

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS
EXPOSIÇÃO À INDOCIANINA VERDE 0,5% - ESTUDO *IN VITRO***

VANESSA RUIZ MOURA DA SILVA

PORTO ALEGRE

2014

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS
EXPOSIÇÃO À INDOCIANINA VERDE 0,5% - ESTUDO *IN VITRO***

Autor: Vanessa Ruiz Moura da Silva

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de mestre no Programa de
Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Moura da Silva, Vanessa Ruiz

Avaliação do endotélio corneano de equinos após
exposição à indocianina verde 0,5% - estudo in vitro /
Vanessa Ruiz Moura da Silva. -- 2014.

40 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. Oftalmologia de equinos. 2. Endotélio
corneano. 3. Indocianina verde. I. Tadeu Pigatto,
João Antonio, orient. II. Título.

Vanessa Ruiz Moura da Silva

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS EXPOSIÇÃO À
INDOCIANINA VERDE 0,5% - ESTUDO IN VITRO

Aprovada em

Aprovada por:

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

Prof. Dr. Sérgio Kwitko
Membro da Comissão

Prof. Dr. André Silva Carissimi
Membro da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor e carinho a mim dedicados. Obrigada por estarem presentes em todos os meus passos, desde o início. Amo vocês!

Ao João Luiz, pela companhia, pelos conselhos, pelo esforço para que eu seja sempre feliz. Obrigada por ser o meu amor!

Ao meu orientador, Prof. João Antonio Tadeu Pigatto pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, disponibilidade e pela oportunidade para que eu me tornasse uma profissional mais qualificada.

A todo o pessoal do Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFRGS, por permitirem que eu aprendesse com o trabalho exemplar de vocês.

À Maria Cristina Andrade e à Cláudia Faganello, pela ajuda e companheirismo durante todas as etapas deste trabalho. Vocês, com certeza, tornaram o desafio menor.

À Dra. Neide e ao Dr. Miguel, médicos veterinários do frigorífico Foresta, por nos receberem sempre da melhor forma possível durante as coletas.

Às meninas da secretaria da pós-graduação, por serem sempre prestativas e atenciosas.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos, pela oportunidade em realizar o mestrado voltado à espécie equina.

Aos membros da banca examinadora, que disponibilizaram o seu tempo e os seus conhecimentos para avaliar este trabalho.

Aos animais, que fazem um bem muito maior a mim do que eu tento fazer a eles.

Por último, e não menos importante, a Deus, que permite que eu tenha tantas pessoas iluminadas no meu caminho.

AValiação DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS EXPOSIÇÃO À INDOCIANINA VERDE 0,5% - ESTUDO *IN VITRO*

Autora: Vanessa Ruiz Moura da Silva

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto

RESUMO

A capsulotomia curvilínea contínua (CCC) é uma das etapas mais importantes da técnica de facoemulsificação. Em cataratas brancas e com reflexo de fundo de olho deficiente ou ausente, a identificação da cápsula anterior do cristalino é dificultada, e é necessária a utilização de substâncias, como os corantes vitais, para permitir a sua diferenciação. Contudo, antes da utilização de substâncias intraoculares, é necessário determinar se elas são seguras para as estruturas do globo ocular, principalmente para as células do endotélio corneano, que podem sofrer lesões irreversíveis. A indocianina verde é uma substância capaz de corar a cápsula do cristalino, tendo seu uso relatado em humanos, mas não existem dados sobre sua utilização em equinos. Objetivou-se determinar o efeito agudo da exposição do endotélio corneano de equinos à indocianina verde 0,5%. Foram estudadas 24 córneas provenientes de 12 equinos divididos em 2 grupos: 12 córneas dos bulbos oculares direitos (grupo controle) e 12 córneas dos bulbos oculares esquerdos (grupo tratamento). As córneas do grupo tratamento foram expostas à indocianina verde durante 1 minuto, e após lavadas com solução salina balanceada. Posteriormente, as córneas foram coradas pela técnica de coloração vital com alizarina vermelha e azul de tripano, visualizadas ao microscópio óptico e fotografadas. As córneas do grupo controle também foram coradas com alizarina vermelha e azul de tripano, visualizadas e fotografadas. Não foram encontradas áreas de perda celular com a coloração pela alizarina vermelha, e nem células com núcleo corado pelo azul de tripano, não havendo diferenças entre grupo controle e grupo tratamento. Baseado nos resultados do presente estudo foi possível concluir que a indocianina verde não induziu dano às células do endotélio da córnea de equinos.

Palavras chaves: *Indocianina verde 0,5%, efeito agudo, endotélio corneano, equinos.*

EVALUATION OF THE EQUINE CORNEAL ENDOTHELIUM AFTER EXPOSURE TO INDOCYANINE GREEN 0,5% - IN VITRO STUDY

Author: Vanessa Ruiz Moura da Silva

Advisor: João Antonio Tadeu Pigatto

ABSTRACT

The continuous curvilinear capsulotomy (CCC) is one of the most important steps on the phacoemulsification technique. In white cataract combined with poor or absent red reflex the identification of the anterior capsule is hampered, thus requiring the use of substances such as vital dyes to allow their differentiation. However, before the use of intraocular substances it is necessary to determine whether these substances are safe to the structure of the ocular globe, mainly to the corneal endothelium cells, which may suffer irreversible damage. The indocyanine green is a substance capable of staining the lens capsule with documented use in humans, but there are no data on its use in horses. This study aimed to determine the acute effect of exposure of equine corneal endothelium to indocyanine green 0.5%. The sample consisted of 24 corneas from 12 horses divided into 2 groups: 12 corneas of right eye bulbs (control group) and 12 corneas of left eye bulbs (treatment group). The corneas belonging to the treatment group were exposed to the indocyanine green for 1 minute, and then washed with balanced saline solution. Subsequently, the corneas were stained by the technique of vital staining with alizarin red and trypan blue, and so visualized and photographed under an optical microscope. The corneas of the control group were also stained with alizarin red and trypan blue, visualized and photographed. No areas of cell loss were found with alizarin red staining, and no cell nuclei stained with trypan blue was visualized, with no difference between control group and treatment group. Based on the results of this study, we concluded that the indocyanine green did not induce damage to equine corneal endothelium.

Keywords: *Indocyanine green 0,5% , acute effect, corneal endothelium, horses.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCC: capsulotomia curvilínea contínua

DCE: densidade de células endoteliais

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fotomicrografia do endotélio corneano de equino após coloração vital com vermelho de alizarina e azul de tripano. Olho direito (controle). Observa-se um padrão regular de células poligonais justapostas, caracterizando o arranjo típico do endotélio corneano. Presença de células poligonais, com bordos bem definidos (40x).....36

Figura 2- Fotomicrografia do endotélio corneano de equino após aplicação de indocianina verde e coloração vital com vermelho de alizarina e azul de tripano. Olho esquerdo (tratamento). Observar ausência de áreas desnudas de células ou células coradas pelo azul de tripano (40x).....36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	Anatomofisiologia da córnea	13
3.1.1	Características específicas da córnea equina	15
3.1.2	O endotélio corneano	15
3.2	Fatores lesivos ao endotélio corneano	15
3.2.1	Envelhecimento	16
3.2.2	Doenças	16
3.2.3	Procedimentos cirúrgicos intraoculares	16
3.3	Técnicas de remoção da catarata	17
3.3.3	A capsulotomia curvilínea contínua	18
3.4	Utilização de corantes vitais na cirurgia de catarata	18
3.4.1	Fluoresceína sódica	19
3.4.2	Violeta de genciana	19
3.4.3	Azul de tripano	19
3.4.4	Indocianina verde	20
3.4.5	Azul brilhante	20
3.5.	Métodos de avaliação do endotélio corneano	21
4	MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS	23
5	ARTIGO: Avaliação do endotélio corneano de equinos após exposição à indocianina verde 0,5% - estudo <i>in vitro</i>	24
	Resumo	25
	Introdução	25
	Materiais e métodos	26
	Resultados	28
	Discussão	28
	Referências	32
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7	CONCLUSÕES	37
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

A córnea é a porção anterior, avascular e transparente da camada fibrosa externa do globo ocular. Na maioria das espécies possui cinco camadas, sendo elas o filme lacrimal, o epitélio e sua membrana basal, o estroma, a membrana de Descemet (membrana basal do endotélio) e o endotélio.

O endotélio é responsável por um dos mais importantes mecanismos que mantêm a transparência da córnea, e suas células têm uma limitada capacidade de regeneração na maioria das espécies (MAGGS, 2008). Por este motivo, é de extrema importância preservar a integridade endotelial em casos onde se torna necessária intervenção cirúrgica intraocular ou corneana, visto que a perda do endotélio corneano poderá causar edema de córnea, não raro irreversível, levando à perda da visão. Dentre outras condições que levam à perda de células endoteliais da córnea, estão a extração de catarata, transplante de córnea e a ceratectomia lamelar posterior (RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2008).

Os equinos são utilizados essencialmente para atividades de trabalho e performance, tendo a visão, neste contexto, um papel essencial para o bom desempenho do animal. Com isto, ao se submeter o cavalo a um procedimento cirúrgico, como a remoção de catarata, deve-se ter em mente a preocupação em preservar o endotélio corneano, lesando-o o mínimo possível, para evitar perda de transparência da córnea.

A catarata é o defeito ocular congênito mais frequente em potros (BROOKS, 2005). Além disso, cataratas secundárias à uveíte recorrente equina ou trauma acometem cavalos adultos (BROOKS, 2005). Nesta espécie, a técnica mais recomendada para remoção de catarata é a facoemulsificação (BROOKS, 2005). Um passo crítico deste procedimento é a capsulotomia curvilínea contínua, a qual requer o uso de corantes vitais para permitir a visualização adequada da cápsula anterior do cristalino. A indocianina verde facilitou a identificação da cápsula anterior do cristalino durante a remoção da catarata em humanos (HOLLEY et al., 2002). No entanto, ainda não foram realizados estudos avaliando o seu uso em cavalos.

A importância deste estudo é a possibilidade de sugerir uma nova alternativa de corante vital para realização da facoemulsificação em equinos, que seria a indocianina verde.

Objetiva-se avaliar os possíveis efeitos agudos da indocianina verde no endotélio da córnea de equinos.

2 OBJETIVOS

Verificar quais os efeitos imediatos da indocianina verde 0,5% no endotélio da córnea de equinos utilizando a técnica de coloração vital com alizarina vermelha e azul de tripano.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomofisiologia da córnea

A córnea, anterior e transparente, e a esclera opaca, constituem a túnica mais externa do globo ocular. A zona de transição entre a córnea e a esclera é denominada limbo. As córneas de equinos e felinos são mais espessas no limbo, ao contrário de caninos e bovinos, que possuem a porção central da córnea mais espessa (SLATTER, 2005).

A córnea é constituída por cinco camadas, na maioria das espécies: filme lacrimal pré-corneano, epitélio e sua membrana basal, estroma, membrana de Descemet e o endotélio.

O filme lacrimal pré-corneano recobre a córnea e a conjuntiva. É constituído por três camadas que diferem entre si em composição, e tem ao redor de 7 μm de espessura. A camada média ou aquosa é constituída predominantemente de água derivada das glândulas lacrimal e da terceira pálpebra, enquanto a camada superficial externa (0,1 μm de espessura) é composta por materiais oleosos e fosfolipídeos provenientes das glândulas tarsais e de Zeiss ao longo da margem palpebral, e finalmente a camada mucóide interna (1 a 2 μm de espessura), constituída por glicoproteínas hidratadas, derivadas das células caliciformes (SLATTER, 2005). Em razão da natureza hidrofílica e lipofóbica da camada aquosa, um meio é necessário para ligar o filme lacrimal pré-corneano à superfície corneana, a qual é lipofílica e hidrofóbica. Acredita-se que as moléculas de mucoproteína sejam bipolares, com uma terminação lipofílica (associada ao epitélio corneano) e outra terminação hidrofílica (associada à camada aquosa). Assim, a camada mucóide une a camada aquosa à córnea (SLATTER, 2005).

O epitélio corneano é simples, escamoso e não queratinizado, de espessura variável, constituído por membrana basal, células epiteliais basais, células aladas e células superficiais escamosas. As células superficiais possuem projeções vilosas que ancoram a camada mucóide profunda do filme lacrimal pré-corneano (SLATTER, 2005).

O estroma é composto por fibrócitos, ceratócitos, colágeno e substância fundamental, constituindo 90% da estrutura corneana. Um espaçamento regular das fibrilas colágenas estromais mantém a transparência corneana. As fibrilas colágenas,

glicosaminoglicanos e glicoproteínas formam o suporte da estrutura corneana (SLATTER, 2005).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio, e é secretada durante toda a vida, sendo mais espessa em animais idosos (CLODE, 2011). Localiza-se posteriormente ao estroma e anteriormente ao endotélio. A membrana de Descemet é elástica, não se cora com o corante de fluoresceína e se apresenta como estrutura saliente no centro de úlcera ou lesão corneana profunda (SLATTER, 2005).

O endotélio se localiza posteriormente à membrana de Descemet, revestindo a câmara anterior. Em razão de alta atividade metabólica, possuem mitocôndrias numerosas e retículo endoplasmático liso e rugoso abundante (SLATTER, 2005).

A córnea é transparente e atua como a superfície de refração óptica mais potente do globo ocular. A transparência corneana se deve à ausência de vasos e células sanguíneas, ausência de pigmento, controle do conteúdo aquoso, superfície óptica lisa (fornecida pelo filme lacrimal) e disposição regular e altamente organizada das fibras colágenas (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

Quanto ao metabolismo, a maior parte da requisição energética dos tecidos corneanos é suprida pelo metabolismo da glicose. Vitaminas, aminoácidos e glicose são obtidos predominantemente através do humor aquoso, e em menores quantidades a partir do filme lacrimal e dos vasos límbicos (CLODE, 2011). Em decorrência da córnea ser avascular, o oxigênio é disponível a partir de outras fontes: humor aquoso, filme lacrimal pré-corneano e atmosfera, plexo capilar límbico e capilares da conjuntiva palpebral (SLATTER, 2005; CLODE, 2011).

O endotélio recebe a maior parte do oxigênio a partir do humor aquoso, enquanto o oxigênio atmosférico é a principal fonte para o remanescente da córnea.

Por uma variedade de processos, a água tende a penetrar na córnea. O controle energia-dependente de água ou manutenção do estado de deturgescência é importante para a transparência da córnea. As células endoteliais são os locais principais dessa “bomba de fluido”, a qual movimenta água do estroma para o humor aquoso contra o gradiente de pressão intraocular, forçando água para o interior da córnea. O epitélio também é essencial no controle do conteúdo de água do estroma. A remoção de água do epitélio e endotélio é balanceada por uma tendência do colágeno e mucopolissacarídeos do estroma para atrair água. Tanto o endotélio quanto o epitélio contêm quantidades grandes de Na^+ e K^+ ativados pela ATPase, associados à bomba de sódio (SLATTER, 2005).

3.1.1 Características específicas da córnea equina

A espessura corneana *in vivo*, mensurada em equinos normais, obtida por paquimetria ultrassônica, é maior periféricamente do que centralmente, com o centro da córnea medindo 770 μm de espessura e a periferia medindo 793 μm (CLODE, 2011).

Andrew *et al.* (2001) utilizando a microscopia especular, concluíram que a densidade endotelial média em equinos saudáveis é de 3155 células/ mm^2 , não ocorrendo variação entre gêneros, mas redução na contagem celular com o aumento da idade. Neste mesmo estudo, não foi encontrada correlação entre a densidade celular endotelial e a espessura corneana.

Ledbetter & Scarlett (2009) fizeram uso da microscopia confocal para determinar as características morfológicas, a paquimetria e a densidade de células endoteliais da córnea de equinos saudáveis, *in vivo*. A densidade endotelial média no centro da córnea foi de 3002 células/ mm^2 .

3.1.2 O endotélio corneano

O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais, localizada na superfície interna da córnea, o qual separa o humor aquoso, na câmara anterior, do estroma corneano hidrofílico (RODRIGUES *et al.*, 2006). O endotélio corneano normal, na maioria dos animais jovens, consiste em um arranjo regular de células poligonais, de tamanhos semelhantes (PIGATTO *et al.*, 2004). A forma das células endoteliais corneanas de vertebrados é principalmente hexagonal e pentagonal, com bordos irregulares e com interdigitações (PIGATTO *et al.*, 2004).

3.2 Fatores lesivos ao endotélio corneano

Vários fatores influenciam a redução na densidade celular endotelial, incluindo envelhecimento, doenças e traumas cirúrgicos envolvendo abertura da câmara anterior (PIGATTO, 2004).

Em contraste à notável capacidade de cicatrização e regeneração do epitélio e estroma em resposta à injúria, o endotélio, por sua vez, tem uma capacidade mitótica mais limitada. A perda de células endoteliais devido à injúria/doença, trauma cirúrgico ou envelhecimento, leva à reorganização por aumento e migração de células endoteliais

adjacentes, mais do que por replicação. O número total de células é reduzido, levando a um aumento de tamanho anormal (polimegatismo) e forma anormal (pleomorfismo) de células endoteliais (CLODE, 2011). A adesão entre as células é mantida durante essa migração, e após o fechamento da lesão, os sítios de bombas de sódio/potássio-adenosina-trifosfato são aumentados, preservando a função efetiva de bomba e barreira do endotélio, até que a densidade celular seja maior do que a densidade crítica (CLODE, 2011).

3.2.1 Envelhecimento

A densidade de células endoteliais é reduzida com a idade, o que foi descrito em humanos, cães, gatos, ratos e cavalos (ANDREW et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006).

Rodrigues et al. (2006) avaliaram a densidade de células endoteliais e sua morfologia, em cães de diferentes idades. Observaram redução da contagem de células endoteliais e aumento de polimegatismo e pleomorfismo nas células endoteliais de cães adultos e idosos, comparado a cães jovens. No entanto, a redução da contagem de células endoteliais em cães não foi linear, de acordo com o estudo.

A descompensação corneana e a inabilidade em remover água do estroma ocorrem quando a densidade celular endotelial está diminuída abaixo de 400 a 800 células/mm² (SLATTER, 2005; CLODE, 2011).

3.2.2 Doenças

A perda precoce de células endoteliais da córnea pode ocorrer por doenças corneanas primárias ou intraoculares, como distrofia endotelial corneana, glaucoma, uveíte e luxação anterior do cristalino (MAGGS, 2008).

3.2.3 Procedimentos cirúrgicos intraoculares

Dentre outras condições que levam à perda de células endoteliais da córnea, estão a extração de catarata e a ceratectomia lamelar posterior (RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2008).

É descrito que com a facoemulsificação ocorre perda de células endoteliais (SLATTER, 2005).

3.3 Técnicas de remoção da catarata

A catarata é uma opacidade óptica no córtex, núcleo ou cápsula do cristalino, causada por uma ruptura da arquitetura normal das fibras do cristalino ou de sua cápsula (BROOKS, 2005). As opacidades podem variar em tamanho, forma, localização no cristalino, etiologia, idade de início e taxa de progressão (OFRI, 2008). A catarata é o defeito ocular congênito mais frequente em potros (BROOKS, 2005). Além disso, cataratas secundárias à uveíte recorrente equina ou trauma são frequentemente vistas em cavalos adultos (BROOKS, 2005).

Os quatro métodos de correção cirúrgica da catarata comumente usados são: discisão e aspiração, extração extracapsular manual ou convencional, extração intracapsular e a facoemulsificação (OFRI, 2008).

A técnica de discisão e aspiração consiste na abertura da córnea e cápsula anterior do cristalino e uso de irrigação e aspiração para remover o conteúdo de dentro da cápsula. Este método é restrito a animais jovens com cataratas líquidas e animais com olhos muito pequenos (OFRI, 2008).

Na extração intracapsular todo o cristalino é removido sem abertura da cápsula. Este método é restrito à remoção de cristalinos luxados (OFRI, 2008).

Na extração extracapsular manual, uma ampla incisão (em 180°) é feita no limbo, e a cápsula anterior do cristalino, núcleo e córtex são extraídos manualmente. A cápsula posterior do cristalino permanece intacta (OFRI, 2008).

A facoemulsificação consiste na fragmentação ultrassônica do cristalino, e remoção por irrigação e aspiração (SLATTER, 2005). A cirurgia é realizada através de uma pequena incisão na córnea ou limbo, seguida pela fragmentação e aspiração do córtex e núcleo do cristalino. A facoemulsificação é a técnica de eleição para remoção de catarata em equinos (MILLICHAMP & DZIEZC, 2000; HARDMAN et al., 2001; BROOKS, 2005; FIFE et al., 2006; HARRINGTON et al., 2013).

3.3.1 A capsulotomia curvilínea contínua

A capsulotomia curvilínea contínua representa um significativo avanço na evolução da facoemulsificação. Entre outras vantagens, ela permite que a turbulência criada pela facoemulsificação seja melhor contida dentro do saco capsular, permite a implantação de lente intraocular e ainda possibilita uma melhor visualização das margens da cápsula anterior, facilitando a completa remoção do córtex (LINEBARGER, et al., 1999).

A visualização da cápsula pode ser dificultada com a presença de cataratas brancas, densas, com ausência de reflexo vermelho do fundo (GERRIT et al., 1999; LINEBARGER, et al., 1999; RODRIGUES, et al., 2009). A coloração da cápsula com um corante não tóxico pode ser útil nesses casos (LINEBARGER, et al., 1999). A visualização deficiente da cápsula pode resultar em uma CCC incompleta ou inadequada, que pode causar subsequente ruptura capsular, perda vítrea e deslocamento do cristalino para o segmento posterior (HISATOMI, et al., 2006).

3.4 Utilização de corantes vitais na cirurgia de catarata

Para permitir a identificação dos limites da capsulotomia durante a cirurgia, já foram descritos vários métodos, como o uso de iluminação lateral, injeção subcapsular de fluoresceína, hemocoloração da cápsula com sangue autólogo e coloração com violeta de genciana 0,1% e metileno azul 1%. Contudo, as três primeiras técnicas requerem tempo para o preparo, ajuste de técnica cirúrgica ou preparo pré-operatório de um hemoderivado. Com a quarta técnica, foi encontrado edema corneano no pós-operatório, devido à toxicidade endotelial do corante (GERRIT et al., 1999).

Corantes vitais são substâncias utilizadas para colorir tecidos vivos ou células (RODRIGUES et al., 2009).

A capsulotomia curvilínea contínua (CCC) é um passo crítico da facoemulsificação (RODRIGUES, et al., 2009). No entanto, ela pode ser dificultada na presença de um olho com catarata madura, branca, devido à dificuldade em distinguir a cápsula anterior do córtex do cristalino adjacente (HISATOMI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009). Em situações como esta, é necessário realizar a coloração da cápsula anterior para permitir sua visualização adequada durante a capsulotomia, o que foi primeiramente relatado em 1993. Desde então, o uso dos corantes vitais como

adjuvantes na cirurgia de catarata tem sido amplamente difundido (HISATOMI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009). Também tem sido demonstrado que a coloração da cápsula facilita a CCC em cataratas imaturas e é útil no treinamento de cirurgiões inexperientes (HISATOMI et al., 2006).

Entre os corantes utilizados para coloração da cápsula do cristalino, encontram-se a fluoresceína sódica, o violeta de genciana, o azul de tripano, a indocianina verde e o azul brilhante (HORIGUCHI et al., 1998; MELLES et al., 1999; HISATOMI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009).

3.4.1 Fluoresceína sódica

A fluoresceína sódica, em uma concentração de 2%, foi o primeiro corante utilizado para colorir a cápsula anterior do cristalino, em 1993 (RODRIGUES et al., 2009).

Contudo, a migração da fluoresceína sódica para o segmento posterior e coloração do córtex e núcleo do cristalino e endotélio corneano, resulta em um contraste inadequado entre a cápsula do cristalino e o córtex, limitando seu uso como um auxiliar na realização da capsulotomia curvilínea contínua. Isto pode ser devido ao seu baixo peso molecular (RODRIGUES et al., 2009).

3.4.2 Violeta de genciana

A coloração da cápsula anterior com o corante violeta de genciana foi primeiramente relatada em humanos em 1998. Desde então, poucos trabalhos referem o uso deste corante na cirurgia de catarata (RODRIGUES et al., 2009).

3.4.3 Azul de tripano

A utilização do azul de tripano para coloração da cápsula do cristalino na capsulotomia curvilínea contínua foi inicialmente introduzida em 1999, e desde então ele tem sido o agente mais frequentemente utilizado na capsulotomia curvilínea contínua durante a cirurgia de catarata (RODRIGUES et al., 2009).

A efetividade para colorir a cápsula anterior depende da concentração e do tempo de exposição do corante. A maioria dos estudos clínicos em humanos utiliza a

concentração de 0,1% de azul de tripano (MELLES et al., 1999; PANDEY et al., 2000; RODRIGUES et al., 2009).

Marback et al. (2001) descreveram a utilização de azul de tripano 0,025% para realização de CCC em olhos sem reflexo vermelho de fundo, verificando que o corante foi eficiente e seguro para corar a cápsula do cristalino, nessa concentração.

3.4.4 Indocianina verde

A coloração da cápsula anterior utilizando a indocianina verde em condições com reflexo vermelho deficiente ou ausente tem sido relatada desde o final dos anos 90, utilizando concentrações que variam de 0,125% a 0,5% (RODRIGUES et al., 2009).

Horiguchi et al. (1998) introduziram o uso da indocianina verde 0,5% para realização da CCC.

Em um estudo comparativo entre a indocianina verde 0,5% e o azul de tripano 0,1%, utilizados na CCC, concluiu-se que a indocianina verde permitiu uma melhor visualização da cápsula (HOLLEY et al., 2002). Uma vantagem do azul de tripano sobre a indocianina verde é o custo baixo (RODRIGUES et al., 2009).

Holley et al. (2002) avaliaram o efeito da indocianina verde sobre o endotélio corneano de humanos e coelhos, *in vitro*, através de microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e um ensaio molecular células vivas/células mortas. Os resultados do estudo mostraram que a indocianina verde não teve efeito sobre a função ou estrutura do endotélio, nestas condições.

A apresentação comercial mais comum da indocianina verde é na forma de 25 mg, que deve ser dissolvida em 0,5 mL de solvente aquoso (água destilada), o qual é diluído em 4,5 mL de solução salina balanceada, resultando em uma solução a 0,5% (PARIKH & EDELHAUSER, 2003). Se a indocianina é dissolvida em água destilada apenas ou se a água destilada é injetada na câmara anterior, ocorre edema corneano (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

3.4.5 Azul brilhante

O uso do azul brilhante para cirurgia de catarata foi primeiramente relatado em 2006, surgindo como uma nova possibilidade entre os corantes vitais (RODRIGUES et al., 2009).

Hisatomi et al. (2006) relataram que o azul brilhante proporcionou uma melhor coloração da cápsula do cristalino, em menores concentrações do que o azul de tripano e a indocianina verde. Além disso, o estudo demonstrou ausência de efeitos tóxicos do corante para coloração da cápsula do cristalino.

3.5. Métodos de avaliação do endotélio corneano

Existem diferentes métodos que permitem avaliar a estrutura e/ou viabilidade do endotélio da córnea, tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre estas técnicas, estão a microscopia especular, a microscopia confocal, a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia eletrônica de transmissão e a coloração por corantes vitais.

A microscopia especular é capaz avaliar o endotélio corneano *in vivo*, possibilitando determinar a densidade de células endoteliais (DCE) e a morfologia celular (SZALAZAI et al., 2011). Esta técnica já foi utilizada em estudos sobre a estrutura corneana de diferentes espécies, como humanos, cães, gatos, equinos, suínos, coelhos, lhamas e alpacas (COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; ANDREW et al., 2001; ANDREW et al., 2002; VICENTI, 2004; PIGATTO et al., 2006; PIGATTO et al., 2008; FRANZEN et al., 2010), assim como estudos de toxicidade de diferentes substâncias ao endotélio corneano, incluindo corantes vitais, antisséptico e anestésicos de uso intra-ocular (KIM et al., 1998; Horiguchi et al., 1998; NAOR et al., 2001; CHUNG et al., 2005; LANDRY et al., 2011). Os principais parâmetros que podem ser mensurados com a microscopia especular são polimegatismo e pleomorfismo. O polimegatismo é um índice associado à variação de tamanho das células, enquanto o pleomorfismo é a variação do formato das células, como o percentual de células hexagonais (PIGATTO et al., 2008). Como limitações da técnica, podem ser citadas a dificuldade na diferenciação entre células saudáveis e células com alterações degenerativas e que, para uso em animais, especialmente os de grande porte, o exame é dificultado pela necessidade de contenção do paciente (ANDREW et al., 2001; SAAD et al., 2008). O alto custo do microscópio especular e a dificuldade em obter boas imagens em áreas endoteliais lesadas, comprometem a utilização da técnica, em muitos casos (PIGATTO et al., 2005).

A microscopia confocal permite a avaliação do endotélio e de outras estruturas da córnea *in vivo*, já tendo sido demonstrada em cães, gatos, pássaros e equinos (KAFARNIK et al., 2007; LEDBETTER & SCARLETT, 2009). A técnica possui uma

ampla aplicabilidade em oftalmologia, permitindo avaliar a morfologia e morfometria de várias camadas e células da córnea, em tecido vivo. A realização do exame requer a utilização de anestesia geral, na maioria das espécies animais (KAFARNIK, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das técnicas *in vitro* que tem sido amplamente utilizada em estudos de efeitos de diferentes substâncias ao endotélio da córnea, como antimicrobianos, corantes vitais, anestésicos, (EGGELING et al., 2000; ARY et al., 2006; CHOI & CHUNG, 2009), em investigações da ultra-estrutura endotelial, em espécies como jacarés, pinguins, avestruzes e coelhos (PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2009).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizada para avaliação ultra-estrutural do endotélio corneano, permitindo detectar alterações que ocorrem no meio intracelular. Em estudos de efeito citotóxico de diferentes substâncias, a técnica é muitas vezes associada à microscopia eletrônica de varredura (ARI et al., 2006; CHOI & CHUNG, 2009). A MEV e a MET são os métodos mais sensíveis para localizar alterações a nível celular (ARY et al., 2006). Contudo, requerem treinamento prévio, processamento das amostras e equipamentos sofisticados para sua realização.

Um dos métodos mais empregados para determinar morte celular ou áreas lesadas é através do uso de coloração por corantes vitais, como azul de tripano e/ou alizarina vermelha (SAAD et al., 2008). A técnica já foi empregada em trabalhos sobre transplante de córnea e estudos sobre o efeito de substâncias ao endotélio, como anestésicos de uso intraocular e outros, analisando, através de imagens fotográficas, a perda quantitativa e qualitativa de células (WERNER et al., 1998; EGGELING et al., 2000; LIOU et al., 2004; CHANG et al., 2005; TERRY et al., 2009; LANDRY et al., 2011). O azul de tripano é utilizado para identificar células endoteliais corneanas severamente danificadas ou mortas, enquanto a coloração com alizarina vermelha tem sido utilizada para identificar bordas celulares e áreas expostas da membrana de Descemet (PARK et al., 2012). Este método de avaliação do endotélio corneano possibilita uma forma simples, rápida e prática de detectar danos celulares (TAYLOR & HUNT, 1981). O azul de tripano cora o núcleo de células mortas em áreas onde a membrana plasmática não está intacta, tornando a célula permeável ao corante.

4 MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS

Esta dissertação de mestrado foi escrita na forma de artigo científico, conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Medicina Animal-Equinos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A metodologia, os resultados obtidos, a discussão e a conclusão desta pesquisa foram escritos de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira (PVB), para a qual o artigo será submetido.

5. ARTIGO

Avaliação do endotélio corneano de equinos após exposição à indocianina verde 0,5%- estudo *in vitro*

Vanessa Ruiz M. da Silva¹; João Antonio T. Pigatto¹; Maria Cristina C. Andrade¹;
Cláudia S. Faganello¹

ABSTRACT.- SILVA, V.R.M., PIGATTO, J.A.T., ANDRADE, M.C.C., & FAGANELLO, C.S. 2014. [**Evaluation of the equine corneal endothelium after exposure to indocyanine green 0,5%- *in vitro* study.**] Avaliação do endotélio corneano de equinos sob microscopia óptica após exposição à indocianina verde 0,5%- estudo *in vitro*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Serviço de Oftalmologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: vanessaruzms@hotmail.com

To assess the acute effects of indocyanine green on equine corneal endothelium were analyzed 24 corneas from 12 horses. The corneas were excised and indocyanine green was added dropwise over the endothelium for one minute. After vital staining with trypan blue and alizarin red S, the endothelium was evaluated and photographed using an optical microscope at a magnification of 40x. Quantitative analysis of the endothelial damage was performed. Optical microscopy demonstrated that corneal endothelium was continuous, without abnormalities detected in all eyes examined. Endothelial cell borders were visualized. Indocyanine green produced no areas of cells lost and there was no cell staining with trypan blue. *In vitro* exposure to indocyanine green showed no cytotoxic effects to equine corneal endothelium through evaluation using vital dyes.

INDEX TERMS: *Indocyanine green, equine corneal endothelium, trypan blue and alizarin red, light microscopic evaluation.*

¹ Serviço de Oftalmologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. *Autor para correspondência: vanessaruzms@hotmail.com

RESUMO.-Para avaliar os efeitos agudos da indocianina verde sobre o endotélio corneano de equinos, foram analisadas 24 córneas provenientes de 12 equinos. As córneas foram excisadas e a indocianina verde foi adicionada em gotas sobre o endotélio durante um minuto. Após coloração vital com alizarina vermelha S e azul de tripano, o endotélio foi avaliado e fotografado utilizando microscópio óptico em magnificação de 40X. Foi realizada análise quantitativa do dano endotelial. Através da microscopia óptica, foi demonstrado que o endotélio corneano foi contínuo e sem anormalidades detectáveis, em todos os olhos examinados. A indocianina verde não induziu perda celular e nem coloração pelo azul de tripano. A exposição do endotélio corneano de equinos à indocianina verde *in vitro* não demonstrou efeitos citotóxicos através de avaliação utilizando corantes vitais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Indocianina verde 0,5%, endotélio corneano equino, azul tripan e alizarina vermelha, avaliação sob microscopia óptica.

INTRODUÇÃO

A córnea é transparente e atua como a superfície de refração óptica mais potente do globo ocular (PARIKH & EDELHAUSER, 2003). O endotélio mantém a transparência da córnea através de suas funções de barreira e bomba, que regula a hidratação estromal. Na maioria das espécies, possui uma limitada capacidade de regeneração (MAGGS, 2008). Por este motivo, é de extrema importância preservar a integridade endotelial em casos onde se torna necessária intervenção cirúrgica intraocular ou corneal, visto que a perda do endotélio corneano poderá causar edema de córnea, não raro irreversível, levando à perda da visão.

A função e a estrutura das células endoteliais podem ser afetadas pela idade e por uma variedade de injúrias, como trauma, medicações, extração de catarata e ceratoplastia penetrante (RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2008; SAAD et al., 2008). Desordens oculares como glaucoma, ceratite intersticial, uveíte e anomalias congênitas do segmento anterior também podem danificar o endotélio (SAAD et al., 2008).

A catarata é o defeito ocular congênito mais frequente em potros (BROOKS, D.E., 2005) e, além disso, cataratas secundárias à uveíte recorrente equina ou trauma são frequentemente diagnosticadas em equinos adultos (BROOKS, D.E., 2005). Nesta

espécie, a facoemulsificação é a técnica de eleição para remoção de catarata (MILLICHAMP & DZIEZC, 2000; HARDMAN et al., 2001; BROOKS, 2005; FIFE et al., 2006; HARRINGTON et al., 2013). Um dos passos mais importantes deste procedimento é a capsulotomia curvilínea contínua (CCC), e a identificação da cápsula do cristalino pode ser dificultada com a presença de cataratas brancas, densas, com ausência de reflexo vermelho do olho (GERRIT, 1999; LINEBARGER, et al., 1999; RODRIGUES, et al., 2009). Nesses casos, o uso de corantes vitais para permitir visualização da cápsula anterior é importante (LINEBARGER, et al., 1999; HOLLEY et al., 2002).

Entre os métodos disponíveis para avaliação endotelial, encontram-se a microscopia especular (ANDREW et al., 2001; PIGATTO et al. 2008; FRANZEN et al., 2010), a microscopia confocal (KAFARNIK et al., 2007; LEDBETTER & SCARLETT, 2009), a microscopia eletrônica de varredura (PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005) e a microscopia óptica (RODRIGUES et al., 2006).

A toxicidade de corantes vitais ao endotélio da córnea, como o azul de tripano, a indocianina verde e o azul brilhante, tem sido avaliada (HORIGUCHI et al., 1998; CHANG et al., 2005; HISATOMI et al., 2006; CHANG et al., 2008).

Os corantes vitais azul de tripano e vermelho de alizarina têm sido utilizados para avaliar a viabilidade celular e os graus de danos à superfície endotelial (SPERLING, 1977; TAYLOR & HUNT, 1981; RUIZ et al., 1991).

A utilização do azul de tripano durante a realização da capsulotomia curvilínea contínua em equinos tem sido descrita (BROOKS, 2005). Contudo, não existem estudos avaliando os efeitos da indocianina verde no endotélio da córnea de equinos. Assim, este trabalho poderá servir como base para a utilização de uma possível alternativa ao azul de tripano para auxiliar a facoemulsificação em cavalos.

Objetivou-se avaliar os possíveis efeitos agudos da indocianina verde sobre o endotélio da córnea de equinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 24 bulbos oculares, provenientes de 12 equinos hípidos, de diferentes idades e raças, machos ou fêmeas, selecionados no abatedouro Foresta. Para execução da pesquisa, foram atendidas com rigor as normatizações da *ARVO* (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) relativas ao emprego de

animais em pesquisas oftálmicas. Os animais foram abatidos em matadouro frigorífico, com inspeção Federal, de acordo com os preceitos técnicos e humanitários vigentes na legislação específica.

Todos os olhos utilizados no experimento foram submetidos à avaliação oftálmica imediatamente após a enucleação, incluindo biomicroscopia com lâmpada de fenda¹ e prova de fluoresceína².

Imediatamente após o abate, foi realizada enucleação subconjuntival e os olhos foram mantidos em câmara úmida por até 4 horas.

Os pares de olhos coletados foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratamento, constituídos por olho direito e olho esquerdo, respectivamente.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi e de uma tesoura para córnea, foi seccionada a porção central da córnea, em que foi obtido um fragmento de 6X6 mm. Após, o fragmento foi posicionado sobre uma lâmina de vidro, com a face endotelial voltada para cima.

A solução de indocianina verde³ foi preparada pela dissolução de 5 mg de indocianina verde em 0,1 ml de solvente aquoso, que foi misturado em 0,9 ml de solução salina balanceada⁴ (BBS Plus®).

No grupo controle, foi realizada coloração com alizarina vermelha⁵ 0,2% e azul de tripano⁶ 0,25% utilizando o método descrito por *Taylor e Hunt, 1981*. No grupo tratamento, foi realizada a aplicação de 10 gotas do corante indocianina verde 0,5% sobre o endotélio corneano, durante um minuto, e após irrigação com 1 mL de solução salina balanceada, duas vezes. Em seguida, foi realizada coloração vital com alizarina vermelha 0,2% e azul de tripano 0,25%.

Para avaliação endotelial e registro fotográfico digital do endotélio, foi utilizado microscópio óptico⁷. De cada amostra, foram obtidas aleatoriamente três imagens nítidas com aumento de 40x.

O dano causado ao endotélio será avaliado em uma escala de 0% a 100%, considerando perda endotelial e células com núcleo corado, e as alterações classificadas conforme sua intensidade:

¹ Portable slit lamp SL15, Kowa, Japão.

² Fluoresceína sódica 1%, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

³ Indocianina verde 5 mg, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

⁴ Solução salina balanceada, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

⁵ Alizarina vermelha S, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

⁶ Azul de tripano, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

⁷ Microscópio biologic, Physis EXP 90.

- Ausente: alterações presentes em menos de 10% da área estudada;
- Leve: alterações presentes em 10 a 25% da área estudada;
- Moderado: alterações presentes em 25 a 50% da área estudada;
- Acentuado: alterações presentes em mais de 50% da área estudada.

RESULTADOS

Em todas as amostras foi possível observar um padrão regular de células poligonais justapostas, caracterizando o arranjo típico do endotélio corneano.

Não foram encontradas áreas de perda celular com a coloração pela alizarina vermelha, e nem células com núcleo corado pelo azul de tripano, não havendo diferenças entre grupo controle (Fig. 1) e grupo tratamento (Fig. 2).

DISCUSSÃO

Os corantes vitais têm sido empregados para facilitar a capsulotomia durante a cirurgia de catarata em humanos e animais. Além de corarem adequadamente a cápsula anterior, estes devem ser seguros quanto aos seus efeitos sobre as estruturas intraoculares. Entre os corantes utilizados para coloração da cápsula do cristalino, facilitando a sua visualização durante a CCC, encontram-se o azul tripano, a indocianina verde e o azul brilhante (HORIGUCHI et al., 1998; MELLES et al., 1999; HISATOMI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009). Contudo, ao recorrer à literatura, não foram encontrados estudos relativos aos possíveis efeitos da indocianina verde no endotélio corneano de equinos.

Neste sentido, a importância do tema, aliada à escassez de informações sobre os efeitos da indocianina verde sobre o endotélio da córnea de equinos, motivaram a realização deste estudo. A utilização de olhos de equinos destinados ao abate constituiu-se numa alternativa viável, evitando-se gastos com a manutenção dos animais. Além disso, com a opção pelo estudo *in vitro*, do ponto de vista ético, foi evitado o sacrifício de animais por motivos relacionados exclusivamente à pesquisa.

Neste estudo, os bulbos oculares foram enucleados imediatamente após o abate, submetidos ao exame oftálmico, mantidos em câmara úmida e estudados em até quatro horas após o óbito. Estudos prévios, realizados com bulbos oculares enucleados

demonstraram ser possível avaliar a córnea em até seis horas post-mortem sem que ocorram alterações estruturais no endotélio (ANDREW et al. 2001, VICENTI 2004, RODRIGUES et al. 2006, PIGATTO et al. 2005, PIGATTO et al. 2008, FRANZEN et al. 2010).

A capsulotomia curvilínea contínua contribuiu com a evolução da facoemulsificação, permitindo, entre outras vantagens, a melhor identificação das margens capsulares e o implante de lente intraocular (LINEBARGER, et al., 1999). Uma CCC incompleta ou inadequada pode causar subsequente ruptura capsular, perda vítrea e deslocamento do cristalino para o segmento posterior (HISATOMI, et al., 2006).

A utilização do azul de tripano para realização de CCC foi introduzido em 1999, desde quando ele se tornou o corante mais utilizado para coloração da cápsula anterior do cristalino (RODRIGUES et al., 2009). A concentração mais utilizada para coloração da cápsula anterior é azul tripan 0,1%. Ao comparar a indocianina verde com o azul tripan, em um estudo com olhos humanos de cadáveres, Pandey et al. (2000) concluíram que a injeção subcapsular intracamerar de indocianina verde foi superior ao azul tripan para permitir a visualização da cápsula anterior do cristalino. Como desvantagens da indocianina verde em relação ao azul de tripano, foram citadas o custo mais elevado e o fato de que, depois de diluída, ela é viável por apenas 10 horas (PANDEY et al., 2000; RODRIGUES et al., 2009).

A indocianina verde é um corante não tóxico, que tem sido utilizado em humanos tanto na medicina geral, para mensurar o fluxo sanguíneo cardíaco e hepático (HORIGUCHI et al., 1998), como especificamente na área oftalmológica, para corar a membrana limitante interna na cirurgia vitreoretiniana, e a cápsula anterior do cristalino em cirurgias de catarata (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

Horiguchi et al. (1998) descreveram uma técnica de coloração da cápsula anterior do cristalino utilizando a indocianina verde 0,5%. O procedimento cirúrgico foi bem sucedido em todos os pacientes, não havendo variação significativa da densidade de células endoteliais antes e após o procedimento, nem aumento de pressão intraocular ou aumento da inflamação intraocular.

Chang et al. (2005) investigaram o efeito no endotélio corneano de coelhos de diferentes corantes vitais, em diferentes concentrações, e também o efeito da indocianina verde 0,25% em exposição prolongada. Foi verificado que após a exposição das células endoteliais à indocianina verde por um minuto, na concentração de 0,5% ou

mais, ocorreu em aumento significativo do percentual de células lesadas. Não foi observado efeito citotóxico induzido pelo azul de tripano ou pela fluoresceína sódica nas concentrações testadas.

Existem diferentes métodos que permitem avaliar a estrutura e/ou viabilidade do endotélio da córnea, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Com a microscopia especular é possível avaliar o endotélio corneano *in vivo*, possibilitando determinar a densidade de células endoteliais (DCE) e a morfologia celular (PIGATTO et al., 2006; PIGATTO et al., 2008; FRANZEN et al., 2010; SZALAZAI et al., 2011). Esta técnica já foi utilizada em estudos de toxicidade de diferentes substâncias ao endotélio corneano, incluindo corantes vitais, antisséptico e anestésicos de uso intra-ocular (KIM et al., 1998; HORIGUCHI et al., 1998; NAOR et al., 2001; CHUNG et al., 2005; LANDRY et al., 2011). Como limitações da técnica incluem-se a dificuldade na diferenciação de células saudáveis de células degeneradas e que, para uso em animais, especialmente os de grande porte, o exame é dificultado pela necessidade de contenção do paciente (ANDREW et al., 2001; SAAD et al., 2008). O alto custo do microscópio especular e a dificuldade em obter boas imagens em áreas endoteliais lesadas, comprometem a utilização da técnica, em muitos casos (PIGATTO et al., 2005).

A microscopia eletrônica de varredura é uma das técnicas *in vitro* que tem sido amplamente utilizada em estudos de efeitos de diferentes substâncias ao endotélio da córnea, como antimicrobianos, corantes vitais e anestésicos, (EGGELING et al., 2000; ARY et al., 2006; CHOI & CHUNG, 2009). É utilizada principalmente para avaliação da ultraestrutura das células do endotélio corneano (PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2009).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizada para avaliação ultra-estrutural do endotélio corneano, permitindo detectar alterações que ocorrem no meio intracelular. Em estudos de efeito citotóxico de diferentes substâncias, a técnica é muitas vezes associada à microscopia eletrônica de varredura (ARY et al., 2006; CHOI & CHUNG, 2009). A MEV e a MET são os métodos mais sensíveis para localizar alterações a nível celular (ARY et al., 2006). Contudo, requerem processamento das amostras e equipamentos de custo elevado para sua realização.

Entre os métodos mais empregados para avaliar a morte celular ou áreas lesadas encontra-se a técnica de coloração por corantes vitais, com azul de tripano e/ou alizarina vermelha (SAAD et al., 2008). Esta técnica *in vitro* tem sido usada para determinar

trauma celular agudo e morte celular (SAAD et al., 2008). Avaliação endotelial pré-operatória para transplante de córnea (TERRY et al., 2009; SAAD et al., 2008) e estudos sobre o efeito de substâncias ao endotélio, como anestésicos de uso intraocular e outros, foram realizados com esta técnica de coloração vital para analisar, através de imagens fotográficas, a perda quantitativa e qualitativa de células (WERNER et al., 1998; EGGELING et al., 2000; LIOU et al., 2004; CHANG et al., 2005; TERRY et al., 2009; LANDRY et al., 2011).

No presente estudo, a coloração empregada, associando o vermelho de alizarina ao azul de tripano, mostrou-se factível para a análise e o registro fotográfico do endotélio da córnea de equinos. O azul de tripano é utilizado para identificar células endoteliais corneanas severamente danificadas ou mortas, enquanto a coloração com alizarina vermelha tem sido utilizada para identificar bordas celulares e áreas expostas da membrana de Descemet (PARK et al., 2012).

O método de avaliação do endotélio corneano através de corantes vitais possibilita uma forma simples, rápida e prática de detectar danos celulares (TAYLOR & HUNT, 1981). O azul de tripano cora o núcleo de células mortas em áreas onde a membrana plasmática não está intacta, tornando a célula permeável ao corante. A alizarina vermelha cora os espaços intercelulares e a membrana de Descemet em áreas com perda ou necrose de células endoteliais (SAAD, 2008). No presente estudo, foi utilizada a técnica de coloração descrita por Taylor & Hunt, 1981, demonstrando que este protocolo pode ser aplicado em córneas de equinos, pois foi possível obter imagens nítidas do endotélio corneano.

Neste estudo, não foram visualizados efeitos tóxicos imediatos causados pela exposição do endotélio corneano de equinos à indocianina verde em nenhuma amostra analisada.

Em estudos anteriores, foi possível identificar perdas e danos celulares utilizando os corantes vitais alizarina vermelha e azul de tripano (NAOR et al., 2001; OH et al., 2007; TERRY et al., 2008; LANDRY et al., 2011). As células danificadas, que se tornam permeáveis ao azul de tripano, demonstram uma coloração azul em seu núcleo, em contraste com a ausência de coloração de células saudáveis. A alizarina vermelha permite a coloração das bordas intercelulares das células endoteliais e possibilita a identificação de áreas expostas da membrana de Descemet devido à perda de células endoteliais. Estas áreas correspondentes à membrana de Descemet exposta são identificadas por uma coloração vermelha difusa.

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a indocianina verde não induziu dano no endotélio da córnea de equinos.

Agradecimentos.- Ao Frigorífico Foresta, pelas amostras fornecidas.

REFERÊNCIAS

- Andrew, S. et al. 2001. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *Am J Vet Res.* 62: 479–482.
- Ari, S. et al. 2006. Effects of Trypan Blue on Corneal Endothelium and Anterior Lens Capsule in Albino Wistar Rats: An Investigator-Masked, Controlled, Two-Period, Experimental Study. *Curr Ther Res Clin Exp.* 67: 366-377.
- Brooks, D.E. 2005. Phacoemulsification Cataract Surgery in the Horse. *Clin Tech Equine Pract* 4: 11-20.
- Chang, Y. et al. 2008. Indocyanine Green-assisted Phacoemulsification in Cases of Complicated or Simple Advanced Cataracts. *J Formos Med Assoc.* 107: 710-719.
- Chang, Y. et al. 2005. Comparison of dyes for cataract surgery Part 1: Cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg.* 31: 792-798.
- Choi, J.A. ; Chung, S.K. 2009. Safety of Intracameral Injection of Gatifloxacin, Levofloxacin on Corneal Endothelial Structure and Viability. *J Ocul Pharmacol Ther.* 25: 425-431.
- Chung, C.F. et al. 2005. Safety of trypan blue 1% and indocyanine green 0.5% in assisting visualization of anterior capsule during phacoemulsification in mature cataract. *J Cataract Refract Surg.* 31: 938-942.
- Eggeling, P. et al. 2000. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. *J Cataract Refract Surg.* 26: 1403-1408.
- Fife, T.M. et al. 2006. Clinical features and outcomes of phacoemulsification in 39 horses: a retrospective study (1993–2003). *Vet Ophthalmol.* 9: 361-368.
- Franzen, A.A. et al. 2010. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Vet Ophthalmol.* 13: 222-226.
- Gerrit, R.J. 1999. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 25: 7-9.
- Hardman, C., McInay, T.R., Dungan, S.J. 2001. Phacofragmentation for morgagnian cataract in a horse. *Vet Ophthalmol.* 4: 221-225.

- Harrington, J.T. et al. 2013. Phacoemulsification and +14 diopter intraocular lens placement in a Saddlebred foal. *Vet Ophthalmol.* 16: 140-148.
- Hisatomi, T. et al. 2006. Staining Ability and Biocompatibility of Brilliant Blue G. *Arch Ophthalmol.* 124: 514-519.
- Holley, G.P. et al. 2002. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability An in vitro study. *J Cataract Refract Surg.* 28:1027-1033.
- Horiguchi, M. et al. 1998. Staining of the Lens Capsule for Circular Continuous Capsulorrhexis in Eyes With White Cataract. *Arch Ophthalmol.* 116: 535-537.
- Kafarnik, C.; Fritzche, J.; Reese, S. 2007. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet Ophthalmol.* 10: 222-230.
- Kim, T. et al. 1998. The Effects of Intraocular Lidocaine on the Corneal Endothelium. *Ophthalmology.* 105: 125-130.
- Landry, H. et al. 2011. Corneal Endothelial Toxicity of Air and SF6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 2279-2286.
- Linebarger, E.J. et al. 1999. Phacoemulsification and Modern Cataract Surgery. *Surv Ophthalmol.* 44: 123-147.
- Liou, S. et al. 2004. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. *J Cataract Refract Surg.* 30: 1351-1355.
- Ledbetter, E.C.; Scarlett, J.M. 2009. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Vet Ophthalmol.* 12: 57-64.
- Naor, J. et al. 2001. Corneal endothelial cytotoxicity of diluted povidone-iodine. *J Cataract Refract Surg.* 27: 941-947.
- MAGGS, D.J. 2008. Cornea and sclera, p. 175-202. In: SLATTER, D. *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology.* 4. ed. Missouri.
- Melles, G.R.J. et al. 1999. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorrhexis in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 25: 7-9.
- Millichamp, N.J. & Dziezc, J. 2000. Cataract phacofragmentation in horses. *Vet Ophthalmol.* 3: 157-164.
- Naor, J. et al. 2001. Corneal endothelial cytotoxicity of diluted povidone-iodine. *J Cataract Refract Surg.* 27:941-947.
- OFRI, R. Lens. In: Slatter's *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology.* 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2008. v. 1, cap. 13, p. 258-276.
- OH, J.Y. et al. 2007. Short-term effect of intracameral triamcinolone. *Eye.* 21:812-818.

- Pandey, S.K. et al. 2000. Dye-enhanced cataract surgery Part 1: Anterior capsule staining for capsulorhexis in advanced/white cataract. *J Cataract Refract Surg.* 26: 1052-1059.
- Parikh, C.H.; Edelhauser, H.F. 2003. Ocular surgical pharmacology: corneal endothelial safety and toxicity. *Curr Opin Ophthalmol.* 14:178-185.
- Park, S. et al. 2012. Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelial Cells. *Cornea.* 31: 1476-1479.
- Pigatto, J.A.T. et al. 2004. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Vet Ophthalmol.* 7: 205-208.
- Pigatto, J.A.T. et al. 2005a. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci Vet.* 33: 41- 45.
- Pigatto, J.A.T. et al. 2005b. Corneal endothelium of the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Z Wildlife Med,* 36: 702-705.
- Pigatto, J.A.T. et al. 2006. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Braz. J. vet Res. Anim. Sci,* 43: 476-480.
- Pigatto, J.A.T. et al. 2008. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesq. Vet. Bras.* 28: 427-430.
- Pigatto, J.A.T. et al. 2009. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural,* 39: 926-929.
- Rodrigues, G.N. et al. 2006. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet Ophthalmol.* 9: 101-107.
- Rodrigues, E.B. et al. 2009. The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. *Surv Ophthalmol.* 54: 576-617.
- Ruiz, J.M.; Medrano, M.; Alió, J.L. 1991. An improved method of vital staining of the corneal endothelium. *Ophthalmic Res, Basel.* 23: 27.
- Saad, H.A. et al. 2008. An Easy and Inexpensive Method for Quantitative Analysis of Endothelial Damage by Using Vital Dye Staining and Adobe Photoshop Software. *Cornea.* 27:818-824.
- Sperling, S. 1977. Combined staining of corneal endothelium by alizarin red and trypan blue. *Acta Ophthalmol.* 55: 573-580.
- Taylor, M.J. & Hunt, C.J. 1981. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol.* 65: 815-819.

Terry, M.A. 2009. Endothelial Keratoplasty: The Influence of Insertion Techniques and Incision Size on Donor Endothelial Survival. *Cornea*. 28: 24-31.

Werner, L.P. et al. 1998. Toxicity of Xylocaine to rabbit corneal endothelium. *J Cataract Refract Surg*. 24: 1371-1376.

Legendas das figuras

Fig. 1 Fotomicrografia do endotélio corneano de equino após coloração vital com vermelho de alizarina e azul de tripano. Olho direito (controle). Observa-se um padrão regular de células poligonais justapostas, caracterizando o arranjo típico do endotélio corneano. Presença de células poligonais, com bordos bem definidos (40x).

Fig. 2 Fotomicrografia do endotélio corneano de equino após aplicação de indocianina verde e coloração vital com vermelho de alizarina e azul de tripano. Olho esquerdo (tratamento). Observar ausência de áreas desnudas de células ou células coradas pelo azul de tripano (40x).

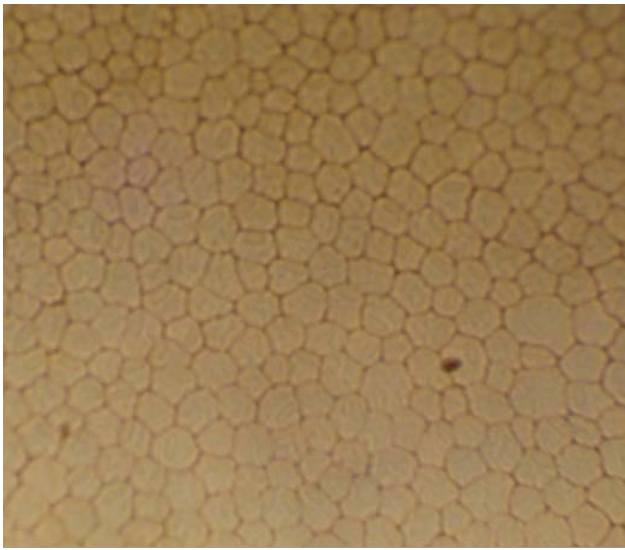


Figura 1

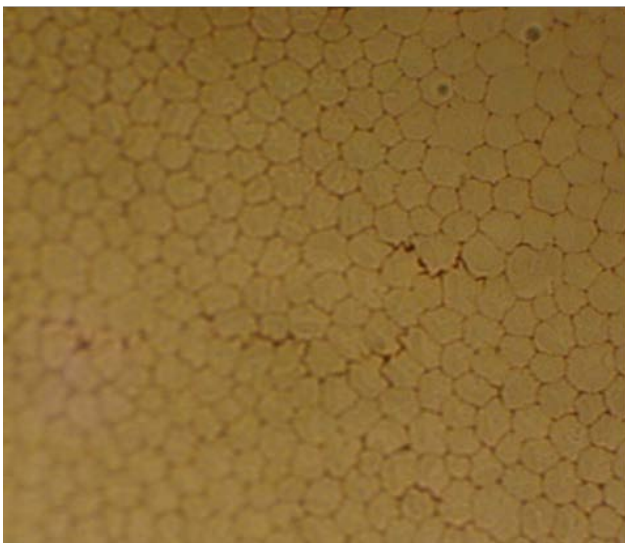


Figura 2

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo observou-se que foi possível avaliar os efeitos da indocianina verde sobre o endotélio corneano de equinos utilizando a técnica de coloração vital com azul de tripano e alizarina vermelha.

7 CONCLUSÕES

A exposição do endotélio corneano de equinos à indocianina verde, *in vitro*, não provocou alterações com relação à perda de células endoteliais ou quanto à viabilidade celular, demonstrado através da técnica de coloração vital com azul de tripano e alizarina vermelha. Com isso, foi possível concluir que a indocianina verde não causou efeitos deletérios agudos *in vitro* no endotélio corneano de equinos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIB, FC. **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000, p. 140.

ANDREW, S. et al. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **Am J Vet Res**, v. 62, n. 4, p. 479–482, apr. 2001.

ANDREW, S.E.; WILLIS, A.M.; ANDERSON, D.E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **Am J Vet Res**, v. 63, n. 3, p. 326–329, mar. 2002.

ARI, S. 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. **Curr Ther Res Clin Exp**, v. 67, n. 6, p. 366-377, dec. 2006.

BROOKS, D.E. Phacoemulsification Cataract Surgery in the Horse. **Clin Tech Equine Pract**, v. 4, n. 1, p. 11-20, mar. 2005.

CHOI, J.A. ; CHUNG, S.K. Safety of Intracameral Injection of Gatifloxacin, Levofloxacin on Corneal Endothelial Structure and Viability. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 25, n. 5, p. 425-431, june 2009.

CHUNG, C.F. et al. Safety of trypan blue 1% and indocyanine green 0.5% in assisting visualization of anterior capsule during phacoemulsification in mature cataract. **J Cataract Refract Surg**, v.31, n. 5, p. 938–942, sept. 2005.

CLODE, A.B.; MATTHEWS, A. Diseases and Surgery of the Cornea. In: GILGER, B.C. **Equine ophthalmology**. 2 ed. China: Elsevier, 2011. cap. 5, p. 181-266.

COLLIN, S.P.; COLLIN, H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clin and Exp Optometry**, v. 81, n. 6, p. 245–254, dec. 1998.

EGGELING, P. et al. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. **J Cataract Refract Surg**, v. 26, n. 9, p. 1403-1408, sept. 2000.

FRANZEN, A.A. et al. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Vet Ophthalmol**, v. 13, n. 4, p. 222–226, 2010.

GERRIT, R.J. et al. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. **J Cataract Refrac Surg**, v. 25, n. 1, p. 7-9, jan. 1999.

HISATOMI, T. et al. Staining Ability and Biocompatibility of Brilliant Blue G. **Arch Ophthalmol**, v.124, n. 4, p.514-519, apr. 2006.

HOLLEY, G.P. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability: an in vitro study. **J Cataract Refract Surg**, v. 28, n. 6, p. 1027-1033, june 2002.

- HORIGUCHI, M. et al. Staining of the Lens Capsule for Circular Continuous Capsulorrhesis in Eyes With White Cataract. **Arch Ophthalmol**, v.116, n. 4, p. 535-537, apr. 1998.
- KAFARNIK, C.; FRITZCHE, J.; REESE, S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. **Vet Ophthalmol**, v. 10, n. 4, p. 222–230, 2007.
- KIM, T. et al., The Effects of Intraocular Lidocaine on the Corneal Endothelium. **Ophthalmology**, v.105, n. 1, p. 125-130, jan.1998.
- LANDRY, H. et al. Corneal Endothelial Toxicity of Air and SF6. **Invest Ophthalmol Visual Sci**, v. 52, n. 5, p. 2279-2286, apr. 2011.
- LEDBETTER, E.C.; SCARLETT, J.M. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. **Vet Ophthalmol**, v. 12, n. 1, p. 57–64, 2009.
- LINEBARGER, E.J. et al. Phacoemulsification and Modern Cataract Surgery. **Survey of Ophthalmol**, v. 44, n. 2, p. 123-147, oct.1999.
- MARBACK, E.F. et al. Anterior capsule staining using 0.025% trypan blue in cataracts without red reflex. **Arq Bras Oftalmol**, v. 64, n. 4, p. 333-335, 2001.
- MAGGS, D.J. Cornea and sclera. In: SLATTER, D. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2008. v. 1, cap. 10, p. 175-202.
- MELLES, G.R.J. et al. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorrhesis in cataract surgery. **J Cataract Refract Surg**, v. 25, n. 1, p. 7-9, jan. 1999.
- NAOR, J. et al. Corneal endothelial cytotoxicity of diluted povidone–iodine. **J Cataract Refract Surg**, v. 27, n. 6, p. 941–947, jun. 2001.
- OFRI, R. Lens. In: SLATTER, D. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2008. v. 1, cap. 13, p. 258-276.
- PANDEY, S.K. Dye-enhanced cataract surgery. Part 1: Anterior capsule staining for capsulorrhesis in advanced/white cataract. **J Cataract Refract Surg**, v. 26, n. 7, p. 1052-1059, july 2000.
- PARIKH, C.H.; EDELHAUSER, H.F. Ocular surgical pharmacology: corneal endothelial safety and toxicity. **Curr Opin Ophthalmol**, v.14, n. 4, p.178–185, aug. 2003.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Vet Ophthalmol**, v. 7 , n. 3, p. 205–208, may 2004.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Sci Vet**, 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. **J Z Wildlife Med**, 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. **Braz J Vet Res Anim Sci**, 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. **Pesq Vet Bras**, v. 28, n.9, p.427-430, set. 2008.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. **Ciênc Rural**, v. 39, n. 3, p. 926-929, june 2009.
- RODRIGUES, G.N., et al. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Vet Ophthalmol**, v. 9, n. 2, p. 101–107, 2006.
- RODRIGUES, E.B. et al. The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. **Survey of Ophthalmol**, v. 54, n. 5, p. 576-617, oct. 2009.
- 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, aug. 2008.
- SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p. 283-338.
- SLATTER, D. Lente. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 14, p. 409-440.
- SZALAZAI, E. et al. Evaluation of the Corneal Endothelium Using Noncontact and Contact Specular Microscopy. **Cornea**, v.30, n. 5, p. 567–570, may 2011.
- VICENTI, F. **Morfologia e morfometria do endotélio corneal de olhos normais de suínos (*Sus scrofa domesticus*, LINNAEUS, 1758) à microscopia especular**. 2004. 61f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Cirurgia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- WERNER, L.P. Toxicity of Xylocaine to rabbit corneal endothelium. **J Cataract Refract Surg**, v. 24, n. 10, p. 1371-1376, oct. 1998.

