

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS  
EXPOSIÇÃO AO CORANTE AZUL BRILHANTE 0,05% - ESTUDO *IN VITRO***

**MARIA CRISTINA CALDART DE ANDRADE**

**PORTO ALEGRE**

**2016**

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS  
EXPOSIÇÃO AO CORANTE AZUL BRILHANTE 0,05% - ESTUDO *IN VITRO*

EVALUATION OF EQUINE CORNEAL ENDOTHELIUM AFTER  
EXPOSURE TO 0,05% BRILLIANT BLUE - AN *IN VITRO* STUDY

Autora: Maria Cristina Caldart de Andrade

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção de grau de Doutor em Medicina  
Animal – Equinos.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu  
Pigatto

PORTO ALEGRE

2016

### CIP - Catalogação na Publicação

CALDART DE ANDRADE, MARIA CRISTINA  
AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS  
EXPOSIÇÃO AO CORANTE AZUL BRILHANTE 0,05% - ESTUDO  
IN VITRO / MARIA CRISTINA CALDART DE ANDRADE. --  
2016.  
46 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Oftalmologia veterinária. 2. Endotélio da córnea. 3. Azul brilhante. 4. Capsulotomia. 5. Facoemulsificação. I. Tadeu Pigatto, João Antonio , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Maria Cristina Caldart de Andrade

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO CORNEANO DE EQUINOS APÓS  
EXPOSIÇÃO AO CORANTE AZUL BRILHANTE 0,05% - ESTUDO *IN VITRO*

Aprovada em:

Aprovada por:

---

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

---

Prof. Dr. Ney Luis Pippi  
Membro da banca

---

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

---

Prof. Dr. André Silva Caríssimi  
Membro da banca

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida.

Agradeço aos meus pais, Elenita e Belmar, pelo apoio incondicional, sempre e em intensidade e tamanho estratosféricos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Pigatto, pela oportunidade que mudou o rumo da minha vida profissional. Jamais conseguirei retribuir a altura, mas serei grata sempre.

Aos colegas de doutorado (Lu), mestrado (Tati e Edu) e estagiárias do Serviço de Oftalmologia Veterinária: Sozinhos vamos mais rápido, mas juntos vamos mais longe! Obrigada pela companhia.

Cláudia, Vanessa, Tati e Marcele, nossas viagens a São Gabriel foram memoráveis!

Paula e Fabi, obrigada pela parceria e ensinamentos! Vocês são exemplos de profissionalismo.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A UFRGS e PPGMAE, pela oportunidade de estudar e fazer pesquisa em uma Instituição com padrão de excelência.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias - UFRGS e seus funcionários, pela oportunidade de atender centenas de pacientes, crescer pessoal e profissionalmente.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em contribuir com nosso trabalho e futura (breve!) publicação.

Ao Frigorífico Foresta, por prestar um serviço sem igual à pesquisa nacional disponibilizando sua estrutura. Obrigada pela recepção acolhedora a nossa equipe.

## RESUMO

Os corantes vitais têm sido utilizados em diversas áreas da oftalmologia para melhorar a visibilização de diferentes tecidos. Com o objetivo de avaliar os efeitos imediatos do corante Azul brilhante a 0,05% no endotélio da córnea de equinos, foram utilizadas 38 córneas de 19 cavalos, machos ou fêmeas, de diferentes idades e provenientes de abatedouro comercial licenciado. As córneas foram aleatoriamente divididas em dois grupos. Grupo 1: o endotélio da córnea foi exposto a solução salina balanceada por 60 segundos. Grupo 2: o endotélio da córnea foi exposto ao corante Azul brilhante 0,05% (Opht-Blue, Ophthalmos, São Paulo, Brazil) por 60 segundos seguido por lavagem com solução salina balanceada (BSS, Ophthalmos, São Paulo, Brazil). As córneas então foram excisadas com trépano de 8mm e preparadas para avaliação com microscopia óptica (24 córneas) e microscopia eletrônica de varredura (14 córneas). As áreas de dano endotelial foram mensuradas. Devido ao aparecimento de resíduos não normais na utilização de comparação de médias via ANOVA, optou-se pelo modelo linear generalizado e, com 5% de significância, o teste Qui-quadrado demonstrou que o fator tratamento não difere do controle. Conclui-se que o corante Azul brilhante em concentração de 0,05% não provocou danos ao endotélio da córnea de equinos.

**Palavras-chave:** Azul brilhante, corantes vitais, endotélio da córnea, equinos.

## ABSTRACT

*Vital dyes have been used in many areas of ophthalmology for improving visualization of different tissues. With the objective of evaluating the immediate effects of 0,05% brilliant blue on corneal endothelium of horses, 38 corneas of 19 horses, both male and female of different ages obtained from a licensed Brazilian commercial slaughterhouse were studied. Corneas were randomly divided into two groups. In group 1, corneal endothelium was perfused with BSS for 60 seconds. In group 2, corneal endothelium was perfused with 0.3 mL of brilliant blue 0.05% (Opht-Blue, Ophthalmos, São Paulo, Brazil) for 60 seconds followed by rinsing with a balanced salt solution (BSS, Ophthalmos, São Paulo, Brazil). The corneas were, subsequently, excised with an 8mm trephine and prepared to analyze posterior endothelial surface using a light microscope (24 corneas) and a scanning electron microscope (14 corneas). Due to non-normal residuals at ANOVA mean comparison, a generalized linear model was utilized at 5% level of significance. Qui-square test stated that treatment and control group were not different statistically. The 0.05 % brilliant blue did not damage equine corneal endothelium.*

**Key words:** *brilliant blue, vital dye, corneal endothelium, equine*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Catarata em equinos.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Facoemulsificação.....</b>	<b>11</b>
2.2.1	A capsulotomia curvilínea contínua.....	12
<b>2.3</b>	<b>O uso de corantes vitais em oftalmologia.....</b>	<b>13</b>
2.3.1	Os corantes vitais e a cirurgia de catarata.....	14
<b>2.4</b>	<b>Azul brilhante.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5</b>	<b>Endotélio da córnea.....</b>	<b>16</b>
2.5.1	Métodos de avaliação do endotélio da córnea.....	19
2.5.1.1	Microscopia especular.....	19
2.5.1.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	20
2.5.1.3	Microscopia óptica com coloração vital.....	21
<b>3</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>23</b>
	<b>Evaluation of equine corneal endothelium after exposure to brilliant blue 0,05% - an <i>in vitro</i> study.....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura, o Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial. Somados aos muares e aos asininos são oito milhões de animais, movimentando R\$ 7,3 bilhões, somente com a produção de cavalos. O setor é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. Neste contexto, o esporte equestre figura entre as principais atividades do cavalo. Estima-se que cerca de 50 mil atletas praticam esportes hípicas no Brasil, nas suas diversas modalidades (LIMA, SHIROTA; BARROS, 2006). Além disso, a valorização dos cavalos como indivíduos, por suas características genotípicas e fenotípicas, tem aumentado o interesse por tratamentos médicos especializados, independente do custo ou complexidade.

A partir deste panorama, as especialidades veterinárias têm ganhado força, por propiciarem um profundo conhecimento das afecções dos sistemas orgânicos, dos métodos diagnósticos e tratamentos específicos. No âmbito da oftalmologia equina, segundo Gilger, 2010, nos últimos anos os oftalmologistas veterinários, clínicos de equinos e as Associações como a *American Association of Equine Practitioners* (AAEP) reconheceram a importância da Oftalmologia equina pelo aumento do número de resumos publicados em encontros científicos, pela publicação de edições especiais em periódicos científicos e pelo número crescente de simpósios na área (GILGER, 2010).

Comparativamente à espécie canina as afecções lenticulares em equinos são menos diagnosticadas. Quando presentes são significativas podendo levar a perda da visão. Além disso, o equino com perda visual pode ter seu desempenho esportivo consideravelmente limitado e suas atividades de pastejo dificultadas. A afecção de lente mais comum é a catarata, que é a opacificação do cristalino e/ou de sua cápsula. A catarata pode ter origem congênita ou adquirida. Estima-se que 5 a 7% dos cavalos apresentem cataratas, que podem ser incipientes ou afetarem significativamente a visão (GILGER, 2010).

As técnicas descritas para a remoção da catarata em equinos são a intracapsular e as extracapsulares manual ou utilizando o facoemulsificador, sendo a última a mais frequentemente descrita nesta espécie (MILLICHAMP; DZIEZYC, 2000). Este procedimento é realizado por uma incisão de 3,2 mm na córnea onde são inseridas ponteiras que realizam a fragmentação, emulsificação e aspiração do cristalino (BROOKS, 2005).

Para acessar a lente com catarata, primeiramente é necessário abrir uma janela na cápsula anterior do cristalino. Esta etapa é chamada de capsulotomia curvilínea contínua e é considerada uma etapa importante da facoemulsificação. Os corantes vitais têm sido utilizados para aprimorar esta etapa com o objetivo de melhorar o contraste entre a cápsula anterior da lente e o córtex. Os corantes também servem para visualizar o limite da capsulotomia em diversos casos de opacidades corneanas e auxiliam a visualização da cápsula no momento do implante da lente intraocular. A indocianina verde e o Azul de tripano têm sido usados para facoemulsificação em humanos (CHANG, TSENG; TSENG, 2005), e mais recentemente o Azul brilhante (HISATOMI *et al.*, 2006).

O Azul brilhante é um corante utilizado em estudos biológicos com proteínas, pois se liga inespecificamente a elas. Também é usado em gel de eletroforese, mas sua ação farmacológica permanece desconhecida. Seu uso médico não fornece indícios de toxicidade e seu uso oftálmico (capacidade de coloração da cápsula anterior do cristalino e biocompatibilidade) foi primeiramente testado em olhos de suínos e ratos em 2006 (HISATOMI *et al.*, 2006). Nesta ocasião, os resultados demonstraram que o Azul brilhante tem maior capacidade de coloração quando comparado ao Azul de tripano e a indocianina verde, mesmo em menor concentração (0,025%) e produz um melhor contraste entre a cápsula anterior e o córtex da lente. Além disso, observou-se, à microscopia eletrônica de varredura, que o Azul brilhante tem toxicidade endotelial inferior ao Azul de tripano e à indocianina verde, mesmo quando utilizado em concentrações acima da recomendada (1%) (HISATOMI *et al.*, 2006).

A complicação mais frequente da facoemulsificação em equinos é o edema de córnea sendo responsável por 56% das complicações cirúrgicas deste procedimento (MILLICHAMP; DZYEZIC, 2000). 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. Das camadas que compõem a córnea o endotélio contribui sobremaneira para a manutenção da transparência e espessura corneana (TUFT; COSTER, 1990).

O endotélio corneano é uma monocamada de células, achatadas, poligonais interligadas, constituindo a superfície posterior da córnea (SLATTER, 2005). Essa camada pode sofrer alterações decorrentes da idade (LAING *et al.*, 1976; RODRIGUES *et al.*, 2006), de agentes químicos e físicos e de procedimentos cirúrgicos, principalmente os relacionados ao segmento anterior do bulbo do olho (MISHIMA, 1982; WARING *et al.*, 1982; PRASAD, 1998; WALKOW, ANDERS; KLEBE, 2000). O edema de córnea

ocorre por descompensação do endotélio corneano, cuja função é regular a entrada de fluido na córnea a fim de manter seu estado de deturgescência e consequente transparência. A entrada de fluido na córnea se acumula entre as fibras do estroma provocando a perda da transparência (SLATTER, 2005).

Várias técnicas têm sido empregadas com o objetivo de se avaliar a morfometria do endotélio corneano, incluindo os métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro*. 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 (1979), com modificações no microscópio especular, obtiveram, além dos resultados de exames *in vivo*, o registro fotográfico das células endoteliais (LAING, SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979).

A microscopia especular tem sido amplamente utilizada na avaliação do endotélio corneano em espécies diversas, tais como a humana, a canina, a leporina, a suína entre outras (GWIN *et al.*, 1982; COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; ANDREW *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2009; YEE, EDELHAUSER; STERN, 1987). O microscópio especular permite análise endotelial nos períodos pré e pós-operatórios da remoção da catarata (LEAMING, 1996; DÍAZ-VALLE, *et al.*, 1998; ABIB, 2000). No entanto, as opacidades corneanas limitam seu uso.

Avaliações *post mortem* de lesões endoteliais e toxicidade a diferentes substâncias têm sido realizadas por microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura (EGGELING *et al.*, 2000; HISATOMI *et al.*, 2006; LANDRY *et al.*, 2011; TRIVEDI *et al.*, 2003).

De acordo com a literatura revisada, não foram encontrados estudos avaliando as repercussões do corante Azul brilhante no endotélio da córnea de equinos. Existem poucos relatos do uso de corantes vitais para capsulotomia curvilínea contínua em equinos (BROOKS, 2005). Levando em consideração que a principal complicação da facoemulsificação em equinos é o edema de córnea pela descompensação endotelial pós-operatória, o estudo aprofundado dos efeitos de qualquer substância introduzida na câmara anterior é de grande importância.

O objetivo deste estudo foi avaliar as repercussões imediatas do corante Azul brilhante 0,05% no endotélio da córnea de equinos (*Equus caballus*) utilizando a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia óptica com coloração vital de Alizarina vermelha e Azul de tripano.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Catarata em equinos

O termo catarata compreende um grupo de afecções oculares manifestadas através da perda da transparência da lente ou de sua cápsula. As opacidades podem variar de tamanho, forma, localização, etiologia, idade de aparecimento e progressão (SLATTER, 2005).

A catarata pode ter origem congênita ou adquirida em equinos. Cataratas adquiridas são comumente encontradas após inflamações do segmento anterior ou posterior do bulbo ocular, após descolamentos de retina, glaucoma, traumas ou neoplasias (MATTHEWS, 2000). Cavalos com cataratas secundárias a uveíte recorrente equina são bons candidatos a facoemulsificação, no entanto, estão mais predispostos a ter episódios de hipertensão pós-operatória e, até mesmo, glaucoma (McMULLEN; UTTER, 2010). Cataratas congênitas são encontradas em casos de microftalmia e disgenesia de segmento anterior. A maioria destas opacidades não progride ou progride muito lentamente. A herdabilidade destas cataratas não foi amplamente estudada, mas tem sido relatada ocorrência esporádica em algumas linhagens de cavalos (MATTHEWS, 2000).

Estima-se que 5 a 7% dos cavalos apresentem cataratas, desde opacidades incipientes até cataratas que afetem significativamente a visão (GILGER, 2010; MATTHEWS, 2000). A diminuição da acuidade visual pode ser danosa para o cavalo, tanto no âmbito esportivo como em atividades de pastejo. Por este motivo, muitos relatos de cirurgias de cataratas têm sido descritos em equinos (MILLICHAMP; DZIEZYC, 2000; BROOKS, 2005; McMULLEN; UTTER, 2010; TOWNSEND, JACOBI; BARTOE, 2012).

As técnicas para remoção da catarata descritas em cavalos incluem as extracapsulares e a intracapsular. A mais comumente descrita em literatura é a técnica extracapsular com facoemulsificação (MILLICHAMP; DZIEZYC, 2000; BROOKS, 2005; FIFE *et al.*, 2006; McMULLEN; UTTER, 2010; TOWNSEND, JACOBI; BARTOE, 2012).

## 2.2 Facoemulsificação

Levando-se em consideração a importância da acuidade visual de um cavalo atleta, nas diferentes modalidades esportivas, a facoemulsificação com implante de lente intraocular constitui-se em uma das mais avançadas e eficazes estratégias de retorno visual para animais com catarata (MCMULLEN; UTTER, 2010).

A técnica cirúrgica de escolha para a remoção da catarata em equinos é a facoemulsificação (BROOKS, 2005; MCMULLEN; UTTER, 2010; TOWNSEND, JACOBI; BARTOE, 2012). Esta consiste na fragmentação ultrassônica do cristalino, que é aspirado do bulbo do olho através de uma incisão corneana mínima (PIGATTO, *et al.*, 2007). As vantagens incluem a manutenção da pressão intraocular intra-operatória, pouca manipulação das estruturas internas ao bulbo ocular, menor índice de contaminação, menor ocorrência de inflamação intraocular pós-operatória, menor tempo operatório e a reabilitação precoce da visão (PIGATTO *et al.*, 2007; WARREN, 2004). A cirurgia é realizada sob anestesia geral em animais e consiste na realização de uma incisão corneana de 3,2mm pela qual se realiza a abertura de uma janela na cápsula anterior da lente e a posterior fragmentação e aspiração de todo seu conteúdo (FIFE *et al.*, 2006; MILLICHAMP; DZIEZYC, 2000).

Devido ao tamanho do bulbo ocular e do cristalino dos equinos, instrumental cirúrgico modificado é essencial, especialmente em cavalos adultos. Uma ponteira de irrigação e aspiração estendida (40mm) é utilizada para acessar facilmente todos os ângulos da lente (MILLICHAMP; DZIEZYC, 2000; McMULLEN; UTTER, 2010).

Um cavalo submetido a facoemulsificação sem implante de lente intraocular enxerga os objetos severamente desfocados. (MILLER; MURPHY, 2010). Por este motivo, o implante da lente é considerado obrigatório por alguns autores (MCMULLEN; UTTER, 2010). Além de melhorar consideravelmente a visão dos cavalos submetidos a facoemulsificação (TOWNSEND, JACOBI; BARTOE, 2012) o implante da LIO sabidamente previne a opacificação da cápsula posterior do cristalino pós-cirúrgica em humanos. O contato da LIO com a região equatorial do saco capsular reduz a migração e proliferação das células epiteliais da lente (SACU *et al.*, 2004).

O implante das LIO's em equinos teve um grande avanço com o desenvolvimento de lentes dobráveis de 14 D (22mm de diâmetro) e 18D (24mm diâmetro). Esta etapa é de vital importância para o retorno visual do paciente. Segundo Townsend, Jacobi; Bartoe, 2012, o implante de uma lente intraocular dobrável de +14 D melhora

significativamente o erro de refração comparado a animais que são deixados afácicos após a facoemulsificação. Neste estudo, 24 semanas após a cirurgia, os autores mediram erros de refração de +2 D até -0.5 D nos cavalos que receberam a lente de +14 D. Este dado não difere estatisticamente do erro de refração da população de cavalos normais (+0,25 D), mas difere substancialmente do erro de refração de cavalos afácicos (+10 D) (TOWNSEND, JACOBI; BARTOE, 2012).

Como a facoemulsificação é uma cirurgia etapa dependente, os passos iniciais tem grande importância, pois problemas em sua realização trazem, frequentemente, o comprometimento de todo o procedimento (FISCHER *et al.*, 2010). Dentre estas etapas, a capsulotomia curvilínea contínua tem sido considerada a contribuição mais importante da cirurgia de catarata moderna, por preservar o saco capsular e possibilitar o implante de lente intraocular (PANDEY *et al.*, 2000; SOUZA, RODRIGUES; SOUZA, 2006).

### 2.2.1 A capsulotomia curvilínea contínua

Uma das etapas mais importantes da facoemulsificação consiste na abertura de uma janela na cápsula anterior do cristalino. Na década de 1980, Howard Gimbel e Thomas Neuhann apresentaram a capsulorrexe, que logo foi reconhecida como a técnica padrão ouro na realização da capsulotomia. Mais tarde foi denominada capsulotomia curvilínea contínua (CCC), termo que descreve com exatidão o procedimento (MOHAMMADPOUR, ERFANIAN; KARIMI, 2012).

A CCC é tipicamente iniciada através de uma abertura pontual no centro da cápsula anterior da lente. Este rasgo central cria uma abertura em forma de 'V'. Com auxílio do cistítilo ou da pinça de utrata a cápsula forma uma dobra sobre ela mesma e é tracionada de forma contínua e circular até formar uma janela completa e circular na cápsula anterior da lente (LINEBARGER *et al.*, 1999). Esta janela permite a remoção do cristalino e o implante adequado da lente intraocular. No entanto, a pobre visualização da cápsula pode resultar em inadequada capsulorrexe com risco de rasgos radiais e complicações como ruptura da porção posterior da cápsula e das zônulas, perda vítrea, luxação trans-cirúrgica do cristalino e mau posicionamento da lente intraocular (PANDEY *et al.*, 2000).

Diferentes princípios são utilizados para melhorar a visualização da cápsula anterior durante a CCC em cataratas duras, brancas, intumescentes ou hiper maduras. As

manobras para facilitação da visualização da cápsula anterior da lente incluem o uso de endoiluminador, injeção de bolha de ar na câmara anterior e o método de capsulotomia em dois passos, que consiste na realização de uma pequena CCC seguida de uma segunda capsulotomia que amplia a abertura inicial. Outros métodos relatados incluem a diminuição da iluminação da sala e aumento da magnificação do microscópio cirúrgico (PANDEY *et al.*, 2000; DADA *et al.*, 2004).

Outro princípio de facilitação da visualização da cápsula anterior da lente consiste em aumentar o contraste entre a cápsula anterior da lente e a catarata através da coloração da cápsula com corantes vitais (DADA *et al.*, 2004).

Nos equinos, a capsulotomia deve ter entre 11 e 12 mm de diâmetro. Pode ser realizada manualmente ou com auxílio de ponteira de diatermia de alta frequência (McMULLEN; UTTER, 2010). A cápsula posterior dos equinos é bastante delgada e tem uma superfície grande a tornando suscetível a rupturas durante a facofragmentação. Cuidado especial deve ser tomado para que a cápsula se mantenha íntegra permitindo o implante da lente no saco capsular. Millichamp e Dziezyc (2000) relataram taxas de ruptura da cápsula posterior da lente de 28% em equinos. Neste estudo, corantes vitais não foram utilizados para capsulotomia e o implante da lente intraocular não foi realizado. A ruptura de cápsula posterior e o prolapso de vítreo para a câmara anterior foram igualmente descritos como complicações da facoemulsificação em equinos por outros autores (BROOKS, 2005; FIFE *et al.*, 2006; MCMULLEN; UTTER, 2010).

### **2.3 O uso de corante vitais em oftalmologia**

Corantes são compostos químicos que se ligam a substâncias variadas na natureza para induzir a sua coloração. Quando se ligam a tecidos vivos ou células são chamados de corantes vitais. Os corantes surgiram como importantes adjuvantes para melhorar a visualização de tecidos oculares em procedimentos cirúrgicos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Cirurgias oculares auxiliadas por corantes vitais incluem a ceratoplastia lamelar anterior, exérese de carcinoma de células escamosas, remoção da catarata com implante de lente intraocular, cirurgia vitreoretiniana com a possibilidade de coloração do vítreo, da membrana limitante interna e membrana epirretiniana, coloração da malha trabecular na cirurgia do glaucoma, cirurgias de órbita com coloração de fâscias e tendões, entre outras (RODRIGUES *et al.*, 2009; FARAH *et al.*, 2009).

Além disto, os corantes vitais são utilizados para a facilitação da visualização da incisão corneana em cirurgias intraoculares e na determinação da viabilidade endotelial de botões de córnea em bancos de olhos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Os corantes vitais e a cirurgia de catarata

É bastante difícil de distinguir a cápsula anterior do cristalino do córtex abaixo dela em cataratas hiper maduras ou brancas e em pacientes com fundo pigmentado ou doença vítrea. A visualização fica comprometida pela ausência do reflexo do fundo do olho. Por esse motivo, os corantes têm sido úteis como auxiliares na capsulorrexe (PANDEY *et al.*, 2000). Seu uso como adjuvante na cirurgia da catarata foi iniciado em 1993 e, desde então, diversos relatos e estudos têm sido amplamente publicados (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os corantes vitais ainda podem auxiliar em outras situações e complicações da facoemulsificação: para encontrar a borda de uma capsulorrexe não visualizada, para visualização de perfurações em cataratas traumáticas, durante facoemulsificação de pacientes com opacidade corneana, para facilitar a remoção de placas na cápsula posterior após a cirurgia da catarata, para capsulotomia posterior em crianças e ainda para auxiliar cirurgiões em treinamento nas técnicas da facoemulsificação (CHANG, TSENG; TSENG, 2005).

Os corantes vitais utilizados para capsulorrexe incluem o Azul de tripano, a indocianina verde, a violeta de genciana, a fluoresceína e o Azul brilhante, mas apenas o Azul de tripano está aprovado para esta finalidade pela *Food and Drug Administration - FDA* (Administração de alimentos e fármacos) nos Estados Unidos e, portanto, é o mais utilizado (MELLES *et al.*, 1999; MOHAMMADPOUR, ERFANIAN; KARIMI, 2012). Em equinos, apenas o uso do Azul de tripano foi relatado para a facilitação da capsulorrexe (BROOKS, 2005), no entanto seus efeitos no endotélio da córnea de equinos são desconhecidos.

Apesar das vantagens na realização da capsulotomia e de sua aprovação para este fim, os corantes vitais já foram descritos como substâncias capazes de causar efeitos tóxicos ao endotélio corneano. O Azul de tripano, em concentrações mais altas que as habitualmente descritas e em contato prolongado com o endotélio provocou perda celular (VAN DOOREN, BEEKHUIS; PELS, 2004). Outro estudo comparou os danos endoteliais provocados por três diferentes corantes vitais. A indocianina verde na



concentração de 5 mg/ml pode causar edema mitocondrial, o Azul de tripano provocou a formação de cistos na camada endotelial devido a separação das células e degeneração do endotélio corneano e o Azul brilhante não resultou em efeitos tóxicos. Os autores deste estudo atribuem os efeitos tóxicos, principalmente, à diferença de osmolaridade das soluções de corantes (HISATOMI *et al.*, 2006). A osmolaridade das diferentes concentrações de Azul brilhante utilizados no estudo variou de 298 a 310 mOsm/Kg, da indocianina verde 5% foi 271 mOsm/Kg e do Azul de tripano foi 316mOsm/Kg (HISATOMI *et al.*, 2006). Segundo Edelhauser e colaboradores (1981), a tolerância do endotélio de coelhos e humanos a diferentes osmolaridades situa-se entre 250 e 350 mOsm/Kg. No entanto, durante a cirurgia de catarata, a osmolaridade dentro da câmara anterior pode variar bastante devido as diversas substâncias que são utilizadas. Essa variação pode provocar edema, degeneração, apoptose e necrose das células endoteliais (EDELHAUSER, 2006). Soluções iso-osmóticas (300mOsm/Kg) não alteram a morfologia das células endoteliais (EDELHAUSER *et al.*, 1981; ARMITAGE, MOSS; EASTY, 1988).

Os métodos de coloração da cápsula anterior da lente descritos para facoemulsificação incluem a injeção do corante na câmara anterior sob uma bolha de ar, a injeção subcapsular do corante e injeção na cápsula anterior sob material viscoelástico. O objetivo das técnicas é limitar o contato do corante à íris e cápsula anterior do cristalino evitando o contato do mesmo com o endotélio (DADA *et al.*, 2004; PANDE, SPALTON; MARSHALL, 1996; JACOBS *et al.*, 2006). O tempo de permanência do corante em contato com a cápsula anterior varia conforme a literatura. Alguns autores sugerem que o corante pode ser removido através de irrigação com solução salina balanceada tão logo entrou em contato com a cápsula (VAN DOOREN, BEEKHUIS; PELS, 2004) ou após 10 a 15 segundos (DADA *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2005).

#### **2.4 Azul brilhante**

Azul brilhante, também chamado Azul ácido ou Comassie, é um composto químico aniônico da classe aminotriarilmetano, cuja fórmula química é  $C_{47}H_{48}N_3S_2O_7Na$  e tem peso molecular de 854 daltons. O corante sintético foi certificado como corante alimentar na Europa e pode ser usado como marcador cardiovascular e de proteínas em doenças neurológicas (DIB *et al.*, 2009).

Sua utilização em oftalmologia foi relatada, primeiramente por Hisatomi e colaboradores (2006), definindo sua habilidade em corar a cápsula anterior do cristalino em diversas concentrações e sua biocompatibilidade através da avaliação de seus efeitos no endotélio corneano (HISATOMI *et al.*, 2006).

Após, foi descrito na realização da cirurgia vitreoretiniana como auxiliar na coloração da membrana limitante interna (RODRIGUES *et al.*, 2007), o que o levou a ser aprovado para uso intraocular na Europa (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Este corante é frequentemente usado em géis de eletroforese. Sua função farmacológica ainda não foi determinada (HISATOMI *et al.*, 2006).

Estudos referentes à concentração dos corantes vitais têm sido feitos com o objetivo de conhecer a menor concentração capaz de corar a cápsula anterior sem resultar em efeitos tóxicos para o endotélio da córnea. Hisatomi e colaboradores (2006), em estudo *in vitro*, obtiveram sucesso ao corar a cápsula anterior da lente de suínos com concentrações de 0,025% ou superiores. Já Rodrigues e colaboradores (2010) estudando a habilidade do Azul brilhante em duas concentrações, obtiveram uma tênue coloração da cápsula da lente de suínos com a concentração de 0,05%, enquanto a concentração 0,5% foi considerada eficaz (HISATOMI *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Pesquisadores espanhóis relataram o uso do Azul brilhante em pacientes submetidos a facoemulsificação e concluíram que a coloração foi eficaz e segura, já que a contagem de células endoteliais antes e após o procedimento não diferiu. Além disso, sugeriram que a coloração é uma boa opção de auxílio a cirurgiões em treinamento (UDAONDO *et al.*, 2007).

## **2.5 O endotélio da córnea**

O endotélio da córnea consiste de uma única camada de células hexagonais firmemente interligadas por interdigitações formando uma barreira física entre a córnea e o humor aquoso. Também se utiliza de um mecanismo de bomba ativo que mantém a córnea livre de água e solutos (GILGER, 2010). O endotélio de equinos foi descrito como sendo uma monocamada de células predominantemente hexagonais e pentagonais com núcleo não visível através da microscopia confocal e o diâmetro das células endoteliais do equino obtido foi de 20-25µm (LEDBETTER; SCARLETT, 2009).

A ultraestrutura das células endoteliais da córnea, demonstrada pela microscopia eletrônica de varredura, consiste de: interdigitações que mantem as células justapostas lateralmente formando uma barreira que controla a entrada e saída de fluido; microvilosidades na face posterior que se projetam para a câmara anterior; vesículas pinocíticas que se estendem da face posterior até as junções laterais ou a membrana anterior; um único cílio por célula, encontrado no endotélio de algumas espécies (JOYCE, 2003; TUFT; COSTER, 1990; COLIN; COLIN, 1998).

A principal função do endotélio é manter a transparência da córnea controlando a sua hidratação. Outra função é permitir passagem de nutrientes do humor aquoso para a córnea, que é avascular. O endotélio forma uma barreira “permeável” ao humor aquoso, mas prevenindo a passagem massiva de fluido. A remoção do excesso de fluido é realizada pelas bombas ativas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . A integridade desta estrutura de bomba e barreira é essencial para a manutenção da transparência da córnea (JOYCE, 2003; TUFT; COSTER, 1990).

O endotélio normal consiste de um arranjo de células poligonais de tamanho semelhante. O formato destas células, em vertebrados, é normalmente hexagonal e pentagonal, podendo conter pequena quantidade de células de outros formatos. A morfologia do endotélio é afetada pela idade, doenças e procedimentos cirúrgicos intraoculares, entre outros (WARRING, 1982; MATSUDA, SUDA; MANABE, 1984; COLIN; COLIN, 1998).

A eficiência da função da barreira física e sua bomba ativa é determinada pelo tamanho das células do endotélio, sua forma, densidade e a presença de alguns cofatores no humor aquoso (GILGER, 2010).

Avaliando-se o endotélio da córnea de equinos utilizando a microscopia especular obteve-se densidade de 3155 células/ $\text{mm}^2$ . Além disso, não foram observadas diferenças na densidade endotelial relacionadas ao sexo dos animais (ANDREW *et al.*, 2001). O endotélio da córnea de equinos já foi avaliado através da microscopia confocal encontrando uma densidade de 3002 células/ $\text{mm}^2$ . Segundo os autores, em virtude do pequeno número de animais avaliados, o estudo não foi capaz de atestar diferença relacionada à idade (LEDBETTER; SCARLETT, 2009).

As mudanças na densidade e forma celular provocadas pela idade já foram observadas em outras espécies de animais como macacos, ratos, gatos, cães e coelhos. Em humanos, estima-se que entre os 20 e 80 anos de idade a redução na densidade celular média seja de 0,52% ao ano (TUFT; COSTER, 1990).

Danos ao endotélio corneano durante a cirurgia de catarata ocorrem devido a alguns fatores como contato de fragmentos do núcleo com o endotélio, contato com a lente intraocular, liberação de radicais livres, entre outros (BOURNE *et al.*, 2004).

A reparação de danos ao endotélio da córnea ocorre principalmente por alargamento e migração celular. A divisão celular é limitada e varia conforme a espécie estudada (MATSUDA, SUDA; MANABE, 1984; TUFT; COSTER, 1990). Pouco se sabe sobre a capacidade regenerativa do endotélio da córnea dos equinos. No entanto, a diminuição da densidade celular do endotélio associada à idade não provocou aumento da espessura da córnea, comprovando que a funcionalidade do endotélio se manteve preservada (ANDREW *et al.*, 2001).

### 2.5.1 Métodos de avaliação do endotélio da córnea

Várias técnicas podem ser utilizadas com o objetivo de se avaliar o endotélio. Incluem-se os métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro*. Das técnicas preconizadas para estudo *in vivo*, a microscopia especular tem sido a mais utilizada (COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; ANDREW *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008; McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008; BERCHT *et al.*, 2015), embora já haja relatos do uso experimental da microscopia confocal em equinos (LEDBETTER; SCARLET, 2009).

Já a avaliação *in vitro* pode ser realizada por microscopia óptica com corantes vitais, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Estas técnicas requerem a excisão da córnea e sua imersão em soluções de coloração ou fixação. A microscopia eletrônica de varredura tem sido amplamente utilizada para se avaliar e comparar a ultraestrutura endotelial de vertebrados e os efeitos de medicamentos e procedimentos cirúrgicos no endotélio da córnea (DOUGHTY, 1989; COLLIN; COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005; PIGATTO *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006).

#### 2.5.1.1 Microscopia especular

Os primeiros relatos do emprego da microscopia especular para avaliação endotelial datam do início do século XX, quando Vogt, em 1920, apresentou o método de avaliação do mosaico endotelial por reflexão especular usando a biomicroscopia em

lâmpada de fenda (YEE, EDELHAUSER; STERN, 1987). Maurice, em 1968, proporcionou avanço ao observar *in vivo*, com magnificação de 400 vezes, as células do endotélio da córnea. LAING e colaboradores, em 1979, modificaram o microscópio especular desenvolvido por Maurice, permitindo registro fotográfico dos exames da córnea (McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008).

A microscopia especular é utilizada para visualizar e registrar imagens de forma não invasiva do endotélio corneano. Os microscópios especulares utilizados na clínica oftalmológica são baseados no microscópio laboratorial desenhado por Maurice. O princípio é fundamentado na reflexão de um feixe luminoso incidente sobre a superfície do endotélio corneal, onde parte deste feixe luminoso reflete de forma especular, e é captada pelo equipamento denominado microscópio especular de córnea (McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008).

Conforme a maneira de captar a imagem, os microscópios especulares podem ser de contato ou de não-contato (LAING *et al.*, 1979).

A microscopia especular de contato requer a presença de contato físico entre a córnea e a lente objetiva. Ao deslizar a objetiva do microscópio especular sobre a superfície da córnea, obtém-se a imagem do mosaico endotelial. Pode-se cobrir toda a superfície corneal, permitindo, portanto, a avaliação de toda a superfície endotelial (ABIB, 2000).

A microscopia de não contato é considerada de execução mais fácil, rápida e com menor possibilidade de lesão corneana, não necessitando o uso de colírios. Estes equipamentos utilizam uma tecnologia de focalização automática. O reflexo especular é menor, pois não ocorre aplanagem da curvatura corneana, sendo obtidas imagens com 150-170 células endoteliais aproximadamente (TUFT; COSTER, 1990; MCCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008).

Os parâmetros endoteliais avaliados podem ser divididos em morfológicos e morfométricos. A morfologia inclui qualquer avaliação da anatomia, histologia e citologia de um organismo ou célula. Na avaliação endotelial, através da microscopia especular, a morfologia do padrão celular é avaliado através de medidas de área celular e da forma celular, ou seja, do polimegatismo e pleomorfismo (ABIB, 2000; McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008). O polimegatismo é o coeficiente de variação na área celular; reparação de dano ao endotélio reflete no aumento deste parâmetro. Ele é determinado pela divisão do desvio padrão da área celular pela média da área celular em micrômetros (ABIB, 2000; McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008). Aumento no

polimegatismo sugere diminuição na avaliação, com exatidão, da área celular média (McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008). O pleomorfismo é a quantidade de células com 6 lados. Quanto maior a quantidade de células hexagonais, maior a eficiência na tensão das membranas entre elas (McCAREY, EDELHAUSER; LYNN, 2008).

O endotélio já foi avaliado por microscopia especular em diversas espécies como equinos (ANDREW *et al.*, 2001), cães (PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008), coelhos (EDELHAUSER *et al.*, 1981), lhamas e alpacas (ANDREW *et al.*, 2002), gatos (PEIFFER, DEVANZO; COHEN, 1981; FRANZEN *et al.*, 2010), chinchilas (BERCHT *et al.*, 2015), galinhas (ALBUQUERQUE, FREITAS; PIGATTO, 2015) e humanos (FARIAS *et al.*, 2007).

#### 2.5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura tem sido amplamente utilizada para se avaliar e comparar a ultraestrutura endotelial de vertebrados e os efeitos de medicamentos e procedimentos cirúrgicos no endotélio da córnea (DOUGHTY, BERGMANSON; BLOCKER, 1997; DOUGHTY, 1989; COLLIN; COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005; PIGATTO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2006). A técnica possibilita, ainda, avaliarem-se a morfologia e as bordas celulares, além do padrão do mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989; PIGATTO *et al.*, 2004).

Com a microscopia eletrônica de varredura podem ser obtidos aumentos de até 900.000 vezes, mas para a análise de materiais normalmente o aumento é da ordem de 10 mil vezes. No caso da microscopia eletrônica a área ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons ao invés da radiação da luz. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações é emitida tais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-X característicos, elétrons Auger, fótons, etc. Estas radiações quando captadas corretamente irão fornecer informações características sobre a amostra - topografia da superfície, composição, cristalografia entre outros (MALISKA, 2013).

A avaliação da densidade e área celular pela microscopia eletrônica de varredura é bastante limitada, devido à retração das amostras de córnea, que ocorrem como resultado do preparo e desidratação do tecido. A média de retração celular endotelial em coelhos foi de 29,7% em um estudo, com variação entre 3,6 e 49% (SCHUTTEN; VAN

HORN, 1980). Outro estudo relata retração de 11 a 20% em amostras de córnea fixadas com glutaraldeído 2% (DOUGHTY, BERGMANSON; BLOCKER, 1997).

### 2.5.1.3 Microscopia óptica com coloração vital

Diferentes técnicas e corantes já foram utilizados para a visualização do endotélio corneano em microscópio óptico *in vitro*. O objetivo das colorações vitais é acessar o endotélio corneano em métodos rápidos e fáceis e com equipamentos acessíveis (DOUGHTY, 1989). Além disso, estas técnicas permitem realizar medidas morfológicas e morfométricas das células endoteliais, avaliar danos celulares e áreas de perda celular separando células viáveis e não-viáveis e evidenciando as bordas e núcleos celulares (DOUGHTY, 1989; GEROSKI; EDELHAUSER, 1989; SPENCE; PEYMAN, 1976; TAYLOR; HUNT, 1981).

Spence; Peyman (1976), descreveram uma técnica de coloração do endotélio da córnea com o Azul de tripano 0,25% e Alizarina vermelha S em coelhos e relataram bons resultados, sendo a visibilização das bordas celulares a principal vantagem da técnica (SPENCE; PEYMAN, 1976).

Em 1981, Taylor; Hunt, destacaram a manutenção do pH da solução de Alizarina vermelha como sendo de vital importância para a formação da reação que evidencia as bordas celulares. Segundo os autores, após tentativas frustradas de visualizar o endotélio da córnea com esta técnica, descobriu-se que o ponto crítico para a deposição do corante nas bordas celulares é a manutenção de pH 4,2 e não o tempo de exposição relatado por Spence e Peyman (1976). Na descrição da coloração do endotélio, Taylor; Hunt, relatam a exposição ao Azul de tripano por 90 segundos, seguido de lavagem com solução salina e drenagem do excesso. O endotélio então é coberto por Alizarina vermelha por 90 segundos, seguido de nova lavagem com solução salina e fixação com glutaraldeído por 10 minutos (Taylor; Hunt, 1981). Geroski; Edelhauser (1989) relatam ótima demarcação das bordas celulares deixando o endotélio exposto a Alizarina por 3 minutos. No entanto, em olhos de coelhos os autores descreveram uma taxa de 14% de retração das amostras com a coloração, quando comparada à microscopia especular. No mesmo experimento ainda discutem que o rápido desaparecimento da coloração dos núcleos pelo Azul de tripano poderia ser minimizado pela fixação das amostras, mas que ainda mais retração resultaria desta técnica (GEROSKI; EDELHAUSER, 1989).

Células com membranas alteradas se tornam permeáveis ao Azul de tripano, que cora o núcleo intensamente de azul. No entanto, as células viáveis são raramente identificadas apenas com esta coloração, não permitindo a avaliação do padrão endotelial, contagem de células e de seus lados (TAYLOR; HUNT, 1981). A Alizarina vermelha então foi adicionada à técnica por ser capaz de delinear as bordas de células danificadas e viáveis. Além disso, áreas com perda celular e exposição da membrana de Descemet são igualmente identificadas pela deposição da Alizarina vermelha (SPENCE; PEYMAN, 1976; TAYLOR; HUNT, 1981).

A microscopia óptica com coloração vital de Alizarina vermelha e Azul de tripano é um método eficaz, de fácil execução e baixo custo para avaliar o endotélio da córnea de diferentes espécies (SAAD et al., 2008). Seu uso já foi relatado para avaliar toxicidade endotelial ao ar e SF6 em córneas de felinos (LANDRY *et al.*, 2011), toxicidade à lidocaína em córneas de coelhos (TRIVEDI *et al.*, 2002), para análise morfométrica em córneas de pessoas e coelhos (GEROSKI; EDELHAUSER, 1989). Além disso, a coloração vital já foi utilizada para avaliar dano celular iatrogênico em coletas de botões para transplantes de córnea (IDE *et al.*, 2007; SAAD *et al.*, 2008), danos celulares na trepanação e inserção dos botões de córnea (TERRY *et al.*, 2009) e para aferir a viabilidade das córneas em bancos de olhos (PIPPARELLI *et al.* 2011).



### 3 ARTIGO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ISSN 1678-4162)

#### **Evaluation of equine corneal endothelium after exposure to 0,05% brilliant blue - an *in vitro* study**

[Avaliação do endotélio corneano de equinos após contato com o corante Azul brilhante 0,05% - estudo *in vitro*]

Maria Cristina Caldart de Andrade<sup>1</sup>, Tatiana Martinez Moreno<sup>1</sup>, Marcele Mucillo<sup>1</sup>, João Antonio Pigatto<sup>1</sup>, Erasnilson Vieira Camilo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo

#### **ABSTRACT**

With the objective of evaluating the immediate effects of 0,05% brilliant blue on corneal endothelium of horses, 38 corneas of 19 horses, male or female, of different ages obtained from a licensed Brazilian commercial slaughterhouse were studied. Corneas were randomly divided into two groups. Group 1: Corneal endothelium was perfused with BSS for 60 seconds. Group 2: Corneal endothelium was perfused with 0.3 mL of brilliant blue 0.05% (Opht-Blue, Ophthalmos, São Paulo, Brazil) for 60 seconds followed by rinsing with a balanced salt solution (BSS, Ophtha]lmos, São Paulo, Brazil). The corneas were, subsequently, excised with an 8mm trephine and prepared to analyze posterior endothelial surface using a light microscope (24 corneas) and a scanning electron microscope (14 corneas). Due to non-normal residuals at ANOVA mean comparison, a generalized linear model was utilized at 5% level of significance. The Qui-square test stated that treatment and control group were not different statistically. The 0.05 % brilliant blue did not cause damage to equine corneal endothelium.

**Key words:** brilliant blue, vital dye, corneal endothelium, equine

#### **INTRODUCTION**

Lens opacities in equine patients are present in 5-7% of clinically normal horses (Matthews, 2000). Surgery is required to resolve cataracts, and the ideal technique is the phacoemulsification (Brooks, 2005). Capsulorhexis is considered by many to be one of the most important steps in cataract surgery (Hisatomi et al., 2006).

Poor visualisation of the capsule results in an inadequate capsulorhexis with a high risk of radial tears toward or beyond the lens equator and associated complications, such as zonular and posterior capsular rupture, vitreous loss, nucleus drop, and intraocular lens (IOL) displacement (Pandey et al., 2000). Staining the anterior capsule with dyes is a useful alternative for performing capsulotomy in cases of advanced/white cataracts (Pandey et al., 2000).

The corneal endothelium consists of a single cell layer between the corneal stroma and anterior chamber. The barrier and “pump” functions of the endothelium are responsible for maintaining corneal transparency by regulating stromal hydration. Lack of a vigorous proliferative response to cell loss in most species makes the endothelium a fragile tissue (Joyce, 2003; Tuft; Coster, 1990). Age and intraocular surgery, mainly in the anterior segment, can decrease the number of endothelial cells leading to decompensation and corneal edema, which is a frequent complication of phacoemulsification in horses (Millichamp; Diziezić, 2000). Thus, every substance that could possibly cause toxicity to the corneal endothelium should be carefully evaluated.

Anterior lens capsule staining efficacy of trypan blue, indocyanine green, gentian violet, and brilliant blue were tested in eyes from different species and the best concentration of each substance was determined (Dada et al., 2004; Chang et al., 2005; Hisatomi et al., 2006). The toxicity of vital dyes was tested in cultured rabbit endothelial cells (Chang et al., 2005), rat eyes (Hisatomi et al., 2006) and rabbit and human eyes (Holey et al., 2002; Van Dooren et al., 2004).

Brilliant blue is a blue dye that binds to a variety of proteins. Its ability to stain ocular tissues was tested for chromovitrectomy and phacoemulsification, as a facilitator of capsulorhexis for improving anterior lens capsule visualisation (Hisatomi et al., 2006). Currently, specular microscopy, vital staining and scanning electron microscopy (SEM) are used to evaluate the corneal endothelium (Chang et al., 2005; Pigatto et al., 2005; Hisatomi et al., 2006; Pigatto et al., 2009; Landry et al., 2011; Bercht et al., 2015).

The use of brilliant blue dye to facilitate capsulotomy has been studied (Hisatomi et al., 2006; Udaondo et al., 2007). However, the effects of brilliant blue dye on the corneal endothelium of horses have not been investigated. This study aimed to assess the

immediate effects of 0.05% brilliant blue on the corneal endothelium of horses by light microscopy and SEM.

## **MATERIALS AND METHODS**

Thirty-eight healthy corneas from 19 equines, including both males and females of different ages, were studied. The eyes were obtained from a licenced Brazilian commercial slaughterhouse (Foresta, São Gabriel, RS). All procedures were performed in compliance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) for the use of animals in ophthalmic and visual research. The eyes were enucleated and kept in a moist chamber containing saline solution and gauze until the time of examination. Ophthalmic examination was performed before the start of the experiment. The examination consisted of evaluation with slit-lamp biomicroscopy (Portable Slit Lamp SL 15, Kowa, Japan) and fluorescein stain (Fluorescein Strips, Ophthalmos, SP, Brazil). Eyes that showed evidence of ocular disease were excluded.

Corneas were randomly divided into two groups. In Group 1, the corneal endothelium was perfused with BSS for 60 seconds. In Group 2, the corneal endothelium was perfused with 0.3 mL of brilliant blue 0.05% (Opht-Blue, Ophthalmos, São Paulo, Brazil) for 60 seconds followed by rinsing with a balanced salt solution (BSS, Ophthalmos, São Paulo, Brazil). The corneas were subsequently punched with an 8 mm trephine and the posterior endothelial surface was analysed using a light microscope (24 corneas) and a scanning electron microscope (14 corneas).

### **Light Microscopy**

Corneal buttons were placed endothelial side up on a glass slide and stained with 0.1% trypan blue (Azul de trypan, Ophthalmos, São Paulo, Brazil) followed by rinsing in BSS and staining with alizarin red (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 90 seconds. After a final rinse with BSS, each sample was flat-mounted endothelial side up and immediately examined and photographed using an optical microscope (Nikon Eclipse E200, Japan) at 40X magnification. Three images of the corneal endothelium of each cornea were chosen for analysis. Images were analysed with software (UTHSCSA Image tool 3.0) and areas with cellular damage were measured.

## Statistical Analysis

In the analysis of variance, the mean cell damage of the treatment and control groups did not differ statistically. However, the excessive number of "zeros" (images without cell damage) resulted in non-normal residuals and the analysis could not be validated. Therefore, "Generalized Linear Models" as proposed by Nelder; Wedderburn (1972) was used in this paper. In the quantitative analysis, corneas were classified as follows. First, the percentage of cellular damage of each image (three images from each horse) was measured. If only one image presented a valid percentage of cell damage (different from zero), it was attributed a binary variable for representation. This way, a binomial model was used with a canonical link to verify the influence of the treatment in the experiment.

## Scanning Electron Microscopy

Corneal buttons were fixed in 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 cacodylate buffer (pH 7.4) for 24 hours. Samples were washed in a cacodylate buffer and dehydrated through an increasing series of ethanol solutions. Thereafter, the specimens were submitted to critical point drying using liquid carbon dioxide. The corneas were placed on aluminum stubs with adhesive tape and sputter coated with gold-palladium. The posterior endothelial surfaces were examined and photographed using a scanning electron microscope (JSM 6060, JEOL, Tokyo, Japan) operating at 10 kV. Five random microphotographs (x750 to x3500) of each sample were taken. Ultrastructural characteristics were observed and compared between groups using microphotographs obtained at 750-4000x. Qualitative analysis of the posterior endothelial surface was performed.

## RESULTS

With alizarin red and trypan blue staining and the use of light microscopy it was possible to obtain images from all analysed samples. The treatment group (Fig. 1), exposed to 0,05% brilliant blue presented large areas of corneal endothelium comparable to that of the BSS group (Fig. 2). Linear areas of damaged cells corresponding to corneal folds (Fig. 3) and cells with two or more nuclei were seen in both groups (Fig. 4). The

boxplot (Fig. 5) represents the behavior of the data in relation to variability and statistical summaries. The mean values are represented by red dots, median values by black dots and the box extension represents variability (Fig. 5). According to the method proposed by Nelder and Wedderburn (1972), the treatment and control groups differences were not significant by the Chi-square test at the 5 % level of significance. This indicates that there is no influence of treatment on cell damage percentage. A half-normal plot graphic was used for model validation and demonstrated good adjustment.

The control and treatment groups presented a regular and normal endothelium upon SEM (Fig. 6). A polygonal pattern was seen with clear cell borders. Interdigitations, pinocytotic vesicles and microvilli could be differentiated in all images (Fig. 7). Punctual membrane cell damage was detected in 3 specimens of both groups (Fig. 8). Large areas of the endothelial mosaic from the control group were comparable to that of the treatment group.

## DISCUSSION

As far as the authors are aware, this is the first time that equine corneal endothelial ultrastructural characteristics are analysed and SEM microphotographs are published. Equine corneal endothelium was already successfully assessed by *in vivo* confocal microscopy describing a confluent monolayer of polygonal cells of 20-25  $\mu\text{m}$  in diameter (Ledbetter; Scarlett, 2009). Scanning electron microscopy has been widely utilised for reporting ultrastructural characteristics of the endothelium and for analysing possible toxic effects of different substances (Eggeling et al., 2000; Pigatto et al., 2005; Hisatomi et al., 2006; Pigatto et al., 2009; Landry et al., 2011). However, the morphometric evaluation was compromised by retraction of the specimens, as there is an expected shrinkage of 11 to 20% using glutaraldehyde 2% fixative solution (Doughty et al., 1997).

In this study, SEM of the equine corneal endothelium revealed characteristics comparable to other species (Pigatto et al., 2005; Pigatto et al., 2009; Bercht et al., 2015). A monolayer with polygonal pattern, microvilli, pinocytotic vesicles, interdigitated cell borders are in accordance with previous description of normal endothelium (Pigatto et al., 2005; Pigatto et al., 2009; Bercht et al., 2015). Cilia could not be well differentiated in our samples of equine endothelium. However, it has been suggested that its fragile character make it difficult to detect (Gallagher, 1980).

Qualitative analysis of SEM microphotographs, regarding to possible toxic effects of brilliant blue, revealed no alterations in endothelium ultrastructure compared to BSS group. According to Hisatomi et al. (2006), cellular edema or shrinkage and some degenerated cells may be seen when toxic solutions contact the corneal endothelium. Eggeling et al. (2000) reported cellular necrosis, denuded Descemet's membrane, swollen cytoplasm and indistinguishable borders, as a result of lidocaine in high concentration exposure. Landry et al. (2011) found cell membrane disruption and missing cells at endothelium SEM microphotographs after using SF6 in anterior chamber of cats (Eggeling et al., 2000; Hisatomi et al., 2006; Landry et al., 2011).

Exposure to brilliant blue did not result in any severe damage to the equine corneal endothelium. Rare damaged cells were detected upon SEM microphotographs in both groups and were possibly due to manipulation of samples. The few alterations were described as punctual cell membrane disruptions. Statistical analysis was not possible to perform, as the high number of samples with 0% damage decreased the power of statistical tests.

The dual staining reported by Taylor; Hunt (1981) is an inexpensive, easy and very satisfactory method for assessing the equine corneal endothelium and evaluating toxicity of vital dyes. Alizarin red S stains intercellular borders and bare Descemet's membrane, while trypan blue penetrates the cell membrane staining the nuclei and cytoplasm of damaged cells. The combination of these dyes permits visualisation of wide pattern of regular endothelium, damaged cell areas and cell loss areas (Taylor; Hunt, 1981; Trivedi et al., 2003; Saad et al., 2008). The efficacy and importance of this technique has already been demonstrated since it is used for assessments of endothelial graft quality during storage in eye banks (Saad et al., 2008; Terry et al., 2009; Pipparelli et al., 2011).

In light microscopy images, brilliant blue also did not have any toxic effects on the equine corneal endothelium compared to the control group. The small percentage of cell damage in both groups was believed to be related to sample preparation, as reported by Trivedi et al. (2003). Even in the control group, these linear areas stained with trypan blue, representing corneal folds, and were due to manipulation during staining and cornea excision (Trivedi et al., 2003). Terry et al. (2009) reported some faint striae damages, probably caused by the stretching "trampoline effect" from trephination. Although the majority of our samples were free of damage, one of each group presented these linear bands stained by trypan blue and with poor visualisation of intercellular spaces. The

manipulation during excision, performing trephination and staining procedures, along with the difficulties in flattening the cornea over the glass laminae, might have caused these slight damages.

Giant cells or cells with two nuclei were a common finding in our light microscopy images. These are characteristics of senescent cells and suggest that healing of the endothelium occurs by coalescence of cells rather than by cell division (Joyce, 2003). Landshman et al. (1988), studying the regenerative capacity of feline corneal endothelium, reported giant cells with two or more nuclei and attributed corneal decompensation to the presence of these cells along with decreased endothelial cell density. An alternative explanation is that some cells in the endothelial population become senescent and undergo amitotic division in which DNA is duplicated, but cells do not complete cytokinesis to produce daughter cells (Joyce, 2003). The regenerative capacity of the equine corneal endothelium has not been elucidated, although Andrew et al. (2001) reported an age-related decrease in endothelial cell density in horses. The ages of our horses were not recorded, although horses tend to be discarded to slaughterhouses in old age, which could explain the frequent observation of these cells.

The importance of dye-enhanced capsulotomy is widely known for white cataracts, and in cases of a pigmented fundus or vitreous disease. Good visualisation of the lens capsule is important to maintain control of tears, to facilitate IOL implantation and, consequently, to prevent severe radial tears and IOL displacement (Pandey et al., 2000; Jacobs et al., 2006). The safety of different dyes used for capsulotomy has been assessed in humans and other species (Holey et al., 2002; Dada et al., 2004; Van Dooren et al., 2004; Hisatomi et al., 2006), although little is known about their effects on the equine corneal endothelium.

For modern cataract surgery in horses, IOL implantation is considered mandatory for vision restoration (McMullen et al., 2010). Additionally, the fact that posterior capsule opacification is diminished in the presence of an IOL (Pandey et al., 2000) makes us to commit to always perform the best capsulotomy. Although horses are not prone to glaucoma, due to their ocular anatomy and aqueous drainage physiology (Wilcock et al., 1991), a good capsulorhexis avoids vitreous prolapse into the anterior chamber and prevents increases in intraocular pressure post-surgery (Pandey et al., 2000).

Our efforts in improving the capsulorhexis technique in horses are due to the importance of this step for surgical success. The accepted recommendations to aid capsulotomy in people are dimming the operating room lights, increasing the operating

microscope's magnification and coaxial illumination, and using high-density viscoelastic agents. The use of air, diathermy, an endoilluminator, a vitrectome and scissors, as well as staining the anterior capsule with dyes have also been suggested (Pandey et al., 2000).

In horses, a continuous curvilinear capsulorhexis is performed manually or with the assistance of a high-frequency diathermy tip (McMullen et al., 2010; McMullen; Utter, 2010). There is a report on the intraocular use of trypan blue for phacoemulsification in horses, but there was no mention of its possible toxic effects (Brooks, 2005).

Our choice for testing brilliant blue in the equine eye was based on availability of a commercial product, novelty of this dye for veterinary use and its safety regarding the corneal endothelium as reported by Hisatomi et al. (2006). According to this study, the osmolality of the solution is an important factor in its toxicity, and therefore for cell survival. The brilliant blue solution has an osmolality similar to that of the physiologic aqueous humor. Thus, the authors concluded that it is a good alternative dye for capsular staining, with superior staining ability and biocompatibility (Hisatomi et al., 2006).

## **CONCLUSION**

The results of this research showed that exposure to 0.05% brilliant blue for 60 seconds did not damage equine corneal endothelial cells.



Figure1 – Light microscopy of equine corneal endothelium stained with alizarin red and trypan blue. Treatment group endothelial mosaic with no alteration (40x).

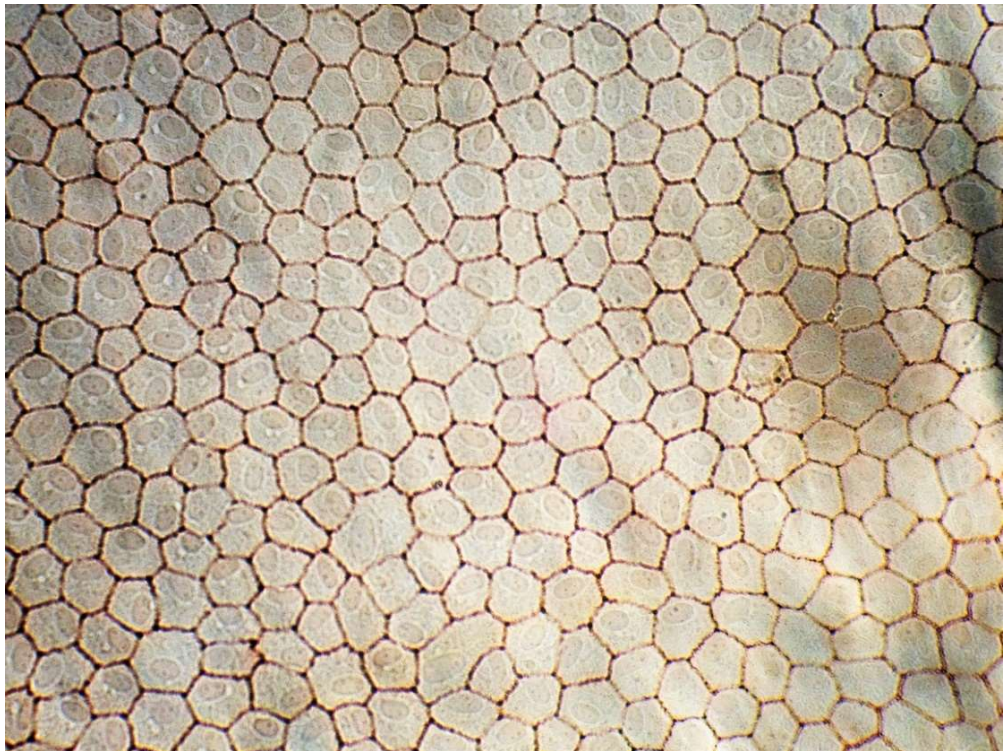


Figure 2 –Light microscopy of equine corneal endothelium stained with alizarin red and trypan blue. Control group endothelial mosaic with no alteration (40x).

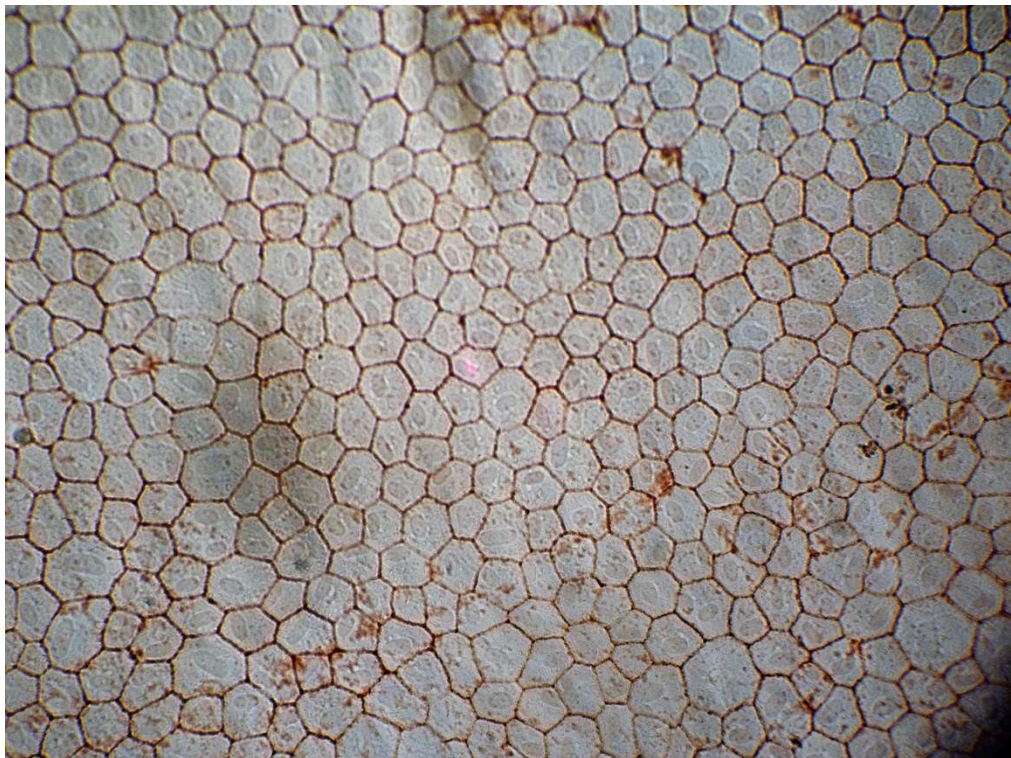


Figure 3 – Light microscopy of equine endothelium stained with alizarin red and trypan blue. Linear areas of damaged cells corresponding to corneal folds in control group (A) and treatment group (B) (40x).

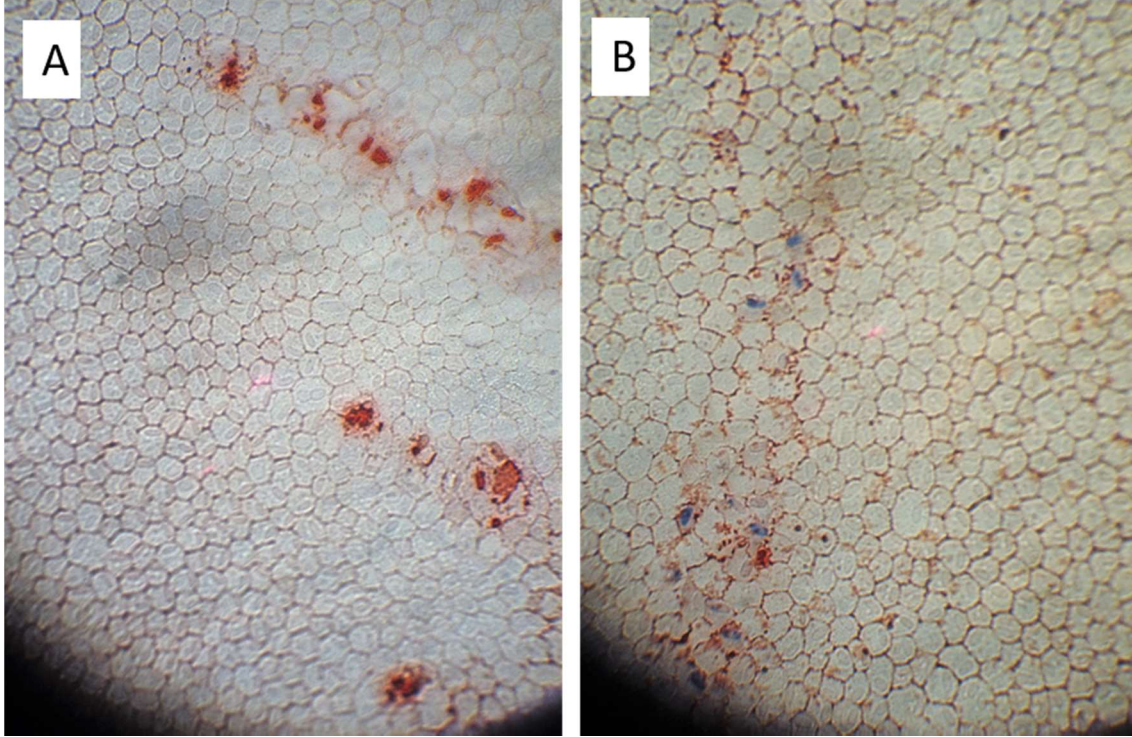


Figure 4 – Light microscopy of equine endothelium stained with alizarin red and trypan blue. Giant cells and cells with 2 or more nuclei (arrows) in control group (A) and treatment group (B) (40x).

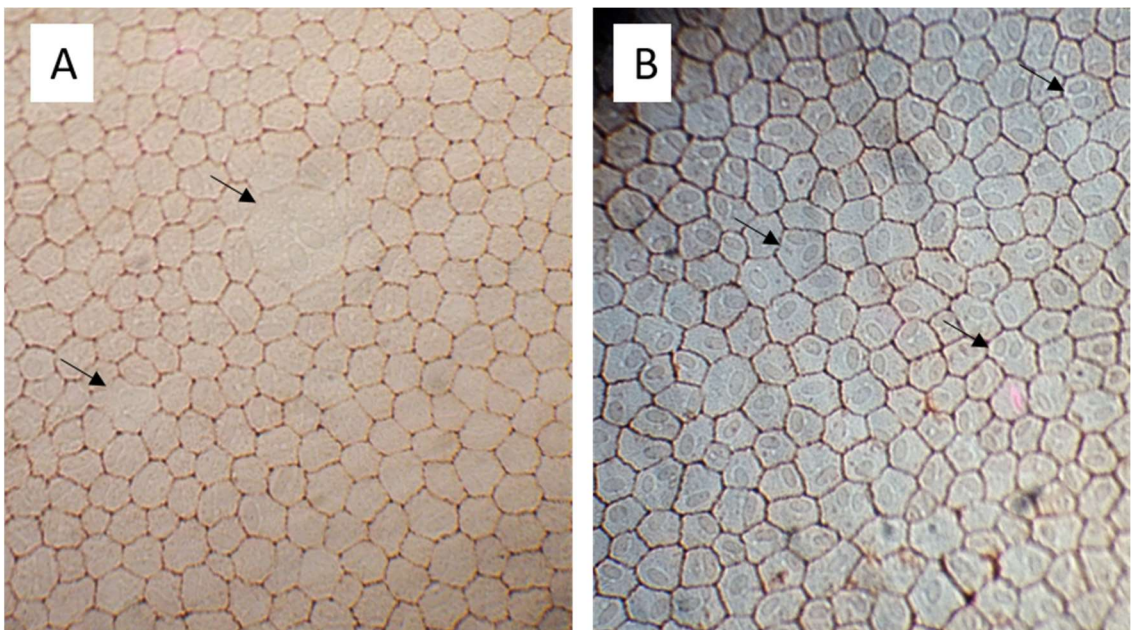


Figure 5 – Box plot of mean percentage of damaged cells for treatment and control groups (red dots), median (black dots) and variability is represented by extension of the box.

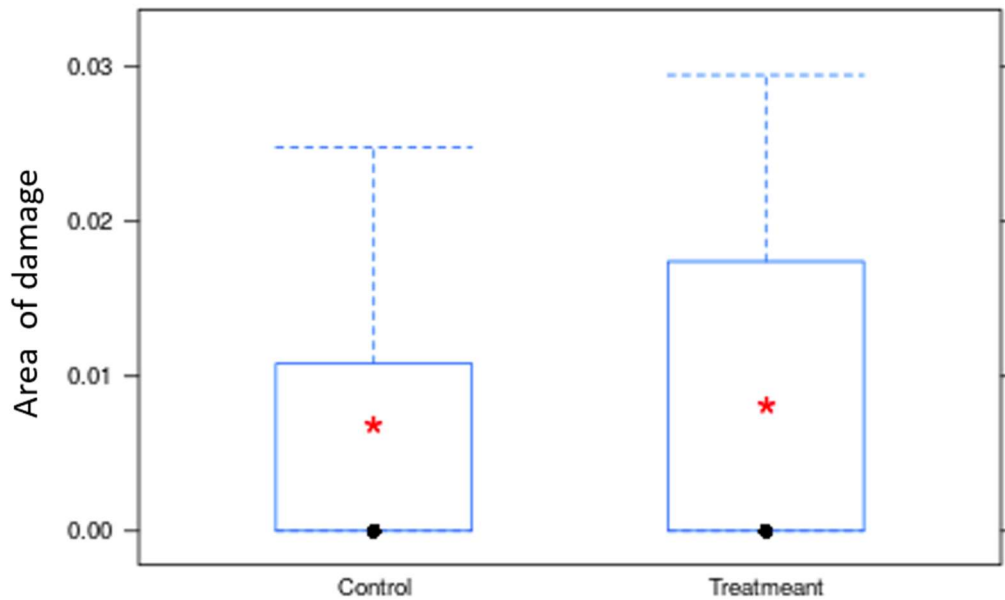


Figure 6 – SEM microphotographs of equine corneal endothelium. Small white dots are microvilli (black arrows) and interdigitations are shown by white arrow (A) (1700x). Regular polygonal pattern (B) (1000x).

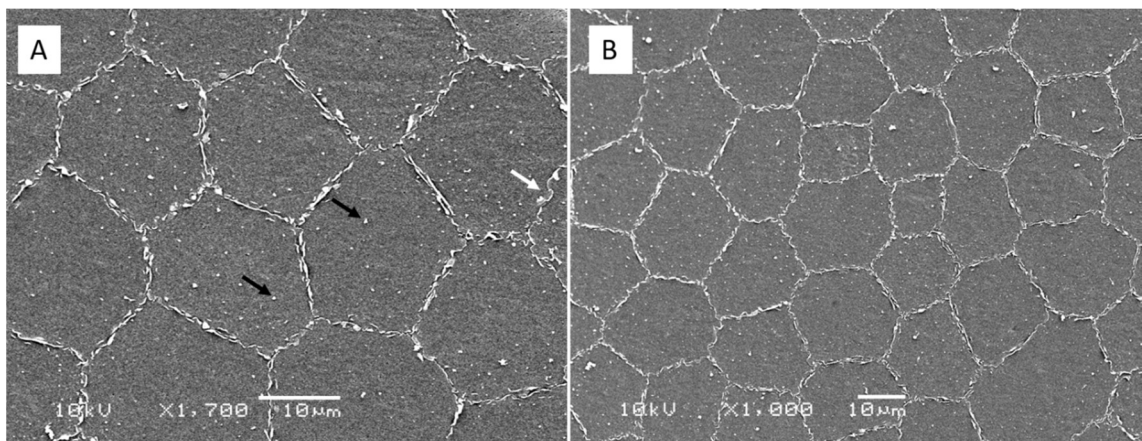


Figure 7 – SEM photomicrograph in higher magnification (x2200). Pinocytotic vesicles are seen as small black dots (black arrows).

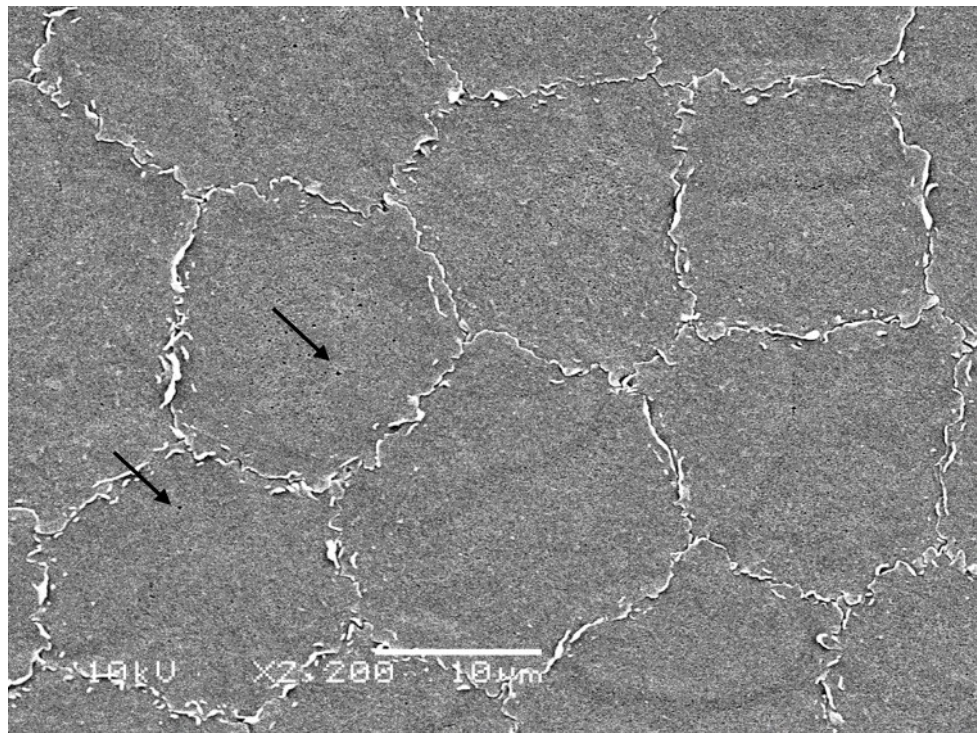
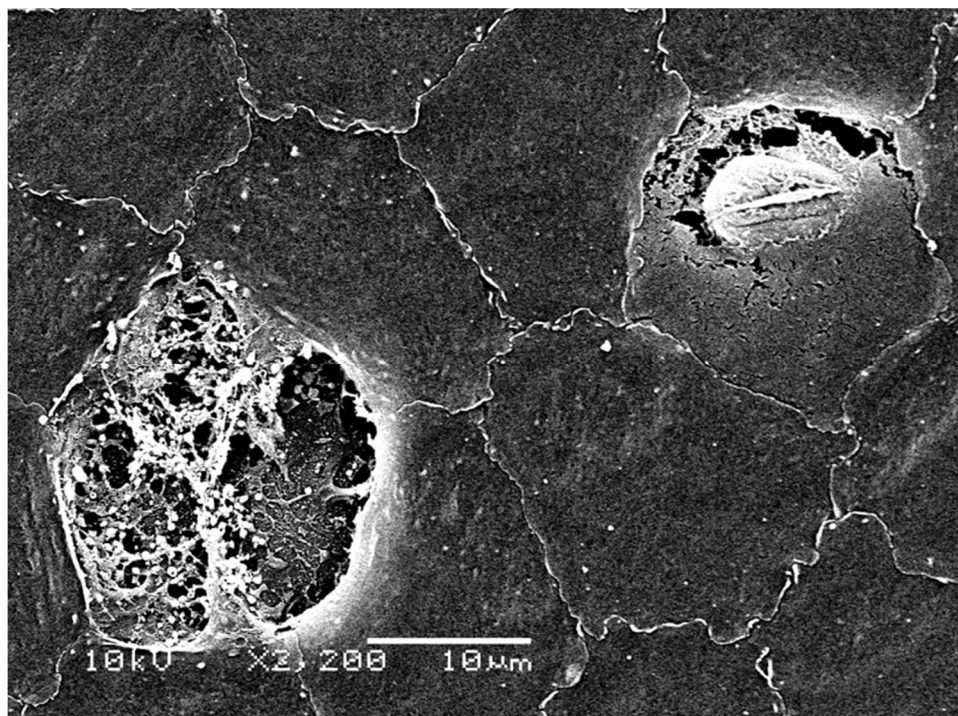


Figure 8 – SEM photomicrograph in higher magnification (x2200). Membrane cell disruption localized in 2 cells of control group.



## REFERENCES

- ANDREW, S.E.; RAMSEY, D. T.; HAUPTMAN, J. G.; BROOKS, D.E. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 479-482, 2001.
- BERCHT, B.S.; ALBUQUERQUE, L.; ARAUJO, A.C.P.; PIGATTO, J.A.T. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Vet. Ophthalmol.*, v. 18, p. 137-142, 2015.
- BROOKS, D.E. Phacoemulsification cataract surgery in the horse. *Clin. Tech. Equine Pract.*, v.4, p. 11-20, 2005.
- CHANG, Y.S.; TSENG, S.Y.; TSENG, S.H. et al. Comparison of dyes for cataract surgery Part 1: Cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. *J. Cataract Refrac. Surg.*, v. 31, p. 792-798, 2005.
- DADA, V.K.; SHARMA, N.; SUDAN, R. et al. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: Comparative clinical study. *J. Cataract Refrac. Surg.*, n. 30, p. 326–333, 2004.
- DOUGHTY, M.J., BERGMANSON, J.P., 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*, v.29, n.5, p.533-47, 1997.
- EGGELING, P.; PLEYER, U.; HARTMANN, C. et al. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. *J. Cataract Refrac. Surg.*, n. 6, p. 1403-1408, 2000.
- GALLAGHER, B. C. Primary cilia of corneal endothelium. *Am. J. Anatomy*, v. 159, n. 4, p. 475-484, 1980.
- HISATOMI, T.; ENAIDA, H.; MATSUMOTO, H. et al. Staining Ability and Biocompatibility of Brilliant Blue G. *Arch. of Ophthalmol.*, V.124, P. 514-519, 2006.
- HOLLEY, G. P.; ALAM, A.; KIRI, A. et al. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability: An in vitro study. *J. Cataract Refrac. Surg.*, v. 28, p. 1027-1033, 2002.
- JACOBS, D.S.; COX, T.A.; WAGONER, M.D. et al. Capsule Staining as an Adjunct to Cataract Surgery. *Ophthalmol.*, v. 113, p.707–713, 2006.
- JOYCE, N.C. Proliferative capacity of corneal endothelium. *Progress in Ret. Eye Res.*, v. 22, p. 359-389, 2003.

- LANDRY, H.; AMINIAN, A.; HOFFART, L. et al. Corneal toxicity of air and SF6. *Invest. Ophthalmol.; Vis. Sci.*, v. 52, n. 5, p. 2279-2286, 2011.
- LANDSHMAN, N.; DEN-HANA, I.; ASSIA, E. et al. Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol.; Vis. Sci.*, v. 29, n. 7, p. 1100-1109, 1988.
- LEDBETTER, E.C.; SCARLETT, J.M. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Vet. Ophthalmol.*, v.12, s.1, p. 57–64, 2009.
- MATTHEWS, A.G. Lens opacities in the horse: a clinical classification. *Vet. Ophthalmol.*, v.3, p. 65-71, 2000.
- McMULLEN, R.J., UTTER, M.E. Current developments in equine cataract surgery. *Equine Vet. J.*, v.37, p. 38-45, 2010.
- McMULLEN, R.J.; DAVIDSON, M.G.; CAMPBELL, N.B. et al. Evaluation of 30- and 25-diopter intraocular lens implants in equine eyes after surgical extraction of the lens. *Am. J. Vet. Res.* V.71, p. 809–816, 2010.
- MILLICHAMP, N.J.; DZIEZYC, J. Cataract phacofragmentation in horses. *Vet. Ophthalmol.*, v.3, p.157-164, 2000.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. “Generalized Linear Models”. *J. Royal Statistical Soc.*, n. 3, p. 135, 1972.
- PANDEY, S.K.; WERNER, L.; ESCOBAR-GOMEZ, M. et al. Dye-enhanced cataract surgery - Part 1: Anterior capsule staining for capsulorhexis in advanced/white cataract. *J. Cataract Refrac. Surg.*, v. 26, p. 1052–1059, 2000.
- PIGATTO, J.A.T.; FRANZEN, A.A.; PEREIRA, F.Q. et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Cienc. Rural*, v. 39, n. 3, p. 926-92, 2009.
- PIGATTO, J. A. T.; LAUS, J. L.; SANTOS, J. M. et al. Corneal edothelium of magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J. Zoo Wildlife Med.*, v.36, n.4, p.702-705, 2005.
- PIPPARELLI, A.; THURET, G.; TOUBEAU, D. et al. Pan-corneal endothelial viability assessment: Application to endothelial grafts pre-dissected by eye banks. *Invest. Ophthalmol.; Vis. Sci.*, v. 52, p. 6018-6025, 2011.
- SAAD, H. S.; TERRY, M. A.; SHAMIE, N. et al. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye stain and Adobe Photoshop software. *Cornea*, v. 27, p. 818-824, 2008.

- TAYLOR, M. J.; HUNT, C. J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br. J. Ophthalmol.*, v. 65, p. 815-819, 1981.
- TERRY, M. A.; SAAD, H. A.; SHAMIE, N. et al. Endothelial keratoplasty: The influence of insertion techniques and incision size on donor endothelial survival. *Cornea*, v. 28, p. 24-31, 2009.
- TRIVEDI, R.H.; WERNER, L.; APPLE, D. J. et al. Viscoanesthesia Part I: Toxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. *J. Cataract Refrac. Surg.*, v.29, p.550 –555, 2003.
- TUFT, S.J., COSTER, D.J. The corneal endothelium. *Eye*, v.4, p.389-424, 1990.
- UDAONDO, P.; DÍAZ-LLOPIS, M.; SALOM, D. et al. Brilliant blue G-assisted capsulorhexis: a good help for phacoemulsification surgeons in training. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, v. 82, p. 471-472, 2007.
- VAN DOOREN, B.T.H, BEEKHUIS, W.H., PELS, E. Biocompatibility of Trypan Blue with human corneal cells. *Arch. Ophthalmol.*, v.122, p. 736-742, 2004.
- WILCOCK, B.P.; BROOKS, D.E.; LATIMER, C.A. Glaucoma in horses. *Vet. Pathol.*, v.28, p.74-78, 1991.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Após a coloração com vermelho de Alizarina e Azul de tripano, utilizando-se microscópio óptico, foi possível visualizar, fotografar e avaliar áreas com perda celular no endotélio da córnea de equinos.

Com a microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a ultraestrutura das células endoteliais dos equinos e realizar a avaliação qualitativa do efeito do corante Azul brilhante no endotélio da córnea.

A exposição ao corante Azul brilhante 0,05% por 1 minuto não provocou danos ao endotélio da córnea de equinos comparado a solução salina balanceada.



## REFERÊNCIAS

- ABIB, F.C. **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 140 p., 2000.
- ALBUQUERQUE, L.; FREITAS, L.V.R.P.; PIGATTO, J.A.T. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 4199-4206, 2015.
- ANDREW, S. E.; WILLIS, A. M.; ANDERSON, D. E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 3, p. 326-329, 2002.
- ANDREW, S.E.; RAMSEY, D. T.; HAUPTMAN, J. G.; BROOKS, D.E. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 479-482, 2001.
- ARMITAGE, W. J.; MOSS, S. J.; EASTY, D. L. Effect of osmotic stress on rabbit corneal endothelium. **Cryobiology**, v. 25, p. 425-439, 1988.
- BERCHT, B.S.; ALBUQUERQUE, L.; ARAUJO, A.C.P.; PIGATTO, J.A.T. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, p. 137-142, 2015.
- BOURNE, R.R.A., MINASSIAN, D.C., DART, J.K.G., ROSEN, P., KAUSHAL, S., WINGATE, N. Effect of Cataract Surgery on the Corneal Endothelium. **Ophthalmology**, v. 111, p. 679 – 685, 2004.
- BROOKS, D.E. Phacoemulsification cataract surgery in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, p. 11-20, 2005.
- CHANG, D.F. Trypan blue versus indocyanine green: a clinical comparison of these dyes for capsular staining. **Cataract and Refractive Surgery Today**, v. 3, p. 2-5, 2005.
- CHANG, Y.S; TSENG, S.Y; TSENG, S.H. Comparison of dyes for cataract surgery: Part 2: Efficacy of capsule staining in a rabbit model. **Journal of Cataract Refractive Surgery**, v.31, p.799–804, 2005.
- COLLIN, S.P.; COLLIN, H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 81, p. 245-254, 1998.
- DADA, V.K.; SHARMA, N.; SUDAN, R.; SETHI, H.; DADA, T.; PANGTEY, M.S. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: Comparative clinical study. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, n. 30, p. 326–333, 2004.
- DÍAZ-VALLE, D.; SANCHEZ, C.; CASTILLO, A.; MORICHE, M. Endothelial damage with cataract surgery techniques. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 24, p. 951-955, 1998.
- DIB, E., RODRIGUES, E.B., MAIA, M., MEYER, C.H., PENHA, F.M., FURLANI, B.A., COSTA, E.P.F., FARAH, M.E. Corantes vitais em cromovitrectomia. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72, n. 6, p. 845-50, 2009.
- DOUGHTY, M. J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: A review of techniques and their application. **Optometry and Visual Science**, v. 66, n. 9, p. 626-642, 1989.

- DOUGHTY, M.J., BERGMANSON, J.P., 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**, v. 29, n. 5, p. 533-47, 1997.
- EDELHAUSER, H. F. The balance between corneal transparency and edema. **Investigative Ophthalmology; Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 1755-1767, 2006.
- EDELHAUSER, H. F.; HANNEKEN A.M.; PEDERSON H.J.; VAN HORN D.L. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v. 99, p. 1281-1287, 1981.
- EGGELING, P.; PLEYER, U.; HARTMANN, C.; RIEK, P. W. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, n. 6, p. 1403-1408, 2000.
- FARAH, M.E.; RODRIGUES, E.B.; MAIA, M. Dyes in Ocular Surgery: Principles for Use in Chromovitrectomy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, p. 332-340, 2009.
- FARIAS, R. J. M.; KUBOKAWA, K.M.; SCHIRMER, M.; SOUSA, L.B. Avaliação de córneas doadoras em lâmpada de fenda e microscopia especular durante o período de armazenamento. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, 2007.
- FIFE, T.M.; GEMENSKY-METZLER, A.J.; WILKIE, D.A.; COLITZ, C.M.H.; BRAS, I.D.; KLAGES, D.C. Clinical features and outcomes of phacoemulsification in 39 horses: a retrospective study (1993-2003). **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 5, p. 361-368, 2006.
- FISCHER, A.F.C.; PIRES, E.M.E.; KLEIN, F.; SIQUEIRA BISNETO, O.; SORIANO, E.S.; MOREIRA, H. Programa de ensino de facoemulsificação CBO/ALCON: resultados do Hospital de Olhos do Paraná. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 6, p. 517-20, 2010.
- FRANZEN, A.A.; PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C.; ALBUQUERQUE, L.; LAUS, J.L. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 4, p. 222-226, 2010.
- GEROSKI, D.H.; EDELHAUSER, H.F. Quantitation of Na/K ATPase Pump Sites in the Rabbit Corneal Endothelium. **Investigative Ophthalmology; Visual Science**, v. 25, p. 1056-1060, 1984.
- GILGER, B.C. Preface. In: \_\_\_\_\_ **Equine Ophthalmology**. 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Saunders, 2010.
- GWIN, R.M.; LERNER, I.; WARREN, J.K.; GUM, G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age. **Investigative Ophthalmology; Visual Science**, v. 22, p. 267-271, 1982.
- HISATOMI, T.; ENAIDA, H.; MATSUMOTO, H.; KAGIMOTO, T.; UENO, A.; HATA, Y.; KUBOTA, T.; GOTO, Y.; ISHIBASHI, T. Staining Ability and Biocompatibility of Brilliant Blue G. **Archives of Ophthalmology**, v. 124, p. 514-519, 2006.
- IDE, T.; YOO, S.H.; GOLDMAN, J.M.; PEREZ, V.; O'BRIEN, T.P. Descemet-Stripping Automated Endothelial Keratoplasty Effect of Inserting Forceps on DSAEK

Donor Tissue Viability by Using an In Vitro Delivery Model and Vital Dye Assay. **Cornea**, v. 26, p. 1079-1081, 2007.

JACOBS, D.S.; COX, T.A.; WAGONER, M.D.; ARIYASU, R.G.; KARP, C.L. Capsule Staining as an Adjunct to Cataract Surgery. **Ophthalmology**, v. 113, p. 707–713, 2006.

JOYCE, N.C. Proliferative capacity of corneal endothelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 359-389, 2003.

LAING, R.A.; SANDSTROM, M.M.; LEIBOWITZ, H.M. Clinical specular microscopy: qualitative evaluation of corneal endothelial microphotographs. **Archives of Ophthalmology**, v. 97, p. 1720-25, 1979.

LAING, R.A.; SANDSTROM, M.M.; LEIBOWITZ, H.M.; BERROSPIA, A.M. Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental Eye Research**, v. 22, n. 6, p. 587-594, 1976.

LANDRY, H.; AMINIAN, A.; HOFFART, L.; NADA, O.; BENSOUOLA, T.; PROULX, S.; CARRIER, P.; GERMAIN, L.; BRUNETTE, I. Corneal toxicity of air and SF6. **Investigative Ophthalmology; Visual Science**, v. 52, n. 5, p. 2279-2286, 2011.

LEAMING, D.V. Practice styles and preferences of American Society of Cataract and Refractive Surgery Members - 1994 survey. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 21, p. 378-385, 1996.

LEDBETTER, E.C.; SCARLETT, J.M. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 1, p. 57–64, 2009.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo agronegócio cavalo. **CEPEA/ESALQ/USP**, 2006. Disponível em: [http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo\\_completo.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo_completo.pdf)

LINEBARGER E.J., HARDTEN, D.R., SHAH, G.K., LINDSTROM, R.L. Phacoemulsification and Modern Cataract Surgery. **Survey Ophthalmology**, v. 44, p. 123–147, 1999.

MALISKA, A.M. **Microscopia eletrônica de varredura**. Apostila, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013. Disponível em: [http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf)

MATSUDA, M., SUDA, T., MANABE, R. Serial alterations in endothelial cell shape and pattern after intraocular surgery. **American Journal of Ophthalmology**, v. 98, p. 313–319, 1984.

MATTHEWS, A.G. Lens opacities in the horse: a clinical classification. **Veterinary Ophthalmology**, v.3, p. 65-71, 2000.

MCCAREY, B.E.; EDELHAUSER, H.F.; LYNN, M. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive produces, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. **Cornea**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2008.

McMULLEN, R.J., UTTER, M.E. Current developments in equine cataract surgery. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 38-45, 2010.

MELLES, G.R.J., WAARD, P.W.T., PANTEYER, J.H., BEEKHUIS, H. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 25, p. 7-9, 1999.

- MILLER, P.E.; MURPHY, C.J. Equine Vision. In: \_\_\_\_\_ **Equine Ophthalmology**. 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Saunders, 2010.
- MILLICHAMP, N.J.; DZIEZYC, J. Cataract phacofragmentation in horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p. 157-164, 2000.
- MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. **American Journal of Ophthalmology**, v. 93, n. 1, p. 1-29, 1982.
- MOHAMMADPOUR, M.; ERFANIAN, R.; KARIMI, N. Capsulorhexis: Pearls and pitfalls. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 26, p. 33-40, 2012.
- PANDE, M., SPALTON, D.J., MARSHALL, J. Continuous curvilinear capsulorhexis and intraocular lens biocompatibility. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 22, p. 89-97, 1996.
- PANDEY, S.K.; WERNER, L.; ESCOBAR-GOMEZ, M.; ROIG-MELO, E.A.; APPLE, D.J. Dye-enhanced cataract surgery - Part 1: Anterior capsule staining for capsulorhexis in advanced/white cataract. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 26, p. 1052-1059, 2000.
- PEIFFER, R. L.; DEVANZO, R. J.; COHEN, K. L. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 5, p. 854-855, 1981.
- PIGATTO, J.A.T. LAUS, J.L.; SANTOS, J. M.; CERVA, C.; CUNHA, L.S.; RUOPPOLO, V.; BARROS, P.S.M. Corneal Endothelium of Magellanic Penguin (*Spheniscus Magellanicus*) by scanning electron microscopy. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 4, p. 702-705, 2005.
- PIGATTO, J.A.T., PEREIRA, F.Q., ALMEIDA, A.C.V.R, MENEZES, L.M., ALBUQUERQUE, L., FRANZEN, A.A. Avanços e benefícios da facoemulsificação. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, s. 2, p. 248-249, 2007.
- PIGATTO, J.A.T.; ABIB, F.C.; PEREIRA, G.T.; BARROS, P.S.M.; FREIRE, C.D.; LAUS, J.L. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 476-480, 2006.
- PIGATTO, J.A.T.; ANDRADE, M.C.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; BROOKS, D.E.; GUEDES, P.M; BARROS, P.S.M. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 3, p. 205 -208, 2004.
- PIGATTO, J.A.T.; CERVA, C.; FREIRE, C.D; ABIB, F.C.; BELLINI, L.P.; BARROS, P.S.M.; LAUS, J.L. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 427-430, 2008.
- PIGATTO, J.A.T.; FRANZEN, A.A.; PEREIRA, F.Q.; ALMEIDA, A.C.V.R.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; GUEDES, GUEDES, P.M.; BARROS, P.S.M. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 926-929, 2009.
- PIPPARELLI, A.; THURET, G.; TOUBEAU, D. HE, Z.; PISELLI, S.; LEFÉVRE, S.; GAIN, P.; MURAINÉ, M. Pan-corneal endothelial viability assessment: Application to endothelial grafts predissected by eye banks. **Investigative Ophthalmology; Visual Science**, v. 52, p. 6018-6025, 2011.

- PRASAD, S. Phacoemulsification learning curve: Experience of two junior trainee ophthalmologists. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.24, n.1, p.73-77, 1998.
- RODRIGUES, E. B.; MAIA, M.; MEYER, C. H.; PENHA, F. M.; DIB, E.; FARAH, M.E. Vital Dyes for Chromovitrectomy. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 18, p. 179-187, 2007.
- RODRIGUES, E. B.; PENHA, F.M. COSTA, E. F.; MAIA, M.; DIB, E.; MORAES, M.; MEYER, C. H.; MAGALHÃES, O.; MELO, G. B.; STEFANO, V.; DIAS, A. B.; FARAH, M.E. Ability of New Vital Dyes to Stain Intraocular Membranes and Tissues in Ocular Surgery. **American Journal of Ophthalmology**, v. 149, p. 265-277, 2010.
- RODRIGUES, E.B; COSTA, E.F.; PENHA, F.M.; MELO, G.B.; BOTTÓS, J.; DIB, E.; FURLANI, B.; LIMA, V.C.; MAIA, M.; MEYER, C.H.; HÖFLING-LIMA, A.L.; FARAH, M.E. The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. **Survey of Ophthalmology**, v. 54, n. 5, p. 576-617, 2009.
- RODRIGUES, G.N.; LAUS J.L.; SANTOS J.M.; RIGUEIRO M.P; SMITH R.L. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, p. 101-107, 2006.
- SAAD, H. S.; TERRY, M. A.; SHAMIE, N.; CHEN, E.S.; FRIEND, D.J.; HOLIMAN, J.D.; STOEGER, C. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye stain and Adobe Photoshop software. **Cornea**, v. 27, p. 818-824, 2008.
- SACU, S.; MENAPACE, R.; BUEHL, W.; RAINER, G.; FINDL. O. Effect of intraocular lens optic edge design and material on fibrotic capsule opacification and capsulorhexis contraction. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 30, p. 1875-1882, 2004.
- SCHUTTEN W.H., VAN HORN D.L. Corneal endothelial cell shrinkage after critical point drying. **Annals of Ophthalmology**, v.12, n.10, p.1165-1172, 1980.
- SLATTER, D.H. Cornea and Sclera. In: \_\_\_\_\_ **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4<sup>th</sup> ed. Missouri: Saunders, p. 175-202, 2005.
- SOUZA, E.V.; RODRIGUES, M.L.V.; SOUZA, N.V. **História da cirurgia da catarata**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 587-590, 2006.
- SPENCE, D.J.; PEYMAN, G.A. A new technique for the vital staining of the corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology**, v. 15, n. 12, p. 1001-1002, 1976.
- TAYLOR, M. J.; HUNT, C. J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v. 65, p. 815-819, 1981.
- TERRY, M. A.; SAAD, H. A.; SHAMIE, N.; CHEN, E.S.; PHILLIPS, P.M.; FRIEND, D.J.; HOLIMAN, J.D.; STOEGER, C. Endothelial keratoplasty: The influence of insertion techniques and incision size on donor endothelial survival. **Cornea**, v. 28, p. 24-31, 2009.
- TOWNSEND, W.M., JACOBI, S., BARTOE, J.T. Phacoemulsification and implantation of foldable+14 diopter intraocular lenses in five mature horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 238-243, 2012.

- TRIVEDI R.H., WERNER, L., APPLE, D.J., IZAK, A.M., PANDEY, S.K., MACKY, T.A. Viscoanesthesia Part I: Toxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 29, p. 550–555, 2003.
- TUFT, S.J., COSTER, D.J. The corneal endothelium. **Eye**, v. 4, p. 389-424, 1990.
- UDAONDO, P.; DÍAZ-LLOPIS, M.; SALOM, D.; GARCÍA-DELPELCH, S.; CERVERA, E. Brilliant blue G-assisted capsulorhexis: a good help for phacoemulsification surgeons in training. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v. 82, p. 471-472, 2007.
- VAN DOOREN, B.T.H, BEEKHUIS, W.H., PELS, E. Biocompatibility of Trypan Blue With Human Corneal Cells. **Archives of Ophthalmology**, v. 122, p. 736-742, 2004.
- WALKOW, T.; ANDERS, N.; KLEBE, S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: Relation to preoperative and intraoperative parameters. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 26, p. 727-732, 2000.
- WARING, G. O.; BOURNE, W. M.; EDELHAUSER, H. F.; KENYON, H. F. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. **Ophthalmology**, v.89, p.531-590, 1982.
- WARREN, C. Phaco chop technique for cataract surgery in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7 p. 348–351, 2004.
- YEE, R. W.; EDELHAUSER, H. F.; STERN, M. E. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. **Experimental Eye Research**, v. 44, p. 703-714, 1987.