

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) APÓS EXPOSIÇÃO AO BESILATO DE ATRACÚRIO – ESTUDO  
*IN VITRO***

CELESTE BLUMENTHAL GUIMARÃES

PORTO ALEGRE

2015

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) APÓS EXPOSIÇÃO AO BESILATO DE ATRACÚRIO – ESTUDO  
*IN VITRO***

**Autora:** Celeste Blumenthal Guimarães

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

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

PORTO ALEGRE

2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Blumenthal Guimarães, Celeste  
Avaliação do endotélio corneano de galinhas  
(Gallus Gallus domesticus) após exposição ao besilato  
de atracúrio - Estudo in vitro / Celeste Blumenthal  
Guimarães. -- 2015.  
49 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

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

1. corantes vitais. 2. aves. 3. dano endotelial.  
I. Pigatto, João Antonio Tadeu, orient. II. Título.

Celeste Blumenthal Guimarães

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) APÓS EXPOSIÇÃO AO BESILATO DE ATRACÚRIO – ESTUDO *IN VITRO*

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 Caríssimi  
Membro da Comissão

---

Profª. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araujo  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, Professor **Pigatto**, pela oportunidade de ter sido sua aluna e por ser um exemplo de liderança e dedicação à pesquisa.

Muito obrigada a minha colega **Luciane** por todo o suporte que foi fundamental em cada passo da execução deste trabalho.

Minha imensa gratidão aos meus pais, **Tania** e **Derli** por todo o amor, liberdade e incentivo. Amo vocês e espero poder trazer felicidade para vocês sempre.

Ao meu **Gusta**, por todo amor, amizade, companheirismo e paciência. Te amo.

Um agradecimento especial à equipe do **Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFRGS**, pela amizade, bom humor e por marcarem sete cirurgias por tarde pra que eu possa anestésiar e acumular experiência.

Agradeço ao Professor **André Caríssimi** por disponibilizar seu espaço e seu tempo sempre de maneira acolhedora, sendo fundamental para a realização deste trabalho.

A minha amiga de toda a vida **Mari Mizutani** pela disponibilidade, amizade verdadeira e talento com as análises estatísticas.

Muito obrigada aos membros da banca, Professora **Ana Cristina Araujo**, Professor **André Caríssimi** e Professor **Marcelo Alievi** pela disponibilidade e por contribuírem com o enriquecimento deste trabalho.

Por fim, e claro, não menos importante, agradeço a **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo para a realização deste projeto.

**Autora:** Celeste Blumenthal Guimarães

**Orientador:** João Antonio Tadeu Pigatto

## RESUMO

A musculatura iridiana de várias espécies de aves é estriada esquelética, dessa forma o controle da midríase transoperatória não é conseguida por agentes que atuem no sistema nervoso autônomo, como ocorre nos mamíferos. O besilato de atracúrio é um agente neurobloqueador que atua no miolorrelaxamento esquelético. O uso intracamerar deste fármaco tem sido realizado em aves e promove midríase imediata, a qual é fundamental em cirurgias para remoção da catarata. Objetivou-se avaliar a repercussão do uso de besilato de atracúrio no endotélio da córnea de galinhas. Utilizaram-se 20 córneas de 10 galinhas (*Gallus gallus domesticus*) que foram avaliadas após a excisão dos botões corneoesclerais e divididas em dois grupos: G1, composto pelas córneas dos bulbos oculares esquerdos, (grupo experimental) e G2, córneas dos bulbos oculares direitos (grupo controle). No grupo experimental foram aplicados 0,2 ml de besilato de atracúrio durante 3 minutos e após, as córneas foram lavadas com solução salina a 0,9%. As córneas do grupo controle receberam apenas solução salina a 0,9%. As córneas de ambos os grupos foram coradas com a técnica de coloração vital, primeiramente com vermelho de alizarina a 0,2% e após, com azul de tripano a 0,25% e visualizada por microscopia óptica. Foram obtidas 10 fotomicrografias aleatórias de cada amostra. Como resultado, observou-se que a área de desnudamento endotelial e exposição da membrana de Descemet no grupo experimental (G1) foi significativamente maior (22,23% +/- 13,67%) que a do grupo controle (G2) que foi de 0,75%. Foi possível concluir que o besilato de atracúrio induziu dano ao endotélio corneano de galinhas.

**Palavras chave:** corantes vitais, aves, dano endotelial, vermelho de alizarina.

## ABSTRACT

*The iridian muscle of various species of birds is skeletal striated, this way, the control of intraoperative mydriasis is not achieved by agents that act in the autonomous nervous system, as in the case of mammals. The atracurium is a neuromuscular blocking agent that causes skeletal muscle relaxation. The intracameral use of atracurium in the anterior chamber has been performed in birds and promotes immediate mydriasis, fundamental in cataract surgeries. Therefore this study aimed to check the effect of the use of atracurium in the corneal endothelium chickens. Twenty corneas of ten chickens (*Gallus gallus domesticus*) that have been evaluated after excision of the corneoesclerals buttons, were divided into two groups: G1, compound by corneas of the lefts eye bulbs (experimental group) and G2, corneas of the rights ocular bulbs (control group). In the experimental group there were 0.2 ml of atracurium besylate applied for three minutes and then the corneas were washed with 0.9% saline solution. The corneas of the control group received only 0.9% saline solution. The corneas of both of groups were then stained with the vital staining technique, first with alizarin red 0,2% and then, with trypan blue 0,25%, and, visualized by light microscopy and 10 random microphotographs were obtained of each sample. The results confirm that the area of endothelial denudation and Descemet's membrane exposure on the experimental group (G1) was significantly higher (22,23% +/- 13,67%) than in the control group (G2) that was 0,75%. It was concluded that the atracurium induced damage on the corneal endothelium of chickens.*

**Keywords:** *vital dye staining, endothelial damage, alizarin red.*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Prof.: Professor  
Dr.: Doutor  
G1: grupo 1  
G2: grupo 2  
%: por cento  
ml: mililitro  
pH: potencial hidrogeniônico  
et al.: e outros  
Na<sup>+</sup>: íon sódio  
K<sup>+</sup>: íon potássio  
ATP: adenosina trifosfato  
mm: milímetro  
células/mm<sup>2</sup>: células por milímetro quadrado  
+/-: mais ou menos  
µm: micrometros  
µm<sup>2</sup>: micrometros quadrados  
mm<sup>2</sup>: milímetros quadrados  
BSS: balanced salt solution (solução salina balanceada)  
®: marca registrada  
NaCl: cloreto de sódio  
mg: miligrama  
mg/ml: miligramas por mililitro  
MET: microscopia eletrônica de varredura  
MET: microscopia eletrônica de transmissão  
mOsm: miliosmol  
mOsm/L: miliosmol por litro  
mg/Kg: miligramas por quilograma  
µg: microgramas  
ISSN: International Standard Serial Number  
360°: 360 graus  
=: igual  
Fig.: figura  
p: significância  
t: valor do teste t  
&: e



## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 Objetivo geral	
2.2 Objetivos específicos	
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
<b>3.1 Endotélio corneano</b> .....	12
3.1.1 Endotélio corneano das aves.....	14
<b>3.2 Fatores lesivos ao endotélio corneano</b> .....	16
3.2.1 Toxicidade endotelial.....	17
3.2.1.1 Efeitos da alteração do pH e osmolaridade das soluções no endotélio corneano.....	22
<b>3.3 Besilato de atracúrio</b> .....	23
3.3.1 O uso do besilato de atracúrio em cirurgias intraoculares em aves.....	24
<b>3.4 Métodos de avaliação do endotélio corneano</b> .....	25
3.4.1 O uso dos corantes vitais vermelho de alizarina e azul de tripano para avaliação endotelial <i>in vitro</i> .....	26
<b>4 ARTIGO: .Avaliação do endotélio corneano de galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>) após exposição ao besilato de atracúrio – Estudo <i>in vitro</i></b>	
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Materiais e métodos.....	31
Resultado.....	32
Discussão e conclusão.....	34
Referências.....	36
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais interligadas que compõe a superfície posterior da córnea (SVEDBERGH & BILL, 1972; YEE *et al.*, 1987; PIGATTO *et al.*, 2004; DeMONTE & KIM, 2011). A integridade e a atividade metabólica do endotélio são essenciais para a manutenção da transparência da córnea (WARING *et al.* 1982; TUFT & COSTER, 1990; JOYCE, 2012).

As aves podem ser acometidas pela opacificação do cristalino e de sua cápsula, sendo causas comuns de cegueira em animais em cativeiro ou de vida livre. A opacificação da lente geralmente é causada por trauma, herança genética, fatores tóxicos ou inflamatórios (BROOKS, 1997; MURPHY, 1987; KERN, 1997). A catarata juvenil foi relatada em calopsitas e corujinhas-do-mato (GREENWOOD & BARNETT, 1981; MURPHY, 1987). Em canários, características hereditárias têm sido consideradas a causa dessas opacidades (MONTIANI-FERREIRA, 2001). Cataratas congênitas bilaterais em filhotes de avestruz foram descritas por Black (1993). A acuidade visual é fundamental para que as aves consigam se alimentar, devido a esse fato, a cirurgia para remoção da catarata em aves de vida livre evita a sua permanência em cativeiro ou até mesmo que sejam encaminhadas para eutanásia nas situações em que desenvolvem opacificação da lente (MURPHY, 1987).

A cirurgia para remoção da catarata foi relatada em diversas espécies de aves de rapina (KERN *et al.*, 1984; MOORE *et al.*, 1985; KERN, 1997). Na maioria das aves pseriformes, devido ao pequeno tamanho do bulbo ocular, não se realiza a extração da lente. No entanto, em aves de rapina, como abutres, as técnicas de punção e aspiração, extração extracapsular e facoemulsificação são possíveis e têm sido executadas com sucesso (KERN, 1997; MONTIANI-FERREIRA, 2001).

A íris de várias espécies de aves possui musculatura estriada (OLIPHANT *et al.*, 1983) que é irresponsiva aos midriáticos e ciclopégicos usuais, sendo assim, se faz necessário o uso de bloqueadores neuromusculares para a dilatação pupilar fundamental ao procedimento (BROOKS, 1997). O uso de besilato de atracúrio como midriático em cirurgias de cataratas em aves já foi descrito por alguns autores como um método eficaz (GONÇALVES *et al.*, 2006; CARTER *et al.*, 2007).

Os fatores que podem levar a alterações no endotélio da córnea incluem envelhecimento, doenças, traumas cirúrgicos (PIGATTO *et al.*, 2004), assim como a

utilização de fármacos de uso intraocular, como antimicrobianos e anestésicos são potencialmente tóxicos para o endotélio corneano (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

Objetivou-se com este estudo avaliar os possíveis efeitos do besilato de atracúrio no endotélio corneano de galinhas através de coloração vital com vermelho de alizarina e azul de tripano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a repercussão do uso de besilato de atracúrio no endotélio corneano de galinhas, utilizando os corantes vitais vermelho de alizarina e azul de tripano.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar se o uso dos corantes vitais juntamente com a microscopia óptica constituem um método viável para a análise endotelial neste estudo.
- Avaliar se o tempo de exposição do endotélio corneano de galinhas ao besilato de atracúrio foi adequado para observação da sua repercussão.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Endotélio corneano

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais uniformes que recobre a superfície posterior da córnea (PIGATTO *et al.*, 2005; GUM, 2007, PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN, 2010). Está em contato anteriormente com a membrana de Descemet e posteriormente com o humor aquoso (TUFT & COASTER, 1990; PIGATTO *et al.*, 2005). Esse mosaico endotelial foi descrito pela primeira vez por Vogt, em 1920, por meio de biomicroscopia (BOTEON, 2000). Sua integridade e atividade metabólica são essenciais para manutenção da transparência corneana (COLLIN & COLLIN, 1998; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

A maioria das células endoteliais possui formato hexagonal, mas também são encontradas células com quatro, cinco, sete e oito lados (TUFT & COASTER, 1990; DOUGHTY, 1998; RAO *et al.*, 2003; PIGATTO *et al.*, 2005). Assim, o padrão hexagonal de 65 a 70% em córneas normais, forma uma estrutura estável e com variação mínima no tamanho celular (AABERG, 1984; DOUGHTY, 1998; RAO *et al.*, 2003).

As células endoteliais da maioria das espécies animais como cães, gatos, coelhos, chinchilas e humanos apresentam bordos irregulares, com interdigitações e vilosidades em sua superfície celular (TUFT & COASTER, 1990; COLLIN & COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005; PIGATTO *et al.*, 2008). A maioria das espécies possui cílios na região posterior das células endoteliais, centralizados e voltados para a câmara anterior. Cada célula possui um cílio único e já foram descritos no homem, em outros primatas, suínos, aves e coelhos, porém o processamento das amostras e o stress fisiológico podem fazer com que se quebrem ou se retraiam dificultando sua observação nas amostras em estudo (COLLIN & COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

As membranas laterais das células endoteliais são unidas por complexos juncionais ou junções *gap*. Estes são divididos em *zonula occludens* que se localizam no terço posterior e em *macula occludens* e *macula adherens* que se encontram nos dois terços anteriores, sendo raras. A *macula adherens* foi denominada anteriormente de desmossoma (BOTEON, 2000).

A função das microvilosidades e das interdigitações é aumentar a superfície de contato e a adesão intercelular. Já o papel dos cílios não está bem estabelecido, mas acredita-se que sirvam como quimiorreceptores, osmorreguladores ou detectores de pressão. Estudos prévios têm relacionado os cílios à capacidade mitótica das células endoteliais, embora a mitose destas células tenha sido observada apenas em algumas espécies, como em coelhos, ou em animais jovens (COLLIN & COLLIN, 1998).

O endotélio é a camada da córnea com maior atividade metabólica, possui um mecanismo de bombeamento ativo, com a presença de bombas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , que removem a água do estroma corneano em direção à câmara anterior e mantém a córnea em um estado constante de deturgescência, o que provém seu aspecto transparente (TUFT & COASTER, 1990; COLLIN & COLLIN, 1998, GUM, 2007). Ele apresenta essa grande atividade devido à presença de inúmeras organelas, como mitocôndrias, responsáveis pela produção de ATP, assim como retículos endoplasmáticos lisos e rugosos bem desenvolvidos. O metabolismo da córnea ocorre por simples difusão através de capilares perilímbicos (MISHIMA, 1982).

A manutenção da transparência e da espessura da córnea é decorrente de dois mecanismos que permitem estabelecer o seu estado de deturgescência. Estes mecanismos são as funções de barreira e bomba ativa de fluidos (MISHIMA, 1982; YEE *et al.*, 1985; TUFT & COASTER, 1990). Se a função endotelial é ineficiente, a água difunde para o interior do estroma, desorganizando as fibras de colágeno, opacificando a córnea (WARING, 1982) e aumentando a sua espessura (MISHIMA, 1982; RAO *et al.*, 2003).

A função barreira se dá pela presença dos complexos juncionais, que mantêm as células endoteliais unidas e impedem a permeabilidade de solutos para o espaço intercelular (TUFT & COASTER, 1990; MISHIMA, 1982).

A bomba ativa atua na remoção de fluidos do estroma para a câmara anterior, através do transporte ativo de íons bicarbonato, sódio e potássio (YEE *et al.*, 1985; SLATTER, 2005). Este transporte necessita da quebra da glicose via glicólise e via ciclo do ácido tricarboxílico, gerando o ATP necessário para a atividade da bomba (MISHIMA, 1982; YEE *et al.*, 1985).

Diversas são as causas de perda endotelial, como envelhecimento, inflamações intraoculares, traumas, hipertensão intraocular, procedimentos cirúrgicos intraoculares, toxicidade a fármacos intracamerulares e diabetes mellitus (REHANY *et al.*, 2000; PRIYA *et al.*, 2011).

A microscopia especular permitiu o registro da densidade endotelial (população de células endoteliais por mm<sup>2</sup>) (ABIB, 2000). Com o avançar da idade, ocorre uma redução no número de células endoteliais (densidade endotelial) e ocorre um mecanismo de compensação com o aumento do tamanho das células (polimegatismo) e a alteração dos seus formatos (pleomorfismo) (PIGATTO *et al.*, 2005; GUM, 2007; FRANZEN *et al.*, 2010). Em alguns vertebrados, ocorre a regeneração através de mitose (BEUERMAN & PEDROSA, 1996) em outros, a mitose somente ocorre no início da vida, justificando a redução da densidade com o passar do tempo (HOGAN *et al.*, 1971). As células endoteliais hipertrofiam e migram a fim de ocupar o espaço deixado pela perda celular ao longo da vida (TUFT & COASTER, 1990; NASSARALLA, 2000). Para a migração, as células rompem suas junções intercelulares e desenvolvem pseudópodos para movimentarem-se em média 0,5 a 1 mm por dia em direção à lesão (BEFANIS *et al.*, 1981; TUFT & COASTER, 1990). Quando as células chegam ao centro da lesão, ocorre um estímulo inibitório pelo contato celular, dando fim à migração (MISHIMA *et al.*, 1982).

Estudos relatam a inexistência de diferenças nos parâmetros endoteliais entre os olhos direitos e esquerdo em diferentes espécies, o que permite extrapolar a avaliação de um endotélio para o olho adelfo (PEIFFER *et al.*, 1981; GWIN *et al.*, 1982; MORITA, 1995; ANDREW *et al.*, 2001; TAMAIO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010).

### 3.1.1 Endotélio corneano das aves

Algumas espécies de aves já tiveram seus endotélios corneanos estudados. O endotélio de ganso demonstrou a densidade de 2410 células/ mm<sup>2</sup> com um padrão hexagonal uniforme de 79%, assemelhando-se ao de mamíferos (YEE *et al.*, 1987). Collin e Collin (1998) usaram a microscopia eletrônica de varredura para avaliar o endotélio de quatro espécies de aves, sendo elas, o avestruz sul-africano (*Struthio camelus australis*), a ema (*Dromaius novaehollandiae*), a coruja barrada (*Bubo strix*) e o galah australiano (*Eolophus roseicapilla*), uma espécie de cacatua, e observou que era composto em sua maior parte por células hexagonais e algumas pentagonais. As densidades variaram de 4713 +/- 7,66 células/mm<sup>2</sup> a 11734 +/- 1,687. Cada célula endotelial de ema possuiu cerca de 30 microvilosidades, que se localizavam em sua maioria na região central da superfície. Em um terço das células pode-se observar um

cílio único que media 0,2  $\mu\text{m}$  de largura por 1,2  $\mu\text{m}$  de comprimento. No galah australiano foram observadas poucas microvilosidades. Nesta espécie também foram vistos cílios em um terço das células, sendo que mediram 0,42  $\mu\text{m}$  por 1,3  $\mu\text{m}$ . Na superfície das células endoteliais da coruja barrada havia poucas microvilosidades (aproximadamente 20 por célula) também localizadas em maior parte na região central. Já em suas bordas havia numerosas microvilosidades e/ou interdigitações. Os cílios apareceram somente em algumas células e mediam 0,14  $\mu\text{m}$  por 0,5  $\mu\text{m}$ . Em avestruzes foi observada homogeneidade de células hexagonais.

O endotélio da córnea de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) foi analisado por Pigatto e colaboradores (2005b) através da microscopia eletrônica de varredura. Foi observado um padrão regular em relação ao formato e tamanho celular tanto na periferia quanto na área central da córnea. Esta regularidade se deve provavelmente devido aos animais apresentarem aproximadamente a mesma idade e as córneas serem todas híginas. A maioria das células possuía 6 lados (80%), e foram encontradas células com cinco lados (14,2%) e sete lados (5,8%). A área celular central do endotélio corneano era de 269 +/- 24  $\mu\text{m}^2$  e a periférica era de 268 +/- 22  $\mu\text{m}^2$ . A densidade endotelial era de 3,717 +/- 324 células/mm<sup>2</sup> e 3,731 +/- 358 células/mm<sup>2</sup> nas áreas central e periférica respectivamente. Não houve diferenças significativas entre as áreas central e periférica, assim como entre os olhos direitos e esquerdos. Não foram observados cílios, provavelmente pela sua fragilidade durante o processamento das amostras para a microscopia eletrônica de varredura ou pela ausência de cílios nesta espécie. A presença de microvilosidades na superfície das células foi descrita em várias espécies de vertebrados (COLLIN & COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2004) e também ocorre em pinguins-de-magalhães.

Pigatto e colaboradores (2009) avaliaram por microscopia eletrônica de varredura o endotélio corneano de 24 avestruzes. Foram observadas células poligonais uniformes em tamanho e forma (75% hexagonais), com poucas interdigitações das bordas celulares. Visibilizaram-se microvilosidades na superfície celular. A área celular média foi de 269±18  $\mu\text{m}^2$  e a densidade celular foi de 3717±240 células mm<sup>2</sup>. Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados entre os olhos esquerdos e direitos, dado que corrobora com estudos em outras espécies (PEIFFER *et al.*, 1981; GWIN *et al.*, 1982; MORITA, 1995; ANDREW *et al.*, 2001; TAMAIO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.* 2010).



Freitas (2012) estudou o endotélio corneano de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de diferentes faixas etárias através da microscopia especular, que revelou um padrão regular na distribuição das células. A densidade média de galinhas com 30 dias era de 8526,50 células/mm<sup>2</sup>, galinhas de 45 dias possuíam uma média de 6124,77 células/mm<sup>2</sup> e galinhas de 60 possuíam 5025,67 células/mm<sup>2</sup> de densidade média. Sendo as áreas celulares médias de 118,11 µm<sup>2</sup>, 164,18 µm<sup>2</sup> e 217,24 µm<sup>2</sup> respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao pleomorfismo que foram em média de 74,5%, 71,5% e 73,9% respectivamente, o que difere de algumas espécies de vertebrados nas quais se observa um aumento do pleomorfismo com o avanço da idade (PIGATTO et al., 2005a; GUM, 2007; FRANZEN, 2010). A maioria das células possuía formato hexagonal, mas também foram encontradas células de quatro, cinco e sete lados. Também não houve diferença entre os olhos direitos e esquerdos. O endotélio corneano de galinhas se mostrou semelhante ao de outras espécies de vertebrados.

### **3.2 Fatores lesivos ao endotélio corneano**

Nos casos em que o comprometimento endotelial é severo ocorre edema com perda da transparência da córnea (SLATTER, 2005).

Vários fatores podem diminuir a densidade endotelial corneana, como envelhecimento, doenças e traumas cirúrgicos (PIGATTO et al., 2004). A redução da densidade endotelial devida ao envelhecimento foi descrita em humanos, cães, gatos, ratos e cavalos (ANDREW et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006; FRANZEN et al., 2010; BERCHT, 2015).

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

Procedimentos cirúrgicos intraoculares como extração de catarata e ceratectomia lamelar posterior também levam a perda de células endoteliais (RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2009).

### 3.2.1 Toxicidade endotelial

Os fármacos de uso intraocular como antimicrobianos, anestésicos e soluções de irrigação são potencialmente tóxicos para o endotélio corneano (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

Kohchi *et al.* (1980) em seu estudo concluíram que o uso intracameral de cloreto de benzalcônio, um conservante ou preservativo, na concentração de 0,05% causava danos endoteliais irreversíveis (necrose). Já na concentração de 0,01%, o cloreto de benzalcônio causava apenas edema corneano transitório em olhos saudáveis de coelhos. O limiar fisiológico e que não provocaria danos na ultraestrutura endotelial é de 0,0001% (GREEN *et al.*, 1977) e a maior concentração segura para uso intraocular é de 0,001% (BRITTON *et al.*, 1976). Esses números são de experimentos realizados com coelhos, mesmo assim a recomendação é evitar o uso de preservativos em humanos o máximo possível em qualquer concentração (PARIKH & EDELHAUSER, 2003). Liu e colaboradores (2001) referiram que a concentração segura em humanos seria de 0,013% (maior que em coelhos). Seria importante a conscientização do cirurgião oftalmologista da composição química dos utilizadas durante os procedimentos (PARIKH & EDELHAUSER, 2003).

Glasser e colaboradores (1985) conduziram um estudo em gatos, com microscopia especular e paquimetria, com o objetivo de comparar o efeito endotelial causado pelo BSS® e BSS plus®. Após tempo de perfusão curto (15 a 20 minutos) ou longo (1 a 2 horas), nenhuma alteração na densidade endotelial foi detectada, porém os índices morfométricos (coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais) se mostraram significativamente alterados nas perfusões com BSS, principalmente nas mais prolongadas. Os autores afirmaram que tais índices (principalmente a porcentagem de células hexagonais) seriam mais sensíveis para a indicação de dano celular do que a densidade endotelial.

Yagoubi *et al.* (1994) verificaram o efeito de várias soluções de irrigação (NaCl 0,9%, Ringer, BSS®, BSS plus® e o meio de cultura de tecido TC199) sobre o endotélio corneano de coelhos *in vitro*. Foram utilizados para a avaliação a paquimetria e coloração com azul de tripano e vermelho de alizarina. Detectaram que o NaCl 0,9% foi a solução que causou maior aumento na espessura corneana e que a solução de Ringer e o BSS, devido à ausência de bicarbonato, glutathiona e glicose, também

causaram aumento na espessura da córnea, porém reversível após a suspensão da irrigação, o que sugere que tais soluções não lesariam o endotélio de modo irreversível.

Petrousos e colaboradores (1989) injetaram 0,1ml de cefazolina na câmara anterior do olho de coelhos para avaliar seu efeito no endotélio corneano. As concentrações testadas foram 1, 2, 5 e 10 mg/ml. O endotélio foi posteriormente analisado através de microscopia especular de contato e microscopia eletrônica de transmissão. Constataram que concentrações de até 2 mg/ml não provocaram danos no endotélio, já as concentrações de 5 mg/ml produziram edema citoplasmático e vacúolos intracelulares. A concentração de 10 mg/ml causou completa disrupção celular.

Um estudo comparativo entre o uso intracameral de gatifloxacina e levofloxacina revelou que pelo método de coloração vital com azul de tripano e vermelho de alizarina não houve diferença entre os dois grupos em relação à viabilidade celular (0,31% e 0,47% respectivamente), assim como nos aspectos clínicos e na paquimetria 3 e 7 dias após a exposição. Já na MEV e MET, o grupo levofloxacina apresentou alterações em sua ultraestrutura (bordos celulares levemente desintegrados) (CHOI & CHUNG, 2009).

O efeito da mitomicina C (antibiótico e antimicótico amplamente usado na oftalmologia humana) no endotélio da córnea foi testado em 32 coelhos por meio de aplicação sob retalho escleral nas concentrações de 0,2 e 0,5 mg/ml. Os endotélios foram avaliados por MEV e MET após 15 e 30 dias, conforme a distribuição dos grupos. Concluíram que havia alterações com as duas concentrações e nos dois momentos. A MET revelou rarefação do citoplasma, dilatação e fragmentação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, aparelhos de Golgi com dilatação das cisternas, redução de vacúolos e irregularidades da membrana celular interna. Já a MEV apresentou alteração de forma e tamanho das células e projeções filopodais mais longas (SILVA & GREGORIO, 2009).

O uso intracameral de anestésicos como a lidocaína, midriáticos como a fenilefrina ou a epinefrina e mióticos como a acetilcolina, a pilocarpina e o carbachol têm demonstrado efeitos endoteliotóxicos dose dependentes (OLSON *et al.*, 1980; MISHIMA *et al.*, 1985; KIM *et al.*, 1998; EDELHAUSER, 2000; LUNDBERG & BEHNDIG, 2003) .

Beniz Neto (1985) estudou o efeito da injeção intracameral de 0,15 ml de epinefrina em diferentes concentrações (1:1000, 1:10000 e 1:100000) sobre o endotélio

corneano de coelhos. O estudo histopatológico com microscopia óptica e MET não evidenciou alterações nem na morfologia, nem na densidade da população endotelial.

Kadonosono *et al.* (1998) testaram a toxicidade endotelial da lidocaína em diferentes concentrações (0.02%, 0,2% e 2%) em olhos de coelhos. Através da MEV, observaram que não havia diferença significativa entre os olhos que receberam lidocaína a 0,02% e a 0,2% em comparação com o grupo controle (BSS®). Já os olhos expostos à lidocaína a 2% mostraram células irregulares e perda significativa de microvilosidades.

Kim e colaboradores (1998) avaliaram o efeito da lidocaína a 1% sem preservativo na função do endotélio corneano, ultraestrutura e viabilidade das células. Utilizaram um sistema de microscópio especular para estudo de tecido perfundido *in vitro*, MEV, MET e um outro sistema, denominado célula viva/ célula morta, que quantifica o número de células viáveis e mortas de um tecido. Utilizaram córneas de humanos e coelhos que foram banhadas por solução de lidocaína 1% sem preservativo por 15 minutos, seguidos de duas a três horas de enxágue com BSS® (o grupo controle recebeu somente BSS®). Os resultados mostraram que a lidocaína 1% causou edema transitório que retornou a sua espessura normal após perfusão com BSS®. As microscopias eletrônicas destacaram apenas edema residual discreto, com manutenção da arquitetura normal do tecido. O mesmo ocorreu com o estudo de célula viva/ célula morta, que diagnosticou a viabilidade do tecido após o experimento.

Werner e colaboradores (1998) estudaram experimentalmente a toxicidade da lidocaína a 1% e a 5% no endotélio corneano de coelhos. Foram divididos em grupos de cinco córneas cada um e um grupo controle que foi exposto ao BSS®. Os endotélios ficaram expostos às soluções por 20 minutos e após corados com azul de tripano e vermelho de alizarina. A seguir foram analisados por microscopia óptica e fotografados. Nenhuma das córneas apresentou coloração pelo azul de tripano (ausência de células danificadas), enquanto algumas áreas de coloração pelo vermelho de alizarina (desnudamento endotelial) foram observadas na periferia das córneas, embora sem diferença estatística entre os grupos. Ocorreram diferenças morfológicas no formato celular e nas bordas intercelulares entre os três grupos. Células expostas ao BSS® tinham formato mais hexagonal, com bordas retilíneas e bem definidas, já as expostas à lidocaína (principalmente na concentração de 5%) apresentaram formato mais irregular, com bordas onduladas.

Anderson *et al.* (1999) estudaram a viabilidade do endotélio corneano de coelhos e sua ultraestrutura após perfusão *in vitro* com bupivacaína a 0,5%, bupivacaína 0,5% diluída em solução de Ringer com glutatona e bicarbonato (1:1) e bupivacaína a 0,5% tamponada ao pH de 7. Os controles foram perfundidos somente com a solução de Ringer com glutatona e bicarbonato. Constataram que a solução de bupivacaína a 0,5% danificou o endotélio corneano de coelhos, exceto quando diluída 1:1 com solução de Ringer, bicarbonato e glutatona.

Ao comparar o uso de lidocaína a 1%, a 10% (ambas sem preservativo) e BSS ® (TAN & BURTON, 2000) em humanos, observaram grandes áreas de exposição da membrana de Descemet, membranas intercelulares alteradas e núcleos celulares indefinidos à microscopia óptica nos endotélios expostos à lidocaína a 10%. Concluíram que a lesão endotelial causada pela lidocaína seria proporcional à concentração.

Eggeling *et al.* (2000) testaram diferentes concentrações de lidocaína em olhos de suínos expostos durante 60 minutos e concluíram após a observação endotelial por microscopia óptica e MEV que o uso intracameral de lidocaína somente é seguro em concentrações até 1%. A exposição a concentrações mais altas (5% e 10%) resultaram em perda celular significativa e alterações na ultraestrutura celular. Judge e colaboradores (1997) observaram que o uso intracameral de lidocaína a 4% causava espessamento e opacificação na córnea em coelhos.

Heuermann e colaboradores (2002) compararam a anestesia com bloqueio peribulbar com lidocaína a 2% e o uso de lidocaína intracameral sem preservativos a 1% e concluíram que o uso intracameral seria mais seguro. O estudo revelou que não havia variação significativa estatisticamente na perda endotelial entre os dois protocolos após a facoemulsificação. Eles afirmaram ser mais seguro, pois o bloqueio peribulbar implica em severas possíveis complicações como perfuração do globo ocular, hemorragia retrobulbar, lesão do nervo óptico e anestesia do tronco cerebral (ANDERSON *et al.*, 1999).

Holley *et al.* (2002) estudaram o efeito do corante indocianina verde (utilizado para corar a cápsula do cristalino) em endotélios corneanos de humanos e coelhos. Concluíram utilizando uma técnica de células vivas/células mortas de acordo com o método descrito por Means e colaboradores (1995) que o corante era seguro quando exposto ao endotélio por três minutos. A reação das córneas expostas ao corante foi semelhante a das córneas expostas ao BSS plus ® (grupo controle) em relação à formação de edema. O estudo também demonstrou que não houve dano na ultraestrutura

dos endotélios humanos expostos à indocianina verde quando observados com MEV e MET.

A toxicidade ao endotélio corneano do azul de tripano, utilizado como corante na cirurgia de catarata foi testada por em 25 pacientes humanos com catarata bilateral submadura. Foi aplicado para corar a cápsula do cristalino na concentração de 0,06% e enxaguado após alguns segundos com BSS®. Os endotélios foram analisados por microscopia especular antes da cirurgia e 12 meses depois. Os parâmetros utilizados foram densidade endotelial, coeficiente de variação do tamanho celular, percentagem de hexagonalidade e paquimetria. Concluíram que o uso de azul tripano para corar a cápsula do cristalino não causou dano celular (VAN DOREEN, 2006).

A utilidade da ação imunossupressora do fluorouracil foi demonstrada na cirurgia de glaucoma por filtração na prevenção da vitreoretinopatia proliferativa após vitrectomia. Devido ao grande contato desta substância com o endotélio da córnea, Mannis e colaboradores (1988) analisaram sua toxicidade em córneas de ovinos em um estudo *in vitro*. As córneas foram expostas ao fluorouracil em diferentes concentrações durante 4 horas e após foram coradas com vermelho de alizarina e azul de tripano e observadas ao microscópio óptico. As córneas expostas a concentrações de até 1 mg/ml continuaram com suas camadas endoteliais intactas. Já as córneas expostas à concentração de 10 mg/ml sofreram dano severo com desnudamento quase total do endotélio e as células remanescentes todas com núcleos corados com azul de tripano.

Çekiç e colaboradores (2002) compararam os efeitos do uso de ar seco e ar umidificado no endotélio de coelhos durante o procedimento de vitrectomia via pars plana. Na MEV observaram que as células endoteliais expostas ao ar umidificado sofreram menos stress do que as células expostas ao ar seco. As células expostas durante vinte minutos ao ar umidificado estavam com as bordas relativamente mais irregulares, com algumas saliências e com menos interdigitações. As células expostas ao ar seco estavam com prolongamentos apicais pronunciados, superfícies elevadas, fendas entre as células e saliências nas bordas. Concluíram que o ar seco causava significantes alterações imediatas no endotélio da córnea, já o ar umidificado prevenia essas alterações.

Oh e colaboradores (2007) investigaram a repercussão da aplicação intracameral de triancinolona acetona (usada para melhorar a visualização do humor vítreo na câmara anterior do olho durante a cirurgia de catarata ou na vitrectomia) durante três minutos, no endotélio corneano de coelhos. Através do método de corantes vitais, pode

se visualizar que este fármaco não causou morte celular significativa comparado ao grupo controle (BSS ®).

Sobre as substâncias utilizadas na limpeza pré esterilização, que acabam por aderir residualmente em materiais ou instrumentais cirúrgicos, que posteriormente entrarão em contato com a câmara anterior, nenhuma pode ser considerada segura para o endotélio da córnea. A medida mais segura em relação a isso seria a não reutilização de cânulas e a limpeza meticulosa de instrumentais antes da esterilização (SINGH *et al.*, 1985; PARIKH *et al.*, 2002; PARIKH & EDELHAUSER, 2003; EDELHAUSER, 2006; MAMALIS *et al.*, 2006).

### 3.2.1.1 Efeitos da alteração do pH e osmolaridade das soluções no endotélio corneano

A toxicidade endotelial corneana foi relacionada às substâncias que entram em contato com endotélio, baseado em suas composições químicas (CARTER *et al.*, 1973; EDELHAUSER *et al.*, 1978), pH (GONNERING *et al.*, 1979) e osmolaridades (EDELHAUSER *et al.*, 1981).

Gonnering e colaboradores (1979) submeteram endotélios de coelhos e de humanos a soluções que variavam seu pHs de 3,5 a 10 em um estudo *in vitro*. Concluíram através de paquimetria, MEV e MET em diferentes tempos de exposição que fora do intervalo de 6,5 a 8,5, ocorriam alterações estruturais e funcionais. A ruptura dos complexos juncionais levava a quebra da função barreira do endotélio. O dano celular foi proporcional a magnitude da alteração de pH e ao tempo de exposição.

Para manter as funções de bomba e barreira endoteliais, a composição das soluções de irrigação usadas nas cirurgias intraoculares devem ter características similares às do humor aquoso. Sua osmolaridade e pH devem estar corretos (aproximadamente 300 mOsm e 7,4 respectivamente). Além disso, seus constituintes devem conter cálcio (essencial para a função barreira) e um tampão. Também precisa ser uma fonte energética e incluir um antioxidante (como a glutatona) (EDELHAUSER *et al.*, 1975; EDELHAUSER *et al.*, 1976; EDELHAUSER *et al.*, 1978; KATZ, 1985; MISHIMA *et al.*, 1985; TUFT & COASTER, 1990; KLOSS & BOHNKE, 1991; EDELHAUSER, 2000).

Edelhauser e colaboradores (1981) perfundiram o endotélio corneano de humanos e coelhos com solução salina balanceada em diferentes osmolaridades e

observaram que a perfusão hiposmótica causou aumento na espessura corneana. O contrário ocorreu com a solução hiperosmótica. No entanto, a estrutura celular observada à MET e MEV, não sofreu alterações. A espessura corneana voltava ao normal quando era usada uma solução de perfusão de 300 mOsm/L. Concluíram que o endotélio corneano pode tolerar soluções com osmolaridade de 200 a 400 mOsm/L sem ruptura celular, desde que íons essenciais estejam presentes.

Ao testarem a toxicidade de diferentes concentrações de lidocaína no endotélio de coelhos, Werner e colaboradores (1998) acreditaram que as alterações morfológicas poderiam não representar a toxicidade causada pelo princípio ativo em si e sim o efeito causado pelas diferentes composições iônicas, pH e osmolaridade das soluções usadas.

Ao compararem o uso de diferentes concentrações de lidocaína no endotélio corneano de humanos, Tan & Burton (2000) alertaram para o ajuste do pH em substâncias a serem inoculadas na câmara anterior de globos oculares para valores próximos àqueles observados no humor aquoso, já que este será substituído pela solução em questão durante procedimentos que envolvam a câmara anterior (GONNERING *et al.*, 1979).

### **3.3 Besilato de atracúrio**

O besilato de atracúrio é um agente curarizante que age sobre a ligação neuromuscular provocando o miorelaxamento esquelético, o qual é utilizado na cirurgia como complemento dos fármacos anestésicos. É um derivado químico da tetraidropapaverina sulfonato que é somente utilizado como sal besilato por via intravenosa em doses de 0,3 a 0,6 mg/kg. Provoca bloqueio neuromuscular completo entre 1 e 2 minutos por um mecanismo de competição não despolarizante. É administrado unicamente por via intravenosa, difunde-se no sangue e possui uma elevada ligação com proteínas séricas (82%); sua meia-vida é breve: 17 a 21 minutos e a faixa de duração dos seus efeitos são de 15 a 35 minutos. Difunde-se com rapidez pelos tecidos, mas não atinge o SNC. Sofre biotransformação metabólica, sendo posteriormente excretado pela bile e pela urina (MUIR III *et al.*, 2001; MILLER & KATZUNG, 2003; BOWMAN, 2006).

O uso sistêmico do besilato de atracúrio pode causar paralisia dos músculos da respiração por sua ação indireta na placa motora. Pode ocorrer broncoconstrição em



decorrência da liberação de histamina, além de diminuição da frequência cardíaca e queda da pressão arterial (FANTONI & CORTOPASSI, 2002).

O uso de bloqueadores neuromusculares em músculos isolados é uma forma de estudo *in vitro* como demonstrado por Nascimento *et al.* (2004) e Fortier *et al.* (2001), avaliando a ação de várias dosagens de atracúrio em diafragmas de ratos.

O besilato de atracúrio é comercializado em solução de ácido benzenossulfônico, na concentração de 10 mg/ml. Possui pH entre 3,25 e 3,65 e sua osmolaridade é de 10-30 mOsmol/L, sendo assim considerado ácido e hiposmótico.

### 3.3.1 O uso do besilato de atracúrio em cirurgias intraoculares em aves

O uso intraocular de bloqueadores neuromusculares em aves foi referido por Gonçalves *et al.* (2006). Eles aplicaram 0,5 ml de besilato de atracúrio (5 mg) para causar midríase em um avestruz para cirurgia de catarata, com efeito satisfatório.

Carter *et al.* (2007) realizaram facoemulsificação bilateral com implantação de lentes intraoculares em um corujão orelhudo (*Bubo virginianus*). Também fizeram uso do besilato de atracúrio (0,05 µg) intracameral como midriático, facilitando assim o procedimento.

Gonçalves e colaboradores (2009) utilizaram 15 frangos de corte com 40 dias de idade, e realizaram aplicação 0,1 ml de atracúrio correspondendo a 1 mg de princípio ativo nos bulbos oculares direitos. Nos bulbos esquerdos foram aplicados 0,1 ml de solução salina isotônica (grupo controle). As aves foram avaliadas a cada 5 minutos pelo teste luminoso pupilar com foco de luz halogenada, foram feitas 30 avaliações de cada bulbo ocular no mesmo intervalo, sendo um total de 150 minutos, e após 24 horas. Os bulbos controles apresentaram-se mióticos do início ao fim dos testes. Os bulbos direitos, que receberam o atracúrio, apresentaram midríase a partir do momento da aplicação e esta se manteve mesmo após estímulos luminosos até o final das observações aos 150 minutos. Ambos os olhos apresentaram reflexos luminosos pupilares e sem sinais de processo inflamatório ou infeccioso ao exame oftalmoscópico na observação após 24 horas. Concluíram que o uso intracameral de atracúrio em galinhas produz midríase satisfatória para procedimentos intracamerais, sem sinais clínicos de efeitos sistêmicos ou mesmo contralaterais.

Comparando o tempo de ação sistêmica do atracúrio, entre 15 e 35 minutos (MUIR III *et al.*, 2001; MILLER & KATZUNG, 2003; BOWMAN, 2006), os

resultados observados pelo seu uso intracameral em olhos de galinhas apresentou relaxamento muscular por tempo superior a duas horas e meia (GONÇALVES *et al.*, 2009).

### 3.4 Métodos de avaliação do endotélio corneano

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

As principais técnicas para avaliação clínica do endotélio corneano são biomicroscopia com lâmpada de fenda, microscopia especular, microscopia confocal, e paquimetria, cada uma com sua indicação específica na prática diária de oftalmologia (JURKUNAS & COLBY, 2005). Podem ainda ser empregados métodos de análise *in vitro* para avaliação morfológica e morfométrica endotelial como a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia eletrônica de transmissão e a utilização de colorações vitais (GWIN *et al.*, 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CANAVAGH *et al.*, 2000; JALBERT *et al.*, 2003; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008; FRANZEN *et al.*, 2010; BERCHT, 2015; FREITAS, 2012).

A microscopia confocal permite a análise *in vivo* de praticamente todas as camadas da córnea, incluindo o filme lacrimal pré corneano e as inervações estromal e subepitelial (JALBERT *et al.*, 2003; KAFARNIK & FRITSCHKE, 2007).

A paquimetria da córnea pode ser realizada utilizando um paquímetro ultrassônico ou o microscópio especular de contato e de não contato (MODIS *et al.*, 2001). A medida da espessura corneana pela paquimetria mostra de forma indireta a função endotelial, já que reflete o estado de sua deturgescência.

O microscópio especular é utilizado de forma rotineira na avaliação pré e pós operatória do endotélio corneano em indivíduos que serão submetidos a cirurgias intraoculares (ABIB, 2000; MCCAREY *et al.*, 2008). É utilizado também para determinar a toxicidade endotelial de fármacos e foi amplamente utilizado para pesquisa da cicatrização endotelial (BOURNE & KAUFMAN, 1976; LAULE *et al.*, 1978; HUANG, *et al.*, 1989; LANDSHMAN *et al.*, 1989; JACKSON *et al.*, 1995; LIOU *et*

*al.*, 2004). A microscopia especular pode ser realizada através da utilização de microscópios de contato e não contato. Na microscopia de contato ocorre o contato da objetiva do microscópio com o epitélio da córnea do paciente, que proporciona uma aplanção da curvatura corneana, levando a um aumento do reflexo especular, sendo possível uma imagem com até 800 células, o que não ocorre com o de não contato que consegue obter imagens de 150-170 células (LAING *et al.*, 1983; TUFT & COSTER, 1990; ABIB, 2000; MACCAREY, 2008).

A microscopia eletrônica de varredura tem sido amplamente utilizada em estudos relacionados à morfologia corneana, à toxicidade de fármacos intracamerulares, à eficácia de meios de preservação da córnea e na avaliação da ultraestrutura do endotélio de diferentes espécies (SVEDBERGH & BILL, 1972; COLIN & COLIN, 1998; OJEDA *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; RODRIGUES *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO ARANGO *et al.*, 2009). Esta técnica permite a avaliação da morfologia e das bordas celulares, além do padrão mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989). Entre os parâmetros de avaliação do endotélio, possíveis de serem estudados por esta técnica, encontram-se a área celular média, a densidade de células endoteliais, o coeficiente de variação da área celular média e a porcentagem de células hexagonais (LAING *et al.* 1976; GWIN *et al.*, 1982; PIGATTO *et al.*, 2004).

#### 3.4.1 O uso dos corantes vitais vermelho de alizarina e azul de tripano para avaliação endotelial *in vitro*

O método tradicional para avaliação de vitalidade celular do endotélio da córnea é a observação da densidade celular central pela microscopia especular (WILSON & BOURNE, 1998; TERRY *et al.*, 2005). No entanto, a microscopia especular tem suas limitações e uma delas é a impossibilidade de diferenciação entre células saudáveis e células com alterações degenerativas terminais (WILSON & BOURNE, 1998; PRICE & PRICE, 2006).

Um dos métodos mais comumente empregados para determinar morte celular ou áreas lesadas no endotélio corneano é através do uso de colorações vitais por corantes como o azul de tripano e vermelho de alizarina (SAAD *et al.*, 2008). Esta técnica já foi utilizada em pesquisas com transplantes de córnea e estudos sobre o efeito de

substâncias no endotélio, como anestésicos de uso intraocular e outros, analisando através de imagens fotográficas, perdas quantitativas e qualitativas das células (WERNER, 1998; EGGELING *et al.*, 2000; LIOU *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2005; TERRY, 2009; LANDRY *et al.*, 2011). Este método possibilita uma forma simples, rápida e prática de detectar danos celulares (TAYLOR & HUNT, 1981).

O azul de tripano é utilizado para identificar células do endotélio corneano severamente danificadas ou mortas, corando seus núcleos se a membrana celular não estiver intacta. O vermelho de alizarina serve para identificar bordas celulares ou áreas expostas da membrana de Descemet (PARK *et al.*, 2012). O uso em conjunto destes dois corantes possibilita a identificação de todas as áreas com dano celular em toda a extensão do endotélio (SAAD *et al.*, 2008).

Vários métodos de utilização de corantes vitais para estudar dano endotelial corneano foram utilizados em humanos e relatados na literatura. Foram descritos diferentes protocolos em relação às concentrações dos corantes e aos tempos de exposição (MEHTA, *et al.*, 2008; SAAD *et al.*, 2008). Park e colaboradores (2012) testaram diversas concentrações de azul de tripano e vermelho de alizarina em endotélios corneanos de humanos e concluíram que o melhor deles seria o azul de tripano a 0,4% e o vermelho de alizarina a 0,5%.

Para determinação dos parâmetros como densidade endotelial, polimegatismo, e pleomorfismo, a contagem das células mesmo que realizada em um modo assistido por computador é uma tarefa tediosa e que demanda tempo, o que pode levar o experimentador a reduzir o número de células descritas para apenas algumas dezenas, afetando a precisão da estimativa destes parâmetros. Para superar esta situação, Ruggeri e colaboradores (2009) desenvolveram um sistema informatizado que permite uma estimativa fiel dos parâmetros morfométricos em amostras coradas com vermelho de alizarina. Eles compararam o método manual com o computadorizado utilizando córneas de suínos e confirmaram a capacidade do sistema de fornecer dados confiáveis.

## 4 ARTIGO

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

### **AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) APÓS EXPOSIÇÃO AO BESILATO DE ATRACÚRIO – ESTUDO *IN VITRO***

Guimarães Celeste B, Albuquerque Luciane de, Pigatto João AT.

#### **Resumo**

**Objetivo:** A musculatura iridiana de várias espécies de aves é estriada esquelética, dessa forma o controle da midríase em transoperatórios intraoculares não é conseguida por agentes que atuem no sistema nervoso autônomo, como no caso dos mamíferos. O besilato de atracúrio é um agente neurobloqueador que provoca miorelaxamento esquelético. O uso intracameral de atracúrio na câmara anterior do olho promove midríase imediata em aves, fundamental em cirurgias de remoção da catarata. Portanto objetivou-se verificar a repercussão do uso de besilato de atracúrio no endotélio corneano de galinhas. **Procedimentos:** Foram estudados 20 córneas de 10 galinhas, machos ou fêmeas, com 21 dias, que foram divididas em dois grupos: G1, composto por córneas dos bulbos oculares esquerdos (grupo experimental) e G2, córneas dos bulbos oculares direitos (grupo controle). No grupo experimental foram aplicados 0,2 ml de besilato de atracúrio durante 3 minutos e após, as córneas foram lavadas com solução salina a 0,9%. As córneas do grupo controle receberam apenas solução salina a 0,9%. As córneas de ambos os grupo foram então coradas com a técnica de coloração vital primeiramente com vermelho de alizarina a 0,2% e após, com azul de tripano a 0,25% e visualizadas por microscopia óptica e foram obtidas 10 imagens fotográficas aleatórias de cada amostra. **Resultados:** Demonstrou-se que a área de desnudamento endotelial e exposição da membrana de Descemet no grupo experimental (G1) é significativamente (22,23% +/- 13,67%) maior que a do grupo controle (G2) que foi de 0,75%. **Conclusão:** Foi possível concluir que o besilato de atracúrio induziu dano ao endotélio corneano de galinhas.

*Descitores: corantes vitais, aves, dano endotelial, vermelho de alizarina*

### Abstract

**Objective:** The iridian muscle of various species of birds is skeletal striated, this way, the control of intraoperative mydriasis in intraocular procedures is not achieved by agents that act in the autonomous nervous system, as in the case of mammals. The atracurium is a neuromuscular blocking agent that causes skeletal muscle relaxation. The intracameral use of atracurium in the anterior chamber promotes immediate mydriasis in birds, fundamental in cataract surgeries. Therefore this study aimed to check the effect of the use of atracurium in the corneal endothelium chickens. **Procedures:** Twenty corneas of ten chickens, females and males, 21 days old, were divided into two groups: G1, compound by corneas of the and the lefts eye bulbs (experimental group) and G2, formed by córneas of the rights ocular bulbs (control group). In the experimental group there were 0.2 ml of atracurium besylate applied for three minutes and then the corneas were washed with 0.9% saline solution. The corneas oh the control group received only saline 0.9% solution. The corneas of both of groups were then stained with the vital staining technique firts with alizarin red 0,2% and then wiht trypan blue 0,25%, and visualized by light microscopy and 10 random photographs were obtained of each sample. **Results:** The results confirm that the area of endothelial denudation and Descemet's membrane exposure on the experimental group (G1) is significantly higher (22,23% +/- 13,67%) than in the control group (G2) that was 0,75%. **Conclusion:** It was concluded that the atracurium induced damage on the corneal endothelium of chickens.

*Keywords: vital dye staining, endothelial damage, alizarin red.*

### INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais interligadas que compõe a superfície posterior da córnea (1-4). A integridade e a atividade metabólica endoteliais são essenciais para a manutenção da transparência da córnea(5-7). Alterações nas células endoteliais podem ocorrer em função da idade, fármacos, doenças oculares ou procedimentos cirúrgicos intraoculares (5,6,8,9,7).

Doenças oculares como a opacidade do cristalino ou de sua cápsula, são causas comuns de cegueira em aves idosas em cativeiro ou de vida livre. Geralmente são causados por motivos como trauma, herança genética, fatores tóxicos ou inflamatórios (10-12). Catarata juvenil foi relatada em calopsitas e corujinhas-do-mato (10,13). Em canários, características hereditárias têm sido incriminadas como a causa dessas opacidades (14). Cataratas congênitas bilaterais em filhotes de avestruz foram também descritas por Black (1993) (15).

A acuidade visual é fundamental para que as aves consigam se alimentar, devido a esse fato, a cirurgia para remoção da catarata em aves de vida livre evita a sua permanência em cativeiro ou até mesmo que sejam encaminhadas para eutanásia nas situações em que desenvolvem opacificação da lente <sup>(10)</sup>. Em aves de rapina, como abutres, técnicas de punção e aspiração, extração extracapsular e facoemulsificação são possíveis e têm sido executadas com sucesso <sup>(12,14)</sup>.

O uso de bloqueadores neuromusculares se faz necessário para gerar midríase em aves, já que a íris de várias espécies possui musculatura estriada <sup>(16)</sup> que é irresponsiva aos midráticos e ciclopégicos usuais <sup>(11)</sup>. O uso de besilato de atracúrio como midrático em cirurgias de cataratas em aves já foi descrito por alguns autores como um método eficaz <sup>(17,18)</sup>.

Objetivou-se avaliar a repercussão do besilato de atracúrio no endotélio corneano de galinha.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se 20 córneas de 10 galinhas (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Cobb500, machos ou fêmeas, com 21 dias de idade, hípidos, com peso médio de 2,500 Kg, advindos da linha de abate da estação experimental agrônômica da UFRGS, localizada em Eldorado do Sul-RS.

A pesquisa foi conduzida conforme as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) e aprovada pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Todos os bulbos oculares foram submetidos ao exame oftálmico, realizando-se, biomicroscopia com lâmpada de fenda<sup>1</sup> (Kowa SL 15, Japão) e prova da fluoresceína<sup>2</sup> (Allergan, Brasil) anteriormente ao experimento.

Após o abate humanitário, realizou-se enucleação subconjuntival e remoção dos botões corneoesclerais em 360°, tomando-se a região límbica como referência, a uma distância de 2 a 3 mm em direção à esclera.

As amostras foram distribuídas em dois grupos compostos por 10 córneas cada. Sendo G1 o grupo experimental composto pelas córneas dos bulbos oculares esquerdos e G2, o grupo controle formado pelas córneas dos bulbos oculares direitos.

O processamento e a análise do material foram realizados no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. Após a excisão dos botões corneoesclerais, estes foram colocados em uma lâmina de vidro para microscopia com a face endotelial voltada para cima. As córneas esquerdas (G1 - grupo experimental) foram expostas a 0,2 ml de besilato de atracúrio (2 mg) (Cristália, Brasil) durante 3 minutos e após enxaguadas com solução salina a 0,9%. Nas córneas direitas (G2 - grupo controle), somente houve aplicação de solução salina a 0,9%.

Ambos os grupos foram corados através da técnica descrita por Taylor e Hunt (1981): receberam o corante azul de tripano a 0,25% (diluído em solução salina a 0,9%) por gotejamento durante 90 segundos. Após, foram enxaguados com 1 ml de solução salina a 0,9% duas vezes. A seguir, por gotejamento, receberam o corante vermelho de alizarina a 0,2% (com pH ajustado em 4,2) durante 90 segundos e novamente enxaguado com solução salina a 0,9% da mesma forma.

Para avaliação endotelial e registro fotográfico digital do endotélio foi utilizado microscópio óptico (Nikon E200, Japão). De cada amostra foram obtidas aleatoriamente dez imagens com aumento de 10X.



A área total de cada fotomicrografia foi mensurada com auxílio do software *Image Tool*, assim como a área de lesão, e assim foram obtidos os percentuais de dano endotelial.

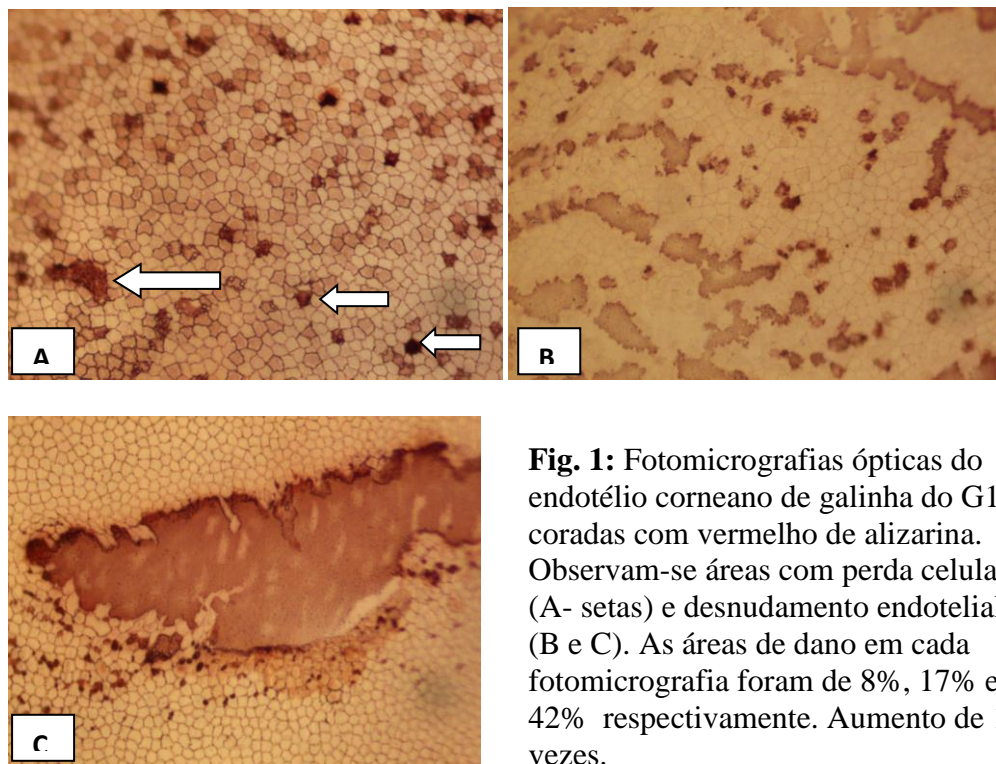
Foi realizado teste de comparação de médias para amostras pareadas (teste t) utilizando um nível de confiança de 95%, no intuito de verificar diferença estatística entre a média de ocorrência de lesão nos olhos esquerdos, G1 (grupo experimental) e direitos, G2 (grupo controle).

## RESULTADOS

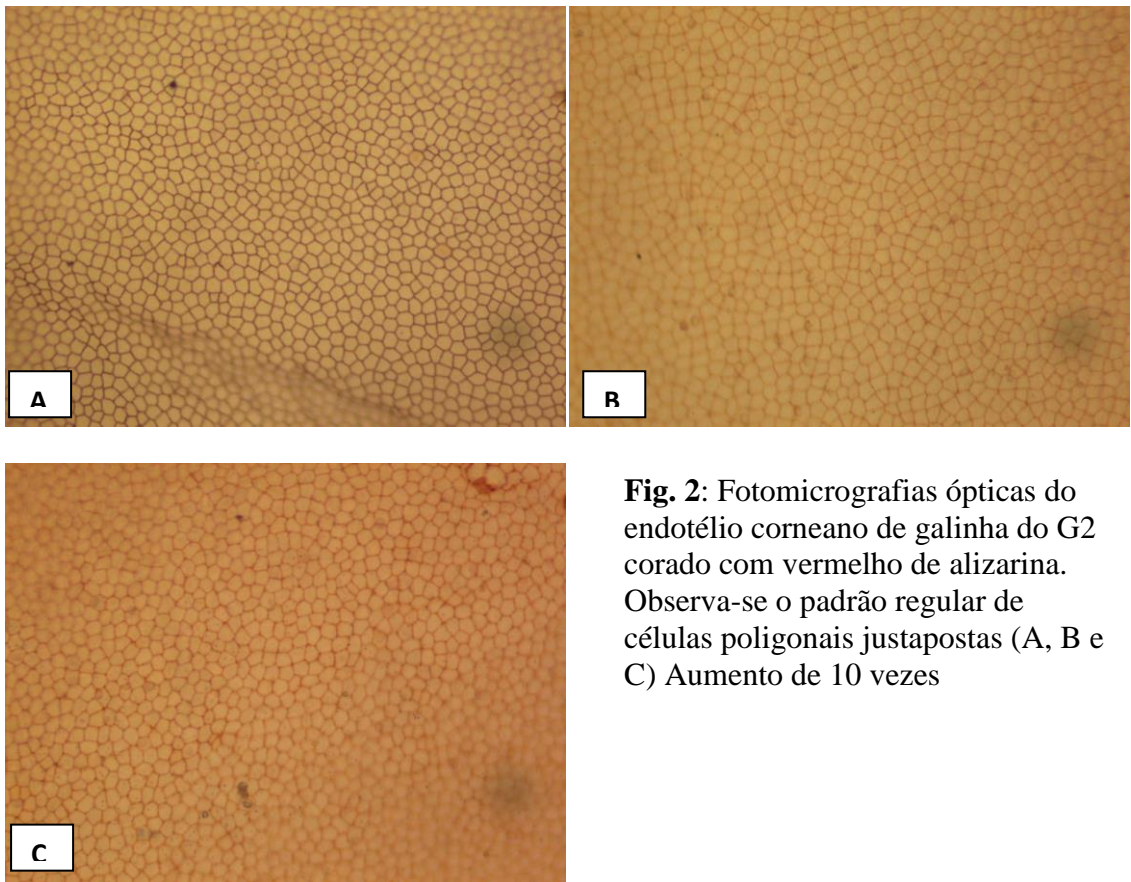
Com a microscopia óptica associada aos corantes vitais foi possível visibilizar as células endoteliais em todas as imagens analisadas. Em todas as córneas do grupo experimental (G1), houve áreas coradas com vermelho de alizarina. Não houve evidências de células endoteliais coradas com azul de tripano.

Demonstrou-se que a área de desnudamento endotelial e exposição da membrana de Descemet no grupo experimental (G1) (Fig.1) é maior que a do grupo controle (G2) (Fig.2).

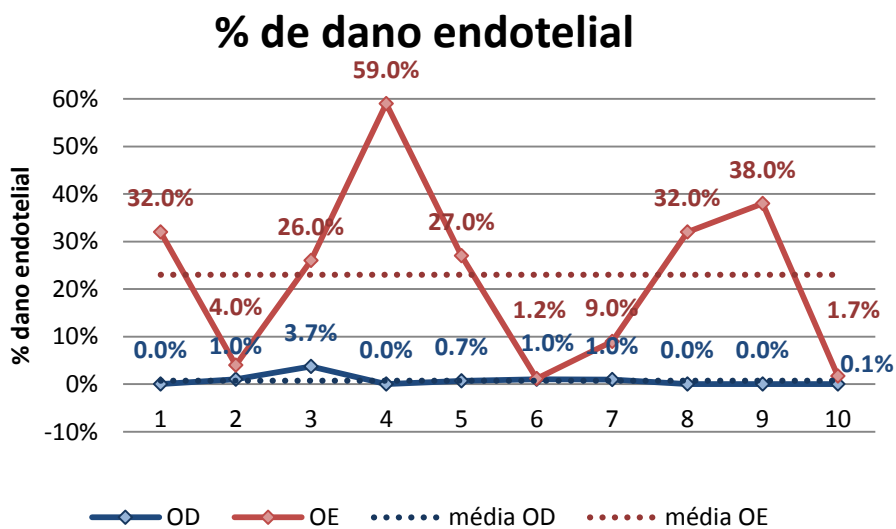
O resultado do teste demonstra que a média do grupo experimental é significativamente maior (22,23% +/- 13,67%) que a média do grupo controle, que foi de 0,75% ( $t=3,678$ ;  $p=0,005$ ) (Gráfico 1).



**Fig. 1:** Fotomicrografias ópticas do endotélio corneano de galinha do G1 coradas com vermelho de alizarina. Observam-se áreas com perda celular (A- setas) e desnudamento endotelial (B e C). As áreas de dano em cada fotomicrografia foram de 8%, 17% e 42% respectivamente. Aumento de 10 vezes.



**Fig. 2:** Fotomicrografias ópticas do endotélio corneano de galinha do G2 corado com vermelho de alizarina. Observa-se o padrão regular de células poligonais justapostas (A, B e C) Aumento de 10 vezes



**Grafico 1:** Representação gráfica dos valores médios percentuais e individuais das perdas celulares do endotélio corneano de galinhas submetidas à exposição ao besilato de atracurio. G1 (grupo experimental) em vermelho e G2 (grupo controle) em azul demonstrando diferença significativa entre os grupos.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O besilato de atracúrio é um fármaco que age sobre a ligação neuromuscular provocando o miorelaxamento esquelético. Usualmente aplicado por via intravenosa provocando bloqueio neuromuscular completo entre um e dois minutos por um mecanismo de competição não despolarizante e o tempo de duração de seus efeitos sistêmicos é de 15 a 35 minutos. (19-21). O uso sistêmico do besilato de atracúrio pode causar paralisia dos músculos da respiração por sua ação indireta na placa motora. Pode ocorrer broncoconstrição em decorrência da liberação de histamina, além de diminuição da frequência cardíaca e queda da pressão arterial (22).

No intuito de não promover os efeitos sistêmicos do besilato de atracúrio, mas somente sua ação local na musculatura iridiana para gerar midríase em cirurgias intraoculares, tem se realizado aplicação intracamerar com efeitos satisfatórios e tempo de duração superior a 150 minutos. Os autores que relataram o uso desta técnica referem a ausência de sinais clínicos oftalmológicos e sistêmicos durante e após o procedimento (17,18,23).

Sendo assim, a importância do tema, aliada à falta de dados sobre a repercussão do besilato de atracúrio no endotélio da córnea, motivaram a realização deste estudo. A opção do estudo *in vitro*, utilizando olhos de galinha provenientes do abate, constitui-se numa alternativa viável, principalmente do ponto de vista ético, já que evitou o óbito de animais por motivos relacionados exclusivamente a esta pesquisa.

O número de amostras não foi maior devido à necessidade de seu processamento em até seis horas após o óbito dos animais. Estudos prévios realizados com bulbos oculares enucleados demonstraram ser possível analisar a córnea em até 6 horas *post mortem* sem que ocorram alterações estruturais no endotélio (24,25,26,17,27,28).

As amostras foram divididas em dois grupos: grupo experimental, G1 (10 córneas) e grupo controle, G2 (10 córneas), constituídos por olhos esquerdos e direitos respectivamente, levando em consideração que estudos prévios relatam a inexistência de diferença em relação aos parâmetros endoteliais obtidos entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo (29,30,24,31,32,28,33), logo, a avaliação de um olho permite inferir os resultados obtidos para o olho adelfo.

O método de avaliação do endotélio corneano através da utilização de colorações vitais possibilita uma forma simples, rápida e prática de detectar danos celulares (35).

Esta técnica foi aplicada neste estudo utilizando-se os corantes vermelho de alizarina e azul de tripano e demonstrou ser um protocolo possível de ser usado para corar o endotélio corneano de galinhas visto que se obtiveram imagens nítidas da monocamada endotelial. O corante vermelho de alizarina cora os espaços intercelulares e a exposição da membrana de Descemet em locais onde ocorreu perda ou necrose celular, já o azul de tripano cora os núcleos de células mortas, em que a membrana celular não está intacta. <sup>(36)</sup>.

Neste experimento foi possível visualizar efeitos tóxicos imediatos causados pela exposição do endotélio da córnea de galinhas ao besilato de atracúrio em todas as córneas do grupo experimental (G1). As áreas de perda celular e desnudamento endotelial com exposição da membrana de Descemet foram coradas pelo vermelho de alizarina.

As córneas do grupo controle (G2) também possuíam áreas coradas pelo vermelho de alizarina. A técnica utilizada para excisão corneal e a manipulação durante o procedimento de coloração podem ser responsáveis por essas áreas de perda celular.

A toxicidade endotelial corneana foi relacionada às substâncias que entram em contato com endotélio, baseado em suas composições químicas <sup>(37)</sup>, pH <sup>(38)</sup> e osmolaridades <sup>(39)</sup>.

Gonnering e colaboradores (1979) submeteram endotélios de coelhos e de humanos a soluções que variavam seu pHs de 3,5 a 10 em um estudo *in vitro*. Concluíram através de paquimetria, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) em diferentes tempos de exposição que fora do intervalo de 6,5 a 8,5, ocorriam alterações estruturais e funcionais. A ruptura dos complexos juncionais levava a quebra da função barreira do endotélio. O dano celular foi proporcional a magnitude da alteração de pH e ao tempo de exposição <sup>(38)</sup>.

Edelhauser e colaboradores (1981) perfundiram o endotélio corneano de humanos e coelhos com solução salina balanceada em diferentes osmolaridades e observaram que a perfusão hiposmótica causou aumento na espessura corneana. Utilizaram MEV e MET para análise endotelial e concluíram que o endotélio corneano pode tolerar soluções com osmolaridade de 200 a 400 mOsm/L sem ruptura celular, desde que íons essenciais estejam presentes <sup>(39)</sup>.

O pH do besilato de atracúrio é de 3,25 a 3,65, e sua osmolaridade é de 10 - 30 mOsmol/L estando abaixo do intervalo tolerado pelo endotélio corneano, sendo ácido e hiposmótico em relação ao humor aquoso, o que eu pode justificar seu efeito tóxico.

O tempo de exposição do endotélio da córnea ao besilato de atracúrio neste estudo foi de três minutos, levando-se em conta que outro estudo previamente realizado mostrou que o endotélio corneano de coelhos e humanos sofreu dano quando exposto a uma solução com pH 3,5 durante 5 minutos (<sup>38</sup>)

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que a preparação comercial de besilato de atracúrio induziu dano ao endotélio corneano de galinhas.

## REFERÊNCIAS

- (1) Svedbergh B, Bill A. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmologica*. 1972;50:321-335.
- (2) Yee RW, Edelhauser, HF, Stern, ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Experimental Eye Research*. 1987;44:703-714.
- (3) Pigatto JAT, Andrade, MC, Laus, JL, Santos, JM, Brooks, DE, Guedes, PM, Barros PS. Morphometric analysis of the corneal endothelium of yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Veterinary Ophthalmology*. 2004;7(3):205-208.
- (4) DelMonde DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2011;37:588-598.
- (5) Waring GO, Krohn MA, Ford GE, Harris RR, Rosenblatt LS. Four methods of measuring human corneal endothelium cells from specular photomicrographs. *Archives of Ophthalmology*. 1980;98:848-855.
- (6) Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye*. 1990;4:389-424.
- (7) Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Experimental Eye Research*. 2012;95(1):16-23.
- (8) Abib FC. Microscopia especular de córnea: manual e atlas. 1 ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000, 140 p.
- (9) Sheng H, Bullimore MA. Factors affecting corneal endothelium morphology. *Cornea*. 2007;26:520-525.
- (10) Murphy CJ. Raptor ophthalmology. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*. 1987;9:241-257.
- (11) Brooks DE. Avian cataracts. *Semin Avian Exotic Pet Med*. 1997;6:131-137.
- (12) Kern TJ. Disorders of the special senses. In: Altman RB, Clubb SL, Dorreisten GM et al. eds. *Avian medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders Co, p.563-589, 1997.
- (13) Greenwood AG, Barnett KC. The investigation of visual defects in raptors. In: Cooper JE. ed. *Recent advances in the study of raptor diseases*. West Yorkshire, England: Chiron Publications Ltd, p.131-135, 1981.

- (14) Montiani-Ferreira F. Ophthalmology. In: Fowler ME, Cubas ZS. Biology, medicine, and surgery of South American wild animals. Ames: Iowa State University Press, 437-456, 2001.
- (15) Black D. Ostrich examination – what to look for! Ostrich Odyssey, Proceedings of the 1993 meeting of the Australian Ostrich association, Sidney: Australia, 99-111, 1993.
- (16) Oliphant LW, Johnson MR, Murphy C, Howland H. The musculature and pupillary response of the great horned owl iris. *Experimental Eye Research*. 1983;37:583-595.
- (17) Gonçalves GF, Pachaly JR, Pippi NL, Romagnolly P, Belletini ST, Neves AG. Facectomia extracapsular em avestruz (*Struthio camelus Linnaeus, 1758*) – Relato de caso. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2006;101(559-560):295-297.
- (18) Carter RT, Murphy CJ, Stuhr CM, Diehl KA. Bilateral phacoemulsification and intraocular lens implantation in great horned owl. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2007;230:559-561.
- (19) Muir III WW, Hubbell JAE, Skarda RT, Bednarski RM. Manual de anestesia veterinária. 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2001. 432p.
- (20) Miller RD, Katzung BG. Relaxantes musculares esqueléticos. cap. 27. In: Katzung BG. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2003, p. 389-403
- (21) Bowman WC. Neuromuscular block. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(1):S277-S286.
- (22) Fantoni DT, Cortopassi SRG. Anestesia em Cães e Gatos. São Paulo: Roca, 2002.
- (23) Gonçalves GF, Merllini NB, Krominski A. Atracúrio intra-cameral em galinhas (*Gallus gallus*). VIII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Resumo ID:02.375-1. 2009.
- (24) Andrew SE, Ramsey DT, Rauptmann JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2001;62:479-482.
- (25) Vicenti F. Morfologia e morfometria do endotélio corneal de olhos normais de suínos (*Sus scrofa domesticus, LINNAEUS, 1758*) à microscopia especular. 2011. 61f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária)- Curso de Pós-graduação em Cirurgia. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.
- (26) Pigatto JAT, Abib FC, Pizetti, JC, Laus JL, Santos JM, Barros PSM. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005;33(1):41-45.
- (27) Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, Abib FC, Bellini LP, Barros PSM, Laus JL. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;8(9):427-430.

- (28) Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. Use of specular microscopy to determine corneal endothelium cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13(4):222-226.
- (29) Peiffer RL, Devanzo RJ, Kohen KL. Specular microscopy observations of clinically normal feline corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research*. 1981;42:854-855.
- (30) Gwin RM, Lerner I, Waren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelium cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1982;22:267-271.
- (31) Pigatto JAT, Laus JL, Santos, JM, Cerva C, Cunha LS, Ruoppolo V, Barros PS. Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscusm megallanicus*) by scanning electron microscopy. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2005;36(4):702-702.
- (32) Pigatto JAT, FRANZEN AA, Pereira FQ, Almeida ACVR, Laus JL, Santos JM, Guedes PM, Barros PSM. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural*. 2009;39(3):926-929.
- (33) Bercht BS, Albuquerque L, Araujo ACP, Pigatto JAT. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. *Veterinary Ophthalmology*. 2015;18(1):137-142.
- (34) Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL, Mendes-Vicenti FA, Pigatto JAT, Abib FC. Ultrastructure, morphology and morphometry of a normal corneal endothelium of adult crossbreed pig. *Ciência Rural*. 2009;9(1):117-122.
- (35) Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with tripan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *British Journal of Ophthalmology*. 1981;65:815-819.
- (36) Saad HA, Terry MA, Shame N, Chen ES, Friend DF, Holiman JD, Stoeger RC. An easy and inexpensive method for quantitative analisis of endothelial damage by using vital dying staining and adobe photoshop software. *Cornea*. 2008;27(7):818-824..
- (37) Carter LM, Duncan G, Rennie GK. Effects of detergents on the ionic balance and permeability of isolated bovine cornea. *Experimental Eye Research*. 1973;17:409–416.
- (38) Gonnering R, Edelhauser HF, van Horn DL, Duran TW. The pH tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1979;18:373– 390.
- (39) Edelhauser HF, Hanneken AM, Pederson HJ, van Horn DL. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Archives of Ophthalmology*, Chicago. 1981;99:1281-1287.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com o presente estudo, nas condições experimentais, foi possível concluir que o besilato de atracúrio induz dano ao endotélio corneano de galinhas. É importante ressaltar que não foram correlacionadas as alterações endoteliais observadas com o comprometimento funcional do endotélio. Neste sentido, novos estudos seriam necessários.



## REFERÊNCIAS

- AABERG, T.M. Correlation between corneal endothelium morphology and function. **American Journal of Ophthalmology**. v.98, n.4, p.510-512, 1984.
- ABIB, F.C. **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000, 140 p.
- ANDERSON, N.J.; NATH, R.; ANDERSON, J. Comparison of preservative-free bupivacaine vs. lidocaine for intracameral anesthesia: a randomized clinical trial and *in vitro* analysis. **American Journal of Ophthalmology**. Chicago, v.127, n.4, p.393-402, 1999.
- ANDREW, S.E.; RAMSEY, D.T.; RAUPTMANN, J.G.; BROOKS, D.E. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**. v.62, p.479-482, 2001.
- BEFANIS, B.J.; PEIFFER, R.L.; BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**., v.42, p.590-595, 1981.
- BENIZ NETO, J. **Efeito da epinefrina sobre o endotélio corneano de coelhos; estudo clínico e histopatológico sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão**. 1985, 110f. Tese (Doutorado em Oftalmologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1985.
- BERCHT, B.S.; ALBUQUERQUE, L.; ARAUJO, A.C.P.; PIGATTO, J.A.T. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. **Veterinary Ophthalmology**. v.18, n.1, p.137-142, 2015.
- BEUERMAN, R.W.; PEDROSA, L.; Ultrastructures of the human cornea. **Microscopy Research and Technique**. v.33, p.320-335. 1996.
- BLACK, D. Ostrich examination – what to look for! Ostrich Odyssey, **Proceedings of the 1993 meeting of the Australian Ostrich association**, Sidney: Australia, 99-111, 1993.
- BOTEON, J.E. Histologia do endotélio corneano. In: ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros. 2000, 140 p.
- 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.
- BOWMAN, W.C. Neuromuscular block. **British Journal of Pharmacology**. v.147, Suppl.1, p.S277- S286, 2006.
- BRITTON, B.; HERVEY, R.; KASTEN, K.; GREGG, S.; McDONALD, T. Intraocular irritation evaluation of benzalkonium chloride in rabbits. **Ophthalmic Surgery**, v.7, p.46–55, 1976.

- BROOKS, D.E. Avian cataracts. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. v.6, p.131-137, 1997.
- CANAVAGH, H.D., EL-AGHA, M.S.; PETROLL, W.M.; JESTER, J.V. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. **Cornea**, v.19, n.5, p.712-722, 2000.
- CARTER, L.M.; DUNCAN, G.; RENNIE, G.K. Effects of detergents on the ionic balance and permeability of isolated bovine cornea. **Experimental Eye Research**. v.17, p.409-416, 1973.
- CARTER, R.T.; MURPHY, C.J.; STUHR, C.M.; DIEHL, K.A. Bilateral phacoemulsification and intraocular lens implantation in great horned owl. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 230, p. 559-561, 2007.
- CHANG, Y., TSENG, S.Y.; TSENG, S.H.; CHEN Y.T.; HSIAO, J.H. Comparison of dyes for cataract surgery Part 1: Cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.31, p.791-798, 2005.
- CHOI, J.A.; CHUNG, S.K. Safety of intracameral injection of gatifloxacin, levofloxacin on corneal endothelial structure and viability. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. v.25, n.5, p.425-431, 2009.
- ÇEKİÇ, O.; OHJI, M.; HAYASHI, A.; FANG, X.Y.; KUSAKA, S.; TANO, Y. Effects of humidified and dry air on corneal endothelial cells during vitreal fluid-air exchange. **American Journal of Ophthalmology**. v.134, p.75-80, 2002.
- 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.
- DelMONTE, D.W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.37, p.588-598, 2011.
- DOUGHTY M.J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelium cell morphology: a review of techniques and their application. **Optometry and Visual 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 de corneal rabbit endothelium *ex vivo*. **Tissue and Cell**. v.30, p.634-643, 1998.
- EDELHAUSER, H.F.; van HORN, D.L.; HYNDIUK, R.A.; SCHULTZ, R.O. Intraocular irrigating solutions. Their effect on the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**. v.93, p.648-57, 1975.
- EDELHAUSER, H.F.; van HORN, D.L.; SHULTZ, R.O. et al.: Comparative toxicity of intraocular irrigating solutions on the corneal endothelium. **American Journal of Ophthalmology**. v.81, p.473-481, 1976.
- EDELHAUSER, H.F.; GONNERING, R.; van HORN, D.L. Intraocular irrigating solutions. A comparative study of BSS Plus® and lactated Ringer's solution. **Archives of Ophthalmology**. v.96, p.516-20, 1978.

EDELHAUSER, H.F.; HANNEKEN, A.M.; PEDERSON, H.J.; VAN HORN, D.L. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.99, p.1281-1287, 1981.

EDELHAUSER, H.F. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. Castroviejo lecture. **Cornea**. v.19, p.263-73, 2000.

EDELHAUSER, H.F. The balance between corneal transparency and edema. The Proctor lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** v.47, p.1755-67, 2006.

EGGELING, P. et al. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.26, n.9, p.1403-1408, 2000.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2002.

FORTIER, L.P.; ROBITALLIE, R.; DONATI, F. Increased sensitivity to depolarizing and nondepolarizing neuromuscular blockingagents in young rat hemidiaphragms. **Anesthesiology**. v.95, p.478-484, 2001.

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

FREITAS, L.V.R.P.; ALBUQUERQUE, L.; PIGATTO, J.A.T. **Avaliação do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular**. 2012. 56f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

GLASSER, D.B.; MATSUDA, M.; ELLIS, J.G.; EDELHAUSER, H.F. Effects of intraocular irrigation solution on the corneal endothelium after *in vivo* chamber irrigation. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v.99, n.3, p.321-328, 1985.

GONÇALVES, G.F.; MERLLINI, N.B.; KROMINSKI, A. Atracúrio intra-cameral em galinhas (*Gallus gallus*). **VIII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária**, Resumo ID:02.375-1. 2009.

GONÇALVES, G.F.; PACHALY, J.R.; PIPPI, N.L.; ROMAGNOLLI, P.; BELLETINI, S.T.; NEVES, A.G. Facectomia extracapsular em avestruz (*Struthio camelus Linnaeus*, 1758) – Relato de caso. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.101 (559-560), p. 295-297, 2006.

GONNERING, R.; EDELHAUSER, H.F.; VAN HORN, D.L.; DURAN, T.W. The pH tolerance of rabbit and human corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v.18, p.373– 390, 1979.

GREEN, K.; HULL, D.S.; VAUGHN, E.D.; MALIZIA Jr, A.A.; KAREN, B. Rabbit endothelial response to ophthalmic preservatives. **Archives of Ophthalmology**. v.95, p.2218–2221, 1977.

GREENWOOD, A.G.; BARNETT, K.C. The investigation of visual defects in raptors. In: COOPER, J.E., ed. **Recent advances in the study of raptor diseases**. West Yorkshire, England: Chiron Publications Ltd, p.131-135, 1981.

GUM, G.G.; GELATT, K.N.; ESSON, D.W.; Physiology of the eye. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. Blackwell Publishing. 4<sup>th</sup> ed. v.1. 149-182p, 2007.

GWIN, R.M.; LERNER, I.; WAREN, J.K.; GUM, .G. Decrease in canine corneal endothelium cell density and increase in corneal thickness as functions of age. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.22, p.267-271, 1982.

HEUERMAN, T.; HARTMANN, C.; ANDERS, N. Long-term endothelial cell loss after phacoemulsification: peribulbar anesthesia versus intracameral lidocaine 1%. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.28, p.639–643, 2002.

HOGAN, M.J.; ALVARADO, J.A.; WEDDEL, L.E.; **Histology of the human eye. An atlas and textbook**. Philadelphia. WB Saunders Co, 1971, 687 p.

HOLLEY, G.P.; ALAM, A.; KIRI, A.; EDELHAUSER, H.F. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.28. p.1027–1033, 2002.

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

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

JALBERT, I.; STAPLETON, F.; PAPAS, E.; SWEENEY, D.F.; CORONEO, M. *In vivo* confocal microscopy of the human cornea. **British Journal of Ophthalmology**, v.87, n.2, p.225-236, 2003.

JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. **Experimental Eye Research**. v.95, n.1, p.16-23, 2012.

JUDGE, A.J.; NAJAFI, K.; LEE, D.A.; MILLER, K.M. Corneal endothelial toxicity of topical anesthesia. **Ophthalmology**. v.104, p.1373–1379, 1997.

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

KADONOSONO, K.; ITO, N.; YAZAMA, F.; NISHIDE, T.; SUGITA, M.; SAWADA, H.; OHNO, S. Effect of intracameral anesthesia on the corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.24, p.1377-1381, 1998.

KAFARNIK, C.; FRITSCH, J.R.S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of dogs, cats and birds. **Veterinary Ophthalmology**. v.10, n.4, p.222-130, 2007.

KATZ, H.R. Effects of intraocular irrigating solution on the corneal endothelium after *in vivo* anterior chamber irrigation. **American Journal of Ophthalmology**. v.100, p.622-623, 1985.

KERN, T.J. Disorders of the special senses. In: ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORREISTEN, G.M. et al. eds. **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: WB Saunders Co, p.563-589, 1997.

KIM, T.; HOLLEY, P.; LEE, J.H.; BROOCKER, G.; EDELHAUSER, H.F. The effects of intraocular lidocaine on the corneal endothelium. **Ophthalmology**, Philadelphia, v.23, n.4, p. 551-554, 1998.

KLOSS, A.; BOHNKE, M. *In-vitro*-Untersuchung der Endothelverträglichkeit von 10 Kulturmedien unter besonderer Berücksichtigung der Pump- und Barrierefunktion. **Fortschr Ophthalmol**. v.88, n.6, p.781-785, 1991.

KOHCHI, H.; GOTO, M.; HIGASHINO, I.; SAKIMOTO, T.; KITANO, S. Bullous keratopathy; endothelial cell changes in experimental corneal edema [in Japanese]. **Acta Societatis Ophthalmologicae Japonicae**. v.84, p.124-125, 1980.

LAING, R.A.; SANSTROM, M.M.; BERROSPÍ, A.R.; LEIBOWITZ, H.M. Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental Eye Research**. v.22, p. 587-594, 1976.

LAING, R.A.; NEUBAUER, L.; LEIBOWITZ, H.M.; OAK, S.S. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. **Archives of Ophthalmology**. v.101, n.11, p.1712-1715, 1983.

LANDRY, H.; AMINIAN, A.; HOFFART, L.; NADA, O.; BENSOUFLA, T.; PROULX, S.; CARRIER, P.; GERMAIN, L.; BRUNETTE, I. Cornea endothelial toxicity of air and SF<sub>6</sub>. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v.52, p.2279-2286, 2011.

LANDSHMAN, N.; SOLOMON, A.; BELKIN, M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. **Archives of Ophthalmology**. v.107, n.12, p.1804-1808, 1989.

LAULE, A.; CABLE, M.K.; HOFFMAN, C.E.; HANNA, C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. **Archives of Ophthalmology**. v.96, n.11, p.2031-2035, 1978.

LIU, S.; CHIU, C.J.; WANG, I.J. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.30, p.1351-1355, 2004.

LIU, H.; ROUTLEY, I.; TEICHMANN, K. Toxic endothelial cell destruction from intraocular benzalkonium chloride. **Journal of Cataract Refractive Surgery**. v.27, p.1746-1750, 2001.

LUNDBERG, B.; BEHNDIG, A. Intracameral mydriatics in phacoemulsification cataract surgery. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.29, p.2366-2371, 2003.

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

MAGGS, D.J. Cornea and sclera. In: **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 4<sup>a</sup> ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2008. v.1. cap.10. p. 175-202.

MANNIS, M.J.; SWEET,E.; LEWIS, R. The effect of fluoracil on the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**. v.106, n.6, p.816-817, 1988.

MAMALIS, N.; EDELHAUSER, H.F.; DAWSON D.G.; CHEW, J.; LeBOYER, R.M.; WERNER, L. Toxic anterior segment syndrome. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.32, p.324-333, 2006.

MEANS, T.L.; GEROSKI, D.H.; HADLEY, A.; LYNN, M.J.; EDELHAUSER, H.F.. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. **Archives of Ophthalmology**. v.113, p.805–809, 1995.

MEHTA, J.S.; POR, Y.M.; POH, R.; BEUERMAN, R.W.; TAN, D. Comparison of donor insertion techniques for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. **Archives of Ophthalmology**. v.126, p.1383–1388, 2008.

MILLER, R.D.; KATZUNG, B.G. Relaxantes musculares esqueléticos. cap. 27. In. KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica and Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2003, p. 389-403

MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium-XXXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. **American Journal of Ophthalmology**. v.93, n.1, p.1-29, 1982.

MISHIMA, S.; TANISHIMA, T.; MASUDA, K. Pathophysiology and pharmacology of intraocular surgery. **Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology**. v.13, p.147-158, 1985.

MODIS, L.J.R.; LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. **Cornea**. v.20, n.7, p.711-714, 2001.

MONTIANI-FERREIRA, F. Ophthalmology. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, medicine, and surgery of South Amercian wild animals**. Ames: Iowa State University Press, 437-456, 2001.

MOORE, C.P.; PICKETT, J.P.; BEEHLER, B. Extracapsular extraction of senile cataract in an Andean condor. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.187, p.1211-1213, 1985.

- MORITA, H. Specular microscopy of corneal endothelium cells in rabbits. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.57, p.273-277, 1995.
- MUIR III, W.W.; HUBBELL, J.A.E.; SKARDA, R.T.; BEDNARSKI, R.M. **Manual de anestesia veterinária**. 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2001. 432p.
- MURPHY, C.J. Raptor ophthalmology. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**. v.9, p.241-257, 1987.
- NASCIMENTO, D.C.; SERRA, C.S.; OLIVEIRA, A.C. Cellular mechanisms of atracurium-induced tetanic fade in the isolated rat muscle. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**. v.95, n.1, p.9-14, 2004.
- NASSARALA, B.A. Fisiologia do endotélio corneano. In: ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros. 2000. 140 p.
- OH, J.Y.; WEE, W.R.; LEE, J.H.; KIM, L.K. Short-term effect of intracameral triamcinolone acetonide on corneal endothelium using the rabbit model. **Eye**. v.21, p.812-818, 2007.
- OJEDA, J. L.; VENTOSA, J.A.; PIEDRA, S. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. **Journal of Anatomy**, v.109, n.5, p.567-576, 2001.
- OLIPHANT, L.W.; JOHNSON, M.R.; MURPHY, C.; HOWLAND, H.. The musculature and pupillary response of the great horned owl iris. **Experimental Eye Research**. v.37, p.583-595, 1983.
- OLSON, R.J.; KOLODNER, H.; RODDLE, P.; ESCAPINI, H. Jr. Commonly used intraocular medications and the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**. v.98, p.2224-2226, 1980.
- PARIKH, C.; SIPPY, B.D.; MARTIN, D.F.; EDELHAUSER, H.F. Effects of enzymatic sterilization detergents on the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**. v.120, p.165-172, 2002.
- PARIKH, C.H.; EDELHAUSER, H.F. Ocular surgical pharmacology: corneal endothelial safety and toxicity. **Current Opinion in Ophthalmology**. v.14, p.178-185, 2003.
- PARK, S. FONG, A.G.; CHO, H.; ZHANG, C.; GRITZ, D.C.; MILAN, G.; HERZLICH, A.A.; GORE, P.; MORGANTI, A.; CHUCK, R.S. Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelium Cells. **Cornea**. v.31, p.1476-1479., 2012.
- PEIFFER, R.L.; DEVANZO, R.J.; KOHEN, K.L. Specular microscopy observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**. v.42, p.854-855, 1981.
- PETROUSOS, G.; SAVOLDELLI, M.; POULIQUEN, Y. Effect of cefazolin on the corneal endothelium. **Ophthalmic Research**, Basel, v.21, n.1, p.33-36, 1989.
- PIGATTO, J.A.T.; ANDRADE, M.C.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; BROOKS, D.E.; GUEDES, P.M., BARROS, P.S. Morphometric analysis of the corneal endothelium of

yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary Ophthalmology**. v.7, n.3, p.205-208, 2004.

PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C.; PIZETTI, J.C.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; BARROS, P.S.M. Análise morfológica 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.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; CERVA, C.; CUNHA, L.S.; RUOPPOLO, V.; BARROS, P.S. Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus megallanicus*) by scanning electron microscopy. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.36, n.4, p.702-702, 2005b.

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

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

PRICE, F.W.; PRICE, M.O. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: early challenges and technique to enhance donor adherence. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.32, p.411-418, 2006.

PRIYA, T.M.; SARADA, D.; NIHAL, T. Endothelial cell loss and central corneal thickness in patients with and without diabetes after manual small incision cataract surgery. **Cornea**. v.30, n.4, p.:424-428, 2011.

RAO, B.; ZHANG, J.; TABAN, M.; MCDONNELL, P.; CHEN, Z. Imaging and investigating the effects of incision angle of clear corneal cataract surgery with optical coherence tomography. **Optics Express**. v.11, p.3254-3261, 2003.

REHANY, U. BERSUDSKY, V.; RUMELT, S. Paradoxical hypotony after laser in situ keratomileusis. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.26, p.1823-1826, 2000.

RODRIGUES, G. N.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; RIQUEIRO, M.P.; SMITH, R.L. Corneal endothelium cell morphology in normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**. v.9, p.101-107, 2006.

RUGGERI, A.; SCARPA, F.; MASSIMO, L.; MELTENDERF, C.; SCHROETER, 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, 2009.



SAAD, H.A.; TERRY, M.A.; SHAMIE, N.; CHEN, E.S., FRIEND, D.F.; HOLIMAN, J.D.; STOEGER, C. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and adobe photoshop software. **Cornea**. v.27, n.7, p.818-824. 2008.

SILVA, M.R.B.M.; GREGORIO, E.A. Toxicidade da Mitomicina C ao endotélio corneano de coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v.72, n.1, p.152-158, 2009.

SHENG, H.; BULLIMORE, M. A. Factors affecting corneal endothelium morphology. **Cornea**. v.26, p.520-525, 2007.

SINGH, G.; BOHNKE, M.; von DOMARUS, D.; DRAEGER, J. Toxicity of methods of implant material sterilization on corneal endothelium. **Annals of Ophthalmology**. v.17, p.727-730, 1985.

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

SVEDBERGH, B.; BILL, A.; Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**. v.50, p.321-335, 1972.

TAMAYO-ARANGO, L.J.; BARALDI-ARTONI, S.M.; LAUS, J.L.; MENDES-VICENTI, F.A.; PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C. Ultrastructure, morphology and morphometry of a normal corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural**. v.9, n.1, p.117-122. 2009.

TAN, J.H.Y.; BURTON, R.L. Does preservative-free lignocaine 1% for hydrossection reduce pain during phacoemulsification? **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.26, n.5, p.733-735, 2000.

TAYLOR, M.J.; HUNT, C.J. Dual staining of corneal endothelium with tripan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**. v.65, p.815-819, 1981.

TERRY, M.A.; OUSLEY, P.J. Deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): visual acuity, astigmatism, and endothelial survival in a large prospective series. **Ophthalmology**. v.112, p.1541-1549, 2005.

TERRY, M.A. Endothelial Keratoplasty: The influence of insertion techniques and incision size on donor endothelial survival. **Cornea**. v.28, p.24-31, 2009.

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

VAN DOREEN, B.T.H. **The corneal endothelium reflected. Studies on surgical damage to the corneal endothelium and on endothelial specular microscopy**. PhD dissertation, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands, 2006.

VICENTI, F. **Morfologia e morfometria do endotélio corneal de olhos normais de suínos (*Sus scrofa domesticus*, LINNAEUS, 1758) à microscopia especular**. 2011. 61f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária)- Curso de Pós-graduação em Cirurgia. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

WARING, G.O.; KROHN, M.A.; FORD, G.E.; HARRIS, R.R.; ROSENBLATT, L.S. Four methods of measuring human corneal endothelium cells from specular photomicrographs. **Archives of Ophthalmology**. v.98, p.848-855, 1980.

WERNER, L.P. Toxicity of lidocaine to rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**. v.24; n.10. p.1371-1376, 1998.

WILSON, S.E.; BOURNE, W.M. Corneal preservation for penetrating keratoplasty. In: KAUFMAN, H.E.; BARRON, B.A.; MCDONALD, M.B. eds. **The Cornea**. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann; 1998, P.781-803.

YAGOUBI, M.I.; ARMITAGE, W.J.; DIAMOND, J.; EASTY, D.L. Effects of irrigation solutions on corneal endothelium function. **British Journal of Ophthalmology**. v.78, n.4, p.302-306, 1994.

YEE, R. W.; GEROSKY, D.H.; MATSUDA, M.; CHAMPEAU, E.J.; MEYER, L.A.; EDELHAUSER, H.F. Correlation of corneal endothelium pump site density, barrier function and morphology in wound repair. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v.46, p.1191-1201, 1985.

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