

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

LUIS FELIPE DUTRA CORRÊA

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO CORNEAL
DE OVINOS (*Ovis aires*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS OBTIDAS PELA
MICROSCOPIA ESPECULAR

Porto Alegre

2011

LUIS FELIPE DUTRA CORRÊA

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO CORNEAL
DE OVINOS (*Ovis aires*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS OBTIDAS PELA
MICROSCOPIA ESPECULAR

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Oliveira Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

Porto Alegre

2011

C824m Corrêa, Luis Felipe Dutra

Morfologia e morfometria das células do endotélio corneal de ovinos (*Ovis aires*) em diferentes faixas etárias obtidas pela microscopia especular / Luis Felipe Dutra Corrêa; orient. Luiz Alberto Oliveira Ribeiro; co-orient. João Antonio Tadeu Pigatto. – Porto Alegre, 2011.

55 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2011.

Inclui resumo em Português e Inglês.

Inclui artigo científico: p. 27-44.

1. Ovinos. 2. Córnea. 3. Endotélio. 4. Microscopia Especular. I. Ribeiro, Luiz Alberto Oliveira. II. Pigatto, João Antonio Tadeu. III. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. III. Título.

Celina Leite Miranda (CRB-10/837)

LUIS FELIPE DUTRA CORRÊA

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO CORNEAL
DE OVINOS (*Ovis aires*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS OBTIDAS PELA
MICROSCOPIA ESPECULAR

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Veterinárias.

Aprovada em Porto Alegre, 24 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Oliveira Ribeiro
Orientador e Presidente da Comissão

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

Prof. Dr. Ney Luis Pippi
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio Kwitko
Membro da Comissão

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

E imprescindível dizer que o trabalho que se segue, não teria sido realizado sem a importante participação de algumas pessoas e o apoio das instituições envolvidas.

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pela força de ultrapassar as barreiras que surgiram ao longo da vida, ao longo deste trabalho, que com simplicidade e humildade sempre me permitiram ter o necessário.

Agradeço à minha família – pai, mãe, irmãos, tios e avós – os ensinamentos, a paciência e os conselhos, a partir dos quais me tornei a pessoa que sou hoje. Sou eternamente grato aos meus pais João da Cunha Corrêa e, *in memoriam*, Gladis Teresinha Dutra Corrêa, pelos aconselhamentos e esforços na viabilização da minha formação educacional, fundamentais na construção do meu caráter e refletidos, certamente, em minha trajetória profissional. Faço um adentro, salientando a falta que me faz minha mãe, sua paciência, seu estilo batalhador de conseguir as coisas muitas vezes inalcançáveis, e suas palavras que me confortavam e serviam muitas vezes para me dar esperanças e vencer obstáculos. Hoje não tenho mais sua presença, infelizmente, mas tenho o reflexo de caráter que me fazem ajudar, reconhecer e agradecer às pessoas que me ajudaram.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Alberto Oliveira Ribeiro, que orientou este estudo com extrema competência e profissionalismo, seu apoio, conhecimento, paciência e companheirismo foram muito importantes no desenvolvimento deste trabalho. Além disso, agradeço a oportunidade dada na busca do conhecimento e registro que ficará gravado aquela constante frase “... vamos tomar aquele café...”, convite esse que servia só para mudar de ambiente, mas que continuava passando os ensinamentos e experiência de vida que levarei comigo.

Agradeço ao Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto, que co-orientou este estudo também com imenso profissionalismo, dedicação, conhecimento, apoio e companheirismo. Além disso, registro aqui as longas conversas formais e informais, na hora do almoço e nas tardes, as quais tanto contribuíram para meu crescimento profissional, já na área da oftalmologia.

Meus sinceros agradecimentos e reconhecimentos à colega e futura mestra Paula S. Hunning pelo companheirismo na execução deste projeto, não importando o dia, hora, local e tempo.

Agradeço também, à graduanda Luciane de Albuquerque, pois sempre se prontificou em me ajudar desde a época de aluno especial, mesmo quando havia algum empecilho particular ou burocrático, a mesma dava um “jeitinho”, mas nunca me deixava na mão. Contudo isso serviu para dizer que nesses anos de mestrado encontrei uma verdadeira amiga, pois essas palavras não refletem toda gratidão que sinto a sua pessoa.

Agradeço também a outra amiga que fiz nesses anos de mestrado, a Msc. Fabiana Quartiero Pereira, grande companheira, parceira, prontificando-se, sempre, a ajudar.

Agradeço à médica veterinária Cíntia Ramos Braseiro pelo apoio, companheirismo, paciência e ajuda motivacional para eu seguir em frente neste projeto sempre se prontificando em me apoiar em qualquer “coisa” que precisasse.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul de um modo geral e a todos que a compõem tornando-a o que ela é e o que representa, a oportunidade. Foi com imenso prazer que fiz parte dessa história, assim como meu avô fez sendo professor da mesma (Prof. Jurandyr Dutra).

Agradeço à Clínica e ao médico Dr. Fernando César Abib por disponibilizar o microscópio especular e por seu auxílio, fundamental para a realização deste estudo.

E por último, agradeço de um modo geral a todos que confiaram em mim, mesmo sem ter aqui mencionado, mas que me apoiaram para a realização deste projeto – espero não tê-los desapontados. E agradeço também àqueles que não apostaram em mim –, pois estes me deram grande força para mostrar que sou capaz. Afinal, se não pude ficar 24h dentro da universidade não foi porque não quis, mas porque que a vida, infelizmente, apresentou-me certos “pesos” que muito afetaram a intenção de dedicar-me à pesquisa, em tempo integral.

RESUMO

Baseado na carência de documentação com respeito ao endotélio da córnea de ovinos, a pesquisa teve como objetivo documentar o endotélio corneal de ovinos em diferentes faixas etárias – jovem, adulto e velho – utilizando a microscopia especular. Logo, buscou-se investigar o efeito da idade sobre a morfologia e morfometria do endotélio da córnea de ovinos. O endotélio corneano foi avaliado com auxílio do microscópio especular de contato. No total, foram avaliados 18 ovinos (*Ovis aires*) neste estudo. Os animais foram distribuídos em três grupos de 6 animais cada um em função da idade. O grupo I continha animais com idade de 6 meses; o grupo II, animais com idade de 2 a 4 anos; e o grupo III continha animais de 5 a 8 anos. Para a avaliação do endotélio corneal foram levados em consideração a densidade de células endoteliais (DCE), a área celular média, o polimegatismo e o pleomorfismo. Os resultados encontrados revelaram a diminuição na DCE em córneas de ovinos normais com o avanço da idade bem como o aumento da área das células endoteliais e do pleomorfismo. O presente trabalho mostrou que os parâmetros endoteliais avaliados sofrem alterações decorrentes da idade.

Palavras-chave: Ovinos. Córnea. Endotélio. Microscopia Especular.

ABSTRACT

Based on the lack of information on the corneal endothelium of ovine, the objective of this research was to evaluate the corneal endothelium of sheep in different age groups – young, adult and old - using the specular microscope. So the aim of this study was to investigate the effect of age on morphology and morphometry corneal endothelium of sheep. The corneal endothelium was evaluated with the help of a contact specular microscope. A total of 18 sheep (Ovis aires) were evaluated in this study. The sheep mob was divided into three groups of six animals each according to age. Group I contained animals 6 months old, group II contained animals from 2 to 4 years old and group III contained animals from 5 to 8 years old. To evaluate corneal endothelium we estimated the endothelial cell density (ECD), the average cell area, polymegathism and pleomorphism. The results revealed on ECD decrease in corneas of normal sheep with advancing age, as well as a corresponding increase in endothelial cell area and pleomorphism. The present work suggests that the endothelial parameters evaluated change with advancing age.

Key words: *Sheep. Cornea. Endothelium. Specular microscopy.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Imagem de microscopia especular do endotélio da córnea de um ovino com seis meses de idade apresentando uma densidade celular de 3729,17 células/mm² 31
- Figura 2** Imagem de microscopia especular do endotélio da córnea de um ovino com três anos de idade apresentando uma densidade celular de 2644,50 células/mm² 32
- Figura 3** Imagem de microscopia especular do endotélio da córnea de um ovino com seis anos de idade apresentando uma densidade celular de 2476,67 ± 239,63 células/mm² 33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Valores médios da densidade celular (células/mm²) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010. 32
- Tabela 2** Valores médios da área celular (µm²) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010. 34
- Tabela 3** Valores médios do coeficiente de variação (%) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010. 35
- Tabela 4** Valores médios do pleomorfismo celular (%) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACM	área celular média
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
células/mm ²	células por milímetro quadrado
CV	Coefficiente de variação
DCE	densidade do endotélio corneal
et al.	e outros
G	grupo
K ⁺⁺	íon Potássio
mL/Kg	mililitros por quilograma
mm ²	milímetro quadrado
Na ⁺	íon Sódio
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
µm	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado
%	porcentagem
<	menor que
=	igual
p	probabilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivo Específico	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Aspectos Estruturais do Endotélio Corneano	16
3.2	Aspectos Funcionais do Endotélio Corneano	19
3.3	Morfometria do Endotélio Corneano	22
4	ARTIGO: Morfologia e Morfometria das Células do Endotélio Corneal de Ovinos (<i>Ovis aires</i>) em Diferentes Faixas Etárias Obtidas pela Microscopia Especular	27
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A córnea dos animais domésticos é composta por camadas celulares e acelulares de formas e funções distintas. As camadas são dispostas na seguinte ordem: epitélio anterior da córnea, substância própria da córnea + lâmina limitante anterior, lâmina limitante posterior e epitélio posterior da córnea (INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURES, 1994). Contudo, na clínica oftalmológica veterinária, a nomenclatura comumente utilizada é a que se segue: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (MAGRANE, 1977; SEVERIN, 1991; WHITLEY, 1991). Já Bloogg (1990), Slatter (1992), Vestre (1996) e Pippi e Gonçalves (2009) citaram também o filme lacrimal como sendo uma camada da córnea. Uma das principais funções da córnea é a sua transparência, a qual permite a transmissão e refração da luz para a retina (SLATTER, 1992). São várias as propriedades da córnea que contribuem para a transparência, entre elas podemos citar: a organização das fibras de colágeno do estroma, a desmielinização das fibras nervosas sensitivas da córnea, a avascularização e a deturgescência (STADES *et al.*, 1999; HERRERA, 2008; PIPPI; GONÇALVES, 2009). Esta última propriedade é de responsabilidade do endotélio da córnea, camada a qual tem uma grande atividade metabólica (NASSARALLA, 2000).

O endotélio corneal apresenta sua face anterior voltada para a membrana de Descemet, enquanto, posterior, limita-se com o humor aquoso (WARING *et al.*, 1982). O endotélio corneal é composto por uma monocamada de células poligonais, em sua maioria, hexagonais (TUFT; COSTER, 1990). A integridade e saúde dessa camada são essenciais para a manutenção da transparência normal da córnea. Esta camada está em constante atividade metabólica no transporte ativo de substância e como barreira impedindo a entrada de substâncias. A estrutura do endotélio corneano tem sido documentada em humanos (ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; LANGSTON, 2001; NISHIDA, 2003), cães (GWIN; LERNER; WARREN, 1982; PIGATTO *et al.*, 2006, RODRIGUES *et al.*, 2006), cavalos (ANDREW *et al.*, 2001), lhamas e alpacas (ANDRE ; WILLIS; ANDERSON, 2002), camelos (AHMED; KARCIOGLU, 1997) e outras espécies animais (YEE; EDELHAUSER; STERN , 1987; COLLIN; COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a, 2005b). Na maioria das espécies

ocorre o decréscimo da densidade endotelial e modificações da morfologia celular com o avanço da idade (DOUGHT, 1994; ABIB; BARRETO JÚNIOR 2001).

Entre as técnicas utilizadas para análise do endotélio, encontram-se os métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro* (COLLIN; COLLIN, 1998; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987). Clinicamente, a microscopia especular tem sido de grande valia para visibilizar o padrão e as alterações em diferentes espécies ocasionadas por doenças e por medicamentos, além do registro fotográfico, *in vivo* (ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; ANDREW *et al.*, 2001; ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002, PIGATTO *et al.*, 2003, 2005a).

Entre os principais parâmetros endoteliais analisados, encontram-se a contagem celular, a área celular e a variação do tamanho (polimegatismo) e da forma de suas células (pleomorfismo). Entretanto, ao se recorrer à literatura, observa-se que os estudos relativos à morfologia endotelial de ovinos em diferentes faixas etárias são ainda desconhecidos.

Objetivou-se estudar os parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea de ovinos (*Ovis aires*) em diferentes faixas etárias, utilizando a microscopia especular.

2 OBJETIVOS

A seguir, são delineados os objetivos: geral e específico.

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão morfológico e morfométrico das células do endotélio corneano de ovinos (*Ovis aries*) em diferentes faixas etárias utilizando microscópio especular.

2.2 Objetivo Específico

Verificar se o endotélio segue o padrão de outras espécies onde a densidade celular e a morfologia, com o avanço da idade, sofrem alterações.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos tópicos que se seguem, são abordados os aspectos estruturais e funcionais do endotélio corneano, bem como sua morfometria.

3.1 Aspectos Estruturais do Endotélio Corneano

O endotélio, originário da migração de células da crista neural, constitui-se na estrutura mais posterior da córnea (JOHNSTON *et al.*, 1979). As células endoteliais apresentam sua face anterior voltada para a membrana de Descemet, enquanto a posterior limita-se com o humor aquoso (TUFT; COSTER, 1990; SLATTER, 2005).

O endotélio corneano é uma monocamada, constituída, em sua maioria, por células hexagonais, ocasionalmente, pentagonais, mas que podem apresentar quatro, sete ou até oito lados (SVEDBERGH; BILL, 1972; RAO; LOHMAN; AQUAVELA, 1982; DOUGHTY, 1989; HERRERA, 2008). Vista de perfil, a célula endotelial é achatada e seus lados, ou superfícies laterais, não apresentam o formato de retângulo, como seria de se esperar em um prisma hexagonal, pois suas membranas não formam superfícies planas, mas sofrem reentrâncias e saliências com as células vizinhas, aumentando as superfícies de contato entre elas (ABIB, 2000). Em razão da alta atividade metabólica, as células endoteliais contêm numerosas mitocôndrias, além de retículo endoplasmático liso e rugoso abundante (SLATTER, 2005).

Em indivíduos da espécie humana, o percentual de células hexagonais aproxima-se de 70% e o seu declínio é indicativo de menor reserva funcional do endotélio corneano (GLASSER *et al.*, 1985; SCHULTZ *et al.*, 1986; YEE *et al.*, 1982).

Pigatto *et al.* (2005a) valendo-se da microscopia eletrônica de varredura encontraram um porcentual de 75% de células hexagonais no endotélio de coelhos. Mesmo valor foi encontrado no estudo do endotélio corneano de gatos em diferentes idades (FRANZEN *et al.*, 2010).

Yee, Edelhauser e Stem (1987), valendo-se da microscopia especular, compararam o endotélio corneano de vertebrados encontrando células com padrão hexagonal em percentuais variáveis entre 58 e 81%.

Rao, Lohman e Aquavella (1982) identificaram a existência de relação entre o número de células hexagonais e o coeficiente de variação da área celular. A partir da constatação, sugeriram que o endotélio com maior número de células com seis lados apresenta menor variação na área celular.

O endotélio de humanos tem uma população de 400 a 500 mil células, cada uma medindo 18 a 20 μm de largura por 4 a 6 μm de espessura. O núcleo mede 7 μm de diâmetro (ABIB, 2000).

A densidade endotelial no recém nascido da espécie humana é de aproximadamente 3.500 a 4.000 células por milímetro quadrado, enquanto que, no adulto, a densidade baixa para 1.400 a 2.500 células por milímetro quadrado (ABIB, 2000). Pigatto *et al.* (2005a) estudando o endotélio corneal de coelhos utilizando a microscopia eletrônica de varredura achou uma densidade média de 5747 ± 238 células por milímetro quadrado. Já, os mesmos autores, em 2006, valendo-se da microscopia especular, encontraram, para a espécie canina uma densidade celular média de 2555 ± 240 células por milímetro quadrado (PIGATTO *et al.*, 2006).

Estudos que se valeram da microscopia eletrônica de varredura demonstraram que, com exceção das bordas celulares, dos cílios e das microvilosidades, a superfície posterior do endotélio é plana, e que as bordas celulares apresentam interdigitações (SVEDBERGH; BILL, 1972; YAMASAKI; INQUÉ, 2001).

A membrana basal do endotélio encontra-se aderida à membrana de Descemet, mas não se verificam hemidesmossomas, complexos juncionais típicos da associação da membrana celular com a lâmina basal (BINDER; BINDER, 1957; TUFT; COSTER, 1990). A ausência dessas estruturas permite que as células endoteliais sejam facilmente separadas da membrana de Descemet, principalmente no curso de intervenções cirúrgicas intra-oculares (WARING *et al.*, 1982). A membrana celular posterior tem cerca de 20 a 30 microvilosidades, por células, em humanos e medem 0,1 a 0,2 μm de largura por 0,5 a 0,6 μm de altura que se projetam cerca de 0,5 μm para câmara anterior (SVEDBERGH; BILL, 1972; TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000). Doughty, Müller, Zaman (2000), valendo-se da microscopia eletrônica de varredura estimaram densidade média de 63 microvilosidades para cada célula do endotélio corneano de coelhos.

A presença de vesículas pinocíticas abertas que fazem faces para a membrana de Descemet e são encontradas nas superfícies internas das membranas laterais e posteriores. Essas contêm substâncias que serão usadas pela célula do estroma da córnea e adjacências; destacam-se da membrana, atravessam o citoplasma e liberam o seu

conteúdo no espaço entre as células endoteliais, anteriormente à *zonulas occludens* ou na região da membrana de Descemet (ABIB, 2000). As aberturas das vesículas pinocíticas, cujo diâmetro médio é de 0,1 μm , encontradas sobre a superfície de cada célula endotelial indicam haver pinocitose (TUFT; COSTER, 1990).

Entre as membranas laterais, encontramos complexos juncionais designados por *zonula occludens*, *macula occludens* e *macula adherens*, as quais são responsáveis pela aderência de uma célula a outra. A *zonula occludens* une as células no terço posterior, mais frequentemente próximo à câmara anterior. A *macula occludens* e a *macula adherens* são raridades, ocorrendo nos terços anteriores das membranas laterais (ABIB, 2000).

No citoplasma das células endoteliais encontram-se grânulos de pigmentos derivados provavelmente da melanina fagocitada do estroma da íris ou de células ou do epitélio pigmentar, fagocitados do humor aquoso, e lisossomas ocasionais (TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000).

Cílios centralizados e dirigidos à câmara anterior têm sido, ocasionalmente, encontrados nas células endoteliais (SVEDBERGH; BILL, 1972; GALLAGHER, 1980; DOUGHTY, 1998; COLLIN; COLLIN, 1998, 2000; ABIB, 2000; PIGATTO, 2004).

O núcleo é achatado e oval. O espaçamento entre os núcleos é regular através da córnea, tornando-se mais irregular com a idade (ABIB, 2000).

O bom desempenho da função endotelial depende da densidade celular, sendo prejudicado quando atinge o limiar de 400 a 700 células por milímetro quadrado, com o aparecimento de edema do estroma e do epitélio da córnea (ABIB, 2000). Quando ocorre perda endotelial, as células adjacentes tentam suprimir o déficit se multiplicando (mitoses) ou se expandindo. Ocorrem mitoses em células endoteliais jovens, sendo extremamente rara nos adultos (ABIB, 2000).

Na maioria das espécies, indivíduos jovens exibem homogeneidade quanto ao tamanho e forma das células endoteliais (COLLIN; COLLIN, 1998; DOUGHTY, 1989; TUFT; COSTER, 1990; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987).

Quando ocorre perda celular, as células sobreviventes preenchem as lacunas resultantes aumentando de tamanho (polimegatismo), perdendo sua regularidade em tamanho (polimegetismo) e forma (polimorfismo) (ABIB, 2000).

3.2 Aspectos Funcionais do Endotélio Corneano

A córnea é um tecido altamente diferenciado que permite refração e transmissão da luz. Para tanto, é necessário que sua integridade e transparência sejam mantidas. Entre os fatores responsáveis pela manutenção da espessura e da transparência corneal podemos citar: ausência de vasos sanguíneos e de pigmentos, inervação superficial amielinizada, bem como a organização e o funcionamento regular das células epiteliais e endoteliais (ZAUBERMAN; SACHS, 1971; MISHIMA, 1982; WARING *et al.*, 1982; DOUGHTY, 1989).

As características histológicas do endotélio, com grande número de mitocôndrias, apontam para um mecanismo ativo de transporte de íons através das células (TUFT; COSTER, 1990; BOTEON, 2000). Um sistema regulador equilibra a quantidade de líquido internamente ao estroma corneal. Enzimas na parede lateral da membrana plasmática induzem a movimentação de íons de bicarbonato, sódio e potássio, gerando gradiente osmótico que mobiliza líquido do estroma (MISHIMA, 1982). Os complexos juncionais, que interligam as células endoteliais, atuam como barreira à entrada de pequenas moléculas da câmara anterior para o espaço intracelular (WARING *et al.*, 1982; TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000). Estas ligações são dependentes de cálcio e fundamentais para a manutenção da função de barreira do endotélio (ABIB, 2000).

O equilíbrio osmótico da córnea se produz pela diferença na concentração de eletrólitos em cada uma de suas camadas. As células epiteliais e endoteliais bombeiam íons sódio para lágrima e humor aquoso, respectivamente, mas como a concentração destes íons é maior nestes líquidos que no estroma, os íons voltam ao estroma, havendo então o equilíbrio osmótico. Este fenômeno se deve à integridade das membranas celulares limítrofes, especialmente ao endotélio, e à existência de um metabolismo ativo, fato este comprovados pela maior concentração de enzimas como fosfatase, amilase, collagenase, ATPase e outras (ABIB, 2000).

O citoplasma das células endoteliais é rico em mitocôndrias, que contém enzimas oxidativas envolvidas na produção de energia. Apresentam, também, grande número de retículos endoplasmáticos lisos e rugosos, além de ribossomos e complexo de golgi bem desenvolvidos. A presença destas estruturas evidencia a grande atividade metabólica do endotélio (ABIB, 2000).

A permeabilidade do epitélio e do endotélio está associado a substâncias lipossolúveis enquanto o estroma, hidrossolúveis (ABIB, 2000).

Na maioria das espécies ocorre um decréscimo fisiológico na densidade endotelial em função da idade (FITCH; NADAKAVUKAREN; RICHARDS, 1982; GWIN; LERNER; WARREN, 1982; BAHN *et al.*, 1986; BAROODY *et al.*, 1987; RODRIGUES, 1999; MULLER; DOUGHTY; WRIGHT, 2000; ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; ANDREW *et al.*, 2001). No primeiro ano de vida os indivíduos da espécie humana apresentam um declínio acentuado na densidade endotelial influenciado, principalmente pelo crescimento do diâmetro da córnea (BAHN *et al.*, 1986; SPEEDWELL *et al.*, 1988).

Murphy, Alvarado e Juster (1984) verificaram que, decorridos os primeiros vinte anos de idade, a densidade endotelial em córneas híidas de indivíduos da espécie humana diminui gradativamente a uma taxa de 0,5% ao ano (BOURNE *et al.*, 1994; DICK *et al.*, 1996).

Além do declínio da densidade endotelial decorrente da idade, as funções do endotélio podem ser alteradas por inúmeros fatores, incluindo diabetes mellitus, trauma ou inflamação intraocular e perfusão da câmara anterior com substâncias livres de cálcio ou pH incompatível entre outros (WARING *et al.*, 1982; DOUGHTY, 1989; TUFT; COSTER, 1990; PILLAI *et al.*, 2000).

Estudos que avaliaram a capacidade regenerativa das células endoteliais de indivíduos adultos nas espécies humana e felina demonstraram que a reparação do endotélio corneano ocorre por hipertrofia e migração de células remanescentes (HOFFER, 1979; TREFFERS, 1982; LAING *et al.*, 1983; LANDSHMAN *et al.*, 1988; HUANG; NELSON; BOURNE, 1989; BOURNE *et al.*, 1994). Embora, nessas espécies verifique-se alguma atividade mitótica em indivíduos jovens, ela é insuficiente para substituir as células que foram lesadas, e a reparação ocorre sempre associada à hipertrofia e a migração de células remanescentes (LAING, 1983; LAING, 1984; BAHN *et al.*, 1986; LANDSHMAN; SOLOMON; BELKIN, 1989).

Reconhece-se que, além da hipertrofia e da migração celular, a reparação endotelial em coelhos demanda intensa mitose celular (OLSEN; DAVANGER, 1984; MATSUDA *et al.*, 1985; ICHIJIMA *et al.*, 1993; WATSKY, 1995).

As investigações quanto à capacidade regenerativa do endotélio corneano de cães são parcas e controversas. Gwin, Lerner e Warren (1982) notificaram que a reparação endotelial nessa espécie decorre da hipertrofia das células remanescente e

que, em função da idade, ocorrem alterações na forma das células com grande contingente de células com tamanho aumentado e com a forma hexagonal alterada.

Befanis, Peiffer e Brown (1981), ao produzirem, por congelamento, a destruição de 90% do contingente celular endotelial de cães verificaram que, decorridas seis semanas as áreas destruídas estavam recobertas por células endoteliais, das observações, os autores concluíram que a reparação endotelial ocorreu por divisão mitótica e hipertrofia das células remanescentes.

Em 1951, Maurice mostrou que a remoção do epitélio leva a um aumento de 200% na espessura da córnea, a uma velocidade de 0,5% de aumento por minuto, enquanto que a remoção do endotélio leva a um aumento de 500%, a uma velocidade de 2% por minuto (ABIB, 2000).

Sabe-se que a atividade mitótica das células endoteliais humana é mais intensa em indivíduos jovens comparativamente aos idosos (TUFT; COSTER, 1990, LAING, 1984). Hoffer e Phillippi (1978) observaram que o estímulo a partir do qual se inicia a reparação endotelial decorre da perda do contato entre as células.

Durante a fase inicial do processo de reparação, ocorre hipertrofia de células residuais adjacentes, resultando em aumento do seu tamanho e diminuição da densidade endotelial (MISHIMA, 1982). Adjutoramente as alterações associadas à contagem celular ocorre também o declínio do número de células endoteliais com formato hexagonal (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; RAO; LOHMAN; AQUAVELA, 1982; MATSUDA *et al.*, 1985). Após o recobrimento da área lesada, há a reorganização da camada celular que reassume o seu aspecto usual de mosaico endotelial (YEE *et al.*, 1982). Doughman *et al.* (1976) mostraram que pode haver mitose no endotélio de indivíduos com menos de 20 anos de idade. Neste caso, a célula endotelial adquire a forma de fibroblasto até que a membrana de Descemet seja totalmente recoberta. Só então adquire a conformação de célula endotelial. Durante o processo de cicatrização do endotélio, a córnea fica espessada imediatamente acima da área lesada, o que demonstra perda temporária das funções de barreira e bomba do endotélio (ABIB, 2000).

O tempo necessário para a restauração morfofuncional do endotélio corneano é variável. Além das características específicas relacionadas a cada espécie, ele é dependente, principalmente, da extensão e da causa da perda celular (MATSUDA *et al.*, 1985; YEE *et al.*, 1982).

3.3 Morfometria do Endotélio Corneano

Inúmeras técnicas têm sido empregadas com o propósito de se avaliar a morfometria do endotélio da córnea de diferentes espécies, incluindo os métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro* (COLLIN; COLLIN, 1998; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987).

A microscopia especular, desenvolvida por Maurice em 1968, permitiu a avaliação das células endoteliais *in vivo*, sem que elas fossem lesadas. Laing, Sandstrom e Leibowitz (1975), com modificações no microscópio especular, obtiveram, além dos resultados de exames *in vivo*, o registro fotográfico das células endoteliais.

A microscopia especular tem sido amplamente empregada na avaliação pré e pós-operatória do endotélio de indivíduos que passarão ou passaram por procedimentos cirúrgicos no segmento anterior do bulbo do olho (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; DOUGHTY, 1989; DICK *et al.*, 1996). Outrossim, ela vem sendo utilizada na avaliação dos efeitos de fármacos aplicados internamente ao olho e na avaliação de meios de preservação de córneas (DOUGHTY; MULLER; ZAMAN, 2000; ALVES, 2001).

O microscópio especular permitiu ainda, a contagem de células endoteliais em espécies diversas, tais como a canina, a felina, a equina, a leporina, e outras (ANDREW *et al.*, 2001, ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002; GWIN; LERNER; WARREN 1982; MORITA, 1995; MORITA; SHIMOMURA; SAKUMA, 1994; PEIFFER; DEVANZO; COHEN, 1981; STAPLETON; PEIFFER, 1979; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; PIGATTO *et al.*, 2006; FRANZEN *et al.*, 2010).

Não obstante os avanços e a ampla utilização da microscopia especular mostram-se limitações. Ichijima *et al.* (1993) relataram que alguns detalhes da migração celular, após trauma intracamerular, podem ser de difícil visualização ao microscópio especular. Watsky (1995) e Canavagh *et al.* (2000) alertaram sobre a dificuldade na obtenção de boas imagens em córneas que passaram por trauma endotelial recente. Oliveira, Motta e Muccioli (2009) salientaram que a aplicabilidade clínica da microscopia especular em pacientes com uveítes pode ser útil na avaliação endotelial na presença de precipitados ceráticos, entretanto não podemos descartar as limitações em alguns casos em que a reflexão especular se torna impossível.

Com o advento da microscopia confocal tem se conseguido realizar, além da morfometria endotelial, estudos *in vivo* de todas as camadas da córnea com excelente resolução de imagem (CANAVAGH *et al.*, 2000; JALBERT *et al.*, 2003; KLAIS; BÜHREN; KOHNEM, 2003).

Klais, Bühren e Kohnem (2003) ao compararem contagens de células endoteliais em indivíduos da espécie humana à microscopia especular e à confocal concluíram que, relativamente à densidade endotelial as técnicas apresentaram valores equivalentes.

Dentre os métodos de estudo *in vitro* utilizados para análise morfométrica destacam-se a coloração vital e a microscopia eletrônica de varredura. Sperling (1977) descreveu a técnica de coloração vital do endotélio corneano com azul de tripan e vermelho de alizarina. A combinação dos corantes permitiu observar bordas celulares, núcleo das células e áreas com ausência de células endoteliais.

Ruiz, Medrano e Alió (1991), valendo-se também dos corantes vitais e da microscopia óptica na avaliação do endotélio corneano, informaram tratar-se de técnica de fácil execução e baixo custo.

Geroski e Edelhauser (1989) compararam a técnica de coloração vital com a microscopia especular ao analisarem, à morfometria, o endotélio corneano de indivíduos das espécies humana e leporina. Os autores observaram que os corantes suscitavam retração celular em até 14% da área celular, mas que, a despeito da retração tecidual, o percentual de células hexagonais permanecia inalterado. Mesmo com as significativas alterações quanto à contagem celular, o método mantém-se útil para a morfometria endotelial (WERNER *et al.*, 1998; ANDREW *et al.*, 1999; CANALS *et al.*, 1999; EGGELING *et al.*, 2000).

A microscopia eletrônica de varredura tem se mostrado de grande valia para o estudo quanto à toxicidade de drogas intracamerulares (ALP *et al.*, 2000; ALVES, 2001; EGGELING *et al.*, 2000; HOLLEY *et al.*, 2002; KADONOSONO *et al.*, 1998; ARNDT; REESE; KÖSTLIN, 2001) e em investigações da ultra-estrutura do endotélio de diferentes espécies (SVEDBERGH; BILL, 1972; DOUGHTY, 1989; COLLIN; COLLIN, 1998, 2000; CANALS *et al.*, 1999; RODRIGUES, 1999; PIGATTO, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a, 2005b, 2009). Régis Pacheco (1997) empregou a microscopia eletrônica de varredura na avaliação da densidade endotelial de córneas transplantadas.

Reconhece-se que as etapas de preparo de córneas para estudos ultra estruturais induzem a graus variáveis de retração celular. Binder, Akers e Zavala (1979), valendo-se da microscopia eletrônica de varredura, encontraram densidade celular endotelial

significativamente maior quando comparada à microscopia especular. Schutten e Van Horn (1980) determinaram a densidade endotelial da córnea de coelhos antes e após o seu preparo para estudos à microscopia eletrônica de varredura, verificando 29,7% de retração tecidual. Virtanen *et al.* (1984) compararam diferentes soluções fixadoras, empregadas no preparo de córneas de coelhos. Os autores concluíram que o glutaraldeído a 1,25% ou a 2,5% era a solução que suscitava menor retração.

Doughty, Bergmanson e Blocker (1997) relataram não haver diferença significativa quanto à retração celular entre as regiões central e periférica da córnea de coelhos após o seu preparo para estudos à microscopia eletrônica de varredura.

A análise da superfície posterior da córnea, valendo-se da microscopia eletrônica, possibilita a visualização e a quantificação de detalhes da ultra-estrutura endotelial (DOUGHTY, 1998; ANDREW *et al.*, 1999; COLLIN; COLLIN, 1998, 2000; GALLAGHER, 1980; SCHULTZ *et al.*, 1986; SVEDBERGH; BILL, 1972; YAMASAKI; INOUÉ, 2001; PIGATTO, 2004).

A avaliação do endotélio corneal esta embasada principalmente na estimativa da densidade celular, na variação do tamanho (polimegatismo) e da forma (polimorfismo) de suas células, e na presença de estruturas depositadas em sua superfície (DOUGHTY, 1989; ABIB; GUIMARÃES, 2000).

Stapleton e Peiffer (1979), empregando a microscopia especular no estudo do endotélio corneano em cães clinicamente normais, com idades variando entre 1 e 3 anos, encontraram densidade celular média de 2.816 células/mm². Gwin, Lerner e Warren (1982), valendo-se da mesma técnica em cães com idade entre 4 meses e 11 anos registraram valores entre 2.100 e 2500 células/mm². Pigatto *et al.* (2006), utilizando a microscopia especular estudaram vinte olhos de cães com seis anos de idades, machos e fêmeas, e encontraram a densidade média de 2.555 ± 240 células/mm², com uma área celular de 395 ± 36 μm², valor confirmado por Collin e Collin (1998), o qual acharam no seu estudo comparativo do endotélio de vertebrados um valor de 2545 células/mm² ratificado por Yee, Edelhauser e Stern (1987).

Rodrigues (1999), utilizando a microscopia eletrônica de varredura na avaliação do endotélio corneano de cães com diferentes idades, encontrou valores compreendidos entre 3.666 e 17.122 células/mm².

Collin e Collin (2000) ao estudar o endotélio do Blowfish (*Torquigener pleurograma*) valendo-se da microscopia eletrônica de varredura encontraram uma

densidade média de $6.486 \pm 1,194$ células/mm², com uma área celular média de 154 μm^2 .

Pigatto *et al.* (2005a) valendo-se do microscópio eletrônico de varredura na avaliação do endotélio corneano de coelhos com três meses de idade da raça Nova Zelândia Branco, encontraram valor da densidade celular de 5.747 ± 238 células/mm², com a presença de células hexagonais (75%), pentagonais (14%) e heptagonais (11%).

Sobre a densidade de córneas híidas, não se encontraram diferenças significativas entre os olhos direito e esquerdo de um mesmo animal (MORITA; SHIMOMURA; SAKUMA, 1994; MORITA, 1995; RODRIGUES, 1999; ANDREW *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2005a).

Brandão *et al.* (2006) valendo-se do microscópio especular de não-contato avaliaram a densidade celular média de ovinos da raça *Ile de France*, de um ano de idade, obtendo uma densidade de 2726 células/mm².

Pigatto *et al.* (2004) utilizando a microscopia eletrônica de varredura avaliaram vinte e quatro olhos híidos do Jacaré do Pantanal (*Yacare caiman*), de 3 anos de idade, onde encontraram uma densidade celular média de 3.704 ± 324 células/mm², sendo uma área celular média de 270 ± 24 μm^2 , com células hexagonais (78%), tetragonais (2%), pentagonais (13,2%), heptagonais (5,8%) e octagonais (1%) com um coeficiente de variação de 0,22.

Andrew, Willis e Anderson (2002), observaram uma densidade média em lhamas de 2669 células/mm². Já em cavalos (ANDREW *et al.*, 2001), o valor descrito é de 3155 células/mm², enquanto que em cães (GWIN; LERNER; WARREN, 1982) e alpacas (ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002), entre 2300 a 2500 células/mm². Nos humanos adultos (BOVELLE *et al.*, 1999), a média é de 3000 células/mm².

Estudos realizados em indivíduos da espécie humana, comparando os valores da contagem celular em diferentes regiões do endotélio, verificaram que a densidade celular em córneas híidas distribui-se uniformemente nas regiões corneanas superior, central e inferior (BLACKWELL; GRAVENSTEIN; KAUFMAN, 1977; HOFFER, 1979; BAHN *et al.*, 1986). Gwin, Lerner e Warren (1982) e Rodrigues (1999) mostraram não haver diferenças significativas quanto à densidade celular entre regiões central e periférica do endotélio corneano de cães. Por outro lado, Yanni *et al.* (2003) em seu estudo utilizando endotélio da córnea de ratos observaram uma variação na densidade do endotélio da região central para periferia salientando que essa espécie não deveria ser utilizada como modelo experimental para espécie humana devido a não

seguir o mesmo padrão, os valores encontrados foram 2.715 ± 84 e 2.426 ± 199 células/ mm^2 para região central e periférica, respectivamente.

Além das alterações decorrentes da idade, o endotélio corneano pode sofrer diminuição da densidade e variação no formato de suas células por ação de agentes químicos e físicos e por traumas, principalmente os que incidem sobre o segmento anterior do bulbo do globo ocular.

Collin e Collin (1998) apresentaram no seu estudo comparativo o decréscimo da densidade endotelial humana ao longo dos anos de vida, apresentando um valor médio de 4.450 células/ mm^2 aos 3 anos de vida e decrescendo para 2.716 ± 320 células/ mm^2 (40 anos) culminando aos 89 anos com uma densidade média de 2.316 ± 154 células/ mm^2 .

4 ARTIGO: Morfologia e Morfometria das Células do Endotélio Corneal de Ovinos (*Ovis aires*) em Diferentes Faixas Etárias Obtidas pela Microscopia Especular

Este artigo foi escrito obdecendo às normas da *Veterinary Ophthalmology* (*Online ISSN*: 1463-5224) e será vertido para o inglês quando encaminhado para submissão.

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO CORNEAL DE OVINOS (*Ovis aires*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS OBTIDAS PELA MICROSCOPIA ESPECULAR

Luis Felipe D. Corrêa¹, Luciana Albuquerque², Paula S. Hünning³, Luiz Alberto O. Ribeiro⁴, João Antonio T. Pigatto⁴, Fernando Cesar Abib⁵

Dissertação de Mestrado

Autor: Luis Felipe Dutra Corrêa

Orientador: Luiz Alberto Oliveira Ribeiro

Coorientador: João Antonio Tadeu Pigatto

¹ Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Endereço para correspondência: Rua Vicente da Fontoura, 2986, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: +55 51 9861-4786 e 9841-8169. *E-mail* lfdejeep@yahoo.com.br.

² Aluna de Graduação, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Médico Veterinário, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵ Médico Oftalmologista, Prof. Doutor do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da idade sobre a morfologia e morfometria do endotélio da córnea de ovinos. O endotélio corneano foi estudado com auxílio do microscópio especular de contato. Um total de 18 ovelhas (*Ovis aires*) foram avaliados neste estudo. Os animais foram distribuídos em três grupos de 6 animais cada um em função da idade. O grupo I continha animais com idade de 6 meses, o grupo II animais com idade de 2 a 4 anos e o grupo III com animais de 5 a 8 anos. Para a avaliação do endotélio corneal foram levados em consideração a densidade de células endoteliais (DCE), a área celular média, o polimegatismo e o pleomorfismo. Os resultados encontrados revelaram a diminuição na DCE em córneas de ovinos normais com o avanço da idade bem como o aumento da área das células endoteliais e do polimorfismo. O presente trabalho sugere que os parâmetros endoteliais da córnea de ovinos avaliados mudam com o avanço da idade.

Palavras-chave: ovinos, córnea, endotélio, microscopia especular.

ABSTRACT

*The purpose of this study was to investigate the effect of age on endothelial morphology and morphometry in ovine. The corneal endothelium was studied using a contact specular microscope. A total of 18 sheep (*Ovis aires*) were evaluated in this study. The subjects were divided into three groups of six animals each according to age: group I with animals 6 months old, group II with animals from 2 to 4 years old and group III with animals from 5 to 8 years old. To evaluate corneal endothelium it was taken into consideration the examination present data as endothelial cell density (ECD), the average cell area, polymegathism and pleomorphism. The results revealed ECD decrease in corneas of normal sheep with advancing age, as well as a corresponding increase in endothelial cell area and pleomorphism. The present work suggests that the endothelial parameters evaluated in ovine change with advancing age.*

Key words: *sheep, cornea, endothelium, specular microscopy.*

INTRODUÇÃO

O endotélio, originário da migração de células da crista neural, constitui-se na estrutura mais posterior da córnea.⁽¹⁾ As células endoteliais apresentam sua face anterior voltada para a membrana de Descemet, enquanto a posterior limita-se com o humor aquoso.⁽²⁻³⁾

O endotélio corneano é uma monocamada, constituída, em sua maioria, por células hexagonais, ocasionalmente, pentagonais, mas que podem apresentar quatro, sete ou até oito lados.⁽⁴⁻⁷⁾ As alterações nas dimensões das células endoteliais ocorrem com o avançar da idade, medicamentos, produtos químicos ou procedimentos cirúrgicos no segmento anterior.⁽⁸⁻⁹⁾ Além disso, as alterações morfológicas no endotélio da córnea associada com a perda de células podem ocorrer perante várias condições, incluindo uveítes, distrofias corneanas, ceratocone, glaucoma e trauma ocular contuso.^(3,8)

Na maioria das espécies, quando há perda das células endoteliais de determinado local da córnea, as células adjacentes começaram um processo altamente específico onde se ampliam e difundem-se com objetivo de cobrir a lesão a fim de estabelecer a integridade corneana, com esse processo a densidade celular diminuirá.^(7, 9-10) Inúmeras técnicas têm sido empregadas com o propósito de se avaliar a morfometria do endotélio da córnea de diferentes espécies, incluindo os métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro*.⁽¹⁰⁻¹¹⁾ A microscopia especular, atualmente, é a técnica diagnóstica mais utilizada para avaliação qualitativa e quantitativa do endotélio corneal e tem sido amplamente empregada na avaliação pré e pós-operatória do endotélio de indivíduos que passarão ou passaram por procedimentos cirúrgicos no segmento anterior do bulbo do olho.^(4, 12-14) Clinicamente, a microscopia especular tem sido de grande valia para visualizar o padrão e as alterações em diferentes espécies ocasionadas por doenças e por medicamentos, além do registro fotográfico, *in vivo*.⁽¹⁵⁻¹⁹⁾ Entre os principais parâmetros endoteliais analisados, encontram-se a contagem celular e a variação do tamanho (polimegatismo) e da forma de suas células (pleomorfismo).

A estrutura do endotélio corneano tem sido documentada em humanos, cães, gatos, suínos, cavalos, lhamas e alpacas, camelos e outras espécies animais.^(8, 10-11, 15-30)

Entretanto, ao se recorrer à literatura, observa-se que os estudos relativos à morfologia endotelial de ovinos em diferentes faixas etárias são inexistentes, sabendo-se somente de um breve relato.⁽³⁰⁾ No presente trabalho, objetivou-se estudar os

parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea de ovinos (*Ovis aires*) em diferentes faixas etárias, utilizando a microscopia especular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Empregaram-se 18 ovinos (*Ovis aires*), clinicamente sadios, da raça Texel, criados em campo nativo no município de Mostardas/RS, fêmeas, divididos em três grupos com 6 animais cada, designados de acordo com a idade: o G I era composto de seis animais com idade de 6 meses, o G II era composto de 6 animais com idade entre dois e quatro anos e o G III era composto de 6 animais com idade entre 5 a 8 anos. A pesquisa foi conduzida obedecendo-se aos critérios da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

Conduziram-se avaliações clínicas e laboratoriais (hemograma e contagem de plaquetas), previamente à seleção dos animais, como critério de inclusão.

O exame oftálmico incluiu avaliação dos reflexos pupilares, teste da lágrima de Schirmer⁶, biomicroscopia com lâmpada de fenda⁷, tonometria de rebote⁸, prova da fluoresceína⁹ e oftalmoscopia direta¹⁰.

No início do experimento, os animais selecionados foram desverminados com 2ml/10 kg de albendazol¹¹, por via oral.

Os animais foram eutanasiados, conforme recomenda a lei pelo abate humanitário com dardo cativo, os bulbos oculares foram enucleados e mantidos em câmara úmida até o exame de microscopia especular. O exame de microscopia especular foi realizado até seis horas *post mortem*. Após a remoção da câmara úmida (FILATOV), os bulbos oculares foram fixados em um suporte adaptado ao microscópio especular BIO-OPTICS LSM-2100C. Posicionou-se a lente objetiva do microscópio sobre a região central da córnea para o registro fotográfico do endotélio. De cada amostra foram capturadas três imagens nítidas. As imagens foram magnificadas em 200 vezes. De cada imagem foram analisadas pelo menos 100 células endoteliais. Para as análises morfométrica e morfológica utilizou-se o software Bambi Plus 2000[®] e Cells Analyzer[®]. O programa forneceu os dados de densidade endotelial, área celular média,

⁶ Teste da Lágrima de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

⁷ Portable Slit Lamp SL – 15, Kowa Company.

⁸ TonoVet[®] - Tiolat, Finland.

⁹ Fluoresceína strips, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

¹⁰ Welch Allyn[®], WA 11720.

¹¹ Farmazole ovinos 1,9% oral. Fagra S/A, São Paulo, SP.

pleomorfismo e polimegatismo. Todas as medidas e análises foram realizadas pelo mesmo investigador.

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com significância de $p < 0,05$, para comparação das médias dos parâmetros analisados entre os grupos.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade federal do Rio Grande do Sul.

RESULTADOS

As imagens obtidas neste trabalho foram capturadas a partir do microscópio especular. Nenhum dos olhos submetidos à avaliação foram excluídos. A análise especular demonstrou que o endotélio da córnea de ovinos foi contínuo e sem anormalidades detectáveis em todos os olhos examinados. O endotélio corneano de ovinos, à microscopia especular, caracterizou-se por uma monocamada de células poligonais uniformes em tamanho e forma (Fig. 1).

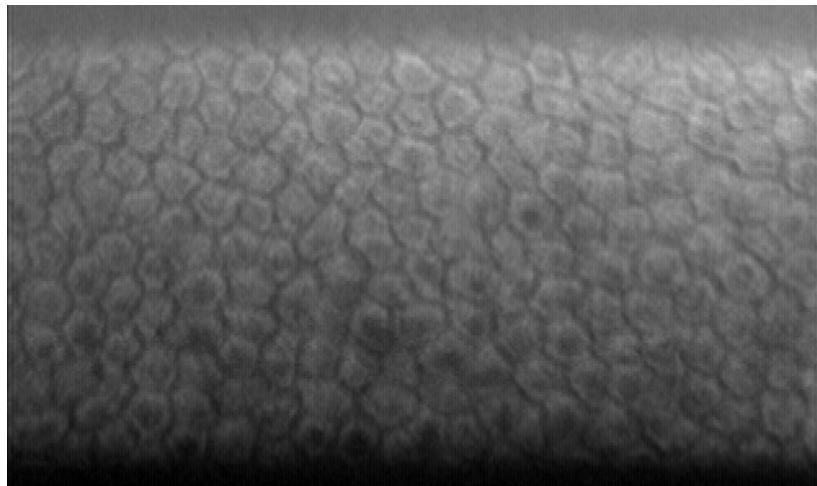


Fig. 1. Imagem de microscopia especular do endotélio da córnea de um ovino com seis meses de idade apresentando uma densidade celular de $3729,17$ células/mm².

A densidade endotelial média para o olho direito de ovinos foi de $2951,56 \pm 623,90$ células/mm², variando de 2197 a 4044 células/mm² para o olho direito e de $2887,50 \pm 586,57$ células/mm² para o olho esquerdo, variando de 2223 a 3951 células/mm² com os respectivos desvios padrões (Tab. 1).

Tab. 1. Valores médios da densidade celular (células/mm²) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010.

Grupos	Densidade endotelial – central	Densidade endotelial – central
	olho direito	olho esquerdo
	Média	Média
I*	3729,17 ± 211,87 ^a	3632,33 ± 206,97 ^a
II*	2648,83 ± 339,00 ^b	2644,50 ± 254,18 ^b
III*	2476,67 ± 239,63 ^b	2385,67 ± 153,58 ^b
Média Geral	2951,56 ± 623,90	2887,50 ± 586,57

*Cada grupo com seis animais (Grupo 1, seis meses de idade; Grupo 2, dois a quatro anos de idade; Grupo 3, cinco a oito anos de idade)

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas (p>0,05)

No grupo I, obteve-se uma densidade endotelial média de 3729,17 ± 211,87 células/mm² para o olho direito, variando de 3527 a 4044 células/mm² e de 3632,33 ± 206,97 células/mm² para o olho esquerdo, variando de 3341 a 3951 células/mm². Assim, os valores para o grupo II, para o olho direito, a densidade endotelial média foi de 2648,83 ± 339,00 células/mm² variando de 2324 a 3132 células/mm² e, para o esquerdo foi de 2644,50 ± 254,18 células/mm², variando de 2273 a 2882 células/mm² (Fig. 2).

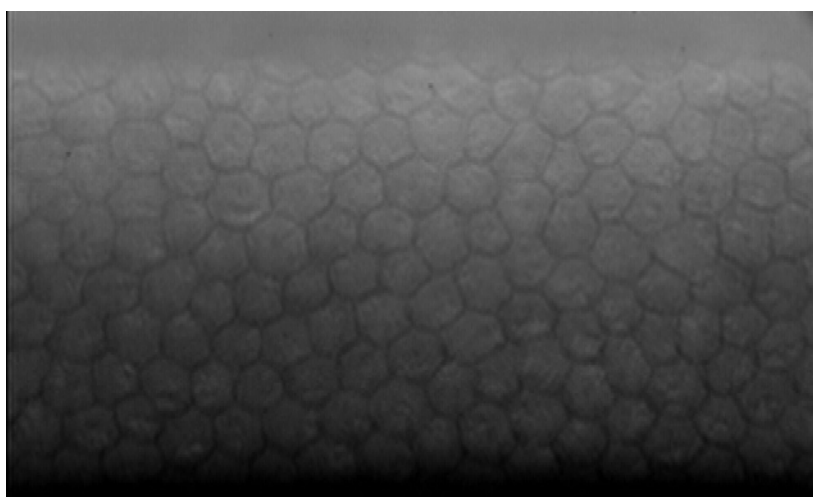


Fig. 2. Imagem de microscopia especular do endotélio da córnea de um ovino com três anos de idade apresentando uma densidade celular de 2644,50 células/mm².

No grupo III, a densidade endotelial média foi de, para o olho direito e esquerdo respectivamente, $2476,67 \pm 239,63$ cells/mm² e $2385,67 \pm 153,58$ células/mm² (Tab. 1), com variações de 2197 a 2922 células/mm² e 2223 a 2676 células/mm², respectivamente, no olho direito e esquerdo (Fig. 3).

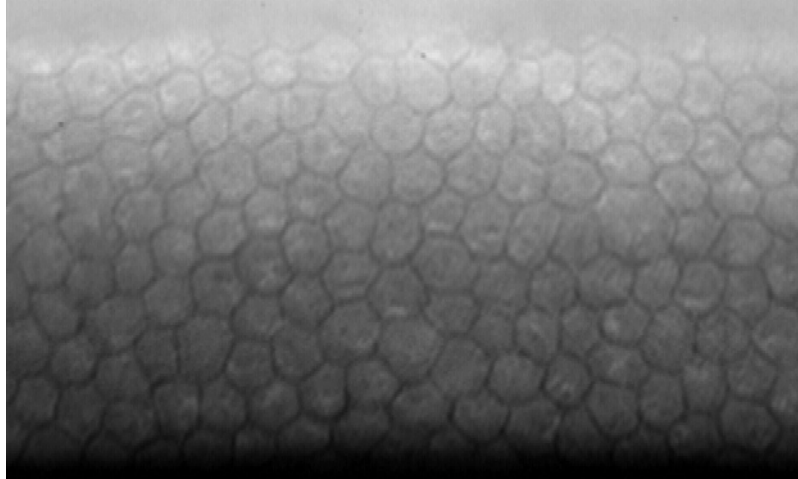


Fig. 3. Imagem de microscopia especular do endotélio da córnea de um ovino com seis anos de idade apresentando uma densidade celular de $2476,67 \pm 239,63$ células/mm².

Houve diferença estatisticamente significativa em relação à média da densidade celular do G I para o G II ($p < 0,001$) quando comparados os mesmos olhos direito e esquerdo com o mesmo valor de p, o mesmo sucedeu-se quando comparamos o G I com o G III, onde encontramos diferença estatisticamente significativa quando comparados os mesmos olhos direito e esquerdo ($p < 0,001$). No entanto, quando comparados os valores do G II com o G III no âmbito da densidade celular notou-se não haver diferença estatisticamente significantes obtendo $p = 0,524$ para comparação entre os olhos direito de ambos os grupos e $p = 0,114$ quando comparados olhos esquerdos entre si. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos o olho direito e esquerdo do G I ($p = 0,233$), G II ($p = 0,972$) e G III ($p = 0,138$).

A área celular média (ACM) para o olho direito foi de $352,78 \pm 70,00$ μm² e de $359,47 \pm 68,20$ μm² para o olho esquerdo, variando de 247,33 a 455,33 μm² para o olho direito e de 253,32 a 450 μm² para o olho esquerdo. A área celular média do grupo I para o olho direito foi de $269,00 \pm 14,87$ μm² para o olho direito, variando de 247,33 a 284 μm² e de $276,11 \pm 15,61$ μm² para o olho esquerdo, variando de 253,32 a 299,33 μm² (Tab. 2). Nota-se que com o avanço da idade, a área celular média tem uma tendência a

aumentar o que sucede com o outro grupo. No grupo II obteve-se uma ACM de $382,50 \pm 45,98 \mu\text{m}^2$ para o olho direito e de $381,24 \pm 38,14 \mu\text{m}^2$ para o olho esquerdo, com as respectivas variações para o olho direito e esquerdo de 319,33 a $430,33 \mu\text{m}^2$ e de 348,68 a $440 \mu\text{m}^2$, respectivamente. No último grupo, tem-se $406,83 \pm 36,57 \mu\text{m}^2$ de ACM para o olho direito e de $421,05 \pm 25,61 \mu\text{m}^2$ para o olho esquerdo (Tab. 2), variando de 342,33 a $455,33 \mu\text{m}^2$ e de 373,67 a $450 \mu\text{m}^2$ para o olho direito e esquerdo, respectivamente. Os valores de significância foram efetivos para o olho direito quando comparamos o G I com o G II ($p < 0,001$) e G I com o G III ($p < 0,001$). Quando analisamos o G II com o G III, observa-se não haver diferença estatisticamente significativa ($p = 0,469$). No olho esquerdo obteve diferença estatisticamente significativa quando comparamos o G I com o G II ($p < 0,001$) e o G I com o G III ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação do G II com o G III ($p = 0,064$). Ao comparar a ACM do mesmo grupo entre os olhos direito e esquerdo não houve diferença estatisticamente significativa, ficando os valores de p para o grupo I, grupo II e grupo III, respectivamente, de $p = 0,239$, $p = 0,944$ e $p = 0,155$.

Tab. 2. Valores médios da área celular (μm^2) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010.

Grupos	Área celular – central olho direito	Área celular – central olho esquerdo
	Média	Média
I*	$269,00 \pm 14,87^a$	$276,11 \pm 15,61^a$
II*	$382,50 \pm 45,98^b$	$381,24 \pm 38,14^b$
III*	$406,83 \pm 36,57^b$	$421,05 \pm 25,61^b$
Média Geral	$352,78 \pm 70,00$	$359,47 \pm 68,20$

* Cada grupo com seis animais (Grupo 1, seis meses de idade; Grupo 2, dois a quatro anos de idade; Grupo 3, cinco a oito anos de idade)

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$)

O coeficiente de variação (CV) médio para o olho direito foi de $0,213 \pm 0,0182$ % e para o olho esquerdo de $0,216 \pm 0,0211$ %, o mesmo teve uma variação de 0,187 a 0,243 % para o olho direito e 0,187 a 0,259 % para o olho esquerdo. O polimegatismo central do grupo I foi de $0,225 \pm 0,0222$ % para o olho direito e de $0,221 \pm 0,0138$ % para o olho esquerdo, variando respectivamente para o olho direito e esquerdo de 0,187

a 0,243 e 0,205 a 0,239 %. No grupo II, o coeficiente de variação para o olho direito foi de $0,204 \pm 0,0138$ % e para o olho contralateral de $0,195 \pm 0,0050$ % (Tab. 3), obtendo uma variação de 0,188 a 0,221 % para o olho direito e de 0,187 a 0,201 % para o olho esquerdo. No grupo III, foi de $0,209 \pm 0,0132$ % e de $0,233 \pm 0,0204$ % para o olho direito e esquerdo, respectivamente. Obteve-se uma variação de 0,187 a 0,226 % para o olho direito e de 0,208 a 0,259 % para o olho esquerdo de polimegatismo. O polimegatismo dos grupos I, II e III em relação ao olho direito não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,130$). No entanto, em relação ao olho esquerdo, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados o G I com o G III ($p=0,351$), mas houve diferença estatisticamente significativa quando comparados o G I com o G II ($p=0,021$) e o G II com o G III ($p<0,001$). Ao se comparar os olhos direito e esquerdo dos grupos I e II não se observou diferença estatisticamente significativa obtendo para os valores de p respectivamente, $p= 0,650$ e $p= 0,190$. No entanto, ao se comparar os olhos direito e esquerdo do grupo III, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,017$).

Tab. 3. Valores médios do coeficiente de variação (%) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010.

Grupos	Coeficiente de variação – central	Coeficiente de variação – central
	olho direito	olho esquerdo
	Média	Média
I [̄]	$0,225 \pm 0,0222^a$	$0,221 \pm 0,0138^a$
II [̄]	$0,204 \pm 0,0138^a$	$0,195 \pm 0,0050^b$
III [̄]	$0,209 \pm 0,0132^{a*}$	$0,233 \pm 0,0204^{a*}$
Média Geral	$0,213 \pm 0,0182$	$0,216 \pm 0,0211$

[̄]Cada grupo com seis animais (Grupo 1, seis meses de idade; Grupo 2, dois a quatro anos de idade; Grupo 3, cinco a oito anos de idade)

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas ($p>0,05$)

* Há diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo do mesmo grupo ($p<0,05$)

A média do pleomorfismo para o olho direito foi de $69,59 \pm 4,25$ % e para o olho esquerdo foi de $68,74 \pm 5,13$ %, variando de 60,9 a 76,4 % para o olho direito e de 59,6 a 78,5 % para o olho esquerdo (Tab. 4). No grupo I obteve-se uma média de $66,37 \pm 4,16$ % para o olho direito e $66,80 \pm 3,86$ % para o olho esquerdo, com uma variação de 60,9 a 73,3 % para o olho direito e de 62,4 a 70,9 % para o olho esquerdo (Tab. 4).

No grupo II, foi encontrada uma média de $70,37 \pm 4,02$ % para o olho direito e $73,33 \pm 3,09$ % para o olho esquerdo. A variação do pleomorfismo para o olho direito ficou de 67 a 74,2 % e de 69,4 a 78,5 % para o olho esquerdo (Tab. 4). No último grupo, obteve-se como média para o pleomorfismo de $72,05 \pm 2,73$ % de células hexagonais para o olho direito diante de $66,10 \pm 5,17$ % para o olho esquerdo, com um intervalo de 68,7 a 76,4 % para o olho direito e de 59,6 a 72,9 % para o olho esquerdo. Quando da análise estatística para o olho direito houve diferença estatística significativa entre os grupos I e III ($p=0,044$). Os grupos I e II ($p=0,180$) e II e III ($p=0,715$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles. No entanto, o olho contralateral não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III ($p=0,954$). O grupo I quando comparado com o grupo II e o grupo II quando comparado com o grupo III houve diferença estatisticamente significantes sendo os valores de p respectivamente $p=0,038$ e $p=0,022$. Na análise dos olhos direito e esquerdo do mesmo grupo não houve diferença estatisticamente significativa no grupo I ($p=0,765$) e no grupo II ($p=0,175$), porém no grupo III diferiu-se significância estatística ($p=0,037$).

Tab. 4. Valores médios do pleomorfismo celular (%) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de ovinos nas diferentes faixas etárias avaliados através da microscopia especular, Mostardas, RS, 2010.

Grupos	Células hexagonais - central olho direito	Células hexagonais - central olho esquerdo
	Média	Média
I [̄]	$66,37 \pm 4,16^a$	$66,80 \pm 3,86^a$
II [̄]	$70,37 \pm 4,02^b$	$73,33 \pm 3,09^{a,b}$
III [̄]	$72,05 \pm 2,73^{a,*}$	$66,10 \pm 5,17^{b,*}$
Média Geral	$69,59 \pm 4,25$	$68,74 \pm 5,13$

[̄]Cada grupo com seis animais (Grupo 1, seis meses de idade; Grupo 2, dois a quatro anos de idade; Grupo 3, cinco a oito anos de idade)

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças significativas ($p<0,05$)

* Há diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo do mesmo grupo ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

O microscópio especular tem sido utilizado para quantificar o tamanho, a forma

e a densidade das células endoteliais em seres humanos e outras espécies incluindo suínos, coelhos, cães, cavalos, lhamas, alpacas, gatos e ovinos, entre outras.^(8, 15, 21-22, 30-32) Ao se recorrer à literatura, estudos anteriores sobre o endotélio corneano de ovinos relatam o uso de animais com um ano de idade⁽³⁰⁾. A escassez de estudos analisando o endotélio da córnea de ovinos aliado à importância do tema, motivou a realização deste estudo.

As características pleomórficas verificadas no endotélio corneano de ovinos mostram ser semelhantes as do homem, gato, cachorro e outros vertebrados, onde temos de 65-80% do endotélio corneano composto de células hexagonais.^(4, 23) Em outras espécies, as características morfológicas e morfométricas são alteradas com o avanço da idade, havendo uma diminuição na densidade de células endoteliais, aumento no tamanho das células e variação da forma.⁽²²⁾ O mesmo foi concluído ao se estudar o endotélio dos ovinos em diferentes faixas etárias. Além disso, verificou-se que o pleomorfismo aumentou com o avançar da idade, o mesmo observado em outros estudos.^(8, 22, 33-34) Um estudo anterior de gatos em diferentes faixas etárias mostrou que pleomorfismo variou de 39% a 74%, aumentando com a idade.⁽⁸⁾ A diminuição da densidade celular e o subsequente aumento na área celular relatados foram atribuídos a um número limitado na capacidade de regeneração do endotélio dos mamíferos.^(4, 18) Neste estudo, observou-se uma alta porcentagem de células hexagonais no endotélio da córnea de ovinos com o avanço da idade, significando que estas células têm como padrão o formato hexagonal, por isso a tendência a manter-se constante. Além disso, a significância observada em relação ao olho esquerdo do G II em relação ao GIII pode ser explicada devido ao CV menor, fato este que significa que o endotélio destes animais sofreram menos danos ou perda pela idade mostrando-se mais íntegros e com maior reserva funcional.

A enucleação dos olhos imediatamente após a eutanásia, mantidos em câmara de Filatov e sua utilização dentro de 6h preservou a sua estrutura endotelial tornando possível a realização da microscopia especular sem interferência na reflexão especular. Essa metodologia de processamento das córneas em até 6 horas já foi adotada em outros estudos e mostrou-se eficaz.^(8, 23, 35) Atualmente, os equipamentos disponíveis para a semiologia endotelial são a lâmpada de fenda, o paquímetro ultra-sônico, o microscópio especular, de contato e não contato, e vem surgindo o microscópio confocal de córnea.^(2, 12, 14, 34, 36) A aplicabilidade da microscopia especular na clínica é vantajosa, porém com limitações quando da presença de alterações corneanas.⁽³⁷⁾ Salienta-se a vantagem e

praticidade da microscopia especular como método de avaliação do endotélio corneal desde que não haja nenhuma alteração que venha de encontro à reflexão especular.^(12, 14) A microscopia tem sido utilizada em outras espécies com resultados satisfatórios,^(8, 15, 21, 31) bem como sua utilização como técnica padrão para avaliar a densidade e a morfologia endotelial das células *in vivo* e *ex vivo*, ainda mais vantajosa se torna com a facilidade de realizar o registro fotográfico.^(9, 14, 16-17, 38) Além da praticidade da técnica, todos os exames referentes à utilização da microscopia especular foram realizados pelo mesmo investigador. No presente estudo, o número de células endoteliais e as análises morfológicas e morfométricas foram documentados na região central da córnea normal de ovinos em diferentes faixas etárias. Pesquisas anteriores demonstraram que, no homem e no coelho, não existem diferenças significativas nas células endoteliais no que tange seus parâmetros na região central e periférica de córneas saudáveis.^(8, 39-41) A microscopia especular pode ser de um microscópio de contato, no qual a frente de lentes objetivas toca a córnea ou um microscópio de não contato, em que há um espaço de ar entre a frente da objetiva e da córnea.^(12, 15) Neste estudo utilizou-se um microscópio de contato que proporciona a observação do endotélio corneano em todo globo permitindo com que somente os olhos saudáveis fossem utilizados na avaliação. Dentre os métodos existentes para quantificar o endotélio da córnea podemos citar: o método de análise do retículo fixo, o método de marcação dos centros celulares e o método de análise do retículo móvel.⁽¹⁴⁾ O método usado para análise da imagem especular foi o método de marcação dos centros celulares. Estudos anteriores salientam que este método de marcação dos centros celulares fornece uma excelente noção dos parâmetros endoteliais, desde que se tenha edição manual da imagem endotelial para evitar erros.⁽¹⁴⁾ No presente trabalho, um mínimo de 100 células bem definidas foram contadas e analisadas. Recomenda-se que pelo menos 50 células sejam contadas por imagem para obter a máxima precisão.⁽¹⁴⁾ Estudos mostram que o erro porcentual foi de 0,1% quando foram contadas 78 células por imagem, sendo que quando o número aumenta para 147 células contadas por imagem o erro baixa para 0,03%.⁽⁴⁰⁾

Os resultados observados neste estudo mostram que o endotélio corneano de ovinos foi caracterizado por uma monocamada de células poligonais uniformes em tamanho e forma, sendo predominantemente hexagonais, na sua maioria.^(22, 42) Na maioria dos vertebrados a forma normal de células endoteliais da córnea é composta, principalmente, de hexagonais e pentagonais.^(10, 39, 41-43) A partir de estudos, onde foi constatada a presença do maior número de células hexagonais no endotélio da córnea da

maioria das espécies, que surge a teoria do mosaico endotelial.⁽¹²⁾ A partir dessa teoria podemos monitorar o endotélio da córnea e suas alterações decorrentes, da idade, de medicamentos e de traumas.

Os resultados do presente estudo, utilizando a microscopia especular, para determinar a densidade celular média nas três faixas de idades, iniciando pelo grupo I, II e III foi de $3.729,17 \pm 211,87$, $2.648,83 \pm 339,00$ e $2476,67 \pm 239,63$ células/mm² para o olho direito e, $3632,33 \pm 206,97$, $2644,50 \pm 254,18$ e $2385,67 \pm 153,58$ células/mm², respectivamente, para o olho esquerdo. Estudo do endotélio da córnea de ovinos foi encontrado valor semelhante quando analisado o endotélio de ovinos de um ano de idade, obtendo $2.697,1 \pm 93,38$ e $2754,8 \pm 77,25$ células/mm², para o olho direito e esquerdo, respectivamente.⁽³¹⁾ Como são inexistentes estudos referentes em diferentes faixas etárias na espécie ovina, concorda-se que o valor encontrado nos estudos vem ao encontro do trabalho realizado, por mostrar um decréscimo com a idade, quando comparado o valor encontrado dentro da faixa etária seguindo a ordem cronológica.⁽³¹⁾ Estudos do endotélio da córnea quantificam uma variação de 1000 a 5000 células/mm² nas espécies de mamíferos.^(2, 22, 34, 41) Condizente com o presente estudo, o declínio da densidade celular do endotélio da córnea com o avanço da idade é também documentado para algumas espécies de mamíferos, incluindo cães, gatos, coelhos e seres humanos.^(7-8, 19, 22, 24, 33, 39) Estudo anterior sobre o endotélio da córnea de humanos salientam que o mesmo diminui gradativamente a uma taxa de 0,5% ao ano com o avanço da idade.⁽¹³⁾ Portanto, o parâmetro densidade endotelial é inversamente proporcional à idade.⁽⁸⁾

Na maioria das espécies documentadas, com o avanço da idade, ocorre perda celular,^(4, 12, 16, 22, 34, 44) que não consegue ser suprida com a baixa capacidade de regeneração das células remanescentes e que, para restabelecer a barreira funcional, se alargam de forma desigual, causando irregularidade de tamanho e na forma, com uma redução da densidade de células endoteliais.^(11, 32, 39) No presente trabalho, quando comparada a área celular média nos três grupos de acordo com a idade observamos o aumento da mesma para restabelecer as possíveis perdas endoteliais ocasionadas com o avanço da idade, doenças e possíveis traumas. Ao comparar a área celular média dos ovinos do grupo II ($382,50 \mu\text{m}^2$), assemelha-se ao mesmo valor achado em estudo anterior ($392,15 \pm 17,13 \mu\text{m}^2$).⁽³¹⁾

O coeficiente de variação médio foi de 0,21% para a espécie ovina. O mesmo

valor foi encontrado quando do estudo morfométrico do endotélio corneano de coelhos.⁽²³⁾ Valor próximo foi achado em 2004, quando do estudo do endotélio do Jacaré do Pantanal.⁽¹⁹⁾ Em 2009, um estudo sobre o endotélio da córnea de avestruz apresentou coeficiente de variação de 0,06 %, salientando que o endotélio da córnea de avestruzes apresenta-se mais homogêneo em relação ao dos ovinos e com uma reserva funcional maior.⁽²⁹⁾ O coeficiente de variação manteve-se constante entre os grupos analisados, com exceção dos olhos esquerdos onde diferiu o GII dos demais, fato este que pode ser explicado pela maior homogeneidade do endotélio da córnea do GII, maior reserva funcional e maior densidade de células hexagonais. No entanto, ao avaliar os demais valores de coeficiente de variação, o endotélio da córnea de ovinos com o avanço da idade segue o mesmo padrão do endotélio de gatos e cães e mantém-se constante ao longo da vida.^(8, 22) Há estudos que vem de encontro ao polimegatismo manter-se constante, salientando que com o passar dos anos há um aumento no mesmo.⁽²⁾ Logo, nesse aspecto, existe a necessidade de haver mais estudos para estabelecer um padrão entre as espécies e salientar quais não mantêm este padrão.

Todos os animais selecionados foram fêmeas, com intuito de padronizar a amostra. No entanto, a literatura diverge em relação à influência do gênero nos parâmetros analisados.^(16, 22, 26, 31, 34) Em um estudo do endotélio de ovinos com um ano de idade observou-se uma menor densidade e maior área celular de fêmeas em relação à machos, porém não foi justificado tal ocorrência.⁽³⁰⁾ Padrão semelhante foi encontrado em um estudo com cavalos, no entanto, há uma disparidade entre as idades dos machos em relação à das fêmeas.⁽¹⁶⁾ Estudos em humanos, cães e suínos observaram que o endotélio da córnea não sofre influência do sexo.^(22, 26, 34)

Quanto aos parâmetros, quando avaliados estatisticamente, não houve diferença estatisticamente significativa observada entre o olho direito e esquerdo do mesmo ovino no G I e G II. No entanto, o G III ao compararem-se os parâmetros coeficiente de variação e pleomorfismo do olho direito com o esquerdo observou-se diferença estatisticamente significativa, fato este que se deve à idade avançada dos animais do grupo, conforme salientado em literatura anterior.⁽¹⁴⁾ Está estabelecido que a densidade de células endoteliais de ambos os olhos saudáveis do mesmo paciente são relativamente constantes.^(7, 16, 25) No entanto, quanto comparados à densidade do endotélio da córnea observou-se haver diferença significativa entre os grupos I e II ($p < 0,001$) e entre o grupos I e III ($p < 0,001$) para ambos os olhos, fato este já explicado em estudos anteriores pelo avanço da idade.^(4, 12, 16, 22, 34, 44) A não significância da

diferença na densidade endotelial do G II para o G III ($p=0,524$), embora haja um decréscimo no número absoluto da densidade, pode ser explicado pela proximidade nas idades dos dois grupos. A área celular média segue o mesmo padrão da densidade, sendo estatisticamente significativo os olhos direito e esquerdo do G I para o G II e do G I para o G III, porém, quando comparamos o olho direito do esquerdo para o mesmo grupo, não há diferença estatisticamente significativa. Os dados obtidos nesse trabalho fornecem subsídios para novos estudos na espécie onde ainda é pouco estudada no que tange a área da oftalmologia. Além disso, fornece subsídios para avaliação das repercussões das doenças oftálmicas sobre o endotélio da córnea de ovinos.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que o endotélio da córnea de ovinos sofre alterações morfométricas e morfológicas com o avanço da idade, ou seja, há uma diminuição na densidade celular e um aumento na área celular e no pleomorfismo com o avanço da idade.

REFERÊNCIAS

- (1) Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ. Origins of avian ocular and periocular tissues. *Experimental Eye Research* 1979; 29(1): 27-43.
- (2) Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Rigueiro MP, Smith RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9(2): 101-107.
- (3) Svedbergh B, Bill A. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmologica* 1972; 50(3): 321-336.
- (4) Dought MJ. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application. *Optometry & Vision Science* 1989; 66(9): 626-642.
- (5) Herrera D. Afecções da córnea. In: *Oftalmologia clínica em animais de companhia*. MedVet, São Paulo, 2008; p. 111-140.
- (6) Pigatto JA, Laus JL, Santos JM, Cerva C, Cunha LS, Ruoppolo V, et al. Corneal endothelium of the Megellanic Penguin (*spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2005; 36(4): 702-705.

- (7) Stapleton S, Peiffer R. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research* 1979; 40(12): 1803-1804.
- (8) Franzen AA, Pigatto JA, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13(4): 222–226.
- (9) Walkow T, Anders N, Klebe S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: relation to preoperative and intraoperative parameters. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2000; 26: 727-732.
- (10) Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry* 1998; 81(6): 245-254.
- (11) Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon HF. Four methods of measuring human corneal endothelial cells from specular photomicrographs. *Archives of Ophthalmology* 1982; 98: 848-855.
- (12) Abib FC. *Microscopia especular de cornea: manual e atlas*. Rio Med Livros, Rio de Janeiro, 2000.
- (13) Dick HB, Kohnen T, Jacobi FK, Jacobi KW. Long-term endothelial cell loss following phacoemulsification through a temporal clear corneal incision. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 1996; 22: 63-71.
- (14) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. *Archives of Ophthalmology* 1979; 97: 1714-1719.
- (15) Abib FC, Barreto JR.J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2001; 27: 1574-1578.
- (16) Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *American Journal of Veterinary Research* 2001; 62(4): 479-482.
- (17) Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llama and alpacas. *American Journal of Veterinary Research* 2002; 63(3): 326-329.
- (18) Petroll WM, Matthew L, Jester JV, Cavanagh HD, Bean J. Organization of junctional proteins in proliferating cat corneal endothelium during wound healing. *Cornea* 2001; 20(1): 73–80.
- (19) Pigatto JAT, Andrade MC, Laus JL, Santos JM, Brooks DE, Guedes PM, *et al.* Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Veterinary Ophthalmology* 2004; 7(3): 205-208.

- (20) Langston DP. Técnicas de exame oftalmológico e testes diagnósticos. *In: Manual de oftalmologia: diagnóstico e tratamento*. 4a edição. Médica e Científica, Rio de Janeiro, 2001; p. 1-42.
- (21) Nishida T. Comparison of confocal biomicroscopy and noncontact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. *Cornea* 2003; 22(6): 512-516.
- (22) Gwin RM, Lerner I, Warren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1982; 22(2): 267-271.
- (23) Pigatto JAT, Abib FC, Pizzeti JC, Laus JL, Santos JM, Barros PSM. Morphometric analysis of the corneal endothelium of rabbits using scanning electron microscopy. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005; 33(1): 41-45.
- (24) Rodrigues GN *Morfologia das células endoteliais de córneas de cães (Canis Familiares - 1758) in diferentes faixas etárias* [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 1999. 67 f.
- (25) Olsen T. Changes in the corneal endothelium after acute anterior uveitis as seen with the specular microscope. *Acta Ophthalmologica* 1980; 58: 250-255.
- (26) Arango LJT, Artoni SMB, Laus JL, Vicenti FAM, Pigatto JA, Abib FC. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural* 2009; 39(1): 117-122.
- (27) Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4: 389-424.
- (28) Ahmed WS, Karcioğlu ZA. Comparative morphology of camel and human corneas. *Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1997; 7(4): 226-232.
- (29) Pigatto JAT, Franzen AA, Pereira FQ, Almeida ACVR, Laus JL, Santos JM, *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural* 2009; 39(3): 926-929.
- (30) Brandão CVS, Ranzani JJT, Rodrigues GN, Marinho LFLP, Peixoto TP, Cremonini DN, *et al.* Espessura e densidade de células endoteliais corneanas em ovinos. *Archives of Veterinary Science* 2006; 11(1): 16-18.
- (31) Vicenti FA, Pigatto JAT, Abib FC, Furlani JM, Pereira GT, Laus JL. Espessura corneana de olhos normais de suínos à microscopia especular. *In: 22o Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*; 2004; Gramado, RS, Brasil. Revista Oficial de Educação Continuada da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2004.
- (32) Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *American Journal of Ophthalmology* 1981; 93(1): 1-29.
- (33) Laing RA, Sandstrom MM, Berrospi AP, Leibowitz H. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Experimental Eye Research* 1976; 2: 587-594.

- (34) Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Archives of Ophthalmology* 1978; 96(11): 2031–2035.
- (35) Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, Abib FC, Bellini LP, Barros PSM, *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2008; 28(9): 427-430.
- (36) Pigatto JAT, Abib FC, Pereira GT, Barros PSM, Freire CD, Laus, JL. Density of corneal endothelium cells in eye of dogs using specular microscopy. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science* 2006; 43(4): 476-480.
- (37) Oliveira F, Motta ACO, Muccioli C. Corneal specular microscopy in infectious and noninfectious uveitis. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2009 [cited 2011 Jan 17]; 72(4): 457-461. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492009000400006>. DOI: 10.1590/S0004-27492009000400006.
- (38) Blackwell WL, Gravenstein N, Kaufman HE. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. *American Journal of Ophthalmology* 1977; 84: 473-476.
- (39) Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *Journal of Veterinary Medicine and Science* 1995; 57(2): 273-277.
- (40) McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea* 2008; 27: 1–16.
- (41) Rao RN, Lohman LE, Aquavella JV. Cell size-shape relationships in corneal endothelial. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1982; 22: 271-274.
- (42) Yee RW, Edelhauser H, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Experience Eye Research* 1987; 44: 703–714.
- (43) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Monitoring for continuing endothelial cell loss with cataract extraction and intraocular lens implantation. *Archives of Ophthalmology* 1975; 93: 143–145.
- (44) Peiffer RL, Devanzo RJ, Cohen KL. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research* 1981; 42: 854–855.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A microscopia especular é um meio de avaliação do endotélio da córnea que é pouco utilizado na rotina oftalmológica veterinária. Este instrumento nos traz grandes vantagens no que se refere à avaliação do endotélio e as suas alterações, sejam elas diretas, por meio de doenças, ou indiretas, sendo alterações em conseqüências de outras doenças ou procedimentos cirúrgicos. Logo a microscopia especular deveria ser mais utilizada no dia a dia da clínica veterinária.

Além disso, espera-se que este trabalho sirva como valores de referência da morfologia e morfometria de ovinos em diferentes faixas etárias a fim de auxiliar futuras avaliações oftálmicas e pesquisas. Novos estudos são esperados a fim de avaliar a influência do sexo sobre o endotélio da córnea da espécie ovina.

REFERÊNCIAS

ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea**: manual e atlas. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000.

ABIB, F. C.; BARRETO JÚNIOR, J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, NY, v. 27, n. 10, p. 1574-1578, 2001.

ABIB, F. C.; GUIMARÃES, M. R. Princípios, técnicas e dados semiológicos da microscopia especular de córnea. *In*: ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea**: manual e atlas. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000. cap.3, p. 19-24.

AHMED, W. S.; KARCIOGLU, Z. A. Comparative morphology of camel and human. corneas. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, Gainesville, FL, v. 7, n. 4, p. 226-232, 1997.

ALP, B. N. *et al.* The effect of povidine on the corneal endothelium. **Cornea**, Hagerstown, MD, v. 19, n. 4, p. 546-550, 2000.

ALVES, E. A. F. **Efeito da lidocaína a 1% sem preservativo sobre o endotélio corneano de coelhos**: estudo comparativo pelas microscopias especular e eletrônica de varredura. 2001. 129 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ANDREW, S. E.; WILLIS, A. M.; ANDERSON, D. E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, IL, v. 63, n. 3, p. 326-329, 2002.

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

ANDREW, S. E. *et al.* Density of corneal endothelium cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, IL, v. 62, p. 479-482, 2001.

ARNDT, C.; REESE, S.; KÖSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, Oxford, UK, v. 4, p. 175-182, 2001.

BAHN, C. F. *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, MA, v. 27, p. 44-51, 1986.

BAROODY, R. A. *et al.* Ocular development of aging I. Corneal endothelial changes in cats and in free-ranging and caged rhesus monkeys. **Experimental Eye Research**, London, v. 45, p. 607-622, 1987.

BEFANIS, P. J.; PEIFFER, R. L.; BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, IL, v. 42, n. 4, p. 590-595, 1981.

BINDER, P. S.; AKERS, P.; ZAVALA, E.Y. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. **Ophthalmology**, Rochester, MN, v. 86, n. 10, p. 1831-1847, 1979.

BINDER, R. F.; BINDER, H. F. Regenerative process in the endothelium of the cornea. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, v. 57, p. 11-13, 1957.

BLACKWELL, W. L.; GRAVENSTEIN, N.; KAUFMAN, H. E. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. **American Journal of Ophthalmology**, New York, NY, v. 84, p. 473-476, 1977.

BLOOGG, J. R. The eye in veterinary practice. *In*: BLOOGG, J. R. **Diseases of the cornea**. Canada: W.B. Saunders, 1990. p. 374-425.

BOTEON, J. E. Histologia do Endotélio Corneano. *In*: ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**, Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000. cap. 2, p. 7-17.

BOURNE, W. M. *et al.* Long-term observation on morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, MA, v. 35, n. 3, p. 891-899, 1994.

BOVELLE, R. *et al.* Corneal thickness measurements with the Topcon SP-2000P specular microscope and an ultrasound pachymeter. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, v. 117, p. 868-870, 1999.

BRANDÃO, C. V. S. *et al.* Espessura e densidade de células endoteliais corneanas em ovinos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 16-18, 2006.

CANALS, M. *et al.* Morphological study of cryopreserved human corneal endothelium. **Cells Tissues Organs**, New York, NY, v. 164, p. 37-45, 1999.

CANAVAGH, H. D. *et al.* Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy. **Cornea**, Hagerstown, MD, v. 19, n. 5, p. 712-722, 2000.

COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, Carlton, Victoria, Australia, v. 81, n. 6, p. 245-254, 1998.

COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. The corneal endothelium in the blowfish (*Torquigener pleurogramma*). **Cornea**, Hagerstown, MD, v. 19, n. 2, p. 231-235, 2000.

DICK, H. B. *et al.* Long-term endothelial cell loss following phacoemulsification through a temporal clear corneal incision. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, NY, v. 22, p. 63-71, 1996.

DOUGHMAN, D. J. *et al.* Human corneal endothelium layer repair during organ culture. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, 94:1791, 1976.

DOUGHTY, M. J. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium *ex vivo*. **Tissue & Cell**, Essex, GB, v. 30, n. 6, p. 634-643, 1998.

DOUGHTY, M. J. The cornea and corneal endothelium in the aged rabbit. **Optometry & Vision Science**. Hagerstown, MD, v. 71, n. 12, p. 809-818, 1994.

DOUGHTY, M. J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: A review of techniques and their application. **Optometry & Vision Science**. Hagerstown, MD, v. 66, n. 9, p. 626-642, 1989.

DOUGHTY, M. J.; BERGMANSON, J. P. G.; BLOCKER, Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. **Tissue & Cell**, Essex, GB, v. 9, n. 5, p. 533-547, 1997.

DOUGHTY, M. J.; MÜLLER, A.; ZAMAN, M. L. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. **Cornea**, Hagerstown, MD, v. 19, n. 2, p. 148-158, 2000.

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

FITCH, K. L.; NADAKAVUKAREN, M. J.; RICHARDS, A. Age-related changes in the corneal endothelium in the rat. **Experimental Gerontology**, Tarrytown, NY, v. 17, n. 3, p. 179-183, 1982.

FRANZEN, A. A. *et al.* Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, Oxford, UK, v. 13, n. 4, p. 222-226, 2010.

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

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

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

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

HERRERA, D. Afecções da córnea. *In*: HERRERA, D. **Oftalmologia clínica em animais de companhia**. São Paulo: MedVet, 2008. cap. 7, p. 111-140.

HOFFER, K. J. Corneal decompensation after endothelium cell count. **American Journal of Ophthalmology**, New York, NY, v. 87, p. 252-253, 1979.

HOFFER, K. J.; PHILLIPI, G. W. A cell membrane theory of endothelial repair and vertical cell loss after cataract surgery. **American Intra-Ocular Implant Society Journal**, Santa Monica, CA, v. 4, p. 18-22, 1978.

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

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

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

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURES. **Nomina anatomica veterinaria**. Ithaca: Association on World Veterinary Anatomists, 1994. p. 153.

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

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

KADONOSONO, K. *et al.* Effect of intracameral anesthesia on the corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, New York, NY, v. 24, n. 10, p. 1377-1381, 1998.

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

LAING, R. A.; SANDSTROM, M. M.; LEIBOWITZ, H. M. Clinical specular microscopy I: optical principles. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, v. 97, p. 1714-1749, 1979.

LAING, R. A.; SANDSTROM, M. M.; LEIBOWITZ, H. M. *In vivo* photomicrography of the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, v. 93, p. 143-145, 1975.

LAING, R. A. *et al.* Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea II. Clinical observations. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, v. 101, p. 1712-1715, 1983.

LAING, R. A. *et al.* Evidence of mitosis in the adult corneal endothelium. **Ophthalmology**, Rochester, MN, v. 91, p. 1129-1134, 1984.

LANDSMANN, N.; SOLOMON, A.; BELKIN, M. Cells division in the healing of the corneal endothelium of cats. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, v. 107, p. 1804-1808, 1989.

LANDSMANN, N. *et al.* Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, MA, v. 29, n. 7, p. 1100-1109, 1988.

LANGSTON, D. P. Técnicas de exame oftalmológico e testes diagnósticos. *In*: LANGSTON, D. P. **Manual de oftalmologia**: diagnóstico e tratamento. 4. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001. p. 1-42.

MAGRANE, W. G. Canine ophthalmology. *In*: MAGRANE, W. G. **Diseases and surgery of the cornea and sclera**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. p. 107-162.

MATSUDA, M. *et al.* Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, MA, v. 26, p. 443-449, 1985.

MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. **American Journal of Ophthalmology**, New York, NY, v. 93, n. 1, p. 1-29, 1982.

MORITA, H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 273-277, 1995.

MORITA, H.; SHIMOMURA, K.; SAKUMA, Y. Specular microscopy of corneal endothelial cells in cynomolgus monkeys. **Journal Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 56, n. 4, p. 763-764, 1994.

MÜLLER, A.; DOUGHTY, M. J.; WRIGHT, L. Reassessment of the corneal endothelial cell organisation in children. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 84, n. 7, p. 692-696, 2000.

MURPHY, C.; ALVARADO, J.; JUSTER, R. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, MA, v. 25, p. 312-322, 1984.

NASSARALLA, B. A. Fisiologia do endotélio corneano. *In*: ABIB, F.C. **Microscopia especular de córnea**: manual e atlas. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000. cap. 2, p. 7-17.

NISHIDA, T. Comparison of confocal biomicroscopy and noncontact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. **Cornea**, Hagerstown, MD, v. 22, n. 6, p. 512-516, 2003.

OLIVEIRA, F.; MOTTA, A. C. O.; MUCCIOLI, C. Corneal specular microscopy in infectious and noninfectious uveitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 457-461, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492009000400006>. Acesso em: 17 jan. 2011. DOI: 10.1590/S0004-27492009000400006.

OLSEN, E. G.; DAVANGER, M. The healing of rabbit corneal endothelium. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 62, n. 6, p. 796-807, 1984.

PEIFFER, R. L.; DEVANZO, R. J.; COHEN, K. L. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, IL, v. 42, n. 5, p. 854-856, 1981.

PIGATTO, J. A. T. **Extração extracapsular do cristalino, comparativamente à facoemulsificação, com enfoque nas repercussões endoteliais corneanas em case (Canis familiaris ? Linnaeus, 1758)**. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) ? Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 41-45, 2005a.

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

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Density of corneal endothelium cells in eye of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 476-480, 2006.

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare Cayman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, Oxford, UK, v. 7, n. 3, p. 205-208, 2004.

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Pleomorphism and polymegathism of normal corneal endothelial cells in dogs. *In*: MEETING OF INTERNATIONAL SOCIETY OF VETERINARY OPHTHALMOLOGY, Cambridge, 2003. p. 126.

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 926-929, 2009.

PILLAI, C. T. *et al.* Evaluation of corneal endothelium and keratic precipitates by specular microscopy in anterior uveitis. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 84, n. 12, p. 1367-1371, 2000.

PIPPI, N. L.; GONÇALVES, G. F. Anatomofisiologia ocular. *In*: LAUS, J.L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p.1-10.

RAO, R. N.; LOHMAN, L. E.; AQUAVELA, J. V. Cell size-shape relationships in corneal endothelial. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, MA, v. 22, p. 271-274, 1982.

RÉGIS-PACHECO, L. F. **Endotélio corneano**: microscopia eletrônica de varredura no transplante de córnea. 1997. 93 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.

RODRIGUES, G. N. **Morfologia das células endoteliais de córneas de case (Canis familiar – LINNAEUS, 1758) em diferentes faixas etárias**. 1999. 67 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

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

RUIZ, J. M.; MEDRANO, M.; ALIÓ, J. L. Na improved method of vital staining of corneal endothelium. **Ophthalmic Research**, Basel, v. 23, n. 1, p. 27-30, 1991.

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

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

SEVERIN, G. A. Manual de oftalmologia veterinária. *In*: SEVERIN, G. A. **Córnea**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1991. p. 113-143.

SLATTER, D. Córnea e esclera. *In*: SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p. 283-338.

SLATTER, D. Fundamentos de oftalmologia veterinária. *In*: SLATTER, D. **Córnea y esclerótica**. 2. ed. Buenos Aires: Intermedica, 1992. p. 301-356.

SPEEDWELL, L. *et al.* The infant corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, IL, v. 106, p. 771-777, 1988.

SPERLING, S. Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypane blue. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 55, n. 15, p. 573-580, 1977.

STADES, F. C. *et al.* Córnea e esclera. *In*: STADES, F. C. *et al.* **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. p. 107-127.

STAPLETON, S.; PEIFFER, R. L. Specular microscopic observations of clinically normal canine endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, IL, v. 40, n. 12, p. 1803-1804, 1979.

SVEDBERGH, B.; BILL, A. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 50, n. 3. p. 321-335, 1972.

TREFFERS, W. F. Human corneal endothelium wound repair. In vitro and in vivo. **Ophthalmology**, Rochester, MN, v. 89, n. 6, p. 605-610, 1982.

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

VESTRE, W. A. Cirurgia da córnea. *In*: BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgias de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1996. p. 91-95.

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

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

WATSKY, M. A. Nonselective cation channel activation during wound healing in the corneal endothelium. **American Journal of Physiology**, Bethesda, MD, v. 268, n. 5, p. C1179-C1185, 1995.

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

WHITLEY, R. D. Canine cornea. *In*: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 307-356.

YAMASAKI, K.; INOUÉ, T. Ultrastructural changes in the rat corneal endothelium preserved at low temperature. **Yonago Acta Medica**, Yonago, v. 44, p. 17-24, 2001.

YANNI, S. *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in the rat and mouse. *In*: SURE 2003: web posters from SURE 2003. **Science NET**. Atlanta, GA: Emory College Center for Science Education, 2003. Disponível em: <http://www.cse.emory.edu/sciencenet/undergrad/SURE/Posters/2003_yanni.html>. Acesso em: 12 dez. 2010

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

YEE, R. W. *et al.* Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. **Current Eye Research**, London, v. 4, p. 671-678, 1982.

ZAUBERMAN, H.; SACHS, U. The endothelium in clear and progressive edematous corneal transplants. **American Journal of Ophthalmology**, New York, NY, v. 71, p. 495-499, 1971.