células por milímetro quadrado.

Num estudo em equinos, Ledbetter e Scarlett (2009), utilizando a microscopia confocal encontraram densidade celular média na região central de 3002 células por mm^2 , e o endotélio composto por uma camada uniforme de células predominantemente hexagonais e pentagonais, com tamanho de 20-25 μm de diâmetro.

3.2.1 Fisiologia endotelial

A transparência e espessura corneal normal é mantida pelo endotélio da córnea através da função de barreira biológica, pela bomba endotelial metabolicamente ativa (MISHIMA, 1982; YEE *et al.*, 1985). A saída de fluido da córnea depende do metabolismo aeróbico por meio do transporte ativo de íons de bicarbonato, sódio e potássio. A energia utilizada na forma de ATP é produzida a partir da glicose nas mitocôndrias, através do ciclo de Krebs e da via das pentoses-fosfato. O oxigênio requerido pelas células endoteliais é difundido primariamente através da câmara anterior. O movimento de fluido através do endotélio acontece de forma passiva e segue o fluxo dos íons que são ativamente transportados pela membrana posterior das células endoteliais (MISHIMA, 1982; YEE *et al.*, 1985; SLATTER, 2005).

A permeabilidade endotelial está relacionada com o peso molecular de cada substância; assim, os solutos passam por difusão simples, através dos espaços teciduais. A passagem de solutos reflete a patência dos complexos juncionais desta camada celular, considerando-se que as junções *gap* são as principais barreiras contra a permeabilidade dos solutos (MISHIMA, 1982).

3.2.2 Reparação endotelial

A regeneração endotelial é espécie-dependente. Em algumas espécies, incluindo seres humanos adultos, primatas, felinos e caninos, as células endoteliais apresentam

baixa atividade mitótica; em vez disso, elas aumentam de tamanho e migram para manter a monocamada funcional (VAN HORN *et al.*, 1977; GWIN *et al.*, 1982). Existem estudos nessas e em outras espécies que comprovam a assertiva (VAN HORN *et al.*, 1977; RAO *et al.*, 1978; BEFANIS *et al.*, 1981; ILMONEN *et al.*, 1984; OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA *et al.*, 1985; LANDSHMAN *et al.*, 1988; HUANG *et al.*, 1989; PETROLL *et al.*, 2001). Em coelhos, além de hipertrofia e migração celular, a reparação endotelial ocorre devido à mitose celular (OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA *et al.*, 1985; ICHIJIMA *et al.*, 1993).

O endotélio corneano esta sujeito à perda de células por uma série de fatores; esta perda está associada com uma diminuição de função da barreira endotelial (O'NEAL *et al.*, 1986; GONZÁLEZ-MÉIJOME *et al.*, 2010), cuja caracterização quantitativa é de interesse clínico para monitorar a saúde da córnea (DOUGHT, 1989; GONZÁLEZ-MÉIJOME *et al.*, 2010).

Ao longo da vida acontece uma diminuição da fisiológica na densidade endotelial. A densidade das células endoteliais diminui com aumento da idade em diversas espécies. Em humanos, a perda celular é mais intensa nos primeiros cinco anos de vida, em parte devido ao aumento do bulbo ocular e crescimento da córnea (TUFT & COSTER 1990; ABIB, 2000). Entretanto, diversas afecções também podem reduzir a densidade endotelial abaixo do limite mínimo para a manutenção da transparência corneana: traumas mecânicos ou químicos, hipertensão ocular, cirurgias intraoculares, toxicidade a fármacos intracamerulares, doenças sistêmicas como *Diabetes mellitus* e inflamação intraocular podem ocasionar diversos graus de lesão endotelial. Estima-se que sejam necessárias ao menos de 10 a 15% de células da densidade endotelial normal para manter a transparência da córnea (MISHIMA *et al.*, 1982; TUFT & COSTER, 1990). Edema da córnea ocorre quando um número crítico mínimo da densidade de células endoteliais é atingido. Este número não foi ainda estabelecido em cavalos (GILGER & STOPPINI, 2011).

Em equinos, disfunção endotelial associada tanto com distrofia ou degeneração das células endoteliais é uma condição relativamente rara, podendo ser unilateral ou bilateral, sem predileção por raça (CLODE, 2011). Diversas afecções também podem afetar a densidade endotelial como córnea globosa em cavalos da raça Rocky Mountain, uveíte recorrente, luxação anterior da lente e glaucoma (ANDREW *et al.*, 2001).

Quando as células do endotélio morrem, as remanescentes não têm capacidade para se multiplicar rápido o suficiente para substituir as perdas; essas se hipertrofiam e

migram para cobrir o defeito e manter a preservação do mosaico em monocamada (SHENG & BULLIMORE, 2007). Porém, nem todas as células do endotélio hipertrofiam-se em grau semelhante; algumas células tornam-se maiores que outras e, ocorre aumento na variação dos formatos e tamanhos das células. Dois termos clínicos diferentes são usados para designar tais mudanças, no tamanho da célula (polimegatismo) e aparência geométrica celular (pleomorfismo) (GONZÁLEZ-MÉJOME *et al.*, 2010).

O aumento na variação de áreas de células individuais, ou seja, polimegatismo ou o coeficiente de variação (CV) é reflexo da reparação de células endoteliais. Células de seis lados indicam uma distribuição uniforme da tensão de superfície da membrana e de células normais. O polígono que tem a área de superfície maior em relação ao seu perímetro é o hexágono. Assim, a forma da célula mais eficiente para cobrir uma área dada é a hexagonal; ou seja, uma córnea perfeita deveria ter 100% de hexágonos (TANIMURA, 1981; McCAREY *et al.*, 2008). Em córneas saudáveis de humanos, espera-se um percentual mínimo de 60% de células hexagonais. O estresse para as células endoteliais resultará numa diminuição da distribuição normal e uma porcentagem menor de 60% de células de seis lados (McCAREY *et al.*, 2008).

Uma lesão inicialmente estimula o processo cicatricial através de estímulos direcionados às células vizinhas, estas, se achatam e deslizam para cobrir o defeito e descartam as células lesionadas para a câmara anterior (WEIMAR *et al.*, 1980; OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA *et al.*, 1985). As células adjacentes quebram suas ligações intercelulares e desenvolvem pseudópodos, migrando em média 0,5 a 1,0 mm por dia, para cobrir o defeito, permanecendo achatadas e atenuadas durante este processo. Este movimento celular é mediado pela F-actina que se polimeriza no citoplasma celular. As células endoteliais em processo de migração apresentam mais organelas e menos vesículas endocíticas, não aparentando estarem cobertas por fibronectina. Quando acontece o encontro no centro da lesão à movimentação é inibida pelo contato celular, ocorrendo uma onda inversa de células se reposicionando (WEIMAR *et al.*, 1980; TUFT & COSTER, 1990).

Inúmeros estudos, valendo-se da microscopia especular, corantes vitais e microscopia eletrônica de varredura, demonstraram o processo de reparação endotelial em diversas espécies animais (SAILSTAD & PEIFFER, 1981; REHANY *et al.*, 2000; HOFFMAN *et al.*, 2009). Avaliações do endotélio corneano foram realizadas em humanos, camundongos, macacos, gatos, peixes, equinos, cães, coelhos, pingüins,

jacarés, avestruzes, ratos e suínos entre outros (BOURNE & KAUFMAN, 1976; SVEDBERGH & BILL, 1972, VAN HORN *et al.*, 1977; GWIN *et al.*, 1982; Mac CALLUM *et al.*, 1983; COLLIN & COLLIN, 2000; ANDREW *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2004b; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2006; SEYHMUS *et al.*, 2006; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

3.3 Métodos de avaliação do endotélio corneano

A observação do mosaico endotelial pela primeira vez foi relatada em 1920 por Vogt, utilizando a biomicroscopia com lâmpada de fenda, realizando-se a microscopia especular pela técnica de iluminação direta focal com grande magnificação. Na prática, esse exame é limitado, pois a magnificação insuficiente e o movimento do olho examinado comprometem a avaliação (JURKUNAS & COLBY, 2005).

A análise do endotélio da córnea tem se tornado cada vez mais importante devido ao crescente número de cirurgias intraoculares (TUFT & COSTER, 1990; ABIB & BARRETO JÚNIOR, 2001; KLAIS *et al.*, 2003). As principais técnicas e instrumentos para avaliação clínica do endotélio corneal são: biomicroscopia com lâmpada de fenda, microscopia especular, microscopia confocal, paquimetria e fluorofotometria. Após avaliação das vantagens e desvantagens de cada técnica, foi possível concluir que cada uma delas tem sua indicação e modalidade clínica na prática oftalmológica diária (JURKUNAS & COLBY, 2005).

A microscopia especular pode fornecer uma análise morfológica não-invasiva da camada de células endoteliais da córnea de indivíduos envolvidos em ensaios clínicos. A análise fornece uma medida da reserva fisiológica de células endoteliais no envelhecimento, procedimentos cirúrgicos oculares, exposição farmacêutica e, estado de saúde geral do endotélio da córnea (McCAREY *et al.*, 2008). O microscópio especular projeta uma fenda de luz na superfície corneana posterior em incidência quase normal. A maioria desta luz é transmitida para o humor aquoso, entretanto, uma pequena parcela de 0,02% é refletida pela porção posterior da córnea em direção as lentes do microscópio. Esta luz é refletida de forma especular, ou seja, em uma imagem semelhante a um espelho, em que o ângulo da reflexão é igual ao ângulo da incidência. A luz especular é transmitida ao microscópio, formando então uma imagem do endotélio corneano, que pode ser capturada, armazenada e analisada (LAING *et al.*, 1979; ABIB, 2000).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é o método de avaliação mais comumente utilizado para obter informações sobre a ultraestrutura endotelial. Esta técnica tem sido empregada em estudos relacionados à morfologia corneana (OJEDA *et al.*, 2001), à toxicidade de fármacos intracamerulares (ALP *et al.*, 2000; HOLLEY *et al.*, 2002; LIOU *et al.*, 2004; SEYHMUS *et al.*, 2006) e à eficácia de meios de preservação da córnea (ARNDT *et al.*, 2001). A MEV tem sido amplamente utilizada na avaliação ultraestrutural e morfométrica do endotélio de aves, caninos, felinos, roedores, peixes, anfíbios, suínos e primatas (COLLIN & COLLIN, 2000; PIGATTO *et al.*, 2004a; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; RODRIGUES *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

Em um estudo comparativo do endotélio de diversos vertebrados, através do uso da microscopia eletrônica de varredura, foi avaliada a densidade endotelial, o polimegatismo, o polimorfismo, bem como os aspectos ultraestruturais do endotélio como a presença e tamanho dos cílios, das microvilosidades e interdigitações (COLLIN & COLLIN, 2000).

Na microscopia confocal, os raios de iluminação e de observação são focados no mesmo plano da córnea e duas fendas são inseridas nos planos de imagem de cada raio (KLAIS *et al.*, 2003). Este arranjo óptico é chamado confocal porque delimita a luz do plano de foco e reduz a contribuição de luz fora do foco (CAVANAGH *et al.*, 2000; KLAIS *et al.*, 2003). Mudando-se a posição do plano focal, é possível a obtenção de imagens de diferentes profundidades, permitindo examinar todos os componentes celulares da córnea, camada por camada, de maneira tridimensional não invasiva (HARA *et al.*, 2003).

A paquimetria da córnea pode ser realizada através da paquimetria ultrassônica, bem como utilizando o microscópio especular de contato e de não contato, havendo boa correlação entre estes métodos (MODIS *et al.*, 2001). A medida de espessura da córnea pela paquimetria mostra de modo indireto a função endotelial, porque esta reflete o estado de sua deturgescência.

A fluorofotometria indica de forma quantitativa, através da análise da passagem da fluoresceína pelo endotélio, a integridade do efeito barreira. De forma geral, a permeabilidade a fluoresceína está aumentada após lesões endoteliais, assim como em doenças endoteliais como a distrofia endotelial de Fuchs (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990).

Na avaliação morfológica e morfométrica do endotélio corneano de humanos e

de animais, podem ainda ser empregados métodos de análise *in vitro*, como a microscopia eletrônica de transmissão e a utilização de colorações vitais (GWIN *et al.*, 1982; YEE *et al.*, 1987; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CAVANAGH *et al.*, 2000; KAFARNIK *et al.*, 2007).

A análise do pleomorfismo e do polimegatismo são parâmetros importantes para a determinação da função endotelial e para a análise do endotélio como tecido vivo. Pode ser determinada também a função metabólica do endotélio, a função da bomba endotelial, da integridade do efeito barreira e da paquimetria da córnea. Todos estes métodos têm o objetivo de avaliar a função endotelial (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990; ABIB, 2000).

Atualmente, o mosaico endotelial pode ser observado e sua aparência quantificada com precisão, utilizando técnicas modernas, como microscopia especular de contato e de não-contato e microscopia confocal. Utilizando estas técnicas, descritores quantitativos podem ser facilmente obtidos por análise de imagem para quantificar indiretamente o grau de polimegatismo e pleomorfismo do mosaico endotelial (GONZÁLEZ-MÉIJOME *et al.*, 2010).

Parâmetros utilizados para quantificar a função endotelial são a densidade das células endoteliais, o tamanho médio celular, o coeficiente de variação na área da célula (CV), percentual de células hexagonais e a paquimetria (EDELHAUSER *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-MÉIJOME *et al.*, 2010; PIRIE *et al.*, 2013). O percentual de células hexagonais ou índice hexagonalidade (HI) e a frequência relativa das diferentes formas de células têm sido considerados como índices de pleomorfismo endotelial (MATSUDA *et al.*, 1985; GONZÁLEZ-MÉIJOME *et al.*, 2010).

3.3.1 Microscopia óptica e corantes vitais

Os corantes vitais são compostos químicos que se ligam a tecidos ou células vivas. O uso desses corantes emergiu recentemente como importantes e eficazes adjuvantes cirúrgicos para melhorar a visualização de tecidos oculares (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os corantes vitais associados a métodos histológicos são utilizados para avaliar a viabilidade, os graus de dano à superfície celular e a morfologia endotelial (SPERLING, 1977; DOUGHTY, 1989; RUIZ, MEDRANO & ALIÓ, 1991). As técnicas histológicas podem fornecer dados importantes em casos de córneas edemaciadas, cuja análise não é

possível com a microscopia especular (GEROSKI & EDELHAUSER, 1989).

As técnicas histológicas obrigam a excisão da córnea e sua imersão em soluções de coloração. A imagem resultante das células endoteliais dependerá da seletividade topográfica do método de coloração utilizado. Os corantes mais utilizados são o vermelho de alizarina, o nitrato de prata, a hematoxilina e o azul de tripano (SPERLING, 1977; DOUGHTY, 1989).

As técnicas oferecem variações quanto aos níveis de hidratação, induzindo a riscos de distorção das células endoteliais. O endotélio pode, ainda, estar distorcido pela ação da pressão sobre a córnea, durante a montagem para captura da imagem (DOUGHTY, 1989). A área celular endotelial média diminui em torno de 30%, quando comparada com a área *in situ* avaliada à microscopia especular (GEROSKI & EDELHAUSER, 1989). Não obstante as limitações, a microscopia de luz com corantes vitais é um método simples, rápido e prático (TAYLOR & HUNT, 1981), além de possuir baixo custo (RUIZ, MEDRANO & ALIÓ, 1991). Avaliações toxicológicas e quanto à estocagem em bancos de olhos têm sido realizadas valendo-se dessa técnica (MANNIS *et al.*, 1998; DOUGHTY, 1989; MEANS *et al.*, 1995; WERNER *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Geroski e Edelhauser (1989) compararam dados morfométricos obtidos a partir da técnica de coloração vital e da microscopia especular, de indivíduos da espécie humana e leporina. Os autores observaram considerável retração na área celular do endotélio da córnea de coelhos (14%), porém, a porcentagem de células hexagonais permaneceu inalterada. Nas células endoteliais humanas, não foram observadas diferenças significativas na área ou no formato celular, quando comparados os dados morfométricos obtidos pela coloração vital com os da microscopia especular.

A alizarina vermelha é um corante intercelular que cora a membrana de Descemet (IGNACIO *et al.*, 2005) e pode ser útil para delinear a margem de células viáveis e não viáveis (RODRIGUES *et al.*, 2009). O azul de tripano é muito utilizado, em combinação com o vermelho de alizarina, para avaliação do núcleo, das bordas celulares do endotélio e áreas com ausência de células endoteliais (SPERLING 1977; TAYLOR & HUNT, 1981).

O método mais comum de determinar morte celular ou lesões nas áreas não vistas por microscopia especular é através da dupla coloração de corantes vitais, utilizando azul de tripano e vermelho de alizarina. Esta técnica *in vitro* foi usada para determinar trauma celular agudo e morte celular por manipulações cirúrgicas em

laboratório. Estudos sobre coloração vital das células endoteliais foram feitos com a avaliação fotográfica para analisar quantitativamente e qualitativamente a perda de células (SAAD *et al.*, 2008).

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.

MORFOLOGIA CELULAR ENDOTELIAL DE DIFERENTES REGIÕES DA CÓRNEA DE EQUINOS (*Equus caballus*) APÓS COLORAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA

Claudia S. Faganello¹, Vanessa Ruiz¹, Maria C. C. de Andrade¹, João A.T. Pigatto¹

Resumo

Objetivo: O endotélio é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea, sendo fundamental na manutenção da transparência desta estrutura. Objetivou-se avaliar a morfologia de diferentes regiões da córnea de equinos após coloração com vermelho de alizarina utilizando a microscopia óptica. **Procedimentos:** Foram estudados 16 bulbos oculares de oito equinos, machos ou fêmeas, de diferentes faixas etárias. O endotélio das córneas foram corados com o corante vital vermelho de alizarina (Alizarin Red S, Sigma Aldrich), dissolvido previamente em solução isotônica (0,2g/100mL), com pH ajustado para 4,2 com ácido clorídrico, e após examinados com microscópio óptico e fotografados. Foi avaliada a morfologia endotelial das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal da córnea. De cada região da córnea, foram analisadas 100 células endoteliais, avaliando a morfologia endotelial. Foi realizada a análise de variância (ANOVA). **Resultados:** A porcentagem média de células hexagonais na região superior da córnea foi de $57,78 \pm 3,14$ %, na região inferior foi de $58,62 \pm 6,413$ %, na região temporal foi de $56,14 \pm 6,749$ %, na região nasal foi de $56,88 \pm 6,296$ %, na região central dos equinos foi de $55,43 \pm 4,464$ %. O percentual de células com menos de seis lados foi $22,72 \pm 3,04$ % para a região central, $20,81 \pm 3,534$ % para a região superior, $20,14 \pm 3,82$ % para a região inferior, $21,66 \pm 4,04$ % para a região temporal, $21,60 \pm 3,04$ % para a região nasal. O percentual de células com mais de seis lados foi de $21,85 \pm 3,99$ % para a região central, $21,31 \pm 3,81$ % para a região superior, $21,24 \pm 4,08$ %

para a região inferior, $22,2 \pm 4,88$ % para a região temporal, $21,52 \pm 4,71$ % para a região nasal. Com relação à morfologia não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões da córnea avaliadas. **Conclusão:** A microscopia óptica e a coloração com vermelho de alizarina possibilitaram a análise e a documentação do endotélio da córnea de equinos. No que diz respeito à morfologia, não existem diferenças entre as regiões da córnea de equinos.

Descritores: equinos, morfologia, endotélio da córnea.

Abstract

Objective: The endothelium is a single layer of flattened, interlocking polygonal cells lining the posterior surface of the cornea; its main function is to maintain the transparency of this structure. The objective was to evaluate the morphology of different regions of the equine cornea by optical microscopy after staining with alizarin red. **Procedures:** 16 eye bulbs of eight horses, male or female, of different ages were studied. The corneal endothelium was stained with alizarin red vital dye (Alizarin Red S, Sigma Aldrich), previously dissolved in isotonic solution (0.2g / 100 mL) with pH adjusted to 4.2 with hydrochloric acid. The corneal endothelium was examined by optical microscope and photographed. Endothelial morphology of central, superior, inferior, temporal and nasal cornea was evaluated. One image of each cornea region with 100 endothelial cells was analyzed. Analysis of variance (ANOVA) was performed. **Results:** The percentage of hexagonal cells in the upper region was $57,78 \pm 3,14$ %, in the lower region was $58,62 \pm 6,413$ %, in temporal region was $56,14 \pm 6,749$ %, in the nasal region was $56,88 \pm 6,296$ %, in the central region was $55,43 \pm 4,464$ %. The percentage of cells with less than six sides was $22,72 \pm 3,04$ % for the region central, $20,81 \pm 3,534$ % for the upper region, $20,14 \pm 3,82$ % for the lower region, $21,66 \pm 4,04$ % for the temporal region, $21,60 \pm 3,04$ % for the nasal region. The percentage of cells with more than six sides was $21,85 \pm 3,99$ % for the region central, $21,31 \pm 3,81$ % for the upper region, $21,24 \pm 4,08$ % for the lower region, $22,2 \pm 4,88$ % for the temporal region, $21,52 \pm 4,71$ % for the nasal region. Regarding to morphology there was no statistically significant difference between the regions of the evaluated corneas. **Conclusion:** Optical microscopy and staining with Alizarin red enabled the

analysis and documentation of the corneal endothelium of horses. There were no morphology differences between regions of the equine cornea.

Keywords: horses, morphology, corneal endothelium.

INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea (^{1,2}). Na maioria dos vertebrados, o mosaico endotelial consiste em células com formato hexagonal, embora também possam ser encontradas células com quatro, cinco, sete e oito lados (³⁻⁶).

O endotélio da córnea reveste a superfície posterior da córnea, sendo derivado da crista neural durante o desenvolvimento embrionário (⁷⁻⁸). Desempenha um papel importante na regulação da hidratação do estroma e na manutenção da transparência da córnea. Esta função é executada por meio de bombas metabolicamente ativas no endotélio da córnea (⁹⁻¹⁰).

A análise endotelial inclui avaliação da área celular, da densidade de células, do polimegatismo e do pleomorfismo. Esses parâmetros morfológicos e morfométricos são importantes ferramentas para avaliar a saúde fisiológica da córnea (¹¹⁻¹⁵). Já foram realizadas avaliações endoteliais em algumas espécies, incluindo: humanos (¹⁶⁻¹⁸), suínos (¹⁹), coelhos (¹⁹⁻²²), cães (^{6, 11, 23}), equinos (²⁴⁻²⁶), lhamas, alpacas (²⁷), gatos (²⁸⁻²⁹), pingüins de Magalhães (¹⁵) e jacarés do pantanal (¹³).

Várias técnicas podem ser utilizadas com o objetivo de se avaliar o endotélio da córnea. Incluem-se os métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro*. Das técnicas preconizadas, a coloração por vermelho de alizarina é uma técnica *in vitro* de fácil e rápida execução, além de possuir baixo custo (³⁰⁻³¹). O vermelho de alizarina é um corante intercelular que cora a membrana de Descemet (³²) e pode aumentar a visibilidade do contorno celular e assim permitir uma estimativa mais fidedigna dos parâmetros morfométricos e morfológicos (^{16,33}).

No entanto, ao se recorrer à literatura, não foram encontrados estudos sobre a morfologia das células do endotélio das diferentes regiões da córnea de equinos normais saudáveis.

Objetivou-se avaliar a morfologia das células do endotélio de diferentes regiões da córnea de equinos utilizando o corante vermelho de alizarina e a microscopia óptica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 16 bulbos dos olhos de oito equinos (*Equus caballus*), machos ou fêmeas, de diferentes idades, selecionados em abatedouro inspecionado pelo Serviço de Inspeção Federal, na cidade de São Gabriel no Rio Grande do Sul, Brasil. Imediatamente após o abate, realizou-se enucleação subconjuntival e acondicionamento dos bulbos oculares em câmara úmida até a realização da microscopia óptica. Todos os olhos foram submetidos ao exame oftálmico, que incluiu biomicroscopia com lâmpada de fenda¹ e prova da fluoresceína². Somente foram incluídos bulbos oculares hígidos.

As córneas foram removidas, posicionadas com o endotélio virado para cima e lubrificadas com solução fisiológica. Ato contínuo, foram realizadas quatro incisões nas extremidades da córnea, para facilitar a acomodação da córnea sobre a lâmina, devido ao seu tamanho.

Impregnou-se a superfície endotelial, instilando aproximadamente 0,5 mL do corante vital vermelho de alizarina (Alizarin Red S, Sigma Aldrich), dissolvido previamente em solução isotônica (0,2g/100mL), com pH ajustado para 4,2 com ácido clorídrico. O corante foi mantido durante dois minutos sobre o endotélio e após, foi irrigado com solução salina balanceada. Uma câmera digital³ (Sony Cyber-Shot DSC W730S) com adaptador para acoplamento ao microscópio óptico⁴ foi usada para fotografar o endotélio da córnea. O aumento do campo visual usado para análise do endotélio foi de 40 vezes nas diferentes regiões da córnea, aproximadamente a 3-5 mm do limbo. Para análise endotelial foi utilizado microscópio óptico, e a morfologia celular endotelial de 100 células de cada região avaliada com o recurso Paint do Microsoft Windows. Em cada imagem de célula foi adicionado um número relativo ao número de lados que esta célula apresentava, analisando o número de células circunvizinhas. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador.

Foi avaliada a morfologia endotelial das regiões central, superior, inferior, temporal e nasal da córnea. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), e foram descritas as medidas pela média e o desvio padrão.

¹ Portable Slit lamp Kowa SL15, Kowa Company, Ltd,

² Fluoresceína sódica a 1%, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

³ Câmera digital Sony Cyber-Shot DSC W730S.

⁴ Microscópio Binocular Physis modelo EXP 100.

RESULTADOS

Com a microscopia óptica foi possível visibilizar um padrão regular de células poligonais uniformes e contínuas (Figura 1). De cada região da córnea foram encontradas células com cinco, seis e sete lados principalmente, com a presença de um número mínimo de outras formas (Figura 2).

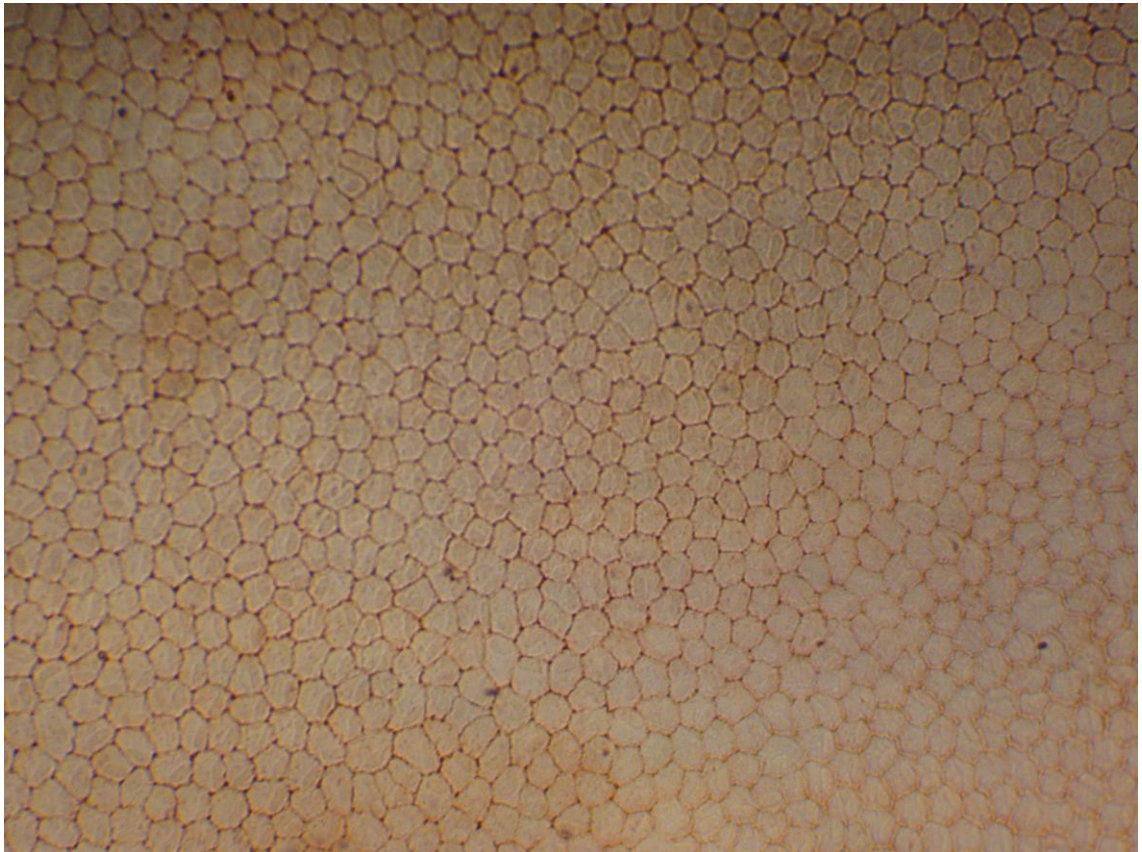


Figura 1: Fotomicrografia do endotélio corneal normal de equino com a coloração vermelha de alizarina com aumento de 40 vezes.

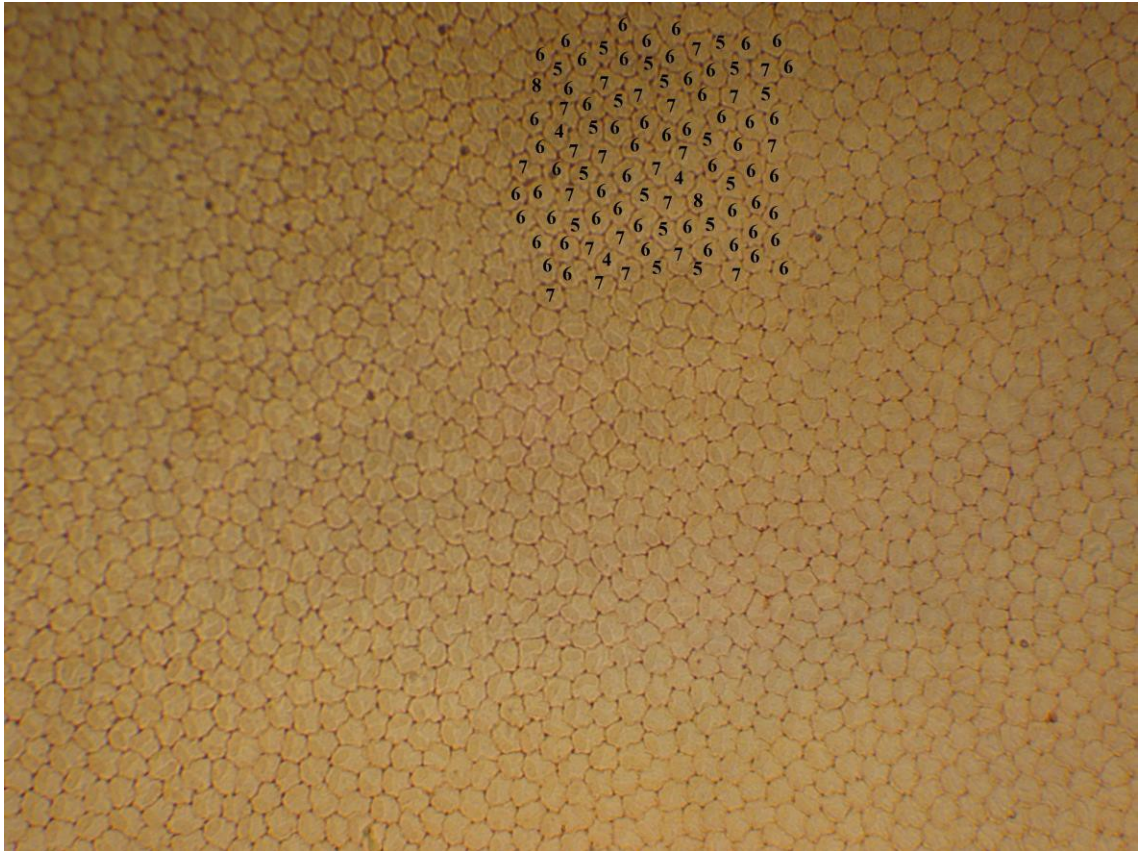


Figura 2: Fotomicrografia do endotélio corneal normal de equino após coloração com vermelho de alizarina. Nota-se endotélio íntegro com padrão regular de células poligonais e predomínio da forma hexagonal (55%) com aumento de 40 vezes.

A porcentagem média de células hexagonais na região superior da córnea foi de $57,78 \pm 3,14$ %, na região inferior foi de $58,62 \pm 6,413$ %, na região temporal foi de $56,14 \pm 6,749$ %, na região nasal foi de $56,88 \pm 6,296$ %, na região central dos equinos foi de $55,43 \pm 4,464$ % ($p:0,338$). O percentual de células com menos de seis lados foi $22,72 \pm 3,04$ % para a região central, $20,81 \pm 3,534$ % para a região superior, $20,14 \pm 3,82$ % para a região inferior, $21,66 \pm 4,04$ % para a região temporal, $21,60 \pm 3,04$ % para a região nasal ($p:0,818$). O percentual de células com mais de seis lados foi de $21,85 \pm 3,99$ % para a região central, $21,31 \pm 3,81$ % para a região superior, $21,24 \pm 4,08$ % para a região inferior, $22,2 \pm 4,88$ % para a região temporal, $21,52 \pm 4,71$ % para a região nasal ($p:0,811$). Com relação à morfologia não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões da córnea avaliadas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os parâmetros morfológicos são importantes para a avaliação da córnea. O

pleomorfismo ou coeficiente de hexagonalidade ou índice de hexagonalidade; definida como a fração de células hexagonais em relação ao número total de células permite a caracterização da morfologia das células endoteliais.

A opção pelo estudo *in vitro*, utilizando animais destinados ao abate facilitou a realização do projeto, devido à objetividade na coleta dos dados, facilidade para obtenção das amostras, concentrando todos os procedimentos em um único local. Além disso, com a opção pelo estudo *in vitro* foi evitado o sacrifício de animais para realização da pesquisa. Estudos prévios, realizados com bulbos oculares enucleados demonstraram ser possível avaliar o endotélio da córnea em até seis horas *post-mortem* sem que ocorressem alterações estruturais (^{24-25, 29, 34-35}).

A enucleação subconjuntival e a manutenção dos olhos em câmara úmida permitiram a realização dos exames, sem interferir na transparência das amostras, preservando a estrutura endotelial. Esta metodologia já foi utilizada em outros estudos e mostrou-se eficaz (^{6, 29, 35}). Neste estudo, logo após o abate, os bulbos dos olhos foram mantidos em câmara úmida com solução salina a 0,9%. A utilização dos olhos em até duas horas após a enucleação, permitiu a manutenção da ultraestrutura endotelial.

Foi possível a obtenção de imagens nítidas do mosaico endotelial das regiões superior, inferior, temporal, nasal e central da córnea dos equinos utilizando-se o microscópio óptico em todos os bulbos oculares avaliados.

A fim de aumentar a visibilidade do contorno celular e, assim, permitir uma estimativa mais confiável dos parâmetros morfométricos descritos acima, o corante de alizarina vermelha foi utilizado neste estudo *in vitro*.

A quantidade de células a serem contatadas por imagem para a obtenção de uma precisão adequada varia de acordo com o estudo analisado. Alguns autores recomendam que sejam contadas pelo menos 30 células, outros recomendam 50, 75 e 100 células por imagem (^{12,36-37}). Ainda, outro estudo mencionou que o ideal seria contar o máximo de células possíveis em três diferentes imagens por quadrante (centro e periferia) sendo realizada a média destas imagens (³⁶).

Embora em imagens coradas com vermelho de alizarina mostrem contornos celulares mais visíveis e melhor delineados, sua contagem manual é uma tarefa de muitas horas. Isto leva muitas vezes que o número de células descrito seja reduzido para apenas algumas dezenas, que afetam significativamente a precisão da estimativa de parâmetros.

No presente trabalho, foi capturada uma imagem de cada área avaliada nas

regiões superior, inferior, temporal, nasal e central respectivamente. A fim de excluir a região periférica das imagens, em que o contraste é mais baixo e muitas vezes impedem a detecção contornos celulares, e para manter o número de células analisadas num total de 100 células, uma região de interesse foi escolhida manualmente em cada imagem. Ato contínuo, foram marcadas as células com o número respectivo de lados dentro de cada célula e isso foi possível devido ao uso do recurso Paint do Microsoft Office.

As imagens especulares obtidas podem ser analisadas através de diferentes métodos, entre eles o método do retículo fixo, o método do retículo variável, o método de comparação, o método dos cantos celulares e o método dos centros celulares (^{2, 36, 40}). O método de retículo variável foi utilizado para a contagem de lados das células endoteliais da córnea de equinos. A precisão deste método depende da decisão subjetiva e da marcação das células.

Os estudos encontrados na literatura a respeito da comparação da densidade endotelial das regiões central e periférica da córnea por microscopia especular apresentaram resultados controversos. Estudos prévios reportaram que em humanos, coelhos e cães, não houve diferença significativa nos parâmetros endoteliais entre as regiões centrais e periféricas de córneas saudáveis (^{2, 11, 41}). No entanto, Amann *et al.* (2003)⁽⁴⁰⁾ concluíram, através da microscopia especular e de métodos histológicos, que a córnea de humanos possui uma densidade endotelial maior nas regiões paracentral e periférica quando comparadas com a região central.

Estudos prévios, utilizando métodos histológicos de avaliação da densidade celular, demonstraram que na região central do endotélio da córnea a densidade foi de 10% a 15% menor que na região periférica (⁴¹). Já no estudo de Binder *et al.* (1979) (³⁶), que utilizaram a técnica de microscopia eletrônica de varredura e a de microscopia especular em olhos de cadáveres humanos, observaram uma densidade celular na região central do endotélio da córnea 10% superior à da região periférica.

A quantificação da variação na forma celular é denominada pleomorfismo e pode ser determinada pelo cálculo do percentual de células endoteliais com formato hexagonal (³⁸). O endotélio corneano é uma monocamada constituída, em sua maioria por células hexagonais, mas que podem apresentar quatro, cinco, sete ou até oito lados (⁴²). Resultados de estudos anteriores reportaram que não houve diferença significativa quanto ao pleomorfismo em função da idade (^{11, 30}) e a inexistência de diferenças, em relação aos parâmetros endoteliais obtidos entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo em caninos, suínos, equinos e felinos (^{11, 19, 24, 29, 40}).

Os resultados observados no presente estudo mostraram que o endotélio normal de equinos consistiu em uma monocamada de células hexagonais, em sua maioria, no entanto, também foram observadas células com quatro, cinco, sete, oito e nove lados. O pleomorfismo entre os quadrantes estudados não apresentou diferença significativa, apresentando valores semelhantes, os quais ficaram entre 52,23% a 64,54%. O padrão regular de células poligonais, avaliado através da microscopia óptica, com predomínio de formato hexagonal, foi similar ao descrito em outras espécies^(20, 28, 29, 34, 35, 39, 43, 44), o que corrobora com o resultado do presente estudo.

No estudo de Pigatto *et al.* (2008)⁽³⁵⁾ foram avaliados 20 olhos de 10 cães, machos ou fêmeas, com seis anos de idade e observou-se que o endotélio corneano normal na espécie é constituído por uma monocamada de células poligonais de tamanho e formato uniformes. Em relação ao pleomorfismo das células do endotélio, a maioria das células apresentaram seis lados (68%), semelhante aos valores obtidos no presente estudo. Franzen *et al.* (2010)⁽²⁹⁾ estudaram o endotélio de felinos domésticos, o qual se caracterizou por uma monocamada de células poligonais de formato e tamanho uniformes. O pleomorfismo variou entre 39% e 74%. No estudo de Vicenti (2004)⁽³⁴⁾, valendo-se da microscopia especular de contato para análise do endotélio da córnea de suínos jovens, foi observado um padrão regular de células poligonais, com o predomínio de formato hexagonal.

Yee *et al.* (1987)⁽⁴⁴⁾ realizaram microscopia especular do endotélio da córnea em diferentes espécies de vertebrados. O ganso, o rato, o coelho, o cão e o humano apresentaram um padrão regular de células endoteliais hexagonais, em sua maioria. Sailstad & Peiffer (1981)⁽²⁰⁾ avaliaram, através da microscopia especular, o endotélio da córnea de 14 coelhos jovens, da raça Nova Zelândia branca. Como resultados, obtiveram que as células endoteliais da região central formaram um padrão de mosaico endotelial com células predominantemente hexagonais, semelhante ao que foi encontrado no presente estudo.

Andrew *et al.* (2001)⁽²⁴⁾ analisaram com o microscópio especular, 52 olhos de 26 equinos, machos ou fêmeas, com idades variadas. A densidade média das células do endotélio da córnea foi de 3155 ± 765 células/mm². A densidade celular decresceu com o envelhecimento. Não houve diferença significativa neste parâmetro relacionada ao sexo dos animais. Os valores não foram significativamente diferentes entre os olhos direito e esquerdo do mesmo animal. Contudo, neste estudo, não houve relato sobre índice de hexagonalidade do endotélio da córnea de equinos.

Resultados de estudos anteriores reportaram que não houve diferença significativa quanto ao pleomorfismo em função da idade (^{11, 29}).

No presente estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao pleomorfismo nas regiões estudadas entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo. Estudos prévios relataram a inexistência de diferenças, em relação aos parâmetros endoteliais obtidos entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo (^{13, 15, 19, 24, 28, 29, 34, 35, 39, 45}).

A microscopia óptica e a coloração com vermelho de alizarina possibilitaram a análise e a documentação do endotélio da córnea de equinos.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que o endotélio da córnea de equinos é formado por células poligonais de padrão regular, com predomínio do formato hexagonal. Além disso, não existem diferenças em relação à morfologia endotelial nas diferentes regiões da córnea de equinos.

REFERÊNCIAS

- (1) Tuft S, Coster D. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4(3): 389-424.
- (2) McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular drugs and solutions. *Cornea* 2008; 27(1): 1-16.
- (3) Svedbergh B, Bill A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmologica* 1972; 50(3): 321-236.
- (4) Collin S.P. & Collin H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clin. Exp. Optom* 1998; 81: 245-254.
- (5) Pigatto JAT. Extração extracapsular do cristalino, comparativamente à facoemulsificação, com enfoque nas repercussões endoteliais corneanas em cães (*Canis familiaris* - Linnaeus, 1758). 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.
- (6) Pigatto JAT, Abib FC, Pereira GT *et al.* Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2006; 43(4): 476-480.
- (7) Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and in disease. *Eye* 2003; 17: 912-918.
- (8) Bahn CF, Glassman R, MacCallum D *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1986; 27(1): 44-51.
- (9) Abib FC, Holzchuh R, Schaefer A *et al.* The endothelial sample size analysis in corneal specular microscopy clinical examination. *Cornea* 2012; 31(5): 546-550.
- (10) Abib FC. In: *Corneal Specular Microscopy with Reliability and Reproducibility*. 1 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Cultura Médica 2006.
- (11) Gwin R, Lerner I, Warren J, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1982; 22(2): 267-271.
- (12) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Archives of Ophthalmology* 1976; 93(2): 143-145.
- (13) Pigatto JAT, Andrade MC, Laus JL, *et al.* Morphometric analysis of the corneal endothelium of yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Veterinary Ophthalmology* 2004; 7: 205-208.
- (14) Pigatto JAT, Abib FC, Pizzeti JC *et al.* Análise morfológica do endotélio

- corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005; 33(1): 33-39.
- (15) Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM *et al.* Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2005; 36: 702-705.
- (16) Ruggeri A, Scarpa F, de Luca M, *et al.* .A system for the automatic estimation of morphometric parameters of corneal endothelium in alizarine red-stained images. *British Journal of Ophthalmology* 2010; 94: 643-647.
- (17) Laule A, Cable MK, Hoffmann CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Archives of Ophthalmology* 1978; 96: 2031-2035.
- (18) Abib FC, Barreto J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2001; 27(10): 1574-1578.
- (19) Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL, *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural* 2009; 39(1): 117-122.
- (20) Sailstad DM & Peiffer RL. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Laboratory Animals* 1981; 15: 393-395.
- (21) Alp BN, Elibol O, Sargon MF *et al.* The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. *Cornea* 2000; 19(4): 546-550.
- (22) Ojeda JL, Ventosa JA, Piedra S. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. *Journal of Anatomy* 2001; 199(5): 567-576.
- (23) Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9(2): 101-107.
- (24) Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *American Journal of Veterinary Research* 2001; 62(4): 479-482.
- (25) Ledbetter EC & Scarlett JM. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Veterinary Ophthalmology* 2009; 12: 57-64.
- (26) Andrew SA, Willis AM. Diseases of the cornea and sclera. In: *Equine Ophthalmology* (ed. Gilger, B.C.). Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, 2005; 157-258.
- (27) Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *American Journal of Veterinary Research* 2002; 63: 326-329.
- (28) Peiffer Jr R, DeVanzo R, Cohen K. Specular microscopic observations of clinically

- normal feline corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research* 1981; 42(5): 854-855.
- (29) Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC *et al.* Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13(4): 222-226.
- (30) Sperling S. Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypan blue. *Acta Ophthalmologica* 1977; 55: 573-580.
- (31) Ruiz JM, Medrano M, Alió JL. An improved method of vital staining of the corneal endothelium. *Ophthalmic Research* 1991; 23(1): 27-30.
- (32) Ignacio TS, Nguyen TT, Sarayba MA *et al.* A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. *American Journal of Ophthalmology* 2005; 139(2): 325—30.
- (33) Rodrigues EB, Costa E F, Penha FM *et al.* The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. *Survey of Ophthalmology* 2009; 54(5): 576-617.
- (34) Vicenti, FM. Morfologia e morfometria do endotélio corneano de suínos (*Sus scrofa domesticus*, LINNAEUS, 1758) à microscopia especular. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 61p. 2004.
- (35) Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira* 2008; 28: 427-430.
- (36) Binder P, Akers P, Zavala E. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmology* 1979; 86(10): 1831-1847.
- (37) Doughty MJ, Müller A, Zaman ML. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. *Cornea* 2000; 19(2): 148.
- (38) Abib FC. Microscopia especular de córnea: manual e atlas. 1.ed. Rio Med Livros, Rio de Janeiro. 2000; 140 p.
- (39) Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *Journal of Veterinary Medicine and Science* 1985; 57: 273–277.
- (40) Amann J, Holley GP, Lee SBM, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *American Journal of Ophthalmology* 2003; 135(5): 584-90.
- (41) Taylor MJ & Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *British Journal of Ophthalmology* 1981; 65: 815-819.

- (42) Doughty MJ. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application. *Optometry and Vision Science Journal* 1989; 66: 626-642.
- (43) Lang RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Archives of ophthalmology* 1975; 93(2): 143-145.
- (44) Yee RW, Edelhauser HF, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Experimental Eye Research* 1987; 44: 703-714.
- (45) Pigatto JAT, Franzen AA, Pereira FQ *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural* 2009; 39(3): 926-929.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível com a microscopia óptica avaliar, documentar e analisar a morfologia de diferentes regiões do endotélio da córnea de equinos. Os dados obtidos com o presente estudo servirão como referência na avaliação do endotélio da córnea de equinos.

REFERÊNCIAS

- AABERG, T. M. Correlation between corneal endothelial morphology and function. **American Journal of Ophthalmology**, v. 98, n. 4, p. 510-512, 1984.
- ABIB, F. C. In: **Microscopia Especular De Córnea: Manual E Atlas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000, 140 p.
- ABIB, F. C.; BARRETO, J.R. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 27, p. 1574-1578, 2001.
- ABIB, F. C. In: **Corneal Specular Microscopy with Reliability and Reproducibility**. 1 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Cultura Médica; 2006.
- ABIB, F. C. *et al.* The endothelial sample size analysis in corneal specular microscopy clinical examination. **Cornea**. v. 31, n. 5, p. 546-550, 2012.
- ALP, B. N. *et al.* The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. **Cornea**, v. 19, n. 4, p. 546-550, 2000.
- AMANN, J.; HOLLEY, G. P.; LEE, S. B. M. *et al.* Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. **American Journal of Ophthalmology**, v. 135, n. 5, p. 584-90, 2003.
- ANDREW, S; RAMSEY, D; HAUPTMAN, J., *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 479-482, 2001.
- ANDREW, S. E; WILLIS A. M.; ANDERSON, D. E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American journal of veterinary research**, v. 63, p. 326-329, 2002.
- ANDREW, S. A.; WILLIS, A.M. Diseases of the cornea and sclera. In: **Equine Ophthalmology** (ed. Gilger, B.C.). Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, p. 157-258, 2005.
- ARNDT, C.; REESE, S. & KOSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 3, p. 175-182, 2001.
- BAHN, C. F. *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 27, p. 44-51, 1986.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.
- BEFANIS, P. J.; PEIFFER, R. L. & BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 4, p. 590-595, 1981.

- BINDER, P.; AKERS, P.; ZAVALA, E. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. **Ophthalmology**, 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.; KAUFMAN, H.E. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. **American Journal of Ophthalmology**, v. 81, n. 3, p. 319-323, 1976.
- BOURNE, W. M. Biology of the corneal endothelium in health and in disease. **Eye**, v. 17, p. 912-918, 2003.
- BRANDÃO, C. V. S. *et al.* Espessura e densidade de células endoteliais corneana em ovinos. **Archives of Veterinary Science**. v. 11, n. 1, p. 16-18, 2006.
- CANAVAGH, H. D. *et al.* Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. **Cornea**, v. 19, n. 5, p. 712-722, 2000.
- CLODE, A. Diseases and surgery of the cornea. In: GILGER, C.G. **Equine Ophthalmology**. 2.ed. Maryland Heights: Elsevier Saunders, 2011. Cap. 5, p. 181-266.
- 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.
- COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. **Cornea**, v. 19, n. 2, p. 218-230, 2000.
- DOUGHTY, M.J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: A review of techniques and their application. **Optometry and Vision Science**, v. 66, n. 9, p. 626-642, 1989.
- DOUGHTY, M.J. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium ex vivo. **Tissue and Cell**, v. 30, p. 634-643, 1998.
- DOUGHTY, M. J.; MÜLLER, A.; ZAMAN, M. L. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. **Cornea** v.19, n.2, p. 148, 2000.
- EDELHAUSER, H. F.; SANDERS, D. R.; AZAR, R.; LAMIELLE H. Corneal endothelial assessment after ICL implantation. **Journal of Cataract Refract Surgery**. v. 30, p. 576-583, 2004.
- FRANZEN, A. *et al.* Use of microscope specular to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cats. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n. 4, p. 222-226, 2010.

- GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Morphometric analysis of the corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, n. 2, p. 254-259, 1989.
- GILGER, B.C.; STOPPINI, R. Equine Ocular Examination: Routine and Advances techniques. In: GILGER, C.G. **Equine Ophthalmology**. 2.ed. Maryland Heights: Elsevier Saunders, 2011. Cap. 1, p. 1-51.
- GWIN, R. M. et al. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 22, n. 2, p. 267-271, 1982.
- GONZÁLEZ-MÉIJOME, J. M.; JORGE, J.; QUEIRÓS, A.; PEIXOTO-DE-MATOS, S. C.; PARAFITA, M. A. Two single descriptors of endothelial polymorphism and pleomorphism. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology**. v. 248, n. 8, p. 1159-1166, 2010.
- HARA, M. *et al.* Comparison of confocal biomicroscopy and noncontact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. **Cornea**, v. 22, n. 6, p. 512-515, 2003.
- HOFFMANN, A. *et al.* Light electron microscopic evaluation of canine corneal endothelium following CO₂ photokeratotomy, **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, p. 28-34, 2009.
- HOLLEY, G. P. *et al.* Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability. An in vitro study. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 28, n. 6, p. 1027-1033, 2002.
- HUANG, P. T.; NELSON, L. R. & BOURNE, W. M. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, n. 8, p. 1794-1801, 1989.
- ICHIJIMA H *et al.* In vivo confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit corneal. **Cornea**. v. 12, n. 5, p. 369-378, 1993.
- IGNACIO, T. S.; NGUYEN, T. T.; SARAYBA, M. A.; *et al.* A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. **American Journal of Ophthalmology**. v. 139, n. 2, p. 325—30, 2005.
- ILMONEN *et al.* Initial healing of the posterior corneal surface following perforation trauma in guinea pig: a scanning electron microscope study. **Acta Ophthalmologica**, v. 62, p. 787-795, 1984.
- JOHNSTON, M. C. *et al.* Origins of avian ocular and periocular tissues. **Experimental Eye Research**, v. 29, n. 1, p. 27-43, 1979.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: textos e atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008.

- JURKUNAS, U.; COLBY, K. Evaluation of the Corneal Endothelium. **Techniques in Ophthalmology**, v. 3, p. 19-26, 2005.
- KAFARNIK, C.; FRITSCHKE, J.; REESE, R. S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. **Veterinary ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 222-230, 2007.
- KLAIS, C. M. C.; BÜHREN, J.; KOHNEN, T. Comparison of endothelial cell count using confocal and contact specular microscopy. **Ophthalmologica**, v. 217, p. 99-103, 2003.
- LANG, R. A.; SANDSTROM, M. M, LEIBOWITZ, H. M. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. **Archives of ophthalmology**, v. 93, n. 2, p. 143-145, 1975.
- LAING, R. A. *et al.*, Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental Eye Research**, v. 22, p. 587-594, 1976.
- 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.
- LANDSHMAN, N. *et al.* Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 29, p. 1100-1109, 1988.
- LAULE, A. *et al.* Endothelial cell population changes of human cornea during life. **Archives of Ophthalmology**, v. 96, n. 11, p. 2031-2035, 1978.
- LEDBETTER, E. C. & SCARLETT, J. M. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. **Veterinary Ophthalmology**. v. 12, p. 57-64, 2009.
- LIOU, S. W.; CHIU, M. D. & WANG, I. J. Effect of intracameral injection of lidocaine and cabachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 30, p. 1351-1356, 2004.
- MacCALLUM, D. K. *et al.* Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 24, p. 247-250, 1983.
- MANNIS, M. J.; SWEET, E. H.; LEWIS, R. A. The fluorouracil on the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v. 106, n. 6, p. 816-823, 1998.
- MATSUDA, M. *et al.* Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 26, n. 4, p. 443-449, 1985.
- McCAREY, B. E.; EDELHAUSER, H. F.; LYNN, M. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive produces, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. **Cornea**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2008.

- MEANS, T. L. *et al.* Viability of human corneal endothelium following optisol-GS storage. **Archives of Ophthalmology**, v. 113, p. 805-809, 1995.
- MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. **American Journal of Ophthalmology**, v. 93, n. 1, p. 1-29, 1982.
- MOCHAL, C. A., MILLER, W. W., COOLEY, A. J., LINFORD, R. L., RYAN, P. L.; RASHMIR-RAVEN, A. M. Ocular findings in Quarter Horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 237, p. 304-310, 2010.
- MODIS, L. J. R., LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Scanning-slit and specularmicroscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. **Cornea**, v. 20, n. 7, p. 711-714, 2001.
- MORITA, H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.57, p. 273–277, 1985.
- MURPHY, C.; SAMUELSON, D.; POLLOCK, R. The Eye. In: EVANS, H.; de LAHUNTA, A. **Miller's Anatomy of the Dog**. 4.ed. St. Louis: Missouri. Saunders, p. 746-752, 2012.
- OJEDA, J. L. *et al.* The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. **Journal of Anatomy**, v. 199, n. 5, p. 567-576, 2001.
- OLSEN, E. G. & DAVANGER, M. The healing of rabbit corneal endothelium. **Acta Ophthalmologica**, v. 62, n. 5, p. 796-807, 1984.
- O'NEAL, M. R.; POLSE, K. A. Decreased endothelial pump function with aging. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 27, p. 457–463, 1986.
- PATEL, S. V.; HODGE D. O.; BOURNE, W. M. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology**. v. 139, p. 311–319, 2005.
- PEIFFER, J. R. R; DEVANZO, R; COHEN, K. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 42, p. 854-855, 1981.
- PETROLL, W. M. *et al.* Organization of junctional proteins in proliferating cat corneal endothelium during wound healing. **Cornea**, v. 20, n. 1, p. 73-80, 2001.
- 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 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004a.
- 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, 2004b.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 41-45, 2005a.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 4, p. 702-705, 2005b.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 476-480, 2006.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 427-430, 2008.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 926-929, 2009.
- PIRIE, C. G.; ALARIO, A. F.; BARYSAUSKAS, C. M.; *et al.* Manual corneal thickness measurements of healthy equine eyes using a portable spectral-domain optical coherence tomography device. **Equine Veterinary Journal**, 2013; doi:10.1111/evj.12198.
- PLUMMER, C. E.; RAMSEY, D. T.; HAUPTMAN, J. G. Assessment of corneal thickness, intraocular pressure, optical corneal diameter, and axial globe dimensions in Miniature Horses. **American Journal of Veterinary Research**. v. 64, n. 6, p. 661-665, 2003.
- RAMSEY, D. T.; HAUPTMAN, J. G.; PETERSEN-JONES, S. M. Corneal thickness, intraocular pressure, and optical corneal diameter in Rocky Mountain Horses with cornea globosa or clinically normal corneas. **American Journal of Veterinary Research**. v. 60, p. 1317-1321, 1999.
- RAO, M. N.; SHAW, E. L.; Arthur, E.; *et al.* Morphological appearance of the healing corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v. 96, p. 2027-2031, 1978.
- RAO, G. N.; LOHMAN, L. E.; AQUAVELLA, J. V. Cell size-shape relationships in corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 22, n. 2, p. 271-274, 1982.
- REHANY, U.; ISHII, Y.; LAHAV, M. *et al.* Ultrastructural changes in corneas of diabetic patients. And electron-microscopy study. **Cornea**, v. 19, n. 4, p. 534-538, 2000.
- RODRIGUES, G. N.; LAUS, J. L.; SANTOS, J.M. *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2006.

- RODRIGUES, E. B.; COSTA, E. F.; PENHA, F. M.; *et al.*, The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. **Survey of Ophthalmology**. v. 54, n. 5, p. 576-617, 2009.
- RUIZ, J. M.; MEDRANO, M.; ALIÓ, J. L. An improved method of vital staining of the corneal endothelium. **Ophthalmic Research**, v. 23, n. 1, p. 27-30, 1991.
- RUGGERI, A.; SCARPA, F.; de LUCA, M.; MELTENDORF, C.; SCHOROETER, J. A system for the automatic estimation of morphometric parameters of corneal endothelium in alizarine red-stained images. *British Journal of Ophthalmology*, v. 94, p. 643-647, 2010.
- SAAD H. A.; TERRY M. A.; SHAMIE N.; *et al.* An Easy and Inexpensive Method for Quantitative Analysis of Endothelial Damage by Using Vital Dye Staining and Adobe Photoshop Software. **Cornea**. v. 27, p. 818–824, 2008.
- SAILSTAD, D. M.; PEIFFER, R. L. Specular microscopic observation of the corneal endothelium in the normal rabbit. **Laboratory Animals**, v. 15, p. 393-395, 1981.
- SEYHMUS, A. *et al.* Effects of trypan blue on corneal endothelium and anterior lens capsule in albino Wistar rats: an investigator-masked, controlled, two-period, experimental study. **Current Therapeutic Research**, v. 6, p. 366-377, 2006.
- SHENG, H.; BULLIMORE, M. A. Factors affecting corneal endothelial morphology. **Cornea**, v. 26, p. 520-525, 2007.
- SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca. cap.11, p. 283-338, 2005.
- SPERLING, S. Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypan blue. **Acta Ophthalmologica**, v. 55, p. 573-580, 1977.
- SVEDBERGH, B. & BILL, A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**, v. 50, n. 3, p. 321-336, 1972.
- TANIMURA K. A. Quantitative Analysis of Corneal Endothelial Cells. **Japanese Journal of Ophthalmology**. v. 32, p. 1835–1839, 1981.
- TAMAYO-ARANGO, L. J. *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 117-122, 2009.
- TAYLOR, M. J.; HUNT, C. J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v. 65, p. 815-819, 1981.
- TOWNSEND, W. M.; WASSERMAN, N.; JACOBI, S. A pilot study on the corneal curvatures and ocular dimensions of horses less than one year of age. **Equine Veterinary Journal**. v. 45, p. 256–258, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

YEE, R. W.; EDELHAUSER, H. F.; STERN, M. E. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. **Experimental Eye Research**, v. 44, p. 703-714, 1987.