

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE SUÍNOS
(*Sus scrofa domesticus*) UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR**

EDUARDA VALIM BORGES DE VARGAS

PORTO ALEGRE

2022

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

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE SUÍNOS
(*Sus scrofa domesticus*) UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR

Autor: Eduarda Valim Borges de Vargas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2022

CIP - Catalogação na Publicação

de Vargas, Eduarda Valim Borges
AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÔRNEA DE SUÍNOS (Sus
scrofa domesticus) UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR
/ Eduarda Valim Borges de Vargas. -- 2022.
44 f.
Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Endotélio corneano. 2. Morfologia endotelial. 3.
Suínos. I. Pigatto, João Antonio Tadeu, orient. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Ingrida e Cláudio, por serem minhas inspirações e por sempre me apoiarem. Nada disso seria possível se vocês não estivessem comigo. Gratidão eterna a vocês!

À minha vó Maria, que nos deixou recentemente, mas que sempre será uma referência de mulher batalhadora. Obrigada por ter sido fonte de amor, cuidado e carinho. Espero que esteja orgulhosa de mim.

Ao meu namorado, Gabriel, obrigada por toda ajuda nesses últimos meses. Obrigada por estar do meu lado sempre disposto a ajudar de alguma forma.

Aos meus filhos de 4 patas, Vida e Woody, que estão sempre junto comigo. É o amor por eles que fez minha trajetória na medicina veterinária começar.

À minha companheira nesses últimos dois anos, Renata, obrigada pela parceria que tivemos. Obrigada por toda ajuda com pacientes, cirurgias, projetos. Tenho certeza de que nossa amizade continuará mesmo fora da UFRGS. Conta sempre comigo.

Ao meu orientador, professor João Pigatto, obrigada pelas inúmeras oportunidades desde quando comecei como estagiária do SOV-UFRGS. Meu caminho na oftalmologia e na pesquisa só foi possível graças a sua orientação. Obrigada por todos os ensinamentos e por acreditar em mim.

À equipe do SOV-UFRGS, pós-graduandas e estagiários, obrigada por tornarem a nossa rotina mais leve. Obrigada por todas as trocas de experiências. Contem comigo para o que precisarem.

À Faculdade de Veterinária-UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e ao Hospital de Clínicas Veterinárias-UFRGS, obrigada pelas oportunidades e pelo ambiente de aprendizado e crescimento.

À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa. À indústria de alimentos Avisui pela doação dos olhos utilizados no estudo.

A todos os pacientes que passaram por mim, obrigada por me mostrarem que eu estava no caminho certo. Minha dedicação aos estudos e empenho para me tornar uma profissional cada vez melhor é por vocês. Aos tutores desses animais, obrigada pela confiança.

Meus sinceros agradecimentos. Estou encerrando um ciclo de 10 anos na UFRGS e, ao olhar para trás, tenho muito orgulho da minha trajetória.

RESUMO

O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais justapostas que recobrem a superfície posterior da córnea. É uma estrutura fundamental para a manutenção da transparência corneana. A espécie suína é bastante empregada como modelo experimental na oftalmologia. No entanto, os estudos avaliando o endotélio da córnea com microscópio especular nessa espécie são escassos. Objetivou-se avaliar a densidade endotelial e o percentual de células hexagonais nas diferentes regiões do endotélio corneano de suínos utilizando a microscopia especular de contato. Foram estudados 24 bulbos oculares de 12 suínos (*Sus scrofa domesticus*), machos, com seis meses de idade e da raça Large White. A microscopia especular de contato foi realizada nas regiões central, superior, inferior, lateral e medial da córnea. A densidade endotelial média na região central foi de 1865 células/mm², na região superior foi de 1877,3 células/mm², na região inferior foi de 1854,9 células/mm², na região lateral foi de 1847 células/mm² e na região medial foi de 1831,7 células/mm². Na região central, a porcentagem média de células hexagonais foi de 53,3%, na região superior foi de 53,8%, na região inferior foi de 54,4%, na região lateral foi de 53,8%, na região medial foi de 53,7%. Não foram observadas diferenças significativas na densidade celular e na hexagonalidade nas diferentes regiões analisadas da córnea. Os valores da densidade endotelial e da hexagonalidade da região central do endotélio podem ser extrapolados para as demais regiões da córnea.

Palavras-chave: Endotélio corneano. Suíno. Morfologia endotelial.

ABSTRACT

*The corneal endothelium is a monolayer of juxtaposed polygonal cells that cover the posterior surface of the cornea. It is a fundamental structure for the maintenance of corneal transparency. The swine species is widely used as an experimental model in ophthalmology. However, studies evaluating the corneal endothelium with a specular microscope in this species are scarce. The objective was to evaluate the endothelial density and cell morphology of different regions of the porcine corneal endothelium using specular contact microscopy. Twenty-four eyeballs from 12 male, six-month-old, Large White pigs (*Sus scrofa domesticus*) were studied. Contact specular microscopy was performed in the central, superior, inferior, lateral and medial regions of the cornea. The mean endothelial density in the central region was 1865 cells/mm², in the upper region it was 1877.3 cells/mm², in the lower region it was 1854.9 cells/mm², in the lateral region it was 1847 cells/mm² and in the medial was 1831.7 cells/mm². In the central region, the average percentage of hexagonal cells was 53.3%, in the upper region it was 53.8%, in the lower region it was 54.4%, in the lateral region it was 53.8%, in the medial region was 53.7%. No significant differences were observed in cell density and hexagonality in the different analyzed regions of the cornea. The endothelial density and hexagonal values of the central region of the endothelium can be extrapolated to the other regions of the cornea.*

Keywords: Corneal endothelium. Swine. Endothelial morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotomicrografia especular do endotélio corneano de um suíno com seis meses de idade..... 29

Figura 2 - Fotomicrografia especular da região superior do endotélio corneano de um suíno com seis meses de idade, com densidade de 1842 células/mm²..... 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores médios da densidade celular endotelial (células/mm²) e desvio padrão de células endoteliais das regiões central, superior, inferior, lateral e medial nos olhos direito e esquerdo de suínos utilizando a microscopia especular de contato..... 30
- Tabela 2** - Valores médios, com intervalo de confiança de 95%, da densidade celular endotelial (células/mm²) das regiões central, superior, inferior, lateral e medial de olhos de suínos utilizando a microscopia especular de contato..... 31
- Tabela 3** - Porcentagens média, com intervalo de confiança de 95%, de células hexagonais em cada uma das cinco regiões analisadas..... 31
- Tabela 4** - Porcentagens média com valores de desvio padrão de células hexagonais em cada uma das cinco regiões analisadas nos olhos direito e esquerdo de suínos utilizando a microscopia especular de contato..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------|---|
| % | Por cento |
| ARVO | <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i> |
| céls/mm ² | Células por milímetro quadrado |
| DEC | Densidade endotelial central |
| DEI | Densidade endotelial inferior |
| DEL | Densidade endotelial lateral |
| DEM | Densidade endotelial medial |
| DES | Densidade endotelial superior |
| et al. | E outros |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| Mm | Milímetros |
| mm ² | Milímetros quadrados |
| RC | Região central |
| RI | Região inferior |
| RL | Região lateral |
| RM | Região medial |
| RS | Região superior |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| µm | Micrômetro |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 | Anatomofisiologia corneana | 13 |
| 2.2 | Cicatrização corneana | 14 |
| 2.3 | Endotélio corneano | 15 |
| 2.3.1 | Métodos de avaliação do endotélio corneano | 18 |
| 2.3.1.1 | Microscopia especular | 18 |
| 2.3.1.2 | Microscopia confocal | 20 |
| 2.3.1.3 | Microscopia óptica com uso de corantes vitais | 20 |
| 2.3.1.4 | Microscopia eletrônica de varredura | 21 |
| 2.3.2 | Parâmetros endoteliais | 22 |
| 3 | ARTIGO: Avaliação do endotélio da córnea de suínos (<i>Sus scrofa domesticus</i>) utilizando a microscopia especular | 24 |
| | Resumo | 25 |
| | Introdução | 27 |
| | Materiais e métodos | 28 |
| | Resultados | 29 |
| | Discussão e conclusão | 32 |
| | Referências | 36 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 39 |
| | REFERÊNCIAS | 40 |

1 INTRODUÇÃO

A córnea, juntamente com a esclera, faz parte da túnica fibrosa ou túnica externa do bulbo do olho. Essas estruturas são responsáveis pela manutenção estrutural do bulbo ocular e proteção. A região de transição entre elas é chamada de limbo. A principal função da córnea é a refração de raios luminosos e, quando hígida, é lisa, transparente e esférica. Na maioria das espécies, é constituída por cinco camadas: filme lacrimal pré-corneano, epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (POWER; NEVES, 2005; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

O endotélio é a camada mais interna da córnea e fica em contato direto com o humor aquoso (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003). Na maioria das espécies o formato predominante das células endoteliais é hexagonal, formando uma estrutura regular e estável, com pouca variação no tamanho celular. Em algumas espécies já estudadas também foram identificadas células com quatro, cinco, sete e oito lados (PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017).

A densidade celular endotelial diminui com o avanço da idade (TUFT; COSTER, 1990; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017). Essa perda celular ocorre de forma mais intensa nos primeiros anos de vida devido ao aumento do olho e ao desenvolvimento corneano. O endotélio é uma camada com capacidade mínima de regeneração na maioria das espécies. Em humanos, a densidade celular média é de 3500 a 4000 células/mm² em recém-nascidos e de 2500 células/mm² em adultos (TUFT; COSTER, 1990).

Além da idade, outros fatores também podem reduzir a densidade endotelial abaixo do limite mínimo para a manutenção do estado de deturgescência da córnea. Traumas mecânicos, inflamação intraocular, hipertensão ocular e procedimentos cirúrgicos intraoculares poderão levar a alteração dos parâmetros endoteliais (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Quando ocorre a perda celular, a reposição normalmente acontece pela mudança de tamanho das células endoteliais adjacentes à área lesionada (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003). Nos suínos, as células endoteliais que estão na margem da lesão perdem seu formato hexagonal e variam de tamanho. Elas arranjam-se de forma irregular para cobrir a lesão e pode ocorrer mitose concomitante (ILMONEN *et al.*, 1984). Quando a perda celular ultrapassa a capacidade de compensação, o resultado é o edema de córnea que pode levar à perda da visão. A descompensação e a incapacidade de remover água do estroma acontecem quando a

densidade celular está abaixo de 500 a 800 células/mm² (JOYCE, 2003; MAGGS, 2018; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

A espécie suína já é bastante empregada como modelo experimental na oftalmologia (HASHIMOTO; KUROSAKA; UETSUKI, 2001; KERMANI; OBERHEIDE, 2008; NICHOLLS *et al.*, 2009; HEICHEL *et al.*, 2011; HEICHEL *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; GROS-OTERO *et al.*, 2019). No entanto, os estudos avaliando a morfologia e a morfometria do endotélio corneano dessa espécie são escassos (COLLIN; COLLIN, 1998; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014). Alguns autores defendem as semelhanças estruturais e comportamentais das células endoteliais corneanas dessa espécie com o homem, possibilitando que resultados obtidos em estudos possam ser correlacionados. Essas similaridades permitem que o suíno sirva de modelo experimental em trabalhos acerca do transplante de córnea (ZENG *et al.*, 2001; HARA; COOPER, 2011; FUJITA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014).

O xenotransplante da córnea suína para humanos que necessitam de ceratoplastia completa mostra-se promissor como uma estratégia terapêutica potencial para restaurar a visão em indivíduos com afecções corneanas avançadas (LEE *et al.*, 2014; ABHARI *et al.*, 2018). Objetivou-se avaliar a densidade endotelial e o percentual de células hexagonais nas diferentes regiões do endotélio corneano de suínos utilizando a microscopia especular de contato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomofisiologia corneana

A córnea, juntamente com a esclera, faz parte da túnica fibrosa ou túnica externa do olho. Essas estruturas são responsáveis pela manutenção estrutural do bulbo ocular e proteção. A região de transição entre elas é chamada de limbo. A principal função da córnea é a refração de raios luminosos e, quando hígida, é lisa, transparente e esférica. Na maioria das espécies, é constituída por cinco camadas: filme lacrimal pré-corneano, epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (POWER; NEVES, 2005; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

O filme lacrimal, embora não seja visível ao corte histológico, é uma camada que recobre a córnea e a conjuntiva. É constituído por três camadas: lipídica, aquosa e mucosa. Suas funções são fornecer oxigênio e nutrientes para a córnea, assim como lubrificá-la, remover corpos estranhos da superfície ocular juntamente com as pálpebras e suprir proteínas antimicrobianas (DUBIELZIG *et al.*, 2010; MAGGS, 2018).

O epitélio é do tipo estratificado, escamoso e não queratinizado. É formado por cinco a sete camadas de células poliédricas ancoradas em uma membrana basal, responsável pela adesão do mesmo ao estroma adjacente (TUFT; COSTER, 1990; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

O estroma representa aproximadamente 90% da espessura corneana e é formado por lamelas de fibras colágenas organizadas de forma paralela entre si. Essa organização é fundamental para manutenção da transparência corneana e é o que diferencia o estroma do colágeno existente no tecido cicatricial e na esclera (DUBIELZIG *et al.*, 2010).

A membrana de Descemet é considerada a membrana basal do endotélio e possui propriedades elásticas. Suas fibras têm pouca resistência e, em casos de descemetocelose, essa camada fica protusa (MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

A última e mais interna camada da córnea é o endotélio, constituído por uma monocamada de células poligonais, sendo na maioria das espécies o formato hexagonal predominante. É a camada que tem maior responsabilidade pela manutenção do estado de deturgescência da córnea, fundamental para sua transparência (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003). As células endoteliais são o principal local da “bomba de fluidos”, a qual movimentada água do estroma para o humor aquoso contra o gradiente de pressão intraocular, forçando água para interior da córnea (JOYCE, 2003; DUBIELZIG *et al.*, 2010; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Além do estado de deturgescência constante e da organização paralela das fibras de colágeno do estroma, a transparência corneana deve-se à ausência de vascularização, de células sanguíneas e de pigmentação e à superfície lisa fornecida pelo filme lacrimal (DUBIELZIG *et al.*, 2010; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Por ser avascular, o suprimento de oxigênio é dado pelo humor aquoso, pelo filme lacrimal pré-corneano, pelos capilares da conjuntiva palpebral e pelo plexo capilar límbico. O metabolismo da glicose é a principal fonte de energia (MAGGS, 2018; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

O epitélio também é importante para esse controle de água e, juntamente com o endotélio, contém grandes quantidades de Na⁺ e K⁺ ativados pela ATPase, associados à bomba de sódio. Se o epitélio for removido, água entra no estroma a partir do filme lacrimal pré-corneano, levando à uma grave tumefação até que haja a regeneração epitelial e o equilíbrio de fluido seja restabelecido (POWER; NEVES, 2005; DUBIELZIG *et al.*, 2010).

A inervação da córnea tem origem no quinto par craniano que se ramifica e origina os ramos sensitivos não mielinizados dos nervos ciliares curto e longo. Os receptores de sensibilidade são encontrados no estroma e na camada basal do epitélio e as suas terminações nervosas situam-se na superfície epitelial (MILLER, 2001; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

2.2 Cicatrização corneana

A cicatrização da córnea depende da profundidade da lesão. Em úlceras superficiais, a cicatrização inicia-se pelo movimento das células epiteliais adjacentes à lesão. Elas perdem suas aderências hemidesmossômicas e migram para a área ulcerada (MILLER, 2001). O epitélio possui uma capacidade de regeneração através de um equilíbrio constante entre células perdidas e células renovadas. As células epiteliais são a base do processo de mitose e o epitélio basal do limbo é o reservatório das células germinativas epiteliais. Esse dinamismo é mediado pelo sistema nervoso simpático, fatores de crescimento, hormônios e mensageiros bioquímicos. No período de cinco a sete dias, a mitose das células epiteliais é completa, restaurando a arquitetura normal do epitélio (MILLER, 2001; DUBIELZIG *et al.*, 2010; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Em injúrias mais profundas, que atingem o estroma corneano, a cicatrização é mais complexa. Essa camada possui um estado metabólico relativamente inativo. Primeiro, a lesão é recoberta por um tampão de fibrina e, posteriormente, polimorfonucleares chegam na região

lesionada através do filme lacrimal e a partir da migração estromal, fazendo a remoção de debris celulares. Após 24 horas, as células adjacentes começam a migrar até a borda da lesão e começa a secreção de colágeno. O colágeno depositado sofre remodelação, porém não recupera a sua organização inicial (MILLER, 2001; POWER; NEVES, 2005; MAGGS, 2018).

Quando ocorre o rompimento da membrana de Descemet, uma camada elástica, seus bordos se retraem e se enrolam. Forma-se um tampão de fibrina na tentativa de tamponar a lesão. Poucas horas depois, as células endoteliais aumentam de tamanho e ficam tumefeitas, podendo permanecer aumentadas ou podendo ocorrer sobreposição celular. Células epiteliais da conjuntiva migram até a ferida e assumem o padrão de células epiteliais corneanas. Ao longo de todo esse processo, ocorre inflamação crônica, neovascularização e formação de cicatrizes (MILLER, 2001; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Uma lesão de córnea torna-se complicada quando a cicatrização não ocorre em função de uma causa base não corrigida ou por invasão microbiana. A superfície ocular intacta é muito resistente a infecções, porém, quando há uma descontinuidade epitelial, permite a multiplicação de microrganismos (MILLER, 2001). Inicialmente, as defesas são por meio dos leucócitos polimorfonucleares. Se a invasão microbiana não for rapidamente controlada, ocorrem processos inflamatórios crônicos e uma cascata enzimática que degrada o colágeno corneano rapidamente. Isso poderá resultar em um quadro de *melting* corneano ou até mesmo a perfuração ocular (POWER; NEVES, 2005; MAGGS, 2018).

Na perfuração ocular, o humor aquoso acaba extravasando e pode levar a íris junto. O prolapso da íris e a formação de fibrina fazem um tampão e a visão pode ser perdida. O processo de reorganização é lento e dificilmente há restauração total da transparência corneana. As cicatrizes são classificadas conforme a densidade. A névoa possui uma opacidade leve, a mácula possui uma opacidade cinza bem definida e o leucoma possui uma opacidade branca e densa (MILLER, 2001; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

2.3 Endotélio corneano

O endotélio é a camada mais interna da córnea e fica em contato direto com o humor aquoso. É uma camada unicelular e suas células possuem cerca de 5µm de espessura e 20µm de diâmetro, são poligonais e com núcleo grande, achatado e ovalado (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003). Na maioria das espécies o formato predominante das células endoteliais é hexagonal, formando uma estrutura regular e estável, com pouca variação no tamanho celular. Também podem ser identificadas células com quatro, cinco, sete e oito lados (PIGATTO *et al.*,

2004; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017). Uma hexagonalidade 100% perfeita não é possível devido à senescência relacionada à idade e aos estresses ambientais (CHAURASIA; VANATHI, 2021).

Em razão da alta atividade metabólica, o citoplasma das células endoteliais é rico em organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e rugoso. Elas possuem bordos irregulares e são unidas umas às outras por intermédio da *zonula ocludens* e dos complexos juncionais, que podem ser do tipo *tight* ou *gap*. As ligações do tipo *tight* atuam na barreira entre o estroma e o humor aquoso; as do tipo *gap* são responsáveis pela comunicação intercelular (ABIB, 2000; JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005).

Na superfície posterior da célula endotelial são encontrados cílios, centralizados e direcionados para a câmara anterior. Essas estruturas já foram observadas em mamíferos, incluindo humanos, coelhos e macacos e, também em peixes e aves. Sua função parece estar relacionada à motilidade celular, osmorregulação, quimiorrecepção e/ou detecção de pressão (TUFT; COSTER, 1990).

A densidade celular endotelial diminui com o avanço da idade (TUFT; COSTER, 1990; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017). Essa perda celular ocorre de forma mais intensa nos primeiros anos de vida devido ao aumento do olho e ao desenvolvimento corneano. O endotélio é uma camada com capacidade mínima de regeneração na maioria das espécies. Em humanos, a densidade celular média é de 3500 a 4000 células/mm² em recém-nascidos e de 2500 células/mm² em adultos (TUFT; COSTER, 1990).

Além da idade, outros fatores também podem reduzir a densidade endotelial abaixo do limite mínimo para a manutenção do estado de deturgescência da córnea. Traumas mecânicos, inflamação intraocular, hipertensão ocular e procedimentos cirúrgicos intraoculares poderão levar a alterações dos parâmetros endoteliais (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

Quando ocorre a perda celular, a reposição normalmente acontece pela mudança de tamanho das células endoteliais adjacentes à área lesionada. Inicialmente, a lesão estimula as células vizinhas, que se achatam e deslizam para cobrir o defeito. As células lesionadas são descartadas para a câmara anterior (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003). Há uma quebra das ligações intercelulares e desenvolvimento de pseudópodos e, assim, as células são capazes de migrar, em média, 0,5 a 1 mm por dia. Essa movimentação é inibida pelo contato celular no centro da lesão. As células envolvidas nesse processo de migração possuem mais organelas e

menos vesículas endocíticas, não aparentando estarem cobertas por fibronectina (ABIB, 2000; MAGGS, 2018).

Nos suínos, as células endoteliais que estão na margem da lesão perdem seu formato hexagonal e variam de tamanho. Elas arranjam-se de forma irregular para cobrir a lesão e pode ocorrer mitose concomitante (ILMONEN *et al.*, 1984).

Quando a perda celular ultrapassa a capacidade de compensação, o resultado é o edema de córnea que pode levar à perda da visão. A descompensação e a incapacidade de remover água do estroma acontecem quando a densidade celular está abaixo de 500 a 800 células/mm² (JOYCE, 2003; MAGGS, 2018; MEEKINS; RANKIN; SAMUELSON, 2021).

A espécie suína já é bastante empregada como modelo experimental na oftalmologia (HASHIMOTO; KUROSAKA; UETSUKI, 2001; KERMANI; OBERHEIDE, 2008; NICHOLLS *et al.*, 2009; HEICHEL *et al.*, 2011; HEICHEL *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; GROS-OTERO *et al.*, 2019). No entanto, os estudos avaliando a morfologia e a morfometria do endotélio corneano dessa espécie são escassos (COLLIN; COLLIN, 1998; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014). Alguns autores defendem as semelhanças estruturais e comportamentais das células endoteliais corneanas dessa espécie com o homem, possibilitando que resultados obtidos em estudos possam ser correlacionados. Essas similaridades permitem que o suíno sirva de modelo experimental em estudos acerca do transplante de córnea (ZENG *et al.*, 2001; HARA; COOPER, 2011; FUJITA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014).

O xenotransplante da córnea suína para humanos que necessitam de ceratoplastia completa mostra-se promissor como uma estratégia terapêutica potencial para restaurar a visão em indivíduos com patologias corneanas avançadas (ABHARI *et al.*, 2018). Em muitos casos de perda da transparência da córnea, o transplante é a única opção curativa. Contudo, há um desequilíbrio entre a demanda e a oferta de córneas doadoras, sendo, atualmente, os doadores humanos falecidos a única fonte de enxertos corneanos. Dessa forma, estudos recentes trazem a possibilidade de xenotransplante utilizando córneas suínas (KIM *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2017; ISIDAN *et al.*, 2019).

Abhari e colaboradores (2018) caracterizaram a morfologia das córneas de suínos miniatura, que são menores em tamanho, de manejo mais fácil e mais econômicas em comparação com os suínos domésticos. Foram utilizados olhos de suínos miniatura de diferentes faixas etárias (1 mês, 2 meses, 4 meses e 8 meses) e de suínos domésticos de 24 meses de idade. Ambos exibiram morfologia corneana semelhante entre si e à espécie humana, com exceção da camada de Bowman, que está ausente nos suínos (ABHARI *et al.*, 2018).

Hwang e Kim (2009) mostraram que as córneas suínas são um pouco mais espessas do que as córneas humanas, porém consideraram que essa diferença não interferiu nos resultados obtidos (HWANG; KIM, 2009). Apesar de algumas distinções, como a presença da camada de Bowman na córnea humana, tornando-a mais rígida, a córnea suína a mimetiza satisfatoriamente (KIM *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2016).

Isidan e colaboradores (2019) compararam diferentes métodos de descelularização de córneas suínas para o xenotransplante com base no mecanismo de ação, biocompatibilidade e efeitos indesejáveis na ultraestrutura corneana e concluíram que uma combinação entre os métodos pode ser mais útil para uma descelularização eficiente (ISIDAN *et al.*, 2019).

2.3.1 Métodos de avaliação do endotélio corneano

As principais técnicas para avaliar o endotélio corneano são a microscopia especular, a microscopia confocal, a microscopia óptica com uso de corantes vitais e a microscopia eletrônica de varredura (SINGH *et al.*, 1985; ABIB, 2000; EGGELING *et al.*, 2000; KAUFMAN *et al.*, 2004; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; SAAD *et al.*, 2008; JONUSCHEIT; DOUGHTY; RAMAESH, 2011; CHAURASIA; VANATHI, 2021). Todas as metodologias utilizadas possuem vantagens e desvantagens e cada uma tem indicação e aplicabilidade na oftalmologia. A avaliação endotelial tem sido cada vez mais relevante visto que os procedimentos intraoculares têm sido cada vez mais frequentes (TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000; JURKUNAS; COLBY, 2005).

O primeiro relato do mosaico endotelial foi feito por Vogt, em 1920, valendo-se da biomicroscopia com lâmpada de fenda (ABIB, 2000). Na prática, esse exame tem limitações pois a magnificação não é satisfatória e o movimento do olho prejudica a avaliação (JURKUNAS; COLBY, 2005).

2.3.1.1. Microscopia especular

A microscopia especular pode ser utilizada para avaliação *in vivo* e *ex vivo* e é um dos métodos mais validados para avaliar a morfologia e morfometria do endotélio corneano (PRICE; CHENG, 1981; ABIB, 2000). No âmbito de pesquisas, tem sido uma técnica empregada para determinar o padrão endotelial de diferentes espécies e apurar a segurança de procedimentos cirúrgicos e de fármacos (ABIB, 2000; LIOU; CHIU; WANG, 2004; PIGATTO *et al.*, 2008; FRANZEN *et al.*, 2010; BERCHT *et al.*, 2015; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

Diferentes regiões podem ser analisadas e a saúde endotelial é interpretada com parâmetros como porcentagem de células endoteliais hexagonais, coeficiente de variação da área celular e densidade de células endoteliais (CHAURASIA; VANATHI, 2021).

O mecanismo desse tipo de microscópio baseia-se na incidência de um feixe luminoso sobre a córnea e na sua reflexão. Uma parte desse feixe é refletido de forma especular e capturado pelo microscópio que irá fornecer uma imagem ampliada do endotélio. A ampliação da imagem captada faz-se por um sistema óptico-eletrônico para então ser direcionada a um software que realizará a análise quantitativa e qualitativa do endotélio corneano. O microscópio especular pode ser de contato e não contato (PRICE; CHENG, 1981; ABIB, 2000; MELO *et al.*, 2008; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

O microscópio especular de contato possui uma lente objetiva que aplanar a superfície da córnea. Durante a aplanar, a córnea é achatada e, portando, a imagem é ampliada (CHAURASIA; VANATHI, 2021). A execução é um pouco mais difícil pois requer o uso de colírio anestésico e um operador experiente (TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; ALBUQUERQUE; PIGATTO; PACICCO, 2015).

Em 2015, Bercht e colaboradores estudaram a densidade celular, a área média e a morfologia do endotélio corneano de chinchilas em diferentes faixas etárias (entre dois meses e 10 anos) valendo-se da microscopia especular de contato. Os resultados sugeriram que o endotélio sofreu alterações relacionadas à idade. Houve aumento da área celular média e diminuição da densidade celular (BERCHT *et al.*, 2015).

Com essa técnica também foram determinadas a densidade celular e a hexagonalidade do endotélio corneano de coelhos saudáveis (BRAMBATTI *et al.*, 2017). Foram avaliados os dois olhos de 18 animais entre seis e 48 meses de idade e os resultados revelaram uma diminuição na densidade celular e na hexagonalidade com o avanço da idade.

O microscópio especular de não contato é mais prático, porém fornece uma área endotelial menor para análise. A focalização é automática, proporcionando um reflexo especular menor (TUFT; COSTER, 1990; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

Coyo *et al.* (2018a) determinaram a densidade endotelial e a morfologia e morfometria das células endoteliais corneanas em corujas de diferentes idades através da microscopia especular de não contato. Os autores também relataram os efeitos do envelhecimento sobre os parâmetros analisados (COYO *et al.*, 2018a).

O endotélio de caprinos já foi estudado por meio dessa técnica (COYO *et al.*, 2018b). Foram avaliados 27 olhos saudáveis de 19 cabras de diferentes idades. Os resultados mostraram

que houve redução da densidade endotelial corneana com a idade, enquanto a área celular média, pleomorfismo e espessura da córnea aumentaram.

2.3.1.2 Microscopia confocal

Essa técnica permite a análise *in vivo* de todos os componentes celulares da córnea de todas as camadas, incluindo o filme lacrimal pré-corneano e a inervação estromal e subepitelial. No microscópio confocal, os raios de iluminação e de observação são focados no mesmo plano da córnea e duas fendas são inseridas nos planos de imagem de cada raio. Essa disposição óptica é chamada confocal porque delimita a luz do plano de foco e reduz a contribuição de luz fora do foco (KAUFMAN *et al.*, 2004; JONUSCHEIT; DOUGHTY; RAMAESH, 2011).

A principal vantagem da microscopia confocal é possibilitar a avaliação endotelial minuciosa mesmo em córneas que perderam a transparência, como por exemplo em casos de distrofia ou antes e após o transplante (KAUFMAN *et al.*, 2004). Em suínos, essa técnica já foi utilizada para avaliar as células endoteliais de animais geneticamente modificados como fonte doadora de córneas para ceratoplastia endotelial (LEE *et al.*, 2014) e para caracterizar parâmetros anatômicos do olho suíno para utilizá-lo como modelo laboratorial de olho seco (MENDUNI *et al.*, 2018).

2.3.1.3. Microscopia óptica com uso de corantes vitais

Os corantes vitais são uma ótima opção para avaliar o endotélio corneano *ex vivo*. O vermelho de alizarina é um corante intercelular, capaz de identificar e delinear o limite de células íntegras e danificadas. O azul de tripano fica impregnado no núcleo de células endoteliais que tiveram sua parede celular rompida. As concentrações desses corantes variam, sendo o vermelho de alizarina utilizado entre 0,2% a 1% e o azul de tripano entre 0,001% e 0,5%. Ambos podem ser utilizados em diferentes tempos de exposição (SINGH *et al.*, 1985; SAAD *et al.*, 2008; CLEROT *et al.*, 2019).

Por ser uma técnica bastante prática e de baixo custo, alguns pesquisadores utilizam os corantes, associados ou não, para avaliar a toxicidade de fármacos no endotélio corneano e os possíveis danos após transplante de córnea (SAAD *et al.*, 2008).

Hünning *et al.* (2018) avaliaram a morfologia das células endoteliais de diferentes regiões da córnea de cães. Foram avaliadas as regiões superior, inferior, central, nasal e temporal com o uso do vermelho de alizarina 0,2% e a microscopia óptica. Nesse estudo, o

corante permaneceu em contato com o endotélio durante 90 segundos e foi lavado três vezes com solução salina balanceada. Em todas as áreas corneanas estudadas, o endotélio apresentou morfologia semelhante (HÜNNING *et al.*, 2018).

Os corantes vitais também já foram utilizados para avaliar os efeitos de fármacos no endotélio corneano. Guimarães e colaboradores (2019) estudaram os efeitos agudos do besilato de atracúrio no endotélio de 20 olhos de galinhas. Os autores utilizaram o vermelho de alizarina e o azul de tripano e concluíram que houve um dano agudo no endotélio corneano (GUIMARÃES *et al.*, 2019).

Clerot *et al.* (2019) avaliaram a morfologia das células endoteliais de 24 olhos de 12 suínos com 14 meses de idade. A técnica utilizada foi a coloração com vermelho de alizarina na concentração de 0,2% e a microscopia óptica, sendo possível explorar e obter imagens de todas as regiões do endotélio corneano suíno (central, superior, inferior, nasal e temporal). Os autores concluíram que não foram observadas diferenças no formato das células das cinco regiões estudadas. Além disso, o formato predominante das células foi hexagonal (CLEROT *et al.*, 2019).

2.3.1.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV é o método mais empregado para avaliar a ultraestrutura endotelial. Essa técnica tem sido utilizada para estudos sobre a morfologia corneana, a toxicidade de fármacos intracamerais e a eficácia de meios de preservação de córnea. Em relação a microscopia especular, a MEV permite a avaliação da ultraestrutura celular, permite a determinação da área celular média, da densidade celular, do pleomorfismo e do polimegatismo. Já foi possível estabelecer o padrão endotelial de diversos animais, como coelhos, pinguins, cães e roedores (ILMONEN *et al.*, 1984; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2009).

Com o microscópio eletrônico de varredura é possível capturar de imagens com aumento de 300.00 vezes ou mais e com excelente resolução. É utilizado um feixe de elétrons ao invés de fótons como em um microscópio óptico convencional. Essa técnica já foi aplicada para avaliação da morfologia e ultraestrutura normal das células endoteliais e a toxicidade endotelial com uso de medicações em diferentes espécies (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A MEV foi eleita por Collins e Collins, em 1998, para estudo da superfície posterior do endotélio corneano de vertebrados. Os autores concluíram que as células endoteliais corneanas

são um conjunto de células pentagonais e hexagonais com bordas irregulares e interdigitações (COLLINS; COLLINS, 1998).

Tamayo-Arango *et al.* (2009) reportaram pela primeira vez, de forma detalhada, a morfologia ultra-estrutural e a morfometria endotelial da córnea de suínos. O formato celular padrão encontrado foi hexagonal, com presença de cílios na periferia das células, microvilosidades e vesículas pinocíticas. A área celular média foi significativamente maior no centro da córnea do que na periferia, com um coeficiente de variação menor no centro da córnea (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

Andrade e colaboradores (2019) utilizaram a MEV para avaliar os efeitos imediatos no endotélio de equinos após exposição ao azul brilhante 0,05% e concluíram que não houve danos ao endotélio corneano equino (ANDRADE *et al.*, 2019). Essa substância também já foi avaliada em suínos pela mesma técnica (TERZARIOL *et al.*, 2016). Os autores concluíram que a concentração de 0,05% não causou efeitos deletérios no endotélio corneano suíno após o uso intracameral, sendo uma opção segura para corar a cápsula anterior do cristalino em cirurgias de catarata.

Para se obter boas imagens, é fundamental que as amostras sejam avaliadas ou fixadas para posterior avaliação endotelial em até 6 horas *post mortem*, independente da técnica escolhida. Nesse processo de fixação, as amostras sofrem retração, pois as soluções utilizadas possuem cerca de três vezes a osmolaridade dos fluidos humanos normais. O glutaraldeído é o fixador recomendado para a maioria dos tecidos (FARIAS *et al.*, 2007; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Tamayo-Arango e colaboradores (2009) avaliaram córneas saudáveis de suínos pela MEV e a densidade celular média foi 43,9% maior do que a descrita na mesma espécie através da microscopia especular, demonstrando o efeito da retração celular durante o preparo das amostras (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

2.3.2 Parâmetros endoteliais

As microscopias especular e confocal permitem o estudo *in vivo* e *ex vivo* do endotélio da córnea (KAUFMAN *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2014; MENDUNI *et al.*, 2018; CHAURASIA; VANATHI, 2021). Entre os parâmetros que podem ser analisados com essas duas técnicas encontram-se a área celular média, a densidade celular, a hexagonalidade, o polimegatismo e o pleomorfismo (LEE *et al.*, 2014; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

A densidade endotelial celular é expressa em células/mm². A hexagonalidade indica a porcentagem de células com seis lados numa área analisada, sendo o arranjo de células

hexagonais a forma geométrica poligonal mais eficiente em termos energéticos, pois confere a vantagem da maior área de superfície em relação ao seu perímetro (ABIB, 2000; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

Um aumento na variabilidade da área celular denomina-se polimegatismo e um desvio na hexagonalidade denomina-se pleomorfismo. Ambos aumentam com a idade e com o desgaste das células endoteliais (CHAURASIA; VANATHI, 2021). Uma hexagonalidade 100% perfeita não é possível devido à senescência relacionada à idade e aos estresses ambientais. O coeficiente de variação da área celular média é o índice mais sensível de disfunção endotelial, enquanto a hexagonalidade é um bom índice do progresso de cicatrização (RAO *et al.*, 2000; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

3 ARTIGO

O artigo a seguir foi escrito de acordo com as normas da revista “Veterinary Ophthalmology” (ISSN 1463-5224) e será traduzido para o inglês no momento da sua submissão.

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE SUÍNOS (*Sus scrofa domesticus*) UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR

**Eduarda Valim Borges de Vargas¹, Anita Marchionatti Pigatto², Rafaella Silva Rocha¹,
João Antonio Tadeu Pigatto¹**

¹Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. ²Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

Resumo

Objetivo: O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais e justapostas que recobrem a superfície posterior da córnea. É uma estrutura fundamental para a manutenção da transparência corneana. A espécie suína já é bastante empregada como modelo experimental na oftalmologia, porém os estudos avaliando a morfologia e a morfometria do endotélio corneano dessa espécie são escassos. Objetivou-se avaliar a densidade endotelial e o percentual de células hexagonais nas diferentes regiões do endotélio corneano de suínos utilizando a microscopia especular de contato. **Procedimentos:** Foram estudados 24 bulbos oculares de 12 suínos (*Sus scrofa domestica*), machos, com seis meses de idade e da raça Large White. A microscopia especular de contato foi realizada nas regiões central, superior, inferior, lateral e medial. **Resultados:** A densidade endotelial média na região central foi de 1865 células/mm², na região superior foi de 1877,3 células/mm², na região inferior foi de 1854,9 células/mm², na região lateral foi de 1847 células/mm² e na região medial foi de 1831,7 células/mm². Na região central, a porcentagem média de células hexagonais foi de 53,3%, na região superior foi de 53,8%, na região inferior foi de 54,4%, na região lateral foi de 53,8%, na região medial foi de 53,7%. Não foram observadas diferenças significativas na densidade celular e na hexagonalidade nas diferentes regiões analisadas da córnea. **Conclusão:** Os valores da densidade endotelial e da hexagonalidade da região central do endotélio podem ser extrapolados para as demais regiões da córnea. A análise da área central é suficiente para estimar a densidade celular e a hexagonalidade das áreas periféricas de córneas de suínos saudáveis.

Palavras-chave: endotélio corneano, morfologia, densidade endotelial, suínos.

Abstract

Objective: The corneal endothelium is a monolayer of polygonal and juxtaposed cells that cover the posterior surface of the cornea. It is a fundamental structure for the maintenance of corneal transparency. The swine species is already widely used as an experimental model in ophthalmology, but studies evaluating the morphology and morphology of the corneal endothelium of this species are scarce. The objective was to evaluate the endothelial density and the percentage of hexagonal cells in the different regions of the swine corneal endothelium using specular contact microscopy. **Procedures:** Twenty-four eyeballs from 12 male, six-month-old Large White pigs (*Sus scrofa domesticus*) were studied. Contact specular microscopy was performed in the central, superior, inferior, lateral and medial regions. **Results:** The mean endothelial density in the central region was 1865 cells/mm², in the upper region it was 1877.3 cells/mm², in the lower region it was 1854.9 cells/mm², in the lateral region it was 1847 cells/mm² and in the medial was 1831.7 cells/mm². In the central region, the average percentage of hexagonal cells was 53.3%, in the upper region it was 53.8%, in the lower region it was 54.4%, in the lateral region it was 53.8%, in the medial region was 53.7%. No significant differences were observed in cell density and hexagonality in the different analyzed regions of the cornea. **Conclusion:** Endotelial cell density and hexagonality of the central cornea area represents the entire endothelial mosaic and may be applied to peripheral areas. Analysis of the central area is sufficient to estimate the endotelial cell density and hexagonality of endothelial cells of peripheral areas of healthy swines corneas.

Keywords: corneal endothelium, morphology, endothelial density, swine.

INTRODUÇÃO

O endotélio é a camada mais interna da córnea, constituído por uma monocamada de células poligonais, sendo na maioria das espécies o formato hexagonal predominante (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003; PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). É a camada que tem maior responsabilidade pela manutenção do estado de deturgescência da córnea, fundamental para a sua transparência (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003).

A microscopia especular é um dos métodos mais validados para avaliar a morfologia e a morfometria do endotélio corneano (PRICE; CHENG, 1981; ABIB, 2000). É uma técnica empregada para determinar o padrão endotelial de diferentes espécies, como cães, gatos, suínos, galinhas, chinchilas, coelhos, corujas e cabras, e apurar a segurança de procedimentos cirúrgicos e de fármacos (LIOU; CHIU; WANG, 2004; PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE; PIGATTO; PACICCO, 2015; BERCHT *et al.*, 2015; COYO *et al.*, 2018a; COYO *et al.*, 2018b; CHAURASIA; VANATHI, 2021).

Diferentemente de outras técnicas, a microscopia especular não causa distorções no endotélio corneano. Na microscopia eletrônica de varredura, por exemplo, durante o processo de fixação das amostras, há retração das mesmas, distorcendo de forma não homogênea o mosaico endotelial e, dessa forma, sendo mais indicada para avaliar a ultraestrutura celular (FARIAS *et al.*, 2007; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

A espécie suína já é bastante empregada como modelo experimental na oftalmologia (HASHIMOTO; KUROSAKA; UETSUKI, 2001; KERMANI; OBERHEIDE, 2008; NICHOLLS *et al.*, 2009; HEICHEL *et al.*, 2011; HEICHEL *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; GROS-OTERO *et al.*, 2019). No entanto, os estudos avaliando a morfologia e a morfometria do endotélio corneano dessa espécie são escassos (COLLIN; COLLIN, 1998; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014). Existem semelhanças entre as células do endotélio da córnea de humanos e de suínos (HARA; COOPER, 2011; LEE *et al.*, 2014).

Objetivou-se avaliar a densidade endotelial e o percentual de células hexagonais nas diferentes regiões do endotélio corneano de suínos utilizando a microscopia especular de contato.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido conforme as normas da ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) e foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Foram estudados 24 bulbos oculares saudáveis de 12 suínos (*Sus scrofa domesticus*), machos, com seis meses de idade e da raça Large White. Os olhos foram doados pelo abatedouro Avisui (Santa Maria, RS).

Após o abate dos suínos e antes da escalda, ambos os olhos de cada animal foram enucleados e mantidos em câmaras úmidas individuais identificadas até o exame com microscópio especular. Após a coleta dos olhos, foi feita marcação na região superior com lápis de violeta de genciana.

Foram incluídos bulbos oculares coletados imediatamente após o abate. Todos os olhos foram submetidos ao exame oftálmico que incluiu biomicroscopia com lâmpada de fenda (Portable Slit lamp SL15, Kowa) e prova da fluoresceína (Fluoresceína sódica a 1%, Allergan Produtos Farmacêuticos). As análises endoteliais foram realizadas em até 4 horas após as enucleações.

Para a análise endotelial, foi utilizado o microscópio especular de contato (Celmax Medical Service®) valendo-se do método semiautomatizado pela técnica de marcação do centro das células. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador.

Após serem removidos da câmara úmida, os olhos foram fixados em um suporte adaptado ao microscópio especular de contato e lubrificados com solução fisiológica. Posicionou-se a lente objetiva do microscópio sobre as regiões central, superior, inferior, lateral e medial para o registro fotográfico digital do endotélio. Foram captadas duas micrografias especulares de cada região da córnea e em cada imagem foram analisadas 50 células. Os valores obtidos foram a média das duas imagens.

A densidade celular foi obtida de forma semiautomatizada através do *software* Celmax®. A morfologia endotelial foi obtida mediante avaliação manual do número de lados de cada célula.

As variáveis quantitativas com distribuição normal foram descritas pela média e o desvio padrão e analisadas através da Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. Foi considerado um nível de significância de 5%. Esses dados foram analisados através do programa estatístico Program IBM* SPSS Statistics 21 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

RESULTADOS

Todos os olhos enucleados foram incluídos no estudo. Com o microscópio especular de contato foi possível observar um padrão regular de células poligonais com bordas nítidas, uniformes e justapostas em todas as regiões estudadas (Figuras 1 e 2).

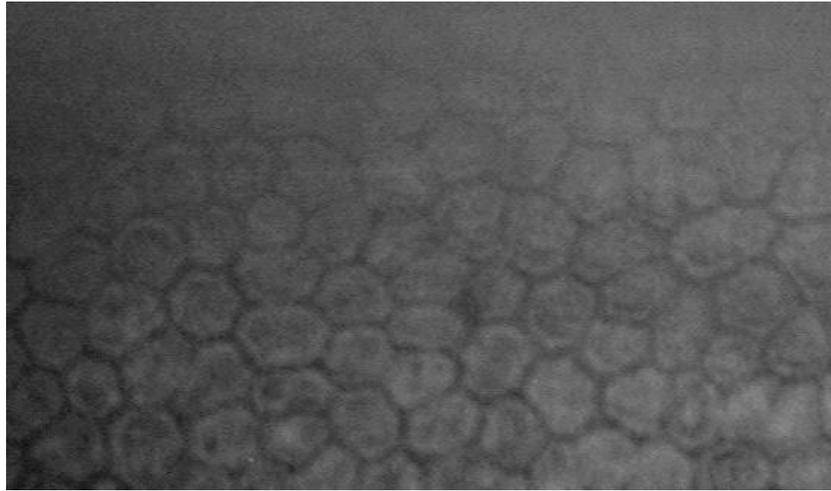


Fig. 1: Fotomicrografia especular do endotélio corneano de um suíno com seis meses de idade

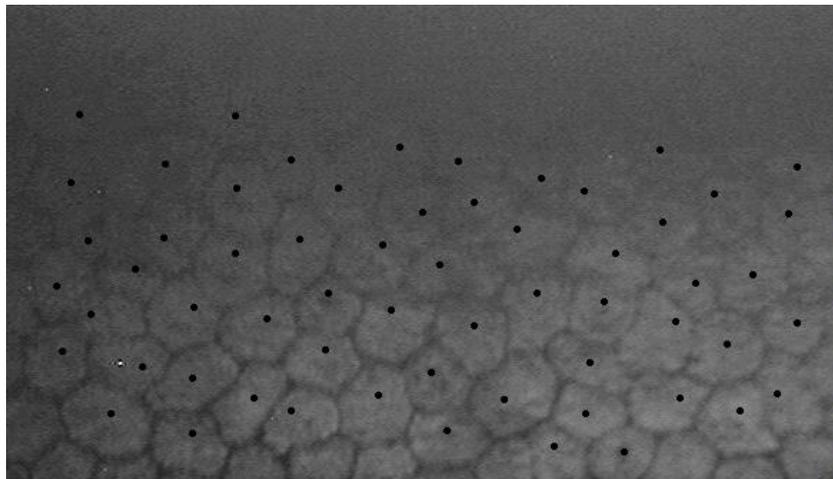


Fig. 2: Fotomicrografia especular da região superior do endotélio corneano de um suíno com seis meses de idade, com densidade de 1842 células/mm².

A densidade endotelial média na região central (DEC) foi de $1867,8 \pm 78,0$ células/mm² no olho direito e de $1862,2 \pm 85,2$ células/mm² no olho esquerdo. A densidade endotelial média

na região superior (DES) foi de $1864,9 \pm 40,1$ células/mm² no olho direito e de $1889,8 \pm 55,4$ células/mm² no olho esquerdo. A densidade endotelial média na região inferior (DEI) foi de $1841,5 \pm 56,3$ células/mm² no olho direito e de $1868,3 \pm 37,4$ no olho esquerdo. A densidade endotelial média na região lateral (DEL) foi de $1827 \pm 38,9$ células/mm² no olho direito e de $1867 \pm 50,3$ células/mm² no olho esquerdo. A densidade endotelial média na região medial (DEM) foi de $1847 \pm 49,6$ células/mm² no olho direito e de $1816,4 \pm 123,2$ no olho esquerdo.

Não houve diferença significativa na densidade endotelial média entre as cinco regiões estudadas e entre olho direito e esquerdo. Esses dados estão apresentados nas tabelas a seguir (Tabelas 1 e 2).

Tab. 1. Valores médios da densidade celular endotelial (células/mm²) e desvio padrão de células endoteliais das regiões central, superior, inferior, lateral e medial nos olhos direito e esquerdo de suínos utilizando a microscopia especular de contato.

| | Olho Direito | Olho Esquerdo |
|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Central (DEC) | $1867,8 \pm 78,0$ | $1862,2 \pm 85,2$ |
| Superior (DES) | $1864,9 \pm 40,1$ | $1889,8 \pm 55,4$ |
| Inferior (DEI) | $1841,5 \pm 56,3$ | $1868,3 \pm 37,4$ |
| Lateral (DEL) | $1827,0 \pm 38,9$ | $1867,0 \pm 50,3$ |
| Medial (DEM) | $1847,0 \pm 49,6$ | $1816,4 \pm 123,2$ |

(p = 0,307)

Tab. 2. Valores médios, com intervalo de confiança de 95%, da densidade celular endotelial (células/mm²) das regiões central, superior, inferior, lateral e medial de olhos de suínos utilizando a microscopia especular de contato.

| | Densidade celular (cél/s/mm²) | Intervalo de confiança 95% |
|-----------------|---|-----------------------------------|
| Central | 1865 | 1830,4 – 1899,5 |
| Superior | 1877,3 | 1856,8 – 1897,8 |
| Inferior | 1854,9 | 1834,6 – 1875,1 |
| Lateral | 1847 | 1828,0 – 1866,1 |
| Medial | 1831,7 | 1791,1 – 1872,3 |

(p = 0,188)

Em todas as regiões da córnea analisadas foram encontradas células endoteliais com quatro lados, cinco lados, seis lados, sete lados e oito lados. Considerando a morfologia de todas as células analisadas, foram encontradas 53,8% das células com seis lados, 21,5% das células com cinco lados e 17,7% das células com sete lados. Além disso, 5% das células apresentavam quatro lados e 2% das células oito lados.

Com relação a hexagonalidade, na região central a porcentagem média de células hexagonais foi de 53,3%, na região superior foi de 53,8%, na região inferior foi de 54,4%, na região lateral foi de 53,8%, na região medial foi de 53,7%. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.

Tab. 3. Porcentagens média, com intervalo de confiança de 95%, de células hexagonais em cada uma das cinco regiões analisadas.

| | Células hexagonais (%) | Intervalo de confiança 95% |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Central | 53,3% ± 2 | 52,3 – 54,2 |
| Superior | 53,8% ± 1,5 | 53 – 54,5 |
| Inferior | 54,4% ± 2,1 | 53,4 – 55,4 |
| Lateral | 53,8% ± 2,8 | 52,5 – 55,1 |
| Medial | 53,7% ± 1,5 | 52,9 – 54,4 |

(p = 0,517)

Não houve diferença significativa nas distribuições dos percentuais de células hexagonais entre os olhos direito e esquerdo. Não houve diferença significativa em relação à hexagonalidade das células do endotélio da córnea em todas as regiões estudadas ($p > 0,05$ para todas as comparações). Esses dados estão apresentados na Tabela 4.

Tab. 4. Porcentagens média com valores de desvio padrão de células hexagonais em cada uma das cinco regiões analisadas nos olhos direito e esquerdo de suínos utilizando a microscopia especular de contato.

| | Olho direito | Olho esquerdo |
|------------|---------------------|----------------------|
| RC6 | 53,1% \pm 1,5 | 53,5% \pm 2,4 |
| RS6 | 53,5% \pm 1,9 | 54,1% \pm 1,1 |
| RI6 | 54,4% \pm 2,3 | 54,5% \pm 2 |
| RL6 | 53% \pm 2,7 | 54,7% \pm 2,9 |
| RM6 | 53,5% \pm 1,5 | 53,9% \pm 1,5 |

(RC6: hexagonalidade região central; RS6: hexagonalidade região superior; RI6: hexagonalidade região inferior; RL6: hexagonalidade região lateral; RM6: hexagonalidade região medial; $p = 0,735$)

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A análise dos parâmetros morfométricos e morfológicos do endotélio corneano saudável tem sido realizada utilizando a microscopia especular em algumas espécies de animais (PIGATTO *et al.*, 2008; FRANZEN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017; COYO *et al.*, 2018a).

Os suínos são utilizados em pesquisas experimentais relacionadas à oftalmologia (HASHIMOTO; KUROSAKA; UETSUKI, 2001; KERMANI; OBERHEIDE, 2008; NICHOLLS *et al.*, 2009; HEICHEL *et al.*, 2011; HEICHEL *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; MENDUNI *et al.*, 2018; GROS-OTERO *et al.*, 2019). No entanto, os estudos avaliando a morfologia e a morfometria do endotélio corneano dessa espécie são escassos (COLLIN; COLLIN, 1998; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014). A ausência de estudos detalhando os parâmetros endoteliais das diferentes regiões da córnea, aliada à facilidade de obtenção dos olhos e à disponibilidade do microscópio especular foram as principais motivações para a realização do presente estudo.

A utilização de olhos de suínos destinados ao abate constituiu-se numa alternativa viável evitando com que animais fossem sacrificados por motivos exclusivamente relacionados à pesquisa. No presente estudo, a coleta dos olhos *post mortem* e o armazenamento individual em câmara úmida por até quatro horas permitiu a preservação da integridade endotelial para realização da microscopia especular. Essa metodologia já foi empregada por outros autores e mostrou-se eficaz permitindo a análise do endotélio da córnea em até seis horas após o óbito (PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE; PIGATTO; PACICCO, 2015; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017).

No presente estudo, em todos os olhos selecionados foi possível observar o padrão regular de células poligonais com bordas nítidas em todas as regiões estudadas. Este padrão celular já foi descrito em outras espécies utilizando microscopia especular (PIGATTO *et al.*, 2008; FRANZEN *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2017; COYO *et al.*, 2018a), inclusive na espécie suína com estudo *ex vivo* usando a microscopia confocal (LEE *et al.*, 2014; MENDUNI *et al.*, 2018).

A microscopia especular de contato mostrou-se factível para a análise e a documentação das células do endotélio corneano de córneas saudáveis de suínos. De acordo com o contato ou não da objetiva com a córnea, existem diferentes modelos de microscópios especulares (CHAURASIA; VANATHI, 2021). Na presente pesquisa, foi utilizado o microscópio especular de contato permitindo com que diferentes regiões da córnea pudessem ser examinadas, fotografadas e os parâmetros endoteliais estudados. A microscopia especular pode ser utilizada para avaliação *in vivo* e *ex vivo* e é um dos métodos mais validados para avaliar a morfologia e morfometria do endotélio corneano (PRICE; CHENG, 1981; ABIB, 2000; CHAURASIA; VANATHI, 2021). Diferentemente de outras técnicas, não há deformação ou distorção das células endoteliais durante o processo de fixação ou coloração (DOUGHTY, 2006). Apesar das inúmeras vantagens, a microscopia especular possui algumas limitações, como a dificuldade em obter imagens nítidas nas áreas endoteliais que tenham sofrido algum trauma ou que estejam edemaciadas (ABIB, 2000). Por ter sido realizado um exame oftálmico prévio, só foram incluídos no estudo olhos saudáveis e com a córnea transparente.

A avaliação endotelial baseia-se principalmente na estimativa da densidade endotelial, no estudo do tamanho e da forma das suas células (McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008). Os parâmetros mais empregados para análise endotelial são a porcentagem de células endoteliais hexagonais, o coeficiente de variação da área celular e a densidade de células

endoteliais (CHAURASIA; VANATHI, 2021). No presente estudo, foram analisadas a densidade celular e a porcentagem de células hexagonais de diferentes regiões da córnea.

Os métodos mais empregados para a quantificação dos parâmetros do endotélio da córnea incluem método de quadro (fixo ou variável), método de centro a centro, método de centro flexível, método de canto e método de comparação (CHAURASIA; VANATHI, 2021). Independentemente do método, a acurácia da avaliação depende da qualidade da imagem endotelial obtida na microscopia especular (MAURICE, 1968; ABIB, 2000). No presente estudo, para determinação da densidade celular endotelial, foi empregado o método de marcação dos centros celulares disponível no equipamento usado. Após a marcação das células selecionadas, o *software* incluído no aparelho forneceu a densidade celular. O valor calculado a partir de uma imagem foi considerada a amostra da população de células.

O número de células endoteliais incluídas em cada imagem varia de acordo com o estudo. Alguns autores recomendam a contagem de 30 células, outros recomendam de 50 a 100 células por imagem (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; MELO *et al.*, 2008). No presente estudo, foram utilizadas duas imagens de cada região e em cada imagem foram contadas 50 células. Os resultados foram apresentados como a média destas imagens.

Em suínos, o primeiro relato detalhado da morfologia ultraestrutural e morfometria do endotélio foi feito em 2009 através da microscopia eletrônica de varredura (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Nesse estudo, os autores avaliaram a região central e periférica e observaram um padrão regular de células poligonais, com predomínio da forma hexagonal, e com bordas celulares nítidas.

Não houve diferença significativa na densidade endotelial média entre as cinco regiões estudadas e entre olho direito e esquerdo. Em humanos, Muller e colaboradores compararam a densidade endotelial das regiões central, superior e temporal de córneas saudáveis através da microscopia confocal e também não encontraram diferença estatística (MULLER *et al.*, 2004). Já Amann e colaboradores encontraram uma densidade maior nas regiões paracentral e periférica do que na região central através da microscopia especular de não contato (AMANN *et al.*, 2003). Em suínos, foi observada uma densidade celular média significativamente maior na periferia do que na região central através da MEV (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

No presente estudo, a densidade celular média entre as regiões variou entre 1831,7 e 1877,3 células/mm². Brambatti e colaboradores (2017) encontraram valores semelhantes em coelhos, com densidade celular média variando entre 1868 e 2307 células/mm² (BRAMBATTI *et al.*, 2017). Em chinchilas, a densidade celular média obtida através da microscopia especular em grupos de diferentes idades variou entre 2124 e 3423 células/mm², sendo a média mais alta

encontrada em animais com 2 a 4 meses de idade (BERCHT *et al.*, 2015). Em coruja, Coyo e colaboradores obtiveram valores entre 2602 e 2864 células/mm², também demonstrando maior densidade celular média em animais mais jovens (COYO *et al.*, 2018a).

Em humanos, o endotélio saudável apresenta no mínimo 60% das suas células com formato hexagonal (CHAURASIA; VANATHI, 2021). No presente estudo, foi possível observar que o endotélio de suínos é constituído por uma monocamada de células poligonais, com a predominância de células hexagonais em todas as regiões avaliadas. A hexagonalidade encontrada na região central foi de 53,3%, na região superior foi de 53,8%, na região inferior foi de 54,4%, na região lateral foi de 53,8%, na região medial foi de 53,7%. Esses dados estão de acordo com o que foi observado por Tamayo-Arango e colaboradores que, através da MEV, encontraram uma hexagonalidade de 61,7% na região central e 53,2% na região periférica (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Lee e colaboradores (2014) analisaram o endotélio de olhos de suínos e de macacos utilizando a microscopia confocal. Os autores encontraram um percentual de células hexagonais de 54% em suínos adultos e de 74,9% em macacos, mais próximo da espécie humana. Embora o valor tenha sido menor, os autores afirmam que um mosaico mais heterogêneo parece ser normal em suínos (LEE *et al.*, 2014).

Na presente pesquisa, não houve diferença significativa na distribuição de células hexagonais entre as cinco regiões avaliadas. Utilizando a microscopia óptica e corantes vitais, também não foram encontradas diferenças significativas na porcentagem de células hexagonais de diferentes regiões da córnea (CLEROT *et al.*, 2019). Tamayo-Arango e colaboradores (2009) observaram diferença estatística nas células hexagonais entre as regiões central e periférica. Os autores não especificaram qual região periférica foi avaliada (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009).

Não foram observadas diferenças significativas entre os olhos direito e esquerdo quanto a todos os parâmetros estudados. Também em suínos, o mesmo já foi observado através da MEV (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Em cães, utilizando a microscopia especular de contato, não foram observadas diferenças entre olho direito e esquerdo (PIGATTO *et al.*, 2008). Isso corrobora com o que já foi observado em outras espécies como humanos, gatos, galinhas, chinchilas, coelhos e corujas (RAO *et al.*, 2000; FRANZEN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; BERCHT *et al.*, 2015; BRAMBATTI *et al.*, 2017; COYO *et al.*, 2018a).

No presente estudo, foram utilizados apenas animais machos. Alguns autores já demonstraram que não existe diferença significativa entre machos e fêmeas (TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; BRAMBATTI *et al.*, 2017).

O suíno vem sendo utilizado como modelo experimental na oftalmologia pelas semelhanças estruturais das suas células endoteliais com o homem, possibilitando que resultados obtidos em estudos possam ser correlacionados. Essas similaridades permitem que o suíno sirva de modelo experimental em trabalhos acerca do transplante de córnea (ZENG *et al.*, 2001; HARA; COOPER, 2011; FUJITA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014), porém são poucos os estudos morfológicos e morfométricos sobre o endotélio corneano dessa espécie.

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que os valores da densidade endotelial e da hexagonalidade da região central do endotélio podem ser extrapolados para as demais regiões da córnea. A análise da área central é suficiente para estimar a densidade celular e a hexagonalidade das áreas periféricas de córneas de suínos saudáveis. Os parâmetros obtidos no presente estudo irão auxiliar na avaliação do endotélio da córnea de suínos.

REFERÊNCIAS

- Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4: 389- 424.
- Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2003; 22(3): 359-389.
- Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2008; 28(9): 427-430.
- Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL, *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural*, 2009; 39(1): 117-122.
- Price NC, Cheng H. Contact and noncontact specular microscopy. *British Journal of Ophthalmology*, 1981; 65: 568-574.
- Abib, FC. In: *Microscopia Especular de Córnea: Manual e Atlas*. Revinter, 2000; p.140.
- Liou S, Chiu C, Wang I. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 2004; 30(6): 1351-1355.
- Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, *et al.* Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Veterinary Ophthalmology*, 2010; 13(4): 222-226.
- Albuquerque L, Pigatto JAT, Pacicco LVR. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. *Semina: Ciências Agrárias*, 2015; 36(2): 4199-4206.

- Bercht BS, Albuquerque L, Araujo ACP, *et al.* Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Veterinary Ophthalmology*, 2015; 18(1): 137-142.
- Coyo N, Leiva M, Costa D, *et al.* Endothelial cell density and characterization of corneal endothelial cells in the Tawny Owl (*Strix aluco*) using specular microscopy. *Veterinary Ophthalmology*, 2018a; 00: 1-6.
- Coyo N, Leiva M, Costa D, *et al.* Corneal thickness, endothelial cell density, and morphological and morphometric features of corneal endothelial cells in goats. *American Journal of Veterinary Research*, 2018b; 79(10): 1087-1092.
- Chaurasia S, Vanathi M. Specular microscopy in clinical practice. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2021; 69(3): 517-524.
- Farias RJM, Kubokawa KM, Schirmer M, *et al.* Evaluation of corneal tissue by slit lamp and specular microscopy during the preservation period. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 2007; 70(1): 79-83.
- Hashimoto C, Kurosaka D, Uetsuki Y. Teaching continuous curvilinear capsulorhexis using a postmortem pig eye with simulated cataract. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 2001; 27(6): 814-816.
- Kermani O, Oberheide U. Comparative micromorphologic in vitro porcine study of IntraLase and Femto LDV femtosecond lasers. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 2008; 34-28: 1393-1399.
- Nicholls S, Bailey M, Mitchard L, *et al.* Can the corneal endothelium of the pig proliferate in vivo? *Acta Ophthalmologica Special issue: Abstracts from the 2009 European Association for Vision and Eye Research Conference*, 2009; 87(244).
- Heichel J, Blum M, Duncker GIW, *et al.* Surface quality of porcine corneal lenticules after Femtosecond Lenticule Extraction. *Ophthalmic Research*, 2011; 46(2): 107-112.
- Heichel J, Wilhem F, Kunert KS, *et al.* Influence of microkeratome parameters on the stromal bed and flap edge quality in laser in situ keratomileusis. *Clinical Ophthalmology*, 2014; 8(61): 61-69.
- Lee SE, Mehra R, Fujita M, *et al.* Characterization of porcine corneal endothelium for xenotransplantation. *Seminars in Ophthalmology*, 2014; 29(3): 127-135.
- Gros-Otero J, Ketabi S, Cañones-Zafra R, *et al.* Analysis of corneal stromal roughness after iFS 150 kHz and LenSx femtosecond LASIK flap creation in porcine eyes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2019; 257(12): 2665-2670.
- Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry*, 1998; 81(6): 245-254.
- Hara H, Cooper DKC. Xenotransplantation – the future of corneal transplantation? *Cornea*, 2011, 30(4): 371-378.
- Brambatti G, Albuquerque L, Vargas EVB, *et al.* Corneal endothelial cell density and morphology in rabbits' eyes using contact specular microscopy. *Ciência Rural*, 2017; 47(12): 1-5.

- Menduni F, Davies LN, Madrid-Costa D, *et al.* Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye. *Contact Lens and Anterior Eye*, 2018; 41(1): 13-17.
- Silveira CPB, Lima TB, Crivelaro RM, *et al.* Ophthalmic parameters in adult lowland paca (Cuniculus paca) raised in captivity. *Veterinary Ophthalmology*, 2017; 21(1): 1-6.
- Doughty MJ. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy - a comparison of two different methods of corneal fixation. *Veterinary Ophthalmology*, 2006; 9(2): 127-135.
- McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for fda clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular drugs and solutions. *Cornea*, 2008; 27(1): 1-16.
- Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia*, 1968; 24(11): 1094-5.
- Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Archives of Ophthalmology*, 1979; 97(9): 1714-1719.
- Melo CM, Santps PM, Santos RCR, *et al.* Utilização do programa Cells Analyser® no estudo comparativo entre imagens do endotélio de córneas obtidas por microscopia especular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 2008; 7(1): 79-82.
- Muller A, Craig JP, Grupcheva CN, *et al.* The effects of corneal parameters on the assessment of endothelial cell density in the elderly eye. *British Journal of Ophthalmology*, 2004; 88(3): 325-330.
- Amann J. *et al.* Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human córnea. *American Journal of Ophthalmology*, 2003; 135(5): 584-590.
- Clerot LL, Hünning PS, Bettio M, *et al.* Morphology of endothelial cells from different regions of the swine cornea. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2019; 47: 1-6.
- Rao SK, Sem PR, Fogla R, *et al.* Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. *Cornea*, 2000; 19(6): 820-823.
- Zeng Y, Yang J, Huang K, *et al.* A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *Journal of Biomechanics*, 2001; 34: 533-537.
- Fujita M, Mehra R, Lee SE, *et al.* Comparison of proliferative capacity of genetically-engineered pig and human corneal endothelial cells. *Ophthalmic Research*, 2013; 49(3): 127-138.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a microscopia especular de contato, foi possível avaliar e documentar o endotélio da córnea de suínos em diferentes regiões. Os dados obtidos nesse estudo propiciaram um maior conhecimento da morfologia endotelial e servirão como referência na avaliação do endotélio da córnea de suínos. Em todas as regiões estudadas, não foram observadas diferenças em relação a densidade celular e o percentual de células hexagonais. Somente a análise da região central é suficiente para a estimar a densidade celular e a hexagonalidade das células endoteliais de córneas saudáveis de suínos.

REFERÊNCIAS

- ABHARI, S. *et al.* Anatomic studies of the miniature swine cornea. **The Anatomical Record**, v. 301, n.11, p. 1955-1967, 2018.
- ABIB, F. C. In: **Microscopia Especular de Córnea: Manual e Atlas**. Revinter, p.140, 2000.
- ALBUQUERQUE, L., PIGATTO, J. A. T., PACICCO, L. V. R. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 4199-4206, 2015.
- AMANN, J. *et al.* Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human córnea. **American Journal of Ophthalmology**, v. 135, n. 5, p. 584-590, 2003.
- ANDRADE, M. C. C. *et al.* Evaluation of equine corneal endothelium after exposure to 0.05% brilliant blue – an *in vitro* study. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 1, n. 4, p. 1158-1164, 2019.
- BERCHT, B. S. *et al.* Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 1, p. 137-142, 2015.
- BRAMBATTI, G. *et al.* Corneal endothelial cell density and morphology in rabbits' eyes using contact specular microscopy. **Ciência Rural**, v. 47, n. 12, p. 1-5, 2017.
- CHAURASIA, S., VANATHI, M. Specular microscopy in clinical practice. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 3, p. 517-524, 2021.
- CLEROT, L. L. *et al.* Morphology of endothelial cells from different regions of the swine cornea. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 1-6, 2019.
- COLLIN, S. P., COLLIN, H. B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 81, n. 6, p. 245-254, 1998.
- COYO, N. *et al.* Corneal thickness, endothelial cell density, and morphological and morphometric features of corneal endothelial cells in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 10, p. 1087-1092, 2018b.
- COYO, N. *et al.* Endothelial cell density and characterization of corneal endothelial cells in the Tawny Owl (*Strix aluco*) using specular microscopy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 00, p. 1-6, 2018a.
- DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007. Disponível em: < [Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras \(pucrs.br\)](http://Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras (pucrs.br)) >. Acesso em: 18 maio 2022.
- DOUGHTY, M. J. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy - a comparison of two different methods of corneal fixation. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 127-135, 2006.

DUBIELZIG, R. R. *et al.* Diseases of the cornea and sclera. In: **Veterinary Ocular Pathology: a comparative review**. Elsevier, p. 201-243, 2010.

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

FARIAS, R. J. M. *et al.* Evaluation of corneal tissue by slit lamp and specular microscopy during the preservation period. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 79-83, 2007.

FRANZEN, A. A. *et al.* 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.

FUJITA, M. *et al.* Comparison of proliferative capacity of genetically-engineered pig and human corneal endothelial cells. **Ophthalmic Research**, v. 49, n. 3, p. 127-138, 2013.

GROS-OTERO, J. *et al.* Analysis of corneal stromal roughness after iFS 150 kHz and LenSx femtosecond LASIK flap creation in porcine eyes. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 257, n. 12, p. 2665-2670, 2019.

GUIMARÃES, C. B. *et al.* Effects of atracurium besylate on corneal endothelium of chickens: in vitro study. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 70-74, 2019.

HARA, H.; COOPER, D. K. C. Xenotransplantation – the future of corneal transplantation? **Cornea**, v. 30, n. 4, p. 371-378, 2011.

HASHIMOTO, C; KUROSAKA, D; UETSUKI, Y. Teaching continuous curvilinear capsulorhexis using a postmortem pig eye with simulated cataract. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 27, n. 6, p. 814-816, 2001.

HEICHEL, J. *et al.* Influence of microkeratome parameters on the stromal bed and flap edge quality in laser in situ keratomileusis. **Clinical Ophthalmology**, v. 8, n. 61, p. 61-69, 2014.

HEICHEL, J. *et al.* Surface quality of porcine corneal lenticules after Femtosecond Lenticule Extraction. **Ophthalmic Research**, v. 46, n. 2, p. 107-112, 2011.

HUANG, J. *et al.* Comparison of noncontact specular and confocal microscopy for evaluation of corneal endothelium. **Eye and Contact Lens: Science and Clinical Practice**, v. 44, p. 144-150, 2008.

HÜNNING, P. S. *et al.* Morphology of endothelial cells from different regions of the cornea of dogs. **Ciência Rural**, v. 48, n. 10, p. 1-6, 2018.

HWANG, H., KIM, M. Endothelial damage of a donor cornea depending on the donor insertion method during descemet-stripping automated endothelial keratoplasty in porcine eyes. **Japanese Journal Ophthalmology**, v. 53, p. 523-530, 2009.

ILMONEN, M. *et al.* Initial healing of the posterior corneal surface following perforating trauma in guinea pig: a scanning electron microscope study. **Acta Ophthalmologica**, v. 62, n. 5, p. 787-795, 1984.

- ISIDAN, A. *et al.* Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives. **Xenotransplantation**, v. 00, p. 1-8, 2019.
- JONUSCHEIT, S., DOUGHTY, M. J., RAMAESH, K. *In vivo* confocal microscopy of the corneal endothelium: comparison of three morphometry methods after corneal transplantation. **Eye**, v. 25, n. 9, p. 1130-1137, 2011.
- JOYCE, N. C. Proliferative capacity of corneal endothelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, n. 3, p. 359-389, 2003.
- JURKUNAS, U., COLBY, K. Evaluation of the corneal endothelium. **Techniques in Ophthalmology**, v. 3, p. 19-26, 2005.
- KAUFMAN, S. C. *et al.* Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. **Ophthalmology**, v. 111, n. 2, p. 396-406, 2004.
- KERMANI, O., OBERHEIDE, U. Comparative micromorphologic in vitro porcine study of IntraLase and Femto LDV femtosecond lasers. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 34, n. 28, p. 1393-1399, 2008.
- KIM, D. H. *et al.* Biophysico-functional compatibility of Seoul National University (SNU) miniature pig cornea as xenocorneal graft for the use of human clinical trial. **Xenotransplantation**, v. 23, p. 202-210, 2016.
- KIM, M. K. *et al.* Xenocorneal transplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 16, p. 231-236, 2011.
- LAING, R. A., SANDSTROM, M. M., LEIBOWITZ, H. M. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. **Archives of Ophthalmology**, v. 97, n. 9, p. 1714-1719, 1979.
- LEE, S. E. *et al.* Characterization of porcine corneal endothelium for xenotransplantation. **Seminars in Ophthalmology**, v. 29, n. 3, p. 127-135, 2014.
- LIU, S., CHIU, C., WANG, I. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 30, n. 6, p. 1351-1355, 2004.
- MAGGS, D. J. Diseases of the cornea and sclera. In: **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. Elsevier, p. 213-253, 2018.
- MAURICE, D. M. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. **Experientia**, v. 24, n. 11, p. 1094-5, 1968.
- MELO, C. M. *et al.* Utilização do programa Cells Analyser® no estudo comparativo entre imagens do endotélio de córneas obtidas por microscopia especular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 7, n. 1, p. 79-82, 2008.

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

MEEKINS, J. M., RANKIN, A. J., SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. In: **Veterinary Ophthalmology** (ed. Gelatt KN). John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, p. 41-123, 2021.

MENDUNI, F. *et al.* Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 41, n. 1, p. 13-17, 2018.

MILLER, W. W. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. **Clinical techniques in small animals practice**, v. 16, n. 1, p. 51-57, 2001.

MULLER, A. *et al.* The effects of corneal parameters on the assessment of endothelial cell density in the elderly eye. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, n. 3, p. 325-330, 2004.

NICHOLLS, S. *et al.* Can the corneal endothelium of the pig proliferate in vivo? **Acta Ophthalmologica Special issue: abstracts from the 2009 European Association for Vision and Eye Research Conference**, v. 87, n. 244, 2009.

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

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 33-39, 2005a.

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

PIGATTO, J. A. T. *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 427-430, 2008.

PIGATTO, J. A. T. *et al.* 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.

POWER, W. J., NEVES, R. A. Anatomia e Fisiologia da Córnea. In: **Córnea Clínica Cirúrgica**. Roca, p. 3-15, 2005.

PRICE, N. C., CHENG, H. Contact and noncontact specular microscopy. **British Journal of Ophthalmology**, v. 65, p. 568-574, 1981.

RAO, S. K. *et al.* Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. **Cornea**, v. 19, n. 6, p. 820-823, 2000.

SAAD, H. A. *et al.* An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. **Cornea**, v. 27, n. 7, p. 818-824, 2008.

SHI, Y. *et al.* Comprehensive evaluation of decellularized porcine corneal after clinical transplantation. **Xenotransplantation**, v. 24, n. 6, p. 1-7, 2017.

SILVEIRA, C. P. B. *et al.* Ophthalmic parameters in adult lowland paca (*Cuniculus paca*) raised in captivity. **Veterinary Ophthalmology**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2017.

SINGH, G. *et al.* Vital staining of corneal endothelium. **Cornea**, v. 4, n. 2, p. 80-91, 1985.

TAMAYO-ARANGO, L. J. *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 117-122, 2009.

TERZARIOL, M. *et al.* Effects of intracameral brilliant blue on the corneal endothelium of swine: in vitro study. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 775-780, 2016.

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

ZENG, Y. *et al.* A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. **Journal of Biomechanics**, v. 34, p. 533-537, 2001.