

**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*) ACONDICIONADO EM MEIO DE PRESERVAÇÃO DE CÓRNEA EUSOL-C® UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

**ALESSANDRA FERNANDEZ DA SILVA**

**Porto Alegre**

**2024**

**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*) ACONDICIONADO EM MEIO DE PRESERVAÇÃO DE CÓRNEA EUSOL-C® UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

**Autor: Alessandra Fernandez da Silva**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.**

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

**Porto Alegre**

**2024**

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**

**CIP - Catalogação na Publicação**

Fernandez da Silva, Alessandra  
Avaliação do endotélio da córnea de suínos (*Sus scrofa domesticus*) acondicionado em meio de preservação de córnea Eusol-C® utilizando a microscopia eletrônica de varredura / Alessandra Fernandez da Silva. -- 2024.  
85 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, 2024.

1. Endotélio da córnea. 2. Preservação da córnea. 3. Transplante de córnea. 4. Xenotransplante. 5. Suínos. I. Pigatto, João Antonio Tadeu, orient. II. Título.

Alessandra Fernandez da Silva

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE SUÍNOS (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)  
ACONDICIONADO EM MEIO DE PRESERVAÇÃO DE CÓRNEA EUSOL-C®  
UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Aprovado em 27 MAR 2024

APROVADO POR

---

Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

Orientador e presidente da Comissão

---

Profa. Dra. Diane Ruschel Marinho

Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Silvia Maria Caldeira Franco Andrade

Membro da Comissão

---

Dra. Eduarda Correa Freitas

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fernando e Miriam, por me darem asas e cuidarem com tanto zelo e amor delas. Sem vocês, eu não seria capaz sequer de sonhar com tudo que já conquistei. Vocês foram escada e conforto nos momentos mais desafiadores da minha trajetória. Cada palavra deste trabalho tem a dedicação de vocês desde meu primeiro dia de vida.

Ao meu irmão, Fabrício, por ser sempre um escudo protetor, mesmo que silencioso. Sempre à sua maneira me guiando por caminhos melhores, pela voz da experiência de irmão mais velho.

Ao meu namorado e companheiro, João, por ser suporte. Por me acalmar nos momentos em que mais perdi a cabeça, por me fazer acreditar em mim nos momentos em que mais duvidei, e por me mostrar, dia após dia, que não existem limites para o sucesso que podemos alcançar juntos.

Ao meu orientador, Prof. João Pigatto, que me acolheu no Serviço de Oftalmologia Veterinária (SOV) da UFRGS com tanto carinho e entusiasmo, lá em 2018. Desde então, foram muitos artigos, trabalhos em congresso, consultas, cirurgias, seminários. Uma carga de conhecimento imensurável, que poucos têm a chance de ter acesso. Agradeço cada oportunidade, cada voto de confiança e cada ensinamento. Obrigada, também, pelos conselhos e ajuda nos momentos em que me senti mais confusa.

Aos meus colegas de SOV, desde os meus colegas na época de estagiária, das mestrandas que acompanhei enquanto estagiária, dos estagiários curriculares que passaram por lá, dos meus estagiários - que me auxiliaram tanto, até às minhas colegas de mestrado - que formaram uma verdadeira equipe comigo. Vocês me ensinaram muito mais que podem imaginar. Sem vocês, minha experiência não teria sido 1% do que realmente foi. Em especial, agradeço à Mariane Gallicchio de Azevedo, à Maiara Poersch Seibel e à Natália Pons Mendéz.

Por fim, agradeço aos meus amigos, de longa - ou nem tão longa - data, por serem leveza na minha vida, e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Vocês todos são o pôr-do-sol ao fim de tarde na minha existência. Obrigada.

## RESUMO

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais, cuja principal função é transportar água do estroma para a câmara anterior, mantendo-a transparente. Em doenças corneanas que cursem com a perda da transparência, o transplante de córnea é a única alternativa para recuperação da visão. A preservação da córnea tem como principal objetivo prolongar o tempo de armazenamento do tecido do doador, mantendo a viabilidade das células endoteliais. O Eusol-C® é um meio de preservação hipotérmico que configura uma forma simples e acessível de preservar a córnea a uma temperatura de 2 a 8°C. Tendo em vista a similaridade das córneas suína e humana, e o advento de xenotransplante em um futuro próximo, estudos com o meio de preservação Eusol-C® na espécie suína ainda são recentes e escassos, e não há relatos na literatura em que a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada como método de análise. Objetivou-se avaliar a viabilidade do endotélio da córnea de suínos após acondicionamento em meio de preservação hipotérmico Eusol-C® por 14 dias, utilizando a MEV. Foram incluídos 12 olhos, provenientes de seis suínos (*Sus scrofa domesticus*) da raça Large White, machos, com seis meses de idade. As amostras foram divididas em dois grupos: grupo controle (G1) e grupo teste (G2). Cada animal forneceu duas córneas, que foram distribuídas uma em cada grupo de forma aleatória (sem considerar olho esquerdo e direito). As córneas do G1 foram imediatamente submersas em frascos contendo glutaraldeído à 2,5%. Já as córneas do G2 foram alocadas nos frascos contendo Eusol-C® por 14 dias a uma temperatura de 2-8°C e, após, foram transferidas para frascos de glutaraldeído. O percentual de perda endotelial foi avaliado com MEV. O G1 não apresentou perda celular. Enquanto que, no G2, a média de perda celular observada em todas as regiões analisadas foi de 3.01%. Em conclusão, o meio hipotérmico Eusol-C® preservou satisfatoriamente as córneas suínas por 14 dias.

Palavras-chave: Endotélio corneano. Suíno. Eusol-C®. Transplante de córnea.

## **ABSTRACT**

*The corneal endothelium is a monolayer of polygonal cells whose main function is to transport water from the stroma to the anterior chamber to keep it transparent. Many times, corneal transplantation is the only alternative for restoring vision in corneal diseases that result in loss of transparency. The main objective of preserving the cornea is to prolong the storage time of the donor tissue maintaining the viability of the endothelial cells. Eusol-C® is a hypothermic preservation medium that provides a simple and affordable way to preserve the cornea at a temperature of 2 to 8°C. Considering the similarity of porcine and human corneas and the advent of xenotransplantation in the near future, studies with the Eusol-C® preservation medium in swine are still recent and scarce, and there are no reports in the literature that use scanning electron microscopy (SEM) as an analysis method. The objective of this study was to evaluate the viability of the corneal endothelium of pigs after conditioning in Eusol-C® hypothermic preservation medium for 14 days, using SEM. 12 eyes from six male pigs (*Sus scrofa domesticus*) of the Large White breed and six months old were included. The samples were divided into two groups: control group (G1) and test group (G2). Each animal provided two corneas, which were distributed one to each group randomly (without considering the left and right eyes). The G1 corneas were immediately submerged in bottles containing 2.5% glutaraldehyde. The G2 corneas were placed in bottles containing Eusol-C® for 14 days at a temperature of 2 to 8°C. After that, they were transferred to bottles of glutaraldehyde. The percentage of endothelial loss was assessed with SEM. G1 did not show cell loss. The average cell loss observed in G2 in all regions analyzed was 3.01%. In conclusion, the Eusol-C® hypothermic medium satisfactorily preserved the porcine corneas for 14 days.*

*Key-words: Corneal endothelium. Swine. Eusol-C®. Corneal transplantation.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Posicionamento da objetiva do microscópio especular de contato na área central da córnea de um suíno.....65
- Figura 2** - Fotomicrografia especular da região central da córnea suína com densidade de 1800 células/mm<sup>2</sup>.....65
- Figuras 3A e 3B** - Eletromicrografias obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo controle. 2000x (3a) e 1000x (3b). Notar ausência de perda endotelial nas imagens.....66
- Figura 4** - Eletromicrografia obtida pelo microscópio eletrônico de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo teste. Aumento de 2000x. Notar área de perda endotelial (setas).....67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Comparação do percentual de perda celular entre os grupos e entre regiões.....	68
--	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATPase	Adenosiltrifosfatase
CA	Câmara anterior
CMM UFRGS	Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
µm	Micrômetro
µm <sup>2</sup>	Micrômetro quadrado
µg	Micrograma
µg/ml	Micrograma por mililitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
-	Negativo
%	Por cento
K <sup>+</sup>	Potássio
pH	Potencial hidrogeniônico
Na <sup>+</sup>	Sódio
UI/ml	Unidades Internacionais por ml

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Anatomofisiologia da córnea .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Transparência da córnea.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Endotélio da córnea .....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Métodos de avaliação do endotélio da córnea .....	18
2.3.1.1 Microscopia especular .....	18
2.3.1.2 Microscopia confocal .....	20
2.3.1.3 Microscopia óptica .....	21
<b>2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</b>	<b>22</b>
2.4.1 Preparo das amostras para análise com MEV .....	23
2.4.2 Diferentes metodologias de avaliação do endotélio da córnea utilizando MEV .....	24
<b>2.5 Preservação da córnea.....</b>	<b>30</b>
2.5.1 Meios de preservação de córnea hipotérmicos .....	31
2.5.2 Eusol-C® .....	35
2.5.3 Preservação da córnea em suínos .....	37
<b>2.6 Transplante de córnea – perspectivas para xenotransplante .....</b>	<b>39</b>
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>43</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O globo ocular é formado por três túnicas: a mais externa é a túnica fibrosa, composta pela córnea e pela esclera; mais internamente, está localizada a túnica vascular – também denominada úvea, composta pela íris, coroide e corpo ciliar; e a túnica mais interna é a nervosa, composta pela retina e nervo óptico (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). A túnica fibrosa fornece sustentação e dá formato ao bulbo do olho. A transparência da córnea, alinhada ao formato côncavo, permite a refração da luz para o eixo visual. As três túnicas envolvem o meio interno do olho, que é totalmente transparente e composto pelo humor aquoso, pelo cristalino e pelo humor (ou corpo) vítreo. O meio interno contribui para a refração da luz em direção à retina, além de promover a manutenção da pressão intraocular (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021).

Nos suínos e na maioria das espécies de animais, a córnea é composta por quatro camadas: a mais externa é o epitélio, seguido do estroma, da membrana de Descemet e do endotélio (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). Em humanos, a córnea é composta por seis camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, camada de Dua, membrana de Descemet e endotélio (Downie *et al.*, 2021). O endotélio desempenha papel fundamental na manutenção da transparência corneana, em humanos e animais, independente do habitat - terrestre, aéreo ou aquático (Collin; Collin, 1998; Downie *et al.*, 2021; Tuft; Coster, 1990).

Algumas doenças afetam a transparência corneana, podendo causar cegueira. Em muitos casos, há a necessidade de transplante (Crawford; Patel; McGhee, 2013; Tan *et al.*, 2012). O primeiro transplante de córnea realizado com sucesso em humanos foi em 1905, pelo médico Eduard Zirm. Desde então, o procedimento evoluiu para técnicas que podem envolver o transplante de espessura total, ou de espessura parcial da córnea, onde somente as porções doentes são substituídas (Crawford; Patel; McGhee, 2013; Singh *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2012). Em animais, o transplante de córnea ainda é incipiente, e visa, principalmente, enxertos tectônicos. A ausência de bancos de tecidos oculares para animais dificulta ainda mais essa realidade. Os transplantes de córnea em animais, quando realizados, em sua maioria são de córnea congelada. Há alguns relatos de transplantes de córnea em cães, gatos e equinos documentados na literatura (Brooks *et al.*, 2008; Brunette *et al.*, 2011; Henriksen *et al.*, 2012; Lacerda *et al.*, 2016; Laguna *et al.*, 2014).

Nos bancos de tecidos oculares são armazenadas e mantidas preservadas córneas doadoras. No presente momento, estão disponíveis três métodos de preservação: hipotermia, cultura e criopreservação (Koulouri *et al.*, 2020; Mena-Linares *et al.*, 2023;). A cultura é um método que demanda equipamentos e pessoal treinado, tendo um custo elevado. Já a criopreservação resulta em uma perda endotelial importante (Koulouri *et al.*, 2020). Os meios de preservação hipotérmicos permitem que a córnea doadora fique preservada por até 14 dias, de acordo com estudos em humanos, cães, gatos e equinos (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Kanavi *et al.*, 2014; Mena-Linares *et al.*, 2023). Esses meios são de fácil utilização e não exigem equipamentos específicos, tendo custo reduzido quando comparados à cultura (Mena-Linares *et al.*, 2023). O principal objetivo da preservação da córnea é prolongar o tempo de armazenamento do tecido do doador, além de manter a viabilidade das células endoteliais (Sharma *et al.*, 2021).

A espécie suína frequentemente é utilizada como modelo experimental na oftalmologia humana (Hashimoto; Kurosaka; Uetsuki, 2001; Lopez-Guajardo; Benitez-Herreros; Silva-Mato, 2011; Menduni *et al.*, 2018; Nicholls *et al.*, 2009; Ruiz-Ederra *et al.*, 2005). Similaridades estruturais e fisiológicas do endotélio da córnea de suínos e humanos permitem a correlação entre as duas espécies (Fujita *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2020). Cerca de 12,7 milhões de pessoas ao redor do mundo necessitam de transplante de córnea, porém, há apenas uma córnea disponível para cada 70 pacientes com essa indicação (Chaurasia *et al.*, 2019). Tendo em vista essa problemática, estudos acerca de xenotransplantes têm sido desenvolvidos. A córnea suína apresenta-se como uma opção viável e como uma fonte promissora de córneas para xenotransplante (Choi *et al.*, 2018; Fujita *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2020).

Dadas as semelhanças entre as córneas suína e humana, e tendo em vista a atual preocupação com a busca de uma nova fonte de tecido para transplante, estudos que avaliem a capacidade de preservação da córnea suína são necessários para formação de futuros bancos de tecidos oculares para xenotransplante. Além disso, a escassez de estudos na medicina veterinária também dificulta a implementação do transplante de córnea como uma realidade em animais. Dessa forma, objetiva-se avaliar a preservação da córnea de suínos, acondicionada no meio de preservação hipotérmico Eusol-C® por 14 dias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anatomofisiologia da córnea

A córnea e a esclera compõem a camada mais externa do olho, a túnica fibrosa. Essa estrutura fornece sustentação e dá formato ao globo ocular (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). Na maioria das espécies de animais, a córnea é composta por quatro camadas: a mais externa é o epitélio, seguido do estroma, da membrana de Descemet e do endotélio (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). Em humanos, a córnea é composta por seis camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, camada de Dua, membrana de Descemet e endotélio (Downie *et al.*, 2021).

O epitélio da córnea é escamoso, queratinizado e não estratificado, e constitui a camada mais anterior da córnea (Dubielzig *et al.*, 2010; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). É derivado do ectoderma superficial, e formado por três grupos celulares: as células escamosas, as células poliédricas e as células basais (Downie *et al.*, 2021; Dubielzig *et al.*, 2010; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). As células escamosas estão localizadas mais superficialmente, em duas a três camadas de células não queratinizadas, sendo que o número de camadas varia entre espécies. Após, há mais duas ou três camadas de células poliédricas, seguidas das células basais, uma única camada de células colunares, ancoradas à lâmina basal por hemidesmossomos e a células vizinhas por desmossomos (Dubielzig *et al.*, 2010). A lâmina basal é secretada pelo próprio epitélio (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). As células epiteliais passam por renovação constante por mitose, por meio de um influxo periférico de células-tronco do limbo (região de transição entre a córnea e a esclera) e da conjuntiva. As células-tronco produzem células-filhas, que migram para a córnea ao longo da membrana basal (Downie *et al.*, 2021; Dubielzig *et al.*, 2010). O epitélio da córnea desempenha as seguintes funções: barreira física que impede a entrada de fluidos e microrganismos, meio de refração, proteção contra radiações na faixa de comprimento de onda curto do espectro ultravioleta e estabilização lacrimal (Downie *et al.*, 2021).

Na maioria das espécies, o estroma mais anterior tem uma zona fina e livre de células, que corresponde em localização à membrana de Bowman, em humanos e primatas não humanos

(Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). A membrana de Bowman, ou membrana limitante anterior, não possui capacidade regenerativa (Downie *et al.*, 2021).

O estroma é a camada imediatamente posterior ao epitélio, e constitui cerca de 90% da espessura total da córnea (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). É formado por lamelas de colágeno, especialmente do tipo I, organizadas de tal forma a manter o tecido transparente. Entre essas lamelas, estão presentes os ceratócitos, que são fibrócitos especializados na formação e manutenção do colágeno do estroma (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). Em caso de lesões oculares que atinjam o estroma da córnea, os ceratócitos podem diferenciar-se em miofibroblastos, formando cicatrizes que, por sua vez, não serão transparentes (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). As fibrilas de colágeno, os proteoglicanos e seus glicosaminoglicanos e glicoproteínas associados, formam apenas de 15% a 25% do estroma. Essas fibrilas de colágeno formam a matriz para uma população especializada de proteoglicanos (Borcherding *et al.*, 1978; Hassell; Birk, 2010; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). O restante do estroma é formado por água e, embora seja um valor expressivo, a córnea está em um estado de desidratação em comparação com outros tecidos (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021).

Em humanos, foi evidenciada uma camada imediatamente anterior à membrana de Descemet, a camada de Dua. Essa camada consiste em uma membrana acelular. Mais estudos são necessários para identificar sua importância e papel no metabolismo da córnea (Dua *et al.*, 2013).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio da córnea (Downie *et al.*, 2021; Dubielzig *et al.*, 2010; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). É considerada a membrana mais espessa do corpo, e estudos demonstram que sua espessura aumenta ao longo da vida, já que é constantemente secretada pelas células endoteliais (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). Em humanos, sua espessura aumenta em aproximadamente 1 µm por ano (Downie *et al.*, 2021; Murphy *et al.*, 1984).

O endotélio é a camada mais interna da córnea, e consiste em uma monocamada de células achatadas (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Tuft; Coster, 1990). Em condições fisiológicas, o endotélio é fortemente aderido à membrana de Descemet, mas, diferentemente do epitélio, não possui hemidesmossomos para ancoragem. Em vez disso, acredita-se que o fluxo contínuo e saudável de material entre o endotélio e a membrana de Descemet proporcione a adesão necessária (Downie *et al.*, 2021). As células endoteliais apresentam pequenas

microvilosidades e poros, e as bordas laterais de uma célula se interdigitam com as adjacentes (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). O formato dessas células é predominantemente hexagonal (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). As células endoteliais da córnea são repletas de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, indicando sua elevada atividade metabólica (Downie *et al.*, 2021). A principal função do endotélio é manter o estroma em um estado de relativa desidratação, assegurando a transparência corneana (Dubielzig *et al.*, 2010; Tuft; Coster, 1990). Ainda, esse grupo celular não possui capacidade mitótica, ou seja, não se regenera. Contudo, a córnea possui um número de células endoteliais no nascimento do indivíduo que permite manutenção da funcionalidade da córnea, apesar da perda celular progressiva ao longo da vida (Downie *et al.*, 2021; Joyce, 2003; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Tuft; Coster, 1990).

## **2.2 Transparência da córnea**

A transparência da córnea depende, basicamente, de cinco fatores principais: ausência de vasos sanguíneos, ausência de pigmento, organização das fibras de colágeno do estroma, ausência de mielinização nas terminações nervosas e estado de relativa desidratação – ou deturgescência (Downie *et al.*, 2021; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). Por não possuir vasos sanguíneos, a nutrição da córnea se dá pelo humor aquoso – em contato com o endotélio, pelo filme lacrimal – em contato com o epitélio, e pelo plexo capilar límbico (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). A inervação da córnea advém do nervo trigêmeo (V par craniano), que dá origem aos ramos dos nervos ciliares curto e longo, que são nervos sensitivos e não mielinizados. As terminações desses nervos estão presentes na superfície epitelial (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021).

A deturgescência da córnea é mantida pelo epitélio e pelo endotélio. As células dessas camadas movem a água para fora do estroma via “bomba” de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> ATPase (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021).

## **2.3 Endotélio da córnea**

O endotélio da córnea é uma monocamada de células achatadas, localizadas abaixo da membrana de Descemet – sua membrana basal, e em contato direto com o humor aquoso na câmara anterior do globo ocular (Joyce, 2003; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Tuft; Coster, 1990). Esse grupo celular é repleto de mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e rugoso, indicando sua elevada atividade metabólica (Downie *et al.*, 2021; Tuft; Coster, 1990). A principal função do endotélio é transportar água do estroma para a câmara anterior, obtendo um estado de deturgescência da córnea, mantendo, assim, sua transparência (Downie *et al.*, 2021; Joyce, 2003; Tuft; Coster, 1990).

Uma célula endotelial mede em torno de 5  $\mu\text{m}$  de altura, entre 18 e 20  $\mu\text{m}$  de largura e possui núcleo redondo medindo cerca de 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Joyce, 2003; Tuft; Coster, 1990). O formato dessas células é predominantemente hexagonal (Downie *et al.*, 2021; Joyce, 2003; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Tuft; Coster, 1990). Embora estudos demonstrem que podem ser encontradas células com quatro, cinco, sete e oito lados (Bercht *et al.*, 2015; Brambatti *et al.*, 2017; Faganello *et al.*, 2016; Franzen *et al.*, 2010; Hünning *et al.*, 2018; 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). Com base na lei de Mullins-von Neumann para o crescimento da área bidimensional de uma única célula, uma célula com seis ou mais lados tem uma tendência a esticar, enquanto uma célula com menos de seis lados tende a encolher. Assim, para melhor manutenção do mosaico celular, o padrão hexagonal é preferível (Lee *et al.*, 2013; Worner *et al.*, 2011).

Diferentemente do epitélio, o endotélio da córnea não possui hemidesmossomos para ancoragem em sua membrana basal. Em vez disso, acredita-se que o fluxo contínuo e saudável de material entre o endotélio e a membrana de Descemet proporcione a adesão necessária (Downie *et al.*, 2021). As células endoteliais apresentam pequenas microvilosidades e poros, e as bordas laterais de uma célula se interdigitam com as adjacentes (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). Como não há complexos juncionais, as células são facilmente deslocadas por ação mecânica (Tuft; Coster, 1990).

As células endoteliais têm origem da crista neural, e não apresentam capacidade mitótica relevante, ou seja, não se regeneram (Downie *et al.*, 2021; Joyce, 2003; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Tuft; Coster, 1990). Algumas células apresentam cílios, que estão voltados para a câmara anterior. A função dos cílios não está bem elucidada, mas estudos indicam que

possuem forte influência na morfogênese coordenada das células endoteliais da córnea, seja durante o desenvolvimento ou em reparo após lesões (Blitzera *et al.*, 2011). Seu papel parece fundamental na quimiorrecepção e motilidade celular (Tuft; Coster, 1990).

Devido à sua baixa capacidade proliferativa e perda celular gradual ao longo da vida, a densidade celular do endotélio da córnea é reduzida ao longo do tempo (Downie *et al.*, 2021; Joyce, 2003; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Tuft; Coster, 1990). Ao nascimento, a densidade endotelial de um humano chega a 7.500 células/mm<sup>2</sup>. O maior percentual de perda ocorre no primeiro ano de vida, devido ao crescimento do globo ocular. A densidade celular segue em queda até meados dos 20 anos, quando atinge certa estabilidade. Dos 20 aos 80 anos, estima-se que a perda celular seja de 0,52% ao ano. A densidade endotelial em adultos é de, aproximadamente 2.500 células/mm<sup>2</sup> (Abib; Barreto Júnior, 2001; Tuft; Coster, 1990). O mesmo comportamento foi observado nas densidades celulares de primatas não-humanos, cães, gatos, ratos, coelhos e suínos (Baroody *et al.*, 1987; Fitch; Nadakavukaren; Richardson, 1982; Gwin *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 2013; Oh, 1963).

Com a redução gradual no número de células endoteliais, observa-se um aumento na área das células sobreviventes, além de maior variação no tamanho das células (Tuft; Coster, 1990). Esse fenômeno ocorre devido à incapacidade de multiplicação celular em níveis efetivos. Dessa forma, as células remanescentes se expandem e migram para cobrir eventuais defeitos deixados pelas células mortas (Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Tuft; Coster, 1990). As células que estão imediatamente ao lado de um local lesionado, desenvolvem pseudópodos, podendo, assim, realizar a migração. Essas células são capazes de migrar de 0,5 a 1 mm ao dia. Quando entram em contato com outras células, ao centro da lesão, essa migração é inibida (Tuft; Coster, 1990).

Em caso de lesão ou inflamação ocular, ocorre perda endotelial. Se houver redução da densidade abaixo de um nível crítico para a manutenção da deturgescência da córnea, ocorrerá edema corneano, e perder-se-á a transparência da córnea. A densidade crítica foi estimada em 10-15% da contagem normal de células, ou entre 300 e 500 células/mm<sup>2</sup> (Joyce, 2003; Tuft; Coster, 1990; Lee *et al.*, 2013).

Em relação ao endotélio da córnea de suínos, ao contrário dos humanos e de outros animais, não parece haver correlação entre a porcentagem de células hexagonais e a idade, indicando que esses animais não são suscetíveis a alterações morfológicas dependentes da

idade, no que diz respeito à heterogeneidade (Lee *et al.*, 2013). Em um estudo realizado comparando-se o endotélio corneano de suínos com o de primatas não-humanos, observou-se que o percentual de células hexagonais em primatas foi de 70%, que corroborou com valores próximos a 65% em humanos (Lee *et al.*, 2013; Worner *et al.*, 2011). Em suínos, esse percentual foi de 50%, mesmo em animais jovens, demonstrando que, provavelmente, esse valor é fisiológico para essa espécie, e não um indicativo de má qualidade endotelial (Lee *et al.*, 2013). Apesar dessa particularidade, os suínos apresentam a mesma tendência de redução na densidade celular com o avanço da idade (Lee *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Métodos de avaliação do endotélio da córnea

O primeiro relato de avaliação do endotélio da córnea foi em 1919, onde foi utilizada a biomicroscopia com lâmpada de fenda para análise (Vogt, 1919). Desde então, com a percepção de que as células endoteliais desempenham papel fundamental na transparência da córnea, diversos estudos foram desenvolvidos em relação à avaliação do endotélio saudável, após preservação, após transplante ou após uso de medicamentos tópicos intra ou extraoculares (Doughty, 1989).

As principais formas de avaliar o endotélio são: microscopia especular, microscopia confocal, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Vale ressaltar que nenhuma técnica de avaliação será perfeita, e teremos pontos positivos e negativos em cada uma delas. Ainda, essas técnicas podem complementar-se e serem utilizadas em conjunto em um mesmo estudo.

#### 2.3.1.1 Microscopia especular

A microscopia especular é um método não invasivo de avaliação do endotélio corneano, que apresenta como grande vantagem a possibilidade de ser feita em pacientes vivos, embora também possa ser realizada *in vitro*. Diversos estudos dispõem dessa ferramenta para análise da viabilidade do endotélio de córneas doadoras, monitoramento dos efeitos de diferentes cirurgias do segmento anterior, documentação da ação de medicamentos intraoculares e

observação dos efeitos de doenças sobre o endotélio (Chaurasia; Vanathi, 2021; Edelhauser *et al.*, 1975; Kim *et al.*, 1994; Kim; Park; Lee, 2008; Liou; Chiu; Wang, 2004; Price; Cheng, 1981; Sharma *et al.*, 2021; Szalai *et al.*, 2011). Podem ser obtidos dados como a densidade celular, área celular e morfologia celular (Chaurasia; Vanathi, 2021). Contudo, a microscopia especular não permite definir eventos intracelulares que refletem alterações fisiológicas ou bioquímicas sutis (Price; Cheng, 1981).

Na microscopia especular, o ângulo do feixe de luz refletido forma um ângulo igual ao da luz incidente. Ou seja, o aparelho incidirá uma luz sobre a córnea, e as células endoteliais refletirão esse feixe especularmente (como um espelho) na mesma direção. Essa reflexão será captada pelo aparelho, e formará a imagem (Chaurasia; Vanathi, 2021; Price; Cheng, 1981). A área de superfície da imagem do reflexo especular depende da curvatura da superfície refletora. Quanto maior a curvatura, menor a área a ser visualizada (McCarey; Edelhauser; Lynn, 2008). Estão disponíveis dois tipos de aparelhos para essa modalidade, o microscópio especular de contato – que aplanar a superfície da córnea e permite visualização de áreas maiores, e o de não contato – que traz mais conforto para o paciente (Chaurasia; Vanathi, 2021).

Em animais, a microscopia especular já foi empregada em estudos com cães, gatos, ovelhas, chinchilas, lhamas, alpacas, galinhas, equinos, suínos e bovinos (Albuquerque; Freitas; Pigatto, 2016; Andrew *et al.*, 2001; Andrew; Willis; Anderson, 2002; Azevedo *et al.*, 2023; Bercht *et al.*, 2015; Brambatti *et al.*, 2017; Chan-Ling; Curmi, 1988; Coyo *et al.*, 2016; Coyo *et al.*, 2018; Franzen *et al.*, 2010; Morita, 1995; Nagatsuyu *et al.*, 2014; Pigatto *et al.*, 2006; Pigatto *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2023). Sua relevância se dá pela possibilidade de avaliação em animais vivos, permitindo o conhecimento da contagem de células endoteliais antes de procedimentos cirúrgicos que exijam a abertura da câmara anterior, possibilitando antecipar o risco de descompensação endotelial (Andrew *et al.*, 2001; Franzen *et al.*, 2010; Pigatto *et al.*, 2006; Pigatto *et al.*, 2008). Além disso, tem sido amplamente utilizada como um dos exames de triagem para olhos que são encaminhados para banco de tecidos ou transplante de córnea (Chaurasia; Vanathi, 2021).

Esse mecanismo de análise pode ser associado à microscopia eletrônica de varredura em estudos mais aprofundados acerca do endotélio da córnea, seja de forma complementar ou como exame de triagem para incluir córneas saudáveis em um estudo (Albuquerque; Pigatto;

Pigatto, 2020; Edelhauser *et al.*, 1975; Kim; Park; Lee, 2008; Liou; Chiu; Wang, 2004; Terzariol *et al.*, 2016).

### 2.3.1.2 Microscopia confocal

A microscopia confocal é um método que, assim como a microscopia especular, pode ser realizado *in vivo*. Porém, diferentemente da microscopia especular, permite a avaliação de todas as camadas da córnea, não somente do endotélio (Kaufman *et al.*, 2004). Isso é possível pois o microscópio confocal faz uma iluminação pontual em cada porção da amostra analisada, bloqueando o excesso de luz em outras porções. Assim, são obtidas imagens que poderão ser agrupadas para formar uma imagem tridimensional. Graças a esse mecanismo, o aparelho fornece imagens do epitélio superficial, epitélio basal, membrana de Bowman – quando presente, plexo nervoso subepitelial, estroma, nervos profundos, membrana de Descemet e endotélio (Jonuscheit; Doughty; Ramaesh, 2011; Kaufman *et al.*, 2004; Petropoulos *et al.*, 2019).

Em humanos, a microscopia confocal tem sido objeto de estudo acerca da morfologia neuronal, uma vez que evidências demonstram que alterações na morfologia precedem ou estão relacionadas às manifestações clínicas de condições neurodegenerativas periféricas e centrais. Um exemplo importante seria a neuropatia diabética, que afeta os neurônios presentes na córnea (Petropoulos *et al.*, 2019). No que diz respeito ao endotélio da córnea, a vantagem mais relevante desse método é a possibilidade de avaliação mesmo em córneas que não estão mais transparentes, seja por uma distrofia endotelial, ou por um enxerto falho em um transplante (Jonuscheit; Doughty; Ramaesh, 2011).

Lagali e colegas (2007) utilizaram a microscopia confocal para avaliar o padrão de regeneração nervosa da córnea após a colocação de enxertos elaborados por engenharia de tecidos, empregando suínos como modelo experimental (Lagali *et al.*, 2007). A microscopia confocal foi eleita para análise do endotélio da córnea por Lee e colaboradores (2014) na caracterização do endotélio suíno para xenotransplante. Esse foi um estudo *ex vivo*, em que foram obtidos dados de densidade celular, tamanho celular, morfologia e espessura da córnea. Os dados foram comparados aos de primatas não humanos (Lee *et al.*, 2014). Em 2017, a densidade celular do endotélio da córnea de suínos foi obtida pela microscopia confocal em um

estudo *ex vivo*, que tinha como objetivo a caracterização de parâmetros oculares de suínos para posterior uso desses animais como modelo de estudo para olho seco (Menduni *et al.*, 2018).

### 2.3.1.3 Microscopia óptica

A microscopia óptica é associada ao uso de corantes vitais para avaliação do endotélio da córnea *ex vivo* (Clerot *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019; Hünning *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2012; Pigatto *et al.*, 2022; Saad *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 1985). Esse é o método mais comum para verificar perda celular nas áreas não vistas pela microscopia especular, e tem sido usado para determinar trauma celular agudo e morte celular por manipulação cirúrgica (Saad *et al.*, 2008). Os corantes mais empregados são o azul de tripano e o vermelho de alizarina (Park *et al.*, 2012; Saad *et al.*, 2008). O azul de tripano permite a identificação de células endoteliais gravemente danificadas e/ou mortas, pois cora as células que tiveram sua membrana rompida. Já o vermelho de alizarina cora os espaços intercelulares, e permite a identificação de bordas celulares – avaliação da morfologia, além de áreas expostas da membrana de Descemet (Park *et al.*, 2012).

As concentrações de corante variam entre os estudos publicados. Para o azul de tripano, foram relatadas concentrações entre 0,001% e 0,5%. Para o vermelho de alizarina, foram relatadas concentrações entre 0,2% e 1%, ambos com tempo de exposição variado (Clerot *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2012; Saad *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 1985). Em um estudo realizado com 15 córneas humanas, Park e colaboradores (2012) pesquisaram a concentração ideal e tempo ideal de exposição do endotélio para ambos os corantes. Os resultados demonstraram que as concentrações e tempo de exposição ideais para melhor visualização no microscópio óptico são: azul de tripano a 0,4% por 60 segundos de exposição; vermelho de alizarina a 0,5% por 90 segundos de exposição (Park *et al.*, 2012).

A microscopia óptica com auxílio de corantes vitais permite a análise quantitativa e qualitativa da perda celular, além de estudos morfológicos para caracterização do endotélio de uma determinada espécie (Clerot *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2012; Pigatto *et al.*, 2022; Saad *et al.*, 2008). Dentre os outros métodos disponíveis, essa é uma forma rápida e barata de avaliação endotelial (Saad *et al.*, 2008). Os corantes podem ser empregados conjuntamente para estudos de toxicidade de medicamentos ou lesão após procedimento

cirúrgico, ou de forma separada utilizando o vermelho de alizarina em estudos morfológicos de olhos sabidamente saudáveis (Clerot *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019; Hünning *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2012; Pigatto *et al.*, 2022; Saad *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 1985).

Em relação aos estudos publicados em animais, Hünning e colaboradores (2018) estudaram o endotélio da córnea de cães recorrendo à microscopia óptica após coloração com vermelho de alizarina. A morfologia do endotélio da córnea de suínos foi estudada valendo-se da microscopia óptica após coloração com vermelho de alizarina por Clerot e colaboradores (2019). Guimarães *et al.* (2019) observaram os efeitos agudos do besilato de atracúrio no endotélio de galinhas pela coloração com azul de tripano e vermelho de alizarina. Pigatto e colaboradores (2022) avaliaram a morfologia do endotélio da córnea de ovelhas saudáveis utilizando a microscopia óptica e os corantes vitais azul de tripano e vermelho de alizarina.

#### **2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A MEV é um método de avaliação *in vitro* do endotélio da córnea. Sua vantagem quando comparada a outros métodos é a capacidade de captação de detalhes. A MEV tem resolução para avaliar detalhes muito finos de características celulares, como as microvilosidades, e tornou-se amplamente utilizada para avaliar o endotélio da córnea (Doughty, 2006). As imagens obtidas da topografia endotelial permitem observar danos físicos da membrana celular, além do grau de ligação célula-célula (Madden, 1987). Embora a morfologia celular não esteja diretamente ligada à função, quando se trata do endotélio da córnea, a integridade das células é particularmente importante para manter a transparência (Dikstein; Maurice, 1972; Madden, 1987).

O limite máximo de resolução dos microscópios ópticos é dependente dos efeitos de difração que são estabelecidos pelo comprimento de onda da radiação incidente. Para aumentar a resolução, a MEV utiliza um comprimento de onda menor que a luz visível. Para esse fim, um feixe de elétrons é utilizado, ao invés de fótons como em um microscópio óptico. Dessa forma, é possível obter imagens com aumento de 300.000 vezes ou mais (Dedavid; Gomes; Machado, 2007).

A MEV é a ferramenta mais utilizada para avaliação da morfologia endotelial, com diversos estudos publicados em humanos e animais acerca da toxicidade de medicamentos,

avaliação após preservação e avaliações após procedimentos cirúrgicos de córnea ou intraoculares (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Andrade *et al.*, 2019; Andrew *et al.*, 1999; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Edelhauser *et al.*, 1975; Ilmonen *et al.*, 1984; Kadonosono *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1994; Kim; Park; Lee, 2008; Liou; Chiu; Wang, 2004; Madden, 1987; Muccillo *et al.*, 2021; Pigatto *et al.*, 2004; Pigatto *et al.*, 2005a; Reddy *et al.*, 1989; Saggau; Bourne, 1989; Silva *et al.*, 2018; Tamayo-Arango *et al.*, 2009; Terzariol *et al.*, 2016; Van Horn; Schultz, 1974). O uso desse método possibilita a obtenção da densidade celular, da área celular e das variações de forma e tamanho celular – pleomorfismo e polimegatismo (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Andrade *et al.*, 2019; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Doughty, 1989; Doughty, 2006; Kadonosono *et al.*, 1998; Muccillo *et al.*, 2021; Pigatto *et al.*, 2004; Pigatto *et al.*, 2005a; Reddy *et al.*, 1989; Tamayo-Arango *et al.*, 2009; Terzariol *et al.*, 2016). Contudo, os valores de densidade celular podem ser expressivamente diferentes de acordo com o método de fixação utilizado na amostra (Doughty, 2006).

Doughty (2006) utilizou um método de avaliação quantitativa do endotélio corneano utilizando a MEV. Foram avaliados olhos de coelhos, que foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo, as córneas eram dissecadas do olho, formando um botão corneoescleral e, então, fixadas no glutaraldeído; no segundo grupo, o olho inteiro foi fixado no glutaraldeído, para posterior dissecação antes da avaliação no microscópio. O autor observou que ambos os protocolos de fixação mantiveram a superfície endotelial intacta, porém, o protocolo de dissecação pré fixação resultou em mais artefatos e distorção, que foram evitados com a fixação do globo ocular inteiro. Ainda, os valores de densidade celular foram superiores no grupo da dissecação pré fixação (Doughty, 2006).

Para uma melhor visualização do mosaico endotelial, seja na MEV, seja em outro método de avaliação endotelial, as amostras devem ser avaliadas ou fixadas para avaliação em um segundo momento em até seis horas *post mortem* (Farias *et al.*, 2007). O glutaraldeído é o fixador mais empregado (Tamayo-Arango *et al.*, 2009).

#### 2.4.1 Preparo das amostras para análise com MEV

Para o preparo de amostras biológicas, o primeiro e mais importante passo é a fixação. O fixador ideal para a MEV é o glutaraldeído. O contato do material com o glutaraldeído tornará

a superfície da amostra mais resistente, além de preservá-la intacta da forma que ela estiver no momento da fixação (Virtanen *et al.*, 1984; CMM UFRGS, 2019). Para o preparo de córneas, estudos trazem concentrações de soluções contendo glutaraldeído em uma proporção que varia de 2 a 2,7% (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Doughty, 2006; Edelhauser *et al.*, 1975; Tamayo-Arango *et al.*, 2009). A solução será formada, também, por um tampão, que pode ser o cacodilato de sódio ou o tampão fosfato (Doughty, 2006; Edelhauser *et al.*, 1975; Tamayo-Arango *et al.*, 2009). O tempo mínimo de fixação varia de três a 24 horas na literatura, e a solução deve ser mantida a uma temperatura de 4°C (Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Doughty, 2006; Edelhauser *et al.*, 1975).

Após a fixação, o material deverá ser lavado com solução tampão e água destilada para remoção do excesso do fixador (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; CMM UFRGS, 2019; Tamayo-Arango *et al.*, 2009). A próxima etapa é a desidratação da amostra, que é realizada submetendo-a a concentrações crescentes de etanol ou acetona por períodos de 10 a 20 minutos (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; CMM UFRGS, 2019).

As amostras desidratadas são levadas à secagem com dióxido de carbono líquido, em um aparelho de ponto crítico, processo que leva em torno de três horas (CMM UFRGS, 2019). Em seguida, são colocadas sobre *stubs* de alumínio com fita adesiva dupla face, com a área a ser analisada virada para cima (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; CMM UFRGS, 2019). Depois, é feita a metalização, onde o material irá tornar-se condutivo para o feixe de elétrons emitido pelo aparelho da MEV. Esse processo é realizado por meio de deposição de um metal sobre a amostra, que pode ser ouro ou platina (CMM UFRGS, 2019). Quando cumpridas todas essas etapas, as amostras estarão prontas para análise.

#### 2.4.2 Diferentes metodologias de avaliação do endotélio da córnea utilizando MEV

Em 1972, Svedbergh e Bill publicaram um estudo em que foi analisado o endotélio da córnea de humanos e macacos, valendo-se da MEV. A maioria dos olhos foram fixados por perfusão da câmara anterior (CA) com glutaraldeído, salvo olhos que foram enucleados por conta de tumores, onde o botão corneoescleral foi removido após a cirurgia, e posteriormente submerso em glutaraldeído. Nenhum dos olhos tinha doença com envolvimento do segmento anterior do olho. Dados como diâmetro celular, área e densidade celular foram coletados. Como

conclusão, os autores afirmam que a MEV pode ser de valor clínico na escolha de enxertos doadores (Svedbergh; Bill, 1972).

Van Horn e Schultz, em 1974, evidenciaram a sobrevivência das células endoteliais humanas após criopreservação, e o método de avaliação foi a MEV. Foi pesquisado o percentual de células endoteliais intactas observadas nas fotomicrografias, e demonstrou-se que 95% ou mais das células endoteliais permaneciam intactas após o descongelamento das amostras criopreservadas (Van Horn; Schultz, 1974).

Madden, em 1987, avaliou o dano das células endoteliais de coelhos após armazenamento. Os grupos de córneas avaliadas foram: frescas; armazenadas por sete dias em câmara úmida; armazenadas após criopreservação – método de Capella e Kaufman; e danificadas pelo congelamento rápido com uma criossonda. Foram testados alguns corantes vitais e foi feita análise com MEV. O autor concluiu que a coloração com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio, com MEV em duplicata para avaliação, configuram a forma mais adequada para uso no desenvolvimento do armazenamento da córnea. Ainda, o uso da MEV demonstrou que não houve descolamento das células endoteliais acarretado pelos procedimentos de armazenamento. Ademais, não houve desorganização da camada celular após o armazenamento e, na maioria dos casos, foi mantido um contacto próximo entre células. Em vez disso, as células gravemente danificadas foram identificadas por corrosão ou perfuração da superfície celular e formação de bolhas na membrana (Madden, 1987).

Em 1975, Edelhauser e colaboradores desenvolveram um estudo para avaliar os efeitos de diversas soluções de irrigação no endotélio da córnea de coelhos e macacos. A relevância do estudo vinha da preocupação com as soluções de irrigação utilizadas na cirurgia de catarata, que podem causar danos endoteliais permanentes. O estudo foi delineado empregando um sistema de perfusão acoplado a um microscópio especular para avaliar o dano em tempo real às células, além das microscopias eletrônica de varredura e de transmissão para avaliação qualitativa do mosaico endotelial (Edelhauser *et al.*, 1975).

Ilmonen e colaboradores (1984) avaliaram a cicatrização do endotélio corneano em porquinhos-da-índia após uma pequena perfuração ocular. Os animais foram aleatoriamente selecionados e sacrificados em 30 minutos, um, dois, três, quatro, sete e 14 dias após a perfuração. Imediatamente após o sacrifício as córneas eram dissecadas e fixadas para posterior preparação para a MEV e avaliação. Observou-se que em sete dias a ferida estava

completamente selada pelo endotélio, contudo, de maneira irregular. As células endoteliais não atingiram seu arranjo regular durante o período de acompanhamento de 14 dias (Ilmonen *et al.*, 1984).

Em um estudo para avaliação dos efeitos da anestesia intracameral no endotélio da córnea, foram utilizados 12 coelhos, divididos em três grupos teste: em um grupo foi realizada irrigação da CA com solução de 0,02% de lidocaína; no segundo grupo, a CA foi irrigada com solução de 0,2% de lidocaína; no terceiro grupo, a solução utilizada foi de 2%. Os respectivos grupos controle receberam injeção de solução salina balanceada intracameral. Após a realização dos testes, os animais foram sacrificados e as córneas imediatamente dissecadas e fixadas no glutaraldeído, para posterior realização da MEV. Foi documentado o número de células hexagonais por mm<sup>2</sup> como parâmetro de comparação. Como resultado, as concentrações de 0,02 e 0,2% foram avaliadas como seguras para irrigação da CA, enquanto que a concentração de 2% demonstrou irregularidade no mosaico endotelial e perda significativa das microvilosidades das células (Kadonosono *et al.*, 1998).

Em outro estudo de avaliação dos efeitos da anestesia intracameral no endotélio, foram comparados lidocaína e carbacol na CA. Foram utilizados 40 coelhos, 20 para cada grupo. O primeiro grupo foi o da lidocaína, em que em um olho foi injetado 0,02 ml de lidocaína a 1%, e no olho contralateral (controle) foi injetado 0,02 ml de solução salina. O segundo grupo foi o do carbacol, em que em um olho foi injetado 0,02 ml de carbacol a 0,01%, e no olho contralateral (controle) foi injetado 0,02 ml de solução salina. A perda de células endoteliais e a espessura da córnea uma semana e um mês após a injeção foram avaliadas por microscopia especular. Para estudos morfológicos, foram excisados os botões corneoesclerais, posteriormente corados com vermelho de alizarina e azul de tripano. Também foi realizado exame de MEV para análise qualitativa do endotélio. Concluiu-se que não houveram alterações morfológicas ou funcionais no endotélio com essas concentrações (Liou; Chiu; Wang, 2004).

Kim, Park e Lee (2008) compararam os efeitos de alguns antibióticos administrados na CA sobre o endotélio da córnea. Foram utilizados 36 olhos de coelhos, divididos em quatro grupos: grupo controle – solução salina balanceada; grupo que recebeu cefazolina 1000 µg/0,1 ml; grupo que recebeu levofloxacin 500 µg/0,1 ml; grupo que recebeu moxifloxacin 500 µg/0,1 ml. A toxicidade endotelial foi avaliada com auxílio da espessura central da córnea, da microscopia especular, da MEV e da microscopia eletrônica de transmissão um dia após a

injeção. A MEV foi empregada de forma qualitativa. Não houve toxicidade significativa nos grupos teste (Kim; Park; Lee, 2008).

No que diz respeito aos estudos envolvendo meios de preservação de córnea e MEV, são vários estudos publicados sobre o tema (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Andrew *et al.*, 1999; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Kim *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1989; Saggau; Bourne, 1989). A MEV permite uma avaliação endotelial com detalhes e, como mencionado anteriormente, a integridade do mosaico endotelial é fator crucial na manutenção da transparência (Dikstein; Maurice, 1972; Madden, 1987). Essa análise morfológica foi e é fundamental no desenvolvimento e aprimoramento dos meios de preservação de córnea, tornando a MEV peça-chave quando o assunto é preservação e transplante de córnea (Kim *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1989; Saggau; Bourne, 1989).

Em um estudo publicado em 1989 por Reddy e colaboradores, foi avaliado o endotélio da córnea de coelhos e humanos, preservados em meio K-Sol®, com e sem antioxidantes. A MEV foi empregada para classificar a morfologia das células em termos de formato celular, bordas celulares, edema celular e orifícios apicais, após 14 a 21 dias de preservação. As características morfológicas foram graduadas de I a IV: formato celular hexagonal (I) a pleomorfismo acentuado (IV); bordas celulares regulares (I) a acentuadamente irregulares (IV); edema celular ausente (I) a proeminente (IV); orifícios apicais presentes em 1% (I) a 70-100% (V) das células. Concluiu-se que, na ausência de antioxidantes, as alterações morfológicas eram significativamente maiores. Ou seja, o uso de antioxidantes se provou necessário (Reddy *et al.*, 1989).

Saggau e Bourne (1989) utilizaram a MEV para comparar a preservação da estrutura endotelial de três grupos de córneas humanas após 14 dias de armazenamento em dois meios de preservação, o K-Sol® e o CSM®. Cada grupo contava com os dois olhos dos pacientes, um que seria preservado em K-Sol®, e outro em CSM®. Ao todo foram 22 pares de olhos, e os grupos foram divididos de acordo com o lote do meio de preservação. Para cada amostra, foram obtidas três fotomicrografias com aumento de 500 vezes do endotélio central, e uma fotomicrografia com aumento de 10 vezes de toda a superfície endotelial. A partir das fotomicrografias com aumento de 500 vezes, foi determinada a porcentagem média de células com membranas celulares intactas. A partir das fotomicrografias com aumento de 10 vezes, foi determinada a porcentagem de toda a superfície endotelial com células intactas remanescentes.

O produto dos dois percentuais foi utilizado como um percentual geral de preservação morfológica das células endoteliais. Como resultado, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os dois meios de preservação (Saggau; Bourne, 1989).

Em um estudo que avaliou os efeitos do armazenamento da córnea, os pesquisadores utilizaram 95 córneas humanas em meio de preservação Optisol® e 22 córneas também humanas em câmara úmida, e compararam a permeabilidade e morfologia do endotélio corneano. Nesse estudo, a análise quantitativa ficou voltada para a permeabilidade das células endoteliais, que foi mensurada utilizando-se carboxifluoresceína. A MEV e a microscopia eletrônica de transmissão foram aplicadas para análise qualitativa, apenas. Os autores concluíram que o Optisol® pode preservar a função da barreira endotelial durante 14 dias, enquanto que essa função é perdida em três dias de armazenamento em câmara úmida (Kim *et al.*, 1994).

Em 1999, Andrew e colaboradores realizaram um estudo comparando a preservação da córnea de cães em Optisol® e em um meio contendo três antibióticos – neomicina, polimixina B e gramicidina (NPG). Foram utilizados 60 olhos de 30 cães eutanasiados por razões alheias ao estudo. Os olhos não apresentavam sinais de doença ocular. O tempo de armazenamento nos meios foi de um, sete, 14, 21 e 35 dias. Seis córneas foram mantidas em cada meio por cada período de avaliação. As córneas eram divididas ao meio, com a porção nasal sendo alocada no meio de preservação, e a porção temporal novamente dividida ao meio: metade passava por coloração com azul de tripano e vermelho de alizarina para realização de microscopia óptica; a outra metade era alocada no glutaraldeído para fixação e posterior realização de MEV. Foi calculado o percentual de células endoteliais viáveis em cada período de armazenamento. Como resultado, observou-se que o Optisol® trouxe um percentual de células viáveis elevado até 21 dias, enquanto que o NPG apresentou perda celular de 100% em todos os períodos analisados (Andrew *et al.*, 1999).

Arndt, Reese e Köstlin (2001) preservaram as córneas de 33 cães e 31 gatos em Optisol GS®. Os animais foram eutanasiados por razões alheias ao estudo. Os olhos não apresentavam sinais de doença ocular. O método de escolha para análise da perda endotelial foi exclusivamente MEV. Cada par de córneas de um mesmo animal passou pela seguinte metodologia: uma das córneas foi imediatamente fixada em glutaraldeído após a eutanásia (grupo controle); a outra córnea foi alocada em meio de preservação por 5, 10, 15 ou, 20 dias

(grupos I a IV). Foram avaliados área celular, densidade celular e percentual de perda celular. Os autores concluíram que o meio de preservação Optisol GS® foi eficaz na preservação da córnea de cães por até 10 dias; e por até 15 dias em gatos (Arndt; Reese; Köstlin, 2001).

Na literatura, há um único estudo que abrange o uso do meio Eusol-C® na preservação da córnea de animais (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020). Nesse estudo, foram utilizados 40 olhos de 20 equinos provenientes de abatedouro licenciado. O período de preservação analisado foi de sete e 14 dias, e a avaliação do endotélio da córnea foi feita exclusivamente por MEV. Os botões corneoesclerais foram divididos em quatro grupos: os que ficaram preservados por sete dias, os que ficaram preservados por 14 dias e seus respectivos controles. Foram calculados os percentuais de perdas celulares em cada amostra, subtraindo-se a área de perda da área total de cada amostra. Como resultado, constatou-se que o meio Eusol-C® é capaz de preservar satisfatoriamente a córnea de equinos por até 14 dias.

#### 2.4.3 Avaliação do endotélio da córnea de suínos utilizando MEV

Em 1992, Ellis, McGhee e Lee realizaram o primeiro estudo envolvendo a avaliação do endotélio da córnea de suínos pela MEV. Foram avaliados os efeitos da preservação da córnea desses animais em sulfato de condroitina por três, cinco, oito e 10 dias. As córneas foram divididas em três grupos: o grupo controle – MEV para analisar a ultraestrutura saudável; grupos teste para cada período de preservação; grupo de diferentes tempos de enucleação – para avaliar perda endotelial no período entre enucleação e fixação da amostra. Com a MEV, foram obtidos os seguintes parâmetros: área celular ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro celular ( $\mu\text{m}$ ), densidade celular (células/ $\text{mm}^2$ ) e percentual de células com membrana celular rompida. Com os resultados obtidos, os autores afirmaram que o endotélio da córnea dos suínos é semelhante ao humano, e que as córneas de suínos poderiam ser uma opção viável para substituir a córnea humana nos estudos relacionados aos meios de preservação (Ellis; McGhee; Lee, 1992).

Em 2009, Tamayo-Arango e colaboradores publicaram estudo acerca da análise do endotélio da córnea de suínos saudáveis utilizando a MEV. Foram utilizados 10 olhos de suínos adultos e saudáveis. Os olhos foram enucleados e fixados em glutaraldeído com a córnea voltada para cima. Os botões corneoesclerais foram obtidos por um corte de 360° e reduzidos a

quatro porções. Após a obtenção das fotomicrografias, foram estimadas a área celular, a densidade celular média, e a porcentagem de variação de pleomorfismo e polimegatismo. Os resultados do trabalho servem como parâmetro para estudos-teste de futuras pesquisas (Tamayo-Arango *et al.*, 2009).

Em 2016, a MEV foi empregada para observar possíveis alterações na ultraestrutura endotelial da córnea de suínos após injeção intracameral de azul de brilhante à 0,05% para coloração da cápsula anterior do cristalino. Foram formados dois grupos de 10 córneas cada: grupo controle (olhos direitos) e grupo teste (olhos esquerdos). Com a obtenção das fotomicrografias, o percentual de perda celular foi calculado em cada amostra por meio da demarcação das áreas de perda, comparando-as com a área total. Como conclusão, os autores relatam que não houve perda endotelial significativa no grupo teste, e que o uso de azul de brilhante na CA é seguro (Terzariol *et al.*, 2016).

## 2.5 Preservação da córnea

O objetivo da preservação da córnea é prolongar o tempo de armazenamento do tecido do doador, mantendo a viabilidade das células endoteliais (Sharma *et al.*, 2021). Para um transplante de córnea bem sucedido, é necessário que, no mínimo, 50% da função endotelial seja mantida (Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). Antes que a preservação de córnea pudesse ser realidade na medicina humana, os transplantes de córnea eram realizados a partir da enucleação de doadores falecidos (Jeng, 2006). O primeiro relato de armazenamento bem sucedido desse tecido foi em 1937, quando globos oculares inteiros foram mantidos em frascos de vidro dentro de um recipiente a 4°C, por 20 a 56 horas (Filatov, 1937 *apud* Jeng, 2006). O modelo proposto por Filatov serviu como base para criação da “câmara úmida”, que foi um método de preservação empregado por muitos anos, onde a córnea era preservada por até 48 horas (Jeng, 2006).

Dependendo do tempo de armazenamento, os meios podem ser classificados como de curto, médio e longo prazo. Os meios de preservação de curto prazo abrangem as câmaras úmidas e os meios hipotérmicos mais antigos - como o McCarey-Kaufman (MK), que possibilitam de 24 a 72 horas de armazenamento (McCarey; Kaufman, 1974; Sharma *et al.*, 2021). Os meios de médio prazo incluem os hipotérmicos mais recentes como o Eusol-C® e o

Optisol-GS®, que permitem de 10 a 14 dias de armazenamento a 2-8°C (Kanavi *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2021; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). Já os meios de longo prazo compreendem: o meio de cultura de órgãos, com período armazenamento de cerca de um mês em 31 a 37°C; glicerina, que permite a preservação por um ano; e a criopreservação, com período indefinido de armazenamento em nitrogênio líquido a – 70°C (Pels; Beele; Claerhout, 2007; Rodríguez-Fernández *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021).

O método de cultura de órgãos para preservação de córnea é o mais utilizado na Europa, e o mais indicado para locais em que haja escassez de tecido doador, permitindo um maior período de armazenamento (Jeng, 2006). Ainda, permite que se identifiquem eventuais contaminações do tecido com mais facilidade antes do transplante (Jeng, 2006; Pels; Beele; Claerhout, 2007). Todavia, necessita de equipamentos específicos e pessoal treinado, o que pode dificultar a realização desse tipo de preservação (Pels; Beele; Claerhout, 2007).

No que tange respeito à criopreservação, a maior vantagem do método é a de manter o tecido preservado por um período indefinido de tempo (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021). Contudo, as córneas criopreservadas apresentam baixa viabilidade endotelial, tendo sua função prejudicada. Assim sendo, córneas criopreservadas são indicadas apenas para emergências, em ceratoplastias tectônicas (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2021). Na medicina veterinária, estudos demonstram que a criopreservação da córnea pode produzir enxertos tectônicos sem alterações estruturais ou microbiológicas por longos períodos de tempo em felinos, caninos e equinos (Costa *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019).

### 2.5.1 Meios de preservação de córnea hipotérmicos

O primeiro meio de preservação hipotérmico desenvolvido foi o McCarey-Kaufman (MK), em 1974. O MK® consiste em uma mistura de meio de preservação de tecidos (TC-199), 5% de dextrano e 100 UI/ml de uma mistura de estreptomicina e penicilina. O pH da substância é de 7,4 (McCarey; Kaufman, 1974). Esse método aumentou o tempo de armazenamento da córnea de um ou dois dias obtido com a câmara úmida, para quatro a sete dias, sendo um passo fundamental para o desenvolvimento do transplante de córnea (Jeng, 2006; Kim *et al.*, 1994; McCarey; Kaufman, 1974).

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de verificar a eficácia do meio MK®, que se demonstrou superior ao armazenamento em câmara úmida na manutenção da viabilidade endotelial, especialmente em um período maior que 48 horas. A avaliação da viabilidade endotelial foi analisada com corantes vitais, microscopia eletrônica de varredura e microscopia especular (Aquavella; Van Horn; Haggerty, 1975; Friedland; Forster, 1976; Neubauer; Laing; Leibowitz, 1984; Taylor; Hunt, 1985). Contudo, ficou estabelecido que seu uso não deveria ultrapassar os quatro dias a uma temperatura de 4°C (Wilson; Bourne, 1989).

Em 1985, Kaufman e colaboradores desenvolveram o meio K-Sol®, uma modificação do meio MK®. A diferença do K-Sol® para o meio MK® foi a adição do tampão HEPES, substituição da estreptomicina e penicilina por gentamicina a uma concentração de 100 µg/ml, e substituição do dextrano por sulfato de condroitina a 2,5% com o objetivo de retardar o desenvolvimento de edema de córnea. O pH da substância é de 7,4 (Kaufman *et al.*, 1985). Foram incluídos 17 pacientes no primeiro ensaio clínico da efetividade do K-sol®, e os autores concluíram que esse meio poderia manter córneas viáveis para ceratoplastia penetrante por, pelo menos, duas semanas. Os resultados obtidos nesse estudo foram considerados virtualmente idênticos aos obtidos com tecido preservado em meio MK® por dois ou três dias (Jeng, 2006; Kaufman *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1994).

Em um estudo realizado em cães e humanos, foi comparada a perda celular endotelial, avaliada por microscopia eletrônica de varredura, em córneas armazenadas nos meios MK® e K-Sol® por 14 dias a 4°C. A perda endotelial foi menor nas córneas armazenadas em K-Sol® (Stein; Bourne; Campbell, 1986). Em outro trabalho onde também foi avaliada a perda endotelial por microscopia eletrônica de varredura, não foram evidenciadas diferenças estatísticas na preservação endotelial entre córneas humanas armazenadas em meio MK® por dois a três dias daquelas armazenadas em K-Sol® por sete a 10 dias (Stein; Laibson, 1987).

A adição do sulfato de condroitina aos meios de preservação desempenhou papel primordial no prolongamento do período de armazenamento, uma vez que atua como antioxidante e como estabilizador de membrana e fator de crescimento (Szaflik; Brix, 2000). Em 1986, foi criado o meio CSM®, composto por meio essencial mínimo, 1,35% de sulfato de condroitina, tampão HEPES, 100 µg/ml de gentamicina, mercaptoetanol e aminoácidos não essenciais (Lindstrom *et al.*, 1986). A intenção da formulação foi fornecer um meio único para

armazenamento de médio prazo a 4°C e armazenamento de longo prazo a 34°C (Lindstrom *et al.*, 1986; Wilson; Bourne, 1989).

No estudo onde o CSM® foi comparado ao K-Sol®, o método de análise foi a microscopia óptica com uso de corantes virais, e o dano às células endoteliais foi semelhante aos sete e 10 dias de armazenamento. Porém, após 14 e 22 dias de armazenamento, as córneas preservadas em K-Sol® apresentaram progressivamente mais danos endoteliais (Lindstrom *et al.*, 1987). Os autores argumentaram que a cultura de órgãos a 34°C deveria ser usada para armazenamento além de 10 dias para uma preservação mais efetiva das células endoteliais, valendo-se da versatilidade do CSM® como meio hipotérmico e meio de cultura de órgãos (Lindstrom *et al.*, 1987). Em outro trabalho comparativo entre os meios CSM® e K-Sol®, a microscopia eletrônica de varredura foi o método de eleição para avaliação da perda endotelial de córneas armazenadas a 4°C por 14 dias em cada meio. Como resultado, os autores não encontraram diferenças entre os meios analisados (Saggau; Bourne, 1989). Apesar de alguns estudos demonstrarem eficácia, o CSM® não ganhou popularidade, sendo pouco utilizado como meio de preservação de córnea (Kim *et al.*, 1994).

No final da década de 1980, foi criado o meio Dexsol®, que diferia do CSM®, basicamente, pela adição de dextrano a 1% na formulação. O objetivo foi aumentar a pressão osmótica coloidal e prevenir o edema de córnea, permitindo, assim, um maior período de armazenamento sem prejudicar o enxerto (Kim *et al.*, 1994). Em um estudo com córneas de coelhos, comparou-se a deturgescência das córneas armazenadas nos meios K-M®, K-Sol®, CSM® e Dexsol® por até 12 dias. Foi realizada uma estimativa da capacidade de transporte ativo de íons de cada grupo experimental pela determinação da espessura da córnea na presença e ausência de ouabaína. As córneas armazenadas em MK®, K-Sol® e CSM® mantiveram, aproximadamente, 70% da atividade de bomba após três dias de armazenamento, o e 65% após seis dias de armazenamento. Já as córneas armazenadas em Dexsol®, mantiveram 92% da atividade após três dias, 78% após seis dias e 44% após 12 dias de armazenamento (Walkenbach; Corwin; Ye, 1991).

Com a criação do Dexsol®, o período de preservação da córnea aumentou, porém, nenhum dos meios disponíveis comercialmente permitia um armazenamento por períodos mais longos com segurança. Apesar de alguns estudos indicarem a preservação por até 14 dias, na prática esse período era de, no máximo, sete a 10 dias (Kim *et al.*, 1994). Estudos em humanos

demonstraram que, embora a função endotelial diminua com o aumento do tempo de armazenamento da córnea, esse tempo pode, na verdade, ter um efeito benéfico na sobrevivência do enxerto em olhos de alto risco. O armazenamento do tecido corneano por mais de sete dias resulta na migração completa das células dendríticas para o meio de cultura. Essas células dendríticas estimulam as células T do receptor, e acredita-se que isso propicie o início precoce da rejeição do transplante de córnea. Ou seja, um período maior de armazenamento pode ser crucial em alguns casos (Ardjomand; Berghold; Reich, 1998; Jeng, 2006; Simon *et al.*, 2004).

Ao início da década de 1990, foi criado o meio Optisol®, um híbrido entre os meios K-Sol® e Dexsol®. O Optisol® apresenta sulfato de condroitina à 2,5% como o K-Sol®, e 1% de dextrano como o Dexsol®. Além disso, possui uma série de aditivos que não estão presentes em outros meios, como vitaminas, hidroxiprolina e precursores de adenosina trifosfato (ATP). Com a adição de estreptomicina e gentamicina, foi criado o Optisol-GS®, o meio hipotérmico mais utilizado desde então (Jeng, 2006; Kim *et al.*, 1994; Lindstrom *et al.*, 1992; Means *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 1995).

Num dos primeiros estudos publicados acerca da efetividade do meio Optisol®, Lindstrom e colegas (1992) compararam os efeitos da preservação desse meio com o M-K® e o Dexsol®. Os autores avaliaram a presença de edema corneano nas amostras, e observaram que o armazenamento das córneas doadoras em Optisol® preservava as células endoteliais por até duas semanas a 4°C, visto que o edema de córnea era significativamente menor nas amostras mantidas nesse meio (Lindstrom *et al.*, 1992). Kim e colaboradores (1994) também estudaram a permeabilidade endotelial após a preservação em Optisol®, utilizando a MEV para analisar a integridade das junções celulares. Como resultado, observou-se que as junções endoteliais foram mantidas durante 14 dias pelo Optisol®, preservando a função de barreira do endotélio por esse período (Kim *et al.*, 1994).

Em 1995, Means e colaboradores (1995) avaliaram a perda endotelial após preservação em meio Optisol-GS® a 4°C com o uso de corantes vitais. Foi observado que as córneas mantidas por até 21 dias no meio de preservação apresentaram uma elevada contagem de células endoteliais, e que, somente após 35 dias de armazenamento, a contagem celular caiu em 50% (Means *et al.*, 1995). A partir de então, o Optisol-GS® passou a ser o meio de preservação de escolha para tecidos doadores, uma vez que permitia o estoque do material por períodos

superiores a 10 dias sem comprometimento da função endotelial. Ademais, é frequentemente utilizado em estudos para comparação com meios novos que surgem no mercado, por ser considerado o padrão ouro no que diz respeito à preservação de córnea (Gimenes *et al.*, 2022; Javadi *et al.*, 2021; Kanavi *et al.*, 2014; Mistò *et al.*, 2020; Parekh *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2021).

Na medicina veterinária, excluindo-se estudos com animais modelo, até o momento, foram desenvolvidas duas pesquisas com Optisol-GS® para analisar a preservação do endotélio da córnea (Andrew *et al.*, 1999; Arndt; Reese; Köstlin, 2001). Andrew e colaboradores (1999) compararam a eficácia do Optisol-GS® e de uma solução com três antibióticos (neomicina, polimixina B e gramicidina) na preservação da córnea de 30 cães. As córneas foram divididas em grupos de diferentes períodos de armazenamento: um, sete, 14, 21 e 35 dias. Ao final de cada período, as córneas do respectivo grupo foram divididas ao meio e analisadas metade por microscopia óptica com corantes vitais, e outra metade por MEV. As córneas mantidas em solução antibiótica apresentaram 100% de perda endotelial em todos os períodos analisados. Enquanto que as córneas mantidas em Optisol-GS® mantiveram uma viabilidade endotelial de cerca de 98,9% após 21 dias de armazenamento. Somente na última avaliação, com 35 dias, a perda endotelial com Optisol-GS® foi de 61,4%, considerada significativa (Andrew *et al.*, 1999).

Arndt, Reese e Köstlin (2001) escolheram o Optisol-GS® como meio de preservação para um estudo com 33 cães e 31 gatos. Cada animal representou um par de córneas, sendo que as córneas dos olhos esquerdos serviram de controle, e foram fixadas em glutaraldeído imediatamente após a eutanásia do animal, para posterior avaliação com MEV. As córneas dos olhos direitos foram armazenadas em Optisol-GS® por períodos de cinco, 10, 15 ou 20 dias e, após, fixadas em glutaraldeído para avaliação com MEV. Como resultado, os autores observaram que o endotélio da córnea foi preservado satisfatoriamente por até 10 dias em cães, e por até 15 dias em gatos (Arndt; Reese; Köstlin, 2001).

### 2.5.2 Eusol-C®

Em 2005, foi apresentado o primeiro estudo preliminar envolvendo o uso do meio Eusol-C®, em uma conferência do *The Cornea Society* e do *Eye Bank Association of America*,

que ocorreu em Chicago, Estados Unidos. Os autores apresentaram o Eusol-C® como uma alternativa eficaz ao Optisol GS® em termos de manutenção da viabilidade do tecido doador (Bryan *et al.*, 2005). Esse meio inclui dextrano como agente osmótico, piruvato de sódio e glicose como fontes energéticas, aminoácidos, sais minerais e vitaminas como nutrientes, gentamicina como antibiótico, HEPES e bicarbonato como tampões e vermelho de fenol como indicador de pH (Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). O Eusol-C® difere do Optisol-GS® por não apresentar sulfato de condroitina, purinas e alguns aminoácidos essenciais e vitaminas na sua composição, além de apresentar somente a gentamicina como antibiótico. Ainda, possui glutamina, uma substância ausente no Optisol-GS® (Kanavi *et al.*, 2014). Por sua composição mais simplificada, o Eusol-C® surgiu como uma opção mais acessível em termos de custo, e ganhou popularidade na Europa (Burgos-Blasco *et al.*, 2022; Kanavi *et al.*, 2014; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016).

Em um estudo realizado para comparar os índices quantitativos e qualitativos das córneas mantidas em Optisol-GS® ou Eusol-C®, foram incluídas 180 córneas de 90 doadores, sendo 90 córneas-teste para cada meio. O período de armazenamento foi de sete dias, e todas as amostras foram avaliadas aos dias um e sete. Edema de córnea e dobras da membrana de Descemet consistiram nos índices qualitativos, que foram analisados pela biomicroscopia com lâmpada de fenda. A densidade de células endoteliais, porcentagem de células hexagonais, porcentagem de polimegetismo e área celular foram os índices quantitativos, avaliados por microscopia especular. Não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados, demonstrando que não há superioridade entre os meios Eusol-C® e Optisol-GS® no período de sete dias de preservação. Os autores discutem que, apesar de o Eusol-C® conter menos componentes que o Optisol-GS®, a presença de glutamina, que é um suplemento básico para vários tipos celulares, pode compensar a ausência dos outros compostos (Kanavi *et al.*, 2014).

Yuksel, Uzunel e Küsbeci (2016) incluíram 27 córneas que não estavam aptas para transplante em um estudo para observar os efeitos da preservação em meio Eusol-C® por 9 a 24 dias a 4°C. Todas as amostras foram avaliadas diariamente com microscópio especular. A perda endotelial foi de 3,1% ao dia, sendo de 24,5% após 8 dias de preservação e de 50% após uma média de 14,2 dias. Foi observado que a perda endotelial foi superior às relatadas em estudos prévios, mas que isso provavelmente deve-se ao método de análise, ou ao fato de as córneas já estarem impróprias para transplante ao início do estudo. Todavia, os autores afirmam

que o Eusol-C® parece ter efeito satisfatório na preservação da córnea (Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016).

Em um estudo transversal que foi realizado usando prontuários de 1.062 córneas de doadores do Banco de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Brasil, desenvolvido por Freire e colegas (2018), a qualidade das córneas doadoras estocadas em meio Eusol-C® e Optisol-GS® nos períodos de 2013 a 2016 foi comparada. A avaliação qualitativa foi feita com lâmpada de fenda, e a quantitativa com microscópio especular. Os resultados adquiridos demonstraram que, nos aspectos qualitativos, o meio Optisol-GS® foi superior ao Eusol-C®. Contudo, nos aspectos quantitativos (densidade celular), os meios não diferiram entre si (Freire *et al.*, 2018). Outro trabalho comparativo dos dois meios foi realizado no banco de olhos do Hospital General do México “Dr. Eduardo Liceaga”. Novamente foi utilizada a microscopia especular como forma de análise. A perda celular, área celular e a hexagonalidade não apresentaram diferença estatística entre os meios durante cinco dias de armazenamento (Mena-Linares *et al.*, 2023).

Recentemente, um estudo publicado por Burgos-Blasco e colegas (2022) demonstrou a eficácia do meio Eusol-C® para uso em enxertos tectônicos de córnea, em temperatura de armazenamento de  $-78^{\circ}\text{C}$  por 6,9 meses em média. Esses enxertos foram posteriormente transplantados, e avaliados no receptor por um período de até 12 meses. Concluiu-se que o meio Eusol-C® pode ser utilizado de forma efetiva para este fim, reduzindo a necessidade de equipamento e pessoal treinado (Burgos-Blasco *et al.*, 2022).

No que tange respeito a estudos em animais, em 2020 foi publicado um trabalho que avaliou a preservação do endotélio da córnea de equinos em meio Eusol-C® por sete a 14 dias (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020). Foram incluídos no estudo 40 bulbos oculares de 20 animais, divididos em quatro grupos: os preservados por sete dias, os preservados por 14 dias e seus respectivos controles. O método de avaliação foi a MEV. A perda endotelial do grupo de córneas que ficou preservado por sete dias foi de 7,62%, enquanto que a do grupo armazenado por 14 dias foi de 9,12%. Não houve diferença estatística entre esses valores, nem entre os grupos controle, concluindo-se que houve sucesso na preservação da córnea de equinos em meio Eusol-C® por até 14 dias.

### 2.5.3 Preservação da córnea em suínos

Embora a córnea suína não apresente a membrana de Bowman, suas características biológicas e morfológicas se provaram bastante semelhantes às da córnea humana (Camber *et al.*, 1987; Crespo-Moral *et al.*, 2020; Heichel *et al.*, 2016; Kunzmann *et al.*, 2017; Menduni *et al.*, 2018; Sanchez *et al.*, 2011). Dada a baixa disponibilidade de córneas humanas, normalmente apenas as córneas que não estão aptas para transplante são usadas em pesquisa, o que pode alterar os resultados obtidos (Rodella *et al.*, 2023). A utilização de córnea suína não apresenta dilemas éticos, uma vez que esses tecidos são geralmente descartados como resíduos da indústria (Doke; Dhawale, 2015). Assim sendo, essa espécie tem sido amplamente empregada como modelo de estudo para doenças e procedimentos cirúrgicos oculares (Chan; Cho; Boost, 2014; Hwang; Kim, 2009; Kunzmann *et al.*, 2017; Menduni *et al.*, 2018; Ruiz-Ederra *et al.*, 2005).

Em relação à preservação da córnea, a espécie suína também tem sido abordada como modelo de estudo. Em 1992, Ellis, McGhee e Lee analisaram os efeitos do armazenamento da córnea desses animais em sulfato de condroitina a 2,5% por três, cinco, oito e 10 dias. O endotélio da córnea foi avaliado com MEV, e os parâmetros descritos foram a densidade celular, área celular e percentual de perda celular. Os autores concluíram que o endotélio suíno se comporta de forma semelhante ao humano quando preservado, e que a córnea suína poderia servir de modelo para estudos com meios de preservação (Ellis; McGhee; Lee, 1992).

Recentemente, em um resumo publicado em 2022, Rodella e colaboradores utilizaram a espécie suína como modelo *ex vivo* de estudo para observar a performance e segurança do armazenamento da córnea em meios de preservação. As córneas foram acondicionadas em meio hipotérmico Eusol-C® a 4°C e em meio de cultura de órgãos Tissue-C® a 31°C. Foram avaliados parâmetros como a densidade celular e perda celular com corantes vitais aos dias zero, três, sete e 14. Encontrou-se uma perda celular inferior a 20% após 14 dias de armazenamento em meio Eusol-C®, e inferior a 10% após 14 dias de armazenamento em meio Tissue-C®. Concluiu-se que o modelo suíno *ex vivo* desenvolvido permitiu avaliar o desempenho e a segurança das condições de armazenamento da córnea (Rodella *et al.*, 2022).

Em outro resumo publicado em 2023 pelo mesmo grupo de pesquisadores, os efeitos do armazenamento da córnea de suínos e de humanos em meio Eusol-C®, com posterior lavagem do tecido com solução comercial PSS-L®, foram avaliados. As córneas humanas incluídas no estudo não estavam aptas para transplante. Os tecidos foram armazenados por um período de

14 dias a 2-8°C e, então, lavados por um minuto com 30 ml da solução PSS-L® para remover os resíduos do meio de preservação. Valendo-se da microscopia especular, os seguintes parâmetros foram obtidos aos dias zero e 14: densidade celular, percentual de hexagonalidade, área celular, morfologia endotelial e mortalidade celular. Após o período de 14 dias, a mortalidade nas córneas humanas foi de 3,1%, em média, enquanto que nas córneas suínas foi de 7,8%, em média. Concluiu-se que as córneas humanas e suínas apresentaram parâmetros de qualidade satisfatórios após acondicionamento em meio Eusol-C® por 14 dias e lavagem com PSS-L® (Giurgola *et al.*, 2023).

Em 2023, Rodella e colaboradores publicaram um artigo trazendo os dados dos estudos anteriores de forma mais detalhada. O trabalho sugere um modelo *ex vivo* de córnea suína como alternativa à córnea humana para analisar a preservação do endotélio após armazenamento. Para este fim, foram comparadas córneas humanas e suínas sob condições hipotérmicas (2 a 8°C) ou de cultura de órgãos (31 a 35°C) para características qualitativas, tais como a espessura central da córnea, transparência da córnea, morfologia endotelial, densidade de células endoteliais e a mortalidade endotelial total. A mortalidade endotelial foi calculada com auxílio de um *software* chamado *ImageJ*, que permite a seleção manual de uma região de interesse em uma imagem - nesse caso, a de perda celular. O *software* calcula a área selecionada manualmente a partir da área total contida na imagem – normalmente as imagens contêm calibração. As imagens foram obtidas com câmera de alta resolução a partir da microscopia óptica com azul de tripano. Como resultado, os parâmetros qualitativos de córneas suínas e humanas mostraram tendências comparáveis sob ambas as condições de armazenamento investigadas por até 14 dias. E como conclusão, o modelo proposto é sugerido como uma alternativa confiável para uso em estudos preliminares de preservação endotelial (Rodella *et al.*, 2023).

## **2.6 Transplante de córnea – perspectivas para xenotransplante**

De acordo com dados publicados pelo *Global Vision Database*, existem 33,6 milhões de pessoas cegas ao redor do mundo (Steinmetz *et al.*, 2021). As opacidades de córnea estão entre as cinco principais causas de cegueira, e representam 5% do total de casos (Bourne *et al.*, 2017). A distrofia endotelial da córnea ou insuficiência endotelial estão se tornando as principais causas de ceratoplastia nos Estados Unidos e Europa, enquanto a ceratite ainda é a

principal indicação de ceratoplastia na Ásia, África e Oriente Médio (Yoon; Choi; Kim, 2021). Na atualidade, o único tratamento eficaz para cicatrizes ou doenças da córnea que afetam a visão é o transplante de córnea (Isidan *et al.*, 2019; Yoeruek *et al.*, 2012; Yoon; Choi; Kim, 2021). Daí vem a importância da preservação da córnea, que tem como principal objetivo prolongar o tempo de armazenamento do tecido do doador, além de manter a viabilidade das células endoteliais para o sucesso do transplante (Sharma *et al.*, 2021).

Até o momento, córneas humanas são a única fonte doadora para transplante, e esse material tem se tornado cada vez mais escasso, sendo o principal fator limitante na cura de doenças desse tecido (Isidan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2017; Yoeruek *et al.*, 2012; Yoon; Choi; Kim, 2021). Para resolver essa questão, estudos têm sido realizados acerca do xenotransplante de córnea, especialmente com a espécie suína, por apresentar, comprovadamente, diversas semelhanças com a córnea humana (Fujita *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Yoeruek *et al.*, 2012). A córnea suína dispõe de refração, tamanho e resistência à tração semelhantes aos da córnea humana, e outro ponto importante é a fácil disponibilidade desse material sem dilemas éticos significativos (Kim *et al.*, 2016). Uma das grandes vantagens do xenotransplante de córnea é a escassez de vasos nesse local, que é imunologicamente privilegiado, reduzindo, assim, as chances de rejeição (Shi *et al.*, 2017). Por esse motivo, o transplante de córnea representa o mais bem-sucedido transplante de tecido em humanos (Singh *et al.*, 2019).

O primeiro transplante de córnea realizado com sucesso em humanos foi em 1905, pelo médico Eduard Zirm (Singh *et al.*, 2019). Durante muitos anos, a ceratoplastia penetrante (PKP, do inglês *penetrating keratoplasty*) – ou de espessura total – foi a técnica de escolha para substituição do tecido doente. Contudo, nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas para substituir somente o tecido doente, chamadas de ceratoplastias lamelares anterior (ALK, do inglês *anterior lamellar keratoplasty*) e posterior (PLK, do inglês *posterior lamellar keratoplasty*) (Fujita *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2019). Dentro dos grupos ALK e PLK existem subdivisões para transplantes contendo mais ou menos camadas, sendo que é possível transplantar o endotélio da córnea com um pouco de estroma, procedimento denominado ceratoplastia endotelial automatizada com remoção da membrana de Descemet (DSAEK, do inglês *Descemet stripping automated endothelial keratoplasty*), ou apenas o endotélio e a membrana de Descemet (DMEK, do inglês *Descemet membrane endothelial keratoplasty*). Esses procedimentos que envolvem espessura parcial da córnea mantêm a integridade estrutural

e evitam complicações associadas a uma cirurgia com abertura do globo ocular. Ainda, reduzem ainda mais as chances de rejeição do enxerto e proporcionam reabilitação rápida pela ausência de pontos (Singh *et al.*, 2019).

Independentemente do procedimento de ceratoplastia selecionado, são necessárias córneas doadoras com densidade endotelial igual ou superior a 2.500 células/mm<sup>2</sup> para almejar um transplante de sucesso. Vale ressaltar que o transplante endotelial é delicado, e dificilmente não ocorrerá perda celular na sua manipulação (Fujita *et al.*, 2013). Em um estudo para caracterização da córnea suína para xenotransplante endotelial, Lee e colegas (2014) compararam córneas de suínos geneticamente modificados e selvagens com as de primatas não-humanos e entre si. Os animais geneticamente modificados eram suínos *knockout* do gene 1,3-galactosiltransferase, e não expressavam o antígeno Gala1,3Gal, o principal alvo dos anticorpos humanos anti-suínos. Os objetivos do trabalho foram: verificar se a córnea suína é comparável à córnea primata em relação a densidade, pleomorfismo e polimegatismo; evidenciar qual faixa etária de suínos é a fonte ideal de córneas para transplante endotelial; e se há alguma diferença nesses parâmetros entre os suínos geneticamente modificados e os selvagens. Foram incluídos quatro grupos etários de suínos: os recém-nascidos (quatro a cinco dias de vida); jovens (oito a 15 semanas); adultos (cinco a 10 meses); e idosos (20 a 42 meses). Os primatas tinham idade equivalente a um humano de 24,3 anos. Não foram observadas diferenças nos parâmetros endoteliais de suínos selvagens e geneticamente modificados. Os suínos jovens e foram considerados a fonte mais semelhante aos primatas quanto aos parâmetros endoteliais, e apresentavam densidade celular de 3789 células/mm<sup>2</sup>, em média. O estudo conclui que, dada a disponibilidade de suínos jovens, a sua maior densidade endotelial, e a proteção conferida contra a resposta imunitária humana, os porcos geneticamente modificados poderiam fornecer uma fonte ilimitada de córneas para xenotransplante (Lee *et al.*, 2014).

Em 2018, foi publicado o primeiro protocolo de ensaio clínico para investigar a segurança e eficácia do xenotransplante de córnea em pacientes com opacidade de córnea, perfuração ou perfuração iminente (Choi *et al.*, 2018). O protocolo foi feito de acordo com o consenso internacional sobre as condições para a realização de ensaios clínicos de xenotransplante de córnea desenvolvido pela Sociedade Internacional de Xenotransplante. Para sua elaboração, foram reunidos oftalmologistas e especialistas multidisciplinares, incluindo um infectologista, um especialista em transplante de órgãos, um farmacologista, um neuropsiquiatra, um patologista clínico e um microbiologista. Os autores trazem os critérios de

inclusão e exclusão de pacientes, preparo da córnea suína, detalhes do procedimento cirúrgico, medicações a serem utilizadas no pré e pós operatório e uma metodologia para avaliação da rejeição do enxerto (Choi *et al.*, 2018).

Em uma pesquisa com nove primatas não-humanos, foi analisada a sobrevivência a longo prazo de xenoenxertos de espessura total da córnea de suínos em miniatura (Yoon *et al.*, 2020). Os primatas foram divididos em dois grupos: um que recebeu o enxerto de suínos *knockout* para o gene 1,3-galactosiltransferase; e o outro que recebeu o mesmo enxerto, mas que também recebeu anticorpo anti-CD20 no pós operatório. Como resultado, os pesquisadores expõem que a supressão do gene 1,3-galactosiltransferase por si só é insuficiente para reduzir a rejeição, sendo necessária a inibição das células B com a administração do anticorpo anti-CD20, onde foi atingida uma sobrevivência do enxerto acima de seis meses (Yoon *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços nos estudos a respeito do xenotransplante de córnea, a rejeição e a necessidade de imunossupressão intensa continuam sendo o principal desafio. Para resolver essas questões, é necessária a produção de suínos geneticamente modificados cada vez menos antigênicos. Para isso, é importante compreender como as rejeições xenogênicas são provocadas, e mais estudos serão fundamentais nesse processo (Perkel, 2016; Yoon *et al.*, 2020). Outro ponto importante é o risco de xenozoonose, que configura o principal fator limitante para a aplicação clínica do xenotransplante de córnea. Esse risco ainda é desconhecido, trazendo enfoque para a importância do desenvolvimento de uma vigilância padronizada de doadores e receptores, que devem ser monitorados cuidadosamente (Yoon *et al.*, 2020).

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

O artigo a seguir foi escrito de acordo com as normas da revista “*The Journal of Veterinary Medical Science*” (ISSN 1347-7439) e será traduzido para o inglês no momento da sua submissão.

**Avaliação endotelial da córnea de suínos em meio de preservação de córnea Eusol-C®:  
um estudo piloto.**

*Laboratory Animal Science*

*Full paper*

**Avaliação endotelial da córnea de suínos em meio de preservação de córnea Eusol-C®:  
um estudo piloto.**

Alessandra Fernandez da Silva<sup>1</sup>, Anita Marchionatti Pigatto<sup>2</sup>, Rafaella da Silva Rocha<sup>1</sup>,  
Maiara Poersch Seibel<sup>1</sup>, Natália Pons Mendéz<sup>1</sup>, João Antonio Tadeu Pigatto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, número 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 91540-000.

<sup>2</sup> Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, Avenida Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Botucatu, SP, Brasil, 18618-687.

## Resumo

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais, cuja principal função é manter a deturgescência da córnea. A preservação da córnea tem como objetivo prolongar o tempo de armazenamento do tecido do doador, mantendo a viabilidade das células endoteliais. O Eusol-C® é um meio de preservação hipotérmico que permite preservar a córnea sob refrigeração. Tendo em vista a similaridade das córneas suína e humana, uso de córneas suínas em modelos de estudo, e o advento de xenotransplante em humanos e animais em um futuro próximo, objetivou-se avaliar a viabilidade do endotélio da córnea de suínos após acondicionamento em meio de preservação hipotérmico Eusol-C® por 14 dias, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram incluídos 12 olhos, de seis suínos (*Sus scrofa domesticus*) da raça Large White, machos, com seis meses de idade. As amostras foram divididas em grupo controle (G1) e grupo teste (G2). As córneas do G1 foram imediatamente submersas em frascos contendo glutaraldeído à 2,5%. Já as córneas do G2 foram alocadas nos frascos contendo Eusol-C® por 14 dias a uma temperatura de 2-8°C, e após transferidas para frascos de glutaraldeído. O percentual de perda endotelial foi avaliado com MEV. O G1 não apresentou perda celular. O G2 apresentou média de perda celular de 3.01%. Em conclusão, o meio hipotérmico Eusol-C® preservou satisfatoriamente as córneas suínas por 14 dias.

Palavras-chave: Endotélio corneano. Suíno. Eusol-C®. Transplante de córnea.

## Introdução

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais, com padrão predominantemente hexagonal, e está em contato direto com o humor aquoso (Joyce, 2003; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021). A principal função dessa camada é transportar líquido do estroma para a câmara anterior, mantendo o estado de deturgescência e a córnea transparente (Downie *et al.*, 2021; Joyce, 2003). As células endoteliais não apresentam capacidade mitótica relevante *in vivo* (Joyce, 2003; Meekins; Rankin; Samuelson, 2021; Downie *et al.*, 2021). Se houver redução da densidade celular abaixo de um nível crítico ocorrerá edema corneano e perda da transparência da córnea (Joyce, 2003; Lee *et al.*, 2013).

Em doenças corneanas que cursam com a perda da transparência, o transplante de córnea é a única alternativa para recuperação da visão (Isidan *et al.*, 2019; Yoeruek *et al.*, 2012; Yoon; Choi; Kim, 2021). Para a realização de um transplante corneano bem-sucedido, ao menos 50% das células endoteliais devem estar viáveis (Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). A preservação da córnea tem como principal objetivo prolongar o tempo de armazenamento do tecido do doador e manter a viabilidade das células endoteliais (Sharma *et al.*, 2021). Os métodos de preservação de córnea mais frequentemente empregados são os meios hipotérmicos e a cultura de órgãos (Sharma *et al.*, 2021). Os meios hipotérmicos preservam a córnea por 10 a 14 dias a uma temperatura de 2 a 8°C (Kanavi *et al.*, 2014; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). O meio Eusol-C® é um meio hipotérmico que surgiu em 2005 como uma alternativa eficaz ao Optisol GS® (Bryan *et al.*, 2005). Por sua composição mais simplificada configura uma opção com custo mais acessível, tornando-se o meio mais utilizado na Europa (Kanavi *et al.*, 2014; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016; Burgos-Blasco *et al.*, 2022).

Apesar da córnea suína não possuir a membrana de Bowman as suas características biológicas e morfológicas são semelhantes às da córnea humana (Crespo-Moral; Garcia-Posadas; Lopez-Garcia, 2020; Heichel *et al.*, 2016; Kunzmann *et al.*, 2018; Menduni *et al.*, 2018; Sanchez *et al.*, 2011). Dada a baixa disponibilidade de córneas humanas, normalmente apenas as córneas que não aptas para transplante são usadas em pesquisa (Rodella *et al.*, 2023). A utilização da córnea suína não apresenta dilemas éticos, uma vez que esses tecidos são geralmente descartados como resíduos da indústria (Doke; Dhawale, 2015). Dessa forma, essa espécie tem sido amplamente empregada como modelo de estudo para doenças e procedimentos cirúrgicos

oculares (Chan; Cho; Boost, 2014; Hwang; Kim, 2009; Kunzmann *et al.*, 2017; Menduni *et al.*, 2017; Ruiz-Ederra *et al.*, 2005).

A córnea suína já foi modelo de estudo em meios de preservação hipotérmicos, seja para avaliar o uso de antibióticos, comparação entre meios ou observar a performance e segurança do armazenamento (Ellis; McGhee; Lee, 1992; Giurgola *et al.*, 2023; Rodella *et al.*, 2022; Rodella *et al.*, 2023). Contudo, estudos com o meio de preservação Eusol-C® nessa espécie ainda são recentes e escassos, e trazem a avaliação endotelial com uso da microscopia especular (Giurgola *et al.*, 2023; Rodella *et al.*, 2022; Rodella *et al.*, 2023). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método de avaliação *in vitro* do endotélio da córnea. Sua vantagem quando comparada a outros métodos é a capacidade de captação de detalhes (Doughty, 2006). A MEV é a ferramenta mais utilizada para avaliação da morfologia endotelial, com diversos estudos publicados acerca da toxicidade de medicamentos, avaliação após preservação e avaliações após procedimentos cirúrgicos de córnea ou intraoculares (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Andrew *et al.*, 1999; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Kadonosono *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1994; Kim; Park; Lee, 2008; Liou; Chiu; Wang, 2004; Pigatto *et al.*, 2005a; Tamayo-Arango *et al.*, 2009;).

A córnea de suínos poderá ser uma fonte promissora para tecido doador (Fujita *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Yoeruek *et al.*, 2012;). Até o momento, córneas humanas são a única fonte doadora para transplante, e esse material tem se tornado cada vez mais escasso (Isidan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2017; Yoeruek *et al.*, 2012; Yoon; Choi; Kim, 2021). Estudos têm sido realizados acerca do xenotransplante de córnea utilizando principalmente a córnea de suínos (Fujita *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Yoeruek *et al.*, 2012).

Na medicina veterinária, o transplante de córnea é uma realidade incipiente. A criação de bancos de tecidos oculares apresenta um futuro promissor, e pesquisas envolvendo meios de preservação em animais são essenciais para iniciar esse processo (Brooks *et al.*, 2008; Henriksen *et al.*, 2012; Lacerda *et al.*, 2016; Laguna *et al.*, 2014; Usha *et al.*, 2019).

Objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade do endotélio da córnea de suínos após acondicionamento em meio de preservação hipotérmico Eusol-C® por 14 dias.

## **Materiais e métodos**

### *Animais*

Foram incluídos 12 olhos, provenientes de 6 suínos (*Sus scrofa domesticus*) da raça Large White, machos, com seis meses de idade. Os olhos foram doados por um abatedouro comercial licenciado (Avisui, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil). O estudo foi conduzido de acordo com as normas da ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) para o uso de animais em pesquisa em oftalmologia e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Imediatamente após o abate dos animais e antes da escalda os olhos foram enucleados. Posteriormente, foram mantidos individualmente em câmaras úmidas identificadas contendo gaze e solução salina, dentro de uma caixa térmica para manutenção da temperatura entre 2-8°C. Em até 1 hora após a enucleação todos os bulbos oculares foram examinados com biomicroscopia com lâmpada de fenda (Portable Slit Lamp SL15, Kowa, Japão), prova da fluoresceína (Fluoresceína sódica a 1%, Allergan Produtos Farmacêuticos) e avaliação com microscópio especular de contato (Celmax Medical Service®, São Carlos, SP, Brasil). Somente olhos hígidos foram incluídos no estudo. Para a microscopia especular os olhos foram retirados da câmara úmida e foram posicionados em um suporte adaptado ao microscópio especular de contato (Figura 1). Foi obtida uma fotomicrografia de 5 regiões de cada córnea: central, superior, inferior, medial e lateral. Em cada imagem foram analisadas 50 células endoteliais.

#### *Descontaminação e preparo das amostras*

Os 12 olhos selecionados foram descontaminados por lavagem com solução de 5% de iodo-povidona (PVP-I; Rioquímica S/A. Indústria, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). Subsequentemente, foram removidos os botões córneo-esclerais com auxílio de bisturi lâmina nº 23 e tesoura de córnea.

#### *Grupos*

As amostras foram divididas em 2 grupos: 6 para o grupo controle (G1) e 6 para o grupo teste (G2). De cada suíno foram obtidos dois botões corneoesclerais, um de cada olho, que foram distribuídos um em cada grupo de forma aleatória (sem considerar olho esquerdo e direito). Os botões do G1 foram imediatamente submersos em frascos contendo glutaraldeído à 2,5%. Já os botões do G2 foram alocados nos frascos contendo Eusol-C®, por onde permaneceram refrigerados durante 14 dias em geladeira numa temperatura entre 2 a 8°C. Após 14 dias os botões corneoesclerais foram transferidos para frascos de glutaraldeído.

### *Preparo das amostras para a MEV*

Após serem fixadas por imersão em glutaraldeído à 2,5%, e mantidas a uma temperatura de, aproximadamente, 4°C, as amostras foram preparadas individualmente para análise com MEV no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS (CMM-UFRGS). As amostras foram lavadas em tampão cacodilato e desidratadas através de uma série crescente de soluções de etanol (30, 50, 70, 85, 90 e 100%), permanecendo por 15 minutos em cada concentração, e 3 vezes na concentração de 100%. Em seguida, foram submetidos à secagem em ponto crítico com dióxido de carbono líquido. As córneas foram colocadas em *stubs* de alumínio de 10 mm com fita adesiva dupla face e revestidas com ouro-paládio.

### *Avaliação da perda endotelial*

A superfície posterior endotelial de cada amostra foi analisada e fotografada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (EVO MA10, Zeiss, Oberkochen, Alemanha), operando a 10 kV. Foram obtidas 5 eletromicrografias de cada amostra (1000x), de regiões correspondentes a: I – central; II – superior; III – inferior, IV – lateral; V - medial. Também foram obtidas eletromicrografias com 2000x de aumento para obter maior riqueza de detalhes do endotélio. As imagens com 1000x de aumento foram processadas com auxílio de um *software* (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos), uma de cada vez, por uma ferramenta que possibilita circular porções na imagem onde há perda endotelial. As medidas eram obtidas em  $\mu\text{m}^2$  e, então, convertidas para  $\text{mm}^2$ . O percentual de perda celular foi calculado subtraindo as áreas circuladas da área total de cada imagem.

### *Análise estatística*

Para a microscopia especular, as variáveis quantitativas com distribuição normal de densidade e hexagonalidade celular foram descritas pela média e o desvio padrão e analisadas através da Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. Os dados foram analisados através do programa estatístico IBM\* SPSS *Statistics* 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos), e foi considerado um nível de significância de 5%.

Para a MEV, as regiões de cada amostra numeradas de I a V foram comparadas entre si e entre as respectivas regiões numeradas das outras amostras. Foram digitados os dados no programa Excel e, posteriormente, exportados para o programa SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) para análise estatística. Foram descritos os percentuais medianos de perda

celular e os valores mínimos e máximo de perda em cada grupo e cada região. Foram comparadas as perdas celulares entre os grupos teste e controle pelo teste de Mann-Whitney e entre as regiões pelo teste de Friedman. Para localizar entre quais regiões havia diferença estatisticamente significativa foi utilizado o teste de Dunn Bonferroni. Foi considerado um nível de significância de 5%.

## **Resultados**

Todos os olhos enucleados e avaliados com lâmpada de fenda e microscopia especular foram incluídos no estudo. A microscopia especular de contato permitiu a visualização do endotélio da córnea de suínos, revelando um padrão regular de células poligonais justapostas (Figura 2). A densidade celular endotelial média foi de  $1867,8 \pm 78,0$  células/mm<sup>2</sup> no olho direito e de  $1862,2 \pm 85,2$  células/mm<sup>2</sup> no olho esquerdo. 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 apresentavam oito lados.

O percentual de perda endotelial foi avaliado com MEV. A maioria das regiões do grupo controle (G1) não apresentou perda celular. Para o grupo teste (G2), a média de perda celular observada em todas as regiões analisadas dos botões córneo-esclerais mantidos em Eusol-C® por 14 dias foi de 3.01%. Ao comparar estatisticamente as perdas endoteliais dos grupos G1 e G2, houve diferença significativa entre os percentuais dos dois grupos. Não houve diferença significativa entre as regiões estudadas no G1. Contudo, houve diferença estatisticamente relevante entre as regiões I e IV do grupo teste (Tabela 1).

As figuras 3a e 3b ilustram as eletromicrografias obtidas de um dos botões córneo-esclerais do G1. A figura 4 ilustra a eletromicrografia obtida de uma das córneas do G2, onde é possível visualizar área de perda endotelial.

## **Discussão**

No presente estudo foi selecionado o meio Eusol-C® por ser mais acessível economicamente em comparação ao Optisol GS®. Apesar do custo mais baixo estudos têm demonstrado a mesma eficácia comparativamente ao Optisol GS® em relação a perda de células do endotélio da córnea (Kanavi *et al.*, 2014; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). A preservação em Optisol GS® foi estudada em cães (Andrew *et al.*, 1999) e em cães e gatos (Arndt; Reese; Köstlin, 2001),

onde as córneas apresentaram uma viabilidade endotelial de cerca de 98,9% após 21 dias de armazenamento (Andrew *et al.*, 1999), e o endotélio foi preservado satisfatoriamente por até 10 dias em cães, e por até 15 dias em gatos (Arndt; Reese; Köstlin, 2001). Em relação ao Eusol-C®, poucos e recentes são os estudos que analisam a preservação endotelial da córnea, seja em humanos (Kanavi *et al.*, 2014; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016) ou em animais (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Giurgola *et al.*, 2023; Rodella *et al.*, 2022; Rodella *et al.*, 2023). Albuquerque, Pigatto e Pigatto (2020) avaliaram a perda endotelial na córnea de equinos após 7 e 14 dias de armazenamento em Eusol-C® utilizando MEV, e observaram que a preservação foi satisfatória por um período de até 14 dias. Rodella e colaboradores (2022) desenvolveram um estudo com córneas suínas, e demonstraram uma preservação satisfatória do endotélio por 14 dias de armazenamento em meio Eusol-C®. O mesmo grupo de pesquisadores realizou um estudo semelhante com córneas humanas e suínas. Após um período de 14 dias, os autores concluíram que as córneas de ambas as espécies apresentaram parâmetros de qualidade satisfatórios após acondicionamento em meio Eusol-C® por 14 dias (Giurgola *et al.*, 2023).

No presente estudo, optou-se pela preservação da córnea de suínos pela possibilidade de uso desse material para xenotransplante. Até o momento, córneas humanas são a única fonte doadora para transplante, e esse material tem se tornado cada vez mais escasso, sendo o principal fator limitante na cura de doenças desse tecido (Isidan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2017; Yoeruek *et al.*, 2012; Yoon; Choi; Kim, 2021). Para resolver essa questão, estudos têm sido realizados acerca do xenotransplante de córnea, principalmente com a espécie suína (Yoeruek *et al.*, 2012; Fujita *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). Embora a córnea suína não apresente a membrana de Bowman, suas características biológicas e morfológicas se provaram bastante semelhantes às da córnea humana (Crespo-Moral; Garcia-Posadas; Lopez-Garcia, 2020; Heichel *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Kunzmann *et al.*, 2017; Menduni *et al.*, 2018; Sanchez *et al.*, 2011). Essa espécie tem sido amplamente empregada como modelo de estudo para doenças e procedimentos cirúrgicos oculares (Chan; Cho; Boost, 2014; Hwang; Kim, 2009; Kunzmann *et al.*, 2017; Menduni *et al.*, 2018; Ruiz-Ederra *et al.*, 2005). Em 2018, foi publicado o primeiro protocolo de ensaio clínico para investigar a segurança e eficácia do xenotransplante de córnea suína em pacientes humanos (Choi *et al.*, 2018). Muitos avanços têm sido alcançados em relação a esse tema, inclusive com produção de animais geneticamente modificados para que se tornem cada vez menos antigênicos, visando reduzir o risco de rejeição do enxerto (Lee *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2020).

A escolha de olhos provenientes de material de descarte de abatedouro deu-se pela possibilidade de realização do estudo sem a necessidade da eutanásia de modelos experimentais para este fim. Em estudos anteriores realizados em até seis horas *post mortem* foi possível observar que a integridade endotelial era mantida (Albuquerque; Freitas; Pigatto, 2016; Azevedo *et al.*, 2023; Bercht *et al.*, 2015; Brambatti *et al.*, 2017; Franzen *et al.*, 2010; Pigatto *et al.*, 2006; Pigatto *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2023). Na realização da presente pesquisa o tempo decorrido entre o abate dos animais e o armazenamento das córneas no meio de preservação foi de até 4 horas. A utilização de olhos de animais que foram abatidos permitiu com que fossem selecionados animais de uma mesma raça e idade, possibilitando a uniformização das amostras. Além disso, viabilizou a seleção somente de córneas hígdas para serem analisadas e preservadas. No presente estudo todos os olhos foram examinados após o abate com lâmpada de fenda e microscópio especular. A utilização de córnea suína em pesquisa não apresenta dilemas éticos, uma vez que esses tecidos são geralmente descartados como resíduos da indústria (Doke; Dhawale, 2015; Kim *et al.*, 2016). Além disso, dada a baixa disponibilidade de córneas humanas, normalmente apenas as córneas que não estão aptas para transplante são usadas em pesquisa (Rodella *et al.*, 2023). Levando em conta esses aspectos, foi feita a opção pela córnea suína por sua semelhança com a córnea humana, e pelo ensejo de selecionar apenas olhos hígdos para o estudo. Ainda, todos os animais eram adultos jovens, o que propiciou descartar variações relacionadas à idade, além de que a densidade endotelial nessa faixa etária se assemelha com a densidade em humanos adultos.

A microscopia especular de contato foi utilizada para verificar a saúde endotelial neste estudo. A microscopia especular é o método padrão de avaliação endotelial em humanos e em animais, e já foi empregada na análise de córneas de diferentes espécies (Albuquerque; Freitas; Pigatto, 2016; Andrew *et al.*, 2001; Andrew; Willis; Anderson, 2002; Azevedo *et al.*, 2023; Bercht *et al.*, 2015; Brambatti *et al.*, 2017; Chan-Ling; Curmi, 1988; Chaurasia; Vanathi, 2021; Coyo *et al.*, 2016; Coyo *et al.*, 2018; Franzen *et al.*, 2010; Morita, 1995; Nagatsuyu *et al.*, 2014; Pigatto *et al.*, 2006; Pigatto *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2021; Vargas *et al.*, 2023). Os parâmetros analisados na microscopia especular foram a densidade celular endotelial e a hexagonalidade. A densidade endotelial média foi de 1864,5 células/mm<sup>2</sup> e hexagonalidade 53,8%. Os valores obtidos foram semelhantes aos obtidos por Vargas e colaboradores (2023). A semelhança dos valores foi devido ao fato que os animais eram em ambos os estudos saudáveis e tinham a mesma raça e idade. Além disso o mesmo equipamento foi empregado para a análise celular.

No presente estudo não houve diferença significativa entre a densidade endotelial e a morfologia quando comparados os olhos direito e esquerdo. Está estabelecido que em olhos saudáveis não existe diferença nos parâmetros do endotélio da córnea quando são comparados os olhos esquerdo e direito (Albuquerque; Freitas; Pigatto, 2016; Azevedo *et al.*, 2023; Bercht *et al.*, 2015; Brambatti *et al.*, 2017; Franzen *et al.*, 2010; Pigatto *et al.*, 2006; Pigatto *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2023). Todos os olhos incluídos foram considerados hígidos. A hígidez do endotélio é fundamental na manutenção da transparência da córnea. Quando há redução da densidade endotelial abaixo de um nível crítico, o sistema de transporte de água entra em colapso, e ocorre edema corneano (Joyce, 2003; Lee *et al.*, 2013). A densidade endotelial em humanos adultos é de, aproximadamente, 2.500 células/mm<sup>2</sup> (Tuft; Coster, 1990). Em suínos adultos, a densidade é de, aproximadamente, 3.000 células/mm<sup>2</sup> (Lee *et al.*, 2013). A densidade crítica foi estimada em 10-15% da contagem normal de células, ou entre 300 e 500 células/mm<sup>2</sup> (Joyce, 2003; Lee *et al.*, 2013).

Em estudos anteriores com o meio Eusol-C®, as córneas foram analisadas em períodos que variaram de 7 a 29 dias (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Kanavi *et al.*, 2014; Rodella *et al.*, 2022; Rodella *et al.*, 2023; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). No presente estudo, o período de armazenamento foi de 14 dias, com base em estudos que demonstram uma preservação endotelial satisfatória nesse período para os meios Optisol®, Optisol GS® e Eusol-C® (Andrew *et al.*, 1999; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Gimenes *et al.*, 2022; Giurgola *et al.*, 2023; Javadi *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 1994; Rodella *et al.*, 2022; Rodella *et al.*, 2023; Sharma *et al.*, 2021; Yuksel; Uzunel; Küsbeci, 2016). A permanência das córneas sob refrigeração mantém as células endoteliais viáveis por um período mais prolongado (Sharma *et al.*, 2021).

A viabilidade endotelial de córneas preservadas pode ser avaliada utilizando diferentes métodos incluindo coloração com corantes vitais e microscopia óptica e MEV, entre outros (Clerot *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019; Hünning *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2012; Pigatto *et al.*, 2022). Dentre os outros métodos disponíveis, a microscopia óptica é uma forma rápida e barata de avaliação do endotélio da córnea (Saad *et al.*, 2008). No presente estudo fez-se a opção pela MEV como forma de avaliar o percentual de perda endotelial após o período de preservação. Sua vantagem quando comparada a outros métodos é a capacidade de captação de detalhes. A MEV tem resolução para avaliar detalhes muito finos de características celulares, como as microvilosidades (Doughty, 2006). As imagens obtidas da topografia endotelial permitem observar danos físicos da membrana celular, além do grau de ligação célula-célula (Madden,

1987). Embora a morfologia celular não esteja diretamente ligada à função, quando se trata do endotélio da córnea, a integridade das células é particularmente importante para manter a transparência (Madden, 1987). A MEV é a ferramenta mais utilizada para análise da morfologia endotelial, com diversos estudos publicados em humanos e animais acerca da toxicidade de medicamentos, avaliação após preservação e avaliações após procedimentos cirúrgicos de córnea ou intraoculares (Albuquerque; Pigatto; Pigatto, 2020; Andrew *et al.*, 1999; Arndt; Reese; Köstlin, 2001; Kadonosono *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1994; Kim; Park; Lee, 2008; Liou; Chiu; Wang, 2004; Pigatto *et al.*, 2005a; Tamayo-Arango *et al.*, 2009). Essa análise morfológica é fundamental no desenvolvimento e aprimoramento dos meios de preservação de córnea, tornando a MEV peça-chave quando o assunto é preservação e transplante de córnea (Kim *et al.*, 1994).

Na medicina veterinária, o transplante de córnea é uma realidade incipiente, e os enxertos normalmente oferecem suporte tectônico, sendo a finalidade óptica ainda distante de ser alcançada (Brooks *et al.*, 2008; Henriksen *et al.*, 2012; Lacerda *et al.*, 2016; Laguna *et al.*, 2014; Usha *et al.*, 2019). Estudos já foram publicados nas espécies equina (Brooks *et al.*, 2008; Henriksen *et al.*, 2012), canina (Lacerda *et al.*, 2016) e felina (Laguna *et al.*, 2014). Embora ocorra opacidade de córnea no local do transplante, foram descritos bons resultados no que tange respeito à prognóstico visual, quando comparados aos resultados de um enxerto conjuntival (Lacerda *et al.*, 2016). A criação de bancos de tecidos oculares na medicina veterinária apresenta um futuro promissor, e pesquisas envolvendo meios de preservação em animais são essenciais para iniciar esse processo. Como discutido anteriormente, os meios hipotérmicos oferecem praticidade operacional, facilitando a implementação de bancos de tecidos oculares para animais. Além disso, o xenotransplante também pode ganhar espaço nesse cenário, visto que os suínos podem oferecer uma fonte ilimitada de enxertos.

Em um estudo publicado recentemente, Rodella e colaboradores (2023) sugeriram um modelo *ex vivo* de córnea suína como alternativa à córnea humana para analisar a preservação do endotélio após armazenamento condições hipotérmicas (Eusol-C®) ou de cultura de órgãos. As imagens foram obtidas com câmera de alta resolução a partir da microscopia óptica com azul de tripano, e analisadas para alguns parâmetros como a mortalidade celular (%), com auxílio de um software. As córneas suínas e humanas mostraram tendências comparáveis sob as condições de armazenamento investigadas por até 14 dias.

Mistò e colaboradores (2021) compararam a preservação da córnea humana em um novo meio de preservação hipotérmico chamado Kerasave® (ALCHIMIA S.R.L., Pádua, Itália) com o Optisol GS®. Para isso, não optaram pela MEV, mas sim pela coloração com azul de tripano e microscopia especular para análise da densidade, mortalidade e morfologia celular. Foi observada, ao dia 14, uma mortalidade na região central da córnea de  $0,54\% \pm 0,40\%$  para córneas no Kerasave® e  $0,14\% \pm 0,14\%$  para aquelas no Optisol-GS®. Nas regiões periféricas da córnea, a mortalidade foi de  $3,07\% \pm 0,93\%$  para córneas no Kerasave® e  $3,38\% \pm 0,78\%$  para aquelas no Optisol-GS®. Essa mortalidade foi considerada condizente com uma preservação satisfatória para o período analisado.

No único estudo publicado com córneas suínas associando meio de preservação hipotérmico e MEV, Ellis, McGhee e Lee (1992) acondicionaram córneas suínas em sulfato de condroitina a 2,5% por um período de até 10 dias. Foi observada uma mortalidade celular de 12% no dia 5 e de 26% no dia 10 de armazenamento, comportamento que foi tido como semelhante ao da córnea humana para esse meio. Rodella e colaboradores (2022) compararam os efeitos da preservação em Eusol-C® e meio de cultura de órgãos pela avaliação da densidade e mortalidade celular, utilizando azul de tripano como marcador celular, por um período de armazenamento de até 14 dias. O percentual de mortalidade foi estimado utilizando o software ImageJ. Ao fim do período, as córneas suínas armazenadas em meio de cultura de órgãos e Eusol-C® apresentaram mortalidade  $<10\%$  e  $<20\%$ , respectivamente. Em outro estudo semelhante, Giurgola e colaboradores (2023) investigaram a densidade, morfologia e mortalidade celular de córneas humanas e suínas após preservação em Eusol-C® por 14 dias, e após lavagem com solução de limpeza, empregando o azul de tripano e a microscopia especular. Ao final do armazenamento, a mortalidade endotelial aumentou em  $3,1 \pm 3,3\%$  nas córneas humanas e  $7,8 \pm 3,5\%$  nas córneas suínas. A partir desses percentuais, os autores consideraram o uso do meio de preservação e da solução de limpeza como seguro e efetivo, e salientam o comportamento semelhante entre as córneas das duas espécies.

No presente estudo a MEV foi escolhida como método de análise em razão da relevância da integridade da morfologia endotelial no que diz respeito à sua função. Foram obtidos os valores percentuais de perda endotelial, subtraindo as áreas com ruptura da membrana celular da área total das fotomicrografias, com auxílio de um software. Foi observada uma perda endotelial de 3,01% ao fim de 14 dias de armazenamento, levando em conta a média das perdas das regiões avaliadas. Em comparação aos estudos com córneas suínas, o percentual de perda celular obtido

neste estudo foi inferior ao encontrado no mesmo período de armazenamento (Giurgola *et al.*, 2023; Rodella *et al.*, 2022). Contudo, o método de análise empregado nesses estudos não foi a MEV. Estudos anteriores com córneas humanas, onde a mortalidade endotelial foi estabelecida com auxílio de corantes vitais e visualização em microscópio, foram encontrados valores entre 4% a 16% de perda celular após 14 dias de armazenamento em meios de preservação (Means *et al.*, 1995; Mistò *et al.*, 2020; Parekh *et al.*, 2014). Esses resultados também foram ligeiramente superiores aos encontrados nesta pesquisa, mas, ainda assim, comparáveis, mesmo com um método de análise diferente. Embora a diferença de perda endotelial entre os grupos G1 e G2 tenha sido estatisticamente significativa neste estudo, não há diferença clinicamente relevante, uma vez que determinado grau de perda é esperado e está em concordância os dados anteriores publicados na literatura, revelando uma preservação satisfatória no período observado.

No presente estudo foi avaliado o percentual de perda celular como parâmetro de preservação satisfatória com base nos estudos anteriormente mencionados, uma vez que os valores de densidade celular podem ser expressivamente diferentes de acordo com o método de fixação utilizado na amostra para MEV (Doughty, 2006). Ademais, esses valores podem variar, também, conforme o método de análise escolhido (Mistò *et al.*, 2020). Ellis, McGhee e Lee (1992) constataram que a densidade endotelial da córnea suína, avaliada com MEV, aumentou entre os dias 0 e 5 de armazenamento em meio de preservação, voltando a diminuir até o dia 10. Isso provavelmente ocorreu devido ao encolhimento das células, e não seguiu o mesmo padrão de mortalidade celular, que aumentou nos dois períodos. Rodella e colaboradores (2023) não observaram diferenças significativas na densidade endotelial das córneas suínas e humanas acondicionadas em Eusol-C® ao longo de 14 dias de armazenamento. Por outro lado, o aumento da mortalidade endotelial foi estatisticamente significativo ao longo do tempo.

Este é o primeiro estudo associando avaliação do endotélio da córnea de suínos preservado em meio hipotérmico Eusol-C® com auxílio da MEV, que permitiu calcular o percentual de perda celular posterior ao armazenamento. Os resultados obtidos indicaram uma preservação satisfatória no período analisado, com perda celular comparável a outros estudos, mesmo que com métodos de análise diferentes. Mais estudos que utilizem MEV na análise endotelial são necessários com amostras maiores e outros tempos de armazenamento, uma vez que as córneas suínas representam fonte promissora para xenotransplante em humanos e animais, e servem como modelo de estudo já consolidado.

Com base nos resultados apresentados foi possível concluir que o meio de preservação hipotérmico Eusol-C® preservou o endotélio corneano de suínos por um período de até 14 dias.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, acadêmica, político e/ou financeira, no processo de apreciação e publicação do referido artigo.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer o frigorífico Avisui (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil) e o Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) pela contribuição neste estudo.

### **Referências**

1. Albuquerque L, Freitas LVRP, Pigatto JAT. 2016. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. *Semina: Cienc Agrar* **36**: 4199-4205.
2. Albuquerque L, Pigatto AM, Pigatto JAT. 2020. Evaluation of equine (*Equus caballus*) corneal endothelium stored in EUSOL-C® preservation medium. *Semina: Cienc Agrar* **41**: 3155-3164.
3. Andrew SE, Samuelson DA, Lewis PA, Kubilis PS. 1999. Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. *Vet Ophthalmol* **2**: 155-161.
4. Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. 2002. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *Am J Vet Res* **63**: 326-329.
5. Arndt C, Reese S, Köstlin R. 2001. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. *Vet Ophthalmol* **4**: 175-182.
6. Azevedo MG, Méndez NP, Cargnin LS, Rocha RS, Seibel MP, Silva AF, Pigatto JAT. 2023. Specular microscopy of the corneal endothelial cells of bovines: na ex vivo study. *Open Vet J* **13**: 1554-1561.

7. Bercht BS, Albuquerque L, Araújo ACP, Pigatto JAT. 2015. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Vet Ophthalmol* **48**: 137-142.
8. Brambatti G, Albuquerque L, Vargas EVB, Neumann CF, Pigatto JAT. 2017. Corneal endothelial cell density and morphology in rabbits' eyes using contact specular microscopy. *Cienc Rural* **47**:1-5.
9. Brooks DE, Plummer CE, Kallberg ME, Barrie KP, Ollivier FJ, Hendrix DVH, Baker A, Scotty NC, Utter ME, Blackwood SE, Nunnery CM, Bem-Sholmo G, Gelatt KN. 2008. Corneal transplantation for inflammatory keratopathies in the horse: Visual outcome in 206 cases (1993–2007). *Vet Ophthalmol* **11**: 123-133.
10. Bryan GS, Abdullayev E, Wellemeyer M. 2005. Eusol-C effectiveness as a corneal storage media. pp. 24. In: Federated Scientific Session, Chicago. Abstracts Eye Bank Association of America and the Cornea Society.
11. Burgos-Blasco B, Vidal-Villegas B, Collado-Vincueria I, Soria-García AM, Cuiña-Sardiña R, Mendez-Fernandez R, Dias-Valle D, Ariño-Gutierrez M. 2022. Clinical outcomes of long term corneas preserved frozen in Eusol C used in emergency tectonic grafts. *Cell Tissue Bank* **24**: 351-356.
12. Chan KY, Cho P, Boost M. 2014. Corneal epithelial cell viability of an ex vivo porcine eye model. *Clin Exp Optom* **97**: 337-340.
13. Chang-Ling T, Curmi J. 1998. Changes in corneal endothelial morphology in cats as a function of age. *Curr Eye Res* **7**: 387-392.
14. Chaurasia S, Vanathi M. 2021. Specular microscopy in clinical Practice. *Indian J Ophthalmol* **69**: 517-524.
15. Clerot LL, Hünning PS, Bettio M, Petersen MB, Silva AF, Carissimi AS, Pigatto JAT. 2019. Morphology of Endothelial Cells from Different Regions of the Swine Cornea. *Acta Sci Vet* **47**: 1-6.
16. Coyo N, Leiva M, Costa D, Rios J, Peña MT. 2018. Corneal thickness, endothelial cell density, and morphological and morphometric features of corneal endothelial cells in goats. *Am J Vet Res* **79**: 1087-1092.

17. Coyo N, Peña MT, Costa D, Rios J, Lacerda R, Leiva M. 2016. Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. *Vet Ophthalmol* **19**: 367-372.
18. Crespo-Moral M, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y. 2020. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. *PLoS One* **15**: 1-17.
19. Doke SK, Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J* **23**: 223-229.
20. Doughty MJ. 2006. 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. *Vet Ophthalmol* **9**: 127-135.
21. Downie LE, Bandlitz S, Bergmanson JPG, Craig JP, Dutta D, Maldonado-Codina C, Ngo W, Siddireddy JS, Wolffsohn JS. 2021. Anatomy and physiology of the anterior eye. *Cont Lens Anterior Eye* **44**: 132-156.
22. Ellis MF, McGhee CNJ, Lee WR. 1992. A Scanning Electron Microscope Study of Porcine Corneal Endothelium Stored in Chondroitin Sulphate. *Cornea* **11**: 127-132.
23. Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. 2010. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Vet Ophthalmol* **13**: 222-226.
24. Fujita M, Mehra M, Lee SE, Roh DS, Long C, Fundenburgh JL, Ayares DL, Cooper DKC, Hara H. 2013. Comparison of Proliferative Capacity of Genetically-Engineered Pig and Human Corneal Endothelial Cells. *Ophthalmic Res* **49**: 127-138.
25. Gimenes I, Pintor AVB, Sardinha MS, Marañón-Vázquez GA, Gonzalez MS, Presgrave OCF, Maia LC, Alves GG. 2022. Cold Storage Media versus Optisol-GS in the Preservation of Corneal Quality for Keratoplasty: A Systematic Review. *Appl Sci* **12**: 1-30.
26. Giurgola L, Rodella U, Gatto C, Rossi O, Honisch C, Ragazzi E, Ruzza P, Ferrari S, Tothova JD. 2023. Assessment of performance and safety of corneal chamber hypothermic storage and PSS-L corneal rinsing in human and porcine corneas. *BMJ Open Ophthalmol* **9**: e001453.

27. Guimarães CB, Albuquerque L, Torikachvili M, Vargas EV, Dall-A'gnol CC, Silva TC, Pigatto JAT. 2019. Effects of atracurium besylate on corneal endothelium of chickens: in vitro study. *Pesq Vet Bras* **39**: 70-74.
28. Heichel J, Wilhelm F, Kunert KS, Hammer T. 2016. Topographic findings of the porcine cornea. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* **5**: 125-131.
29. Henriksen ML, Plummer CE, Mangan B, Bem-Sholmo G, Tsujita H, Greenberg S, Toft N, Brooks DE. 2012. Visual outcome after corneal transplantation for corneal perforation and iris prolapse in 37 horses: 1998–2010. *Equine Vet J* **44**: 115-119.
30. Hünning PS, Andrade MCC, Carissimi A, Pigatto JAT. 2018. Morphology of endothelial cells from different regions of the cornea of dogs. *Cienc Rural* **48**: 1-6.
31. Hwang, H, Kim M. 2009. Endothelial Damage of a Donor Cornea Depending on the Donor Insertion Method During Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty in Porcine Eyes. *Jpn J Ophthalmol* **53**: 523-530.
32. Isidan A, Liu S, Li P, Lashmet M, Smith LJ, Hara H. 2019. Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives. *Xenotransplantation* **26**: e12564.
33. Javadi MA, Arkbarzadeh AR, Chamani T, Kanavi MR. 2021. Sinasol versus Optisol-GS for cold preservation of human cornea: a prospective ex vivo and clinical study. *Cell Tissue Bank* **22**: 563-574.
34. Jeng BH. 2006. Preserving the cornea: corneal storage media. *Curr Opin Ophthalmol* **17**:332-337.
35. Joyce NC. 2012. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* **95**: 16-23.
36. Kadonosono K, Ito N, Yazama F, Nishide T, Sugita M, Sawada H, Ohno S. 1998. Effect of intracameral anesthesia on the corneal Endothelium. *J Cataract Refract Surg* **24**: 1377-1381.
37. Kanavi MR, Javadi MA, Chamani T, Fahim P, Javadi F. 2014. Comparing quantitative and qualitative indices of the donated corneas maintained in Optisol-GS with those kept in Eusol-C. *Cell Tissue Bank* **16**: 243-247.

38. Kim KS, Edelhauser HF, Holley GP, Geroski DH, Lynn M, Walsh GE. 1994. Corneal Endothelial Permeability of Human Tissue After Storage in Optisol. *Am J Ophthalmol* **117**: 385-393.
39. Kim SY, Park YH, Lee YC. 2008. Comparison of the effect of intracameral moxifloxacin, levofloxacin and cefazolin on rabbit corneal endothelial cells. *Clin Exp Ophthalmol* **36**: 367-370.
40. Kunzmann BC, Hellwinkell OJC, Klameth C, Wenzel D, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS, Schultheiss M. 2017. Establishment of a porcine corneal endothelial organ culture model for research purposes. *Cell Tissue Banking* **19**: 269-276.
41. Lacerda RP, Peña MT, Laguna F, Costa D, Rios J, Leiva M. 2017. Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: a review of 50 cases. *Vet Ophthalmol* **20**: 222-231.
42. Laguna F, Leiva M, Costa D, Lacerda R, Peña MT. 2015. Corneal grafting for the treatment of feline corneal sequestrum: a retrospective study of 18 eyes (13 cats). *Vet Ophthalmol* **18**: 291-296.
43. Lee SE, Mehra R, Fujita M, Roh DS, Long C, Lee W, Funderburgh JL, Ayares DL, Cooper DKC, Hara H. 2013. Characterization of Porcine Corneal Endothelium for Xenotransplantation. *Semin Ophthalmol* **29**: 127-135.
44. Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, Laing RA, Lass JH, Musch DC, Trousdale MD, Reinhart WJ, Burris TE, Sugar A, Davis RM, Hirokawa K, Smith T, Gordon JF. 1987. Optisol Corneal Storage Medium. *Am J Ophthalmol* **114**: 345-356.
45. Liou SW, Chiu CJ, Wang IJ. 2004. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal Endothelium. *J Cataract Refract Surg* **30**: 1351-1355.
46. Madden PW. 1987. The evaluation of endothelial damage following corneal storage: a comparison of staining methods and the value of scanning electron microscopy. *Curr Eye Res* **6**: 1441-1452.
47. McCarey BE, Kaufman HE. 1974. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **13**: 165-173.

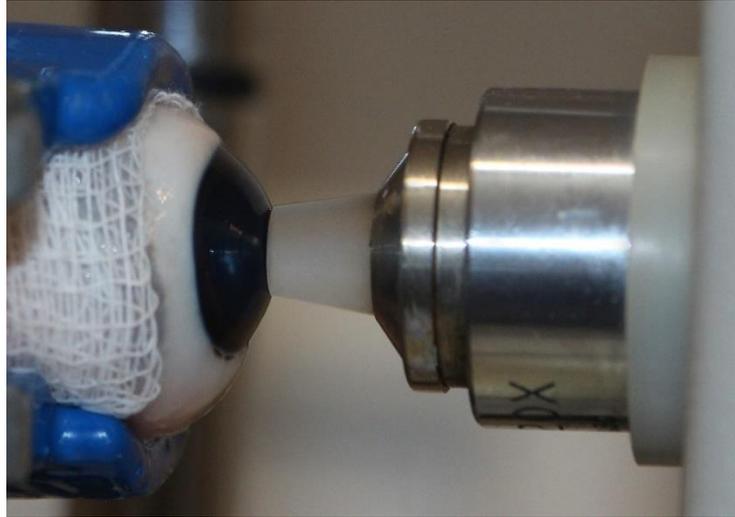
48. Means TL, Geroski DH, Hadley A, Lynn MJ, Edelhauser HF. 1995. Viability of Human Corneal Endothelium Following Optisol-GS Storage. *Arch Ophthalmol* **113**: 805-809.
49. Meekins JM, Rankin AJ, Samuelson DA. 2021. Ophthalmic Anatomy. pp. 41-123. In: *Veterinary Ophthalmology*, 6 ed. (Gelatt KN ed), John Wiley and Sons, Inc, New Jersey.
50. Menduni F, Davies LN, Madrid-Costa D, Fratini A, Wolffsohn JS. 2018. Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye. *Cont Lens Anterior Eye* **41**: 13-17.
51. Mistò R, Giurgola L, Pateri F, Limongelli A, Ragazzi E, Tothova JD. 2020. A new storage medium containing amphotericin B versus Optisol-GS for preservation of human donor corneas. *Br J Ophthalmol* **106**: 1-6.
52. Morita H. 1995. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *J Vet Med Sci* **57**: 273-277.
53. Nagatsuyu CE, Abreu PB, Kobashigawa KK, Conceição LF, Morales A, Andrade AL, Padua IRM, Martins BC. 2014. Non-contact specular microscopy in aphakic and pseudophakic dogs. *Cienc Rural* **44**: 682-687.
54. Parekh M, Salvalaio G, Ferrari S, Amoureux, MC, Albrecht C, Fortier D, Ponzin D. 2014. A quantitative method to evaluate the donor corneal tissue quality used in a comparative study between two hypothermic preservation media. *Cell Tissue Bank* **15**: 543-554.
55. Park S, Fong A, Cho H, Zhang C, Grtiz D, Mian G, Herzlich A, Gore P, Morganti A, Chuck R. 2012. Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelial Cells. *Cornea* **31**: 1476-1479.
56. Pels E, Beele H, Claerhout I. 2007. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol* **28**: 155-163.
57. Pigatto JAT, Abib FC, Pereira GT, Barros PSM, Freire CD, Laus JL. 2006. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Bras J Vet Res Anim Sci* **43**:476-480.
58. Pigatto JAT, Abib FC, Pizzeti JC, Laus JL, Santos JM, Barros PSM. 2005a. Análise morfológica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci Vet* **33**: 41-45.

59. Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, Abib FC, Bellini LP, Barros PSM, Laus JL. 2008. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesq Vet Bras* **28**:427-430.
60. Rodella U, Bosio L, Ferrari S, Gatto C, Giurgola L, Rossi O, Ciciliot S, Ragazzi E, Ponzin D, Tothova JD. 2023. Porcine Cornea Storage Ex Vivo Model as an Alternative to Human Donor Tissues for Investigations of Endothelial Layer Preservation. *Transl Vis Sci Technol* **12**: 1-13.
61. Rodella U, Bosio L, Giurgola L, Gatto C, Rossi O, Ferrari S, Tothova JD. 2022. A porcine cornea and lamellar tissue model to investigate effects of storage conditions on corneal preservation. In: Europe Eye Banking Association Virtual Meeting. Abstracts *BMJ Open Ophthalmol* **7**: A8.
62. Rodríguez-Fernández S, Álvarez-Portela M, Rendal-Vásquez E, Piñero-Ramil M, Sanjurjo-Rodríguez C, Castro-Viñuelas R, Sánchez-Ibáñez J, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S. 2021. Analysis of Cryopreservation Protocols and Their Harmful Effects on the Endothelial Integrity of Human Corneas. *Int J Mol Sci* **22**: 1-14.
63. Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, Hurcola H, Hernández-Barbáchano E, Araiz J, Vecino E. 2005. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res* **81**: 561-569.
64. Saad HA, Terry MA, Shamie N, Chen ES, Friend DF, Holiman JD, Stoeger C. 2008. An Easy and Inexpensive Method for Quantitative Analysis of Endothelial Damage by Using Vital Dye Staining and Adobe Photoshop Software. *Cornea* **27**: 818-824.
65. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. 2011. The parameters of porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **249**: 475-482.
66. Sharma N, Shaikh F, Nagpal R, Manumuraleekrishna, Maharana PK, Agarwal T, Sinha R, Satpathy G, Velpandian T, Titiyal JS. 2021. Evaluation of various preservation media for storage of donor corneas. *Indian J Ophthalmol* **69**: 2452-2456.
67. Shi Y, Bikkuzin T, Song Z, Jin X, Jin H, Li X, Zhang H. 2017. Comprehensive evaluation of decellularized porcine corneal after clinical transplantation. *Xenotransplantation* **24**: 1-7.

68. Smith TM, Popplewell J, Nakamura T, Trousdale M. 1995. Efficacy and safety of gentamicin and streptomycin in Optisol-GS: a preservation medium for donor corneas. *Cornea* **14**: 49-55.
69. Tamayo-Aranjo LJ, Baraldi-Artoni SN, Laus JL, Vicenti FAM, Pigatto JAT, Abib FC. 2009. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Cienc Rural* **39**: 117-122.
70. Tuft SJ, Coster DJ. 1990. The Corneal Endothelium. *Eye* **4**: 389-424.
71. Usha B, Kontsevaya S, Lutsay V, Nityaga IM, Lukashina UE. 2019. Penetration Ketatoplasty with a Preserved Donor Cornea in Veterinary Ophthalmology. *J Mol Biol Res* **9**: 71.
72. Vargas EVB, Pigatto AM, Rocha RS, Franceschini MEM, Pigatto JAT. 2023. Specular microscopy of the different regions of the cornea in enucleated swine eyes – ex vivo evaluation. *Cienc Anim* **24**: 1-6.
73. Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, Hofmann J, Spitzer MS, Schmidt KUB, Szurman P. 2012. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. *Acta Ophthalmol* **90**: 206-210.
74. Yoon CH, Choi HJ, Kim MK. 2021. Corneal xenotransplantation: Where are we standing? *Prog Ret Eye Res* **80**: 1-40.
75. Yuksel MB, Uzunel UD, Küsbeci T. 2016. Endothelial Cell Viability of Donor Corneas Preserved in Eusol-C Corneal Storage Medium. *Exp Clin Transplant* **14**: 441-444.

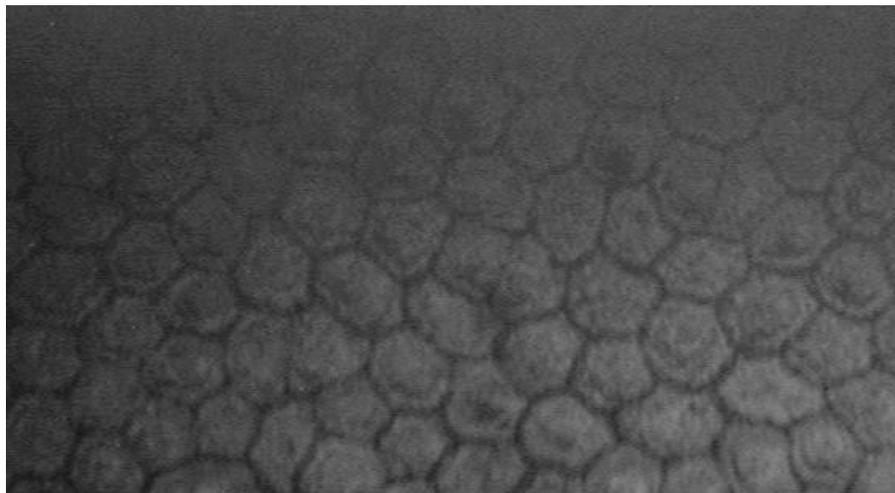
## Figuras e Legendas

Figura 1 – Posicionamento da objetiva do microscópio especular de contato na área central da córnea de um suíno.



Fonte: A própria autora (2023).

Figura 2 – Fotomicrografia especular da região central da córnea suína com densidade de 1800 células/mm<sup>2</sup>.



Fonte: João Antonio Tadeu Pigatto (2023).

Figuras 3a e 3b – Eletromicrografias obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo controle. 2000x (3a) e 1000x (3b). Notar ausência de perda endotelial nas imagens.

Figura 3a

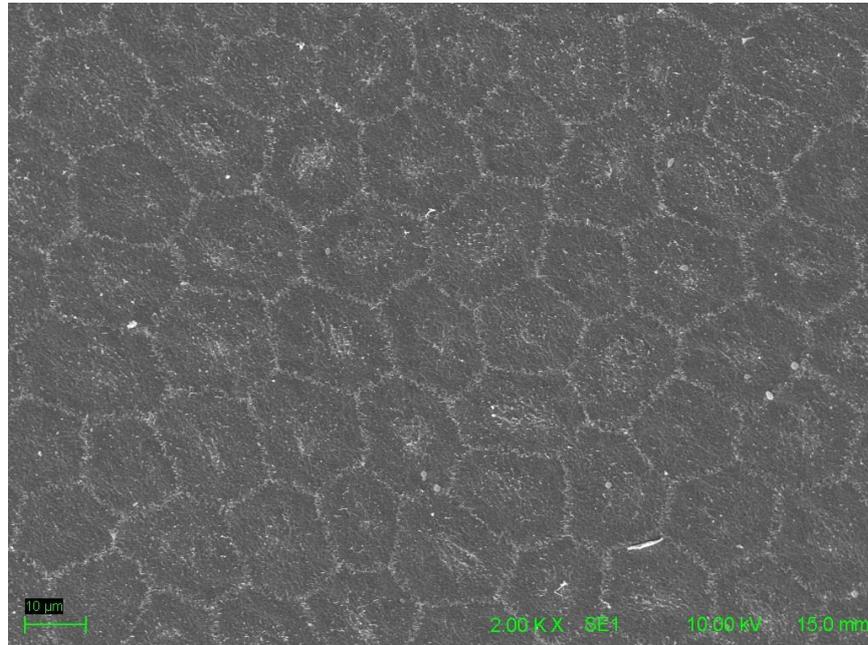
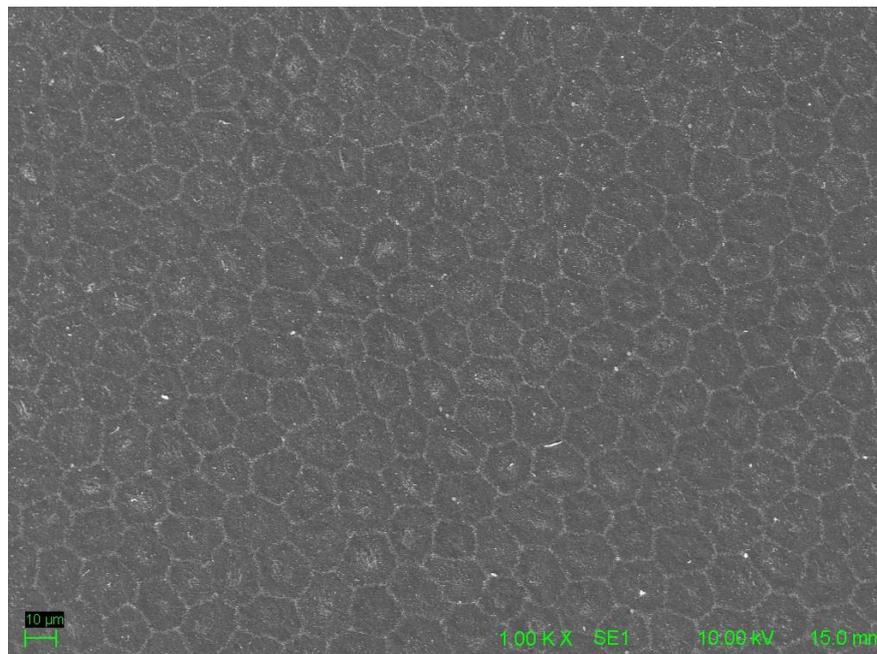
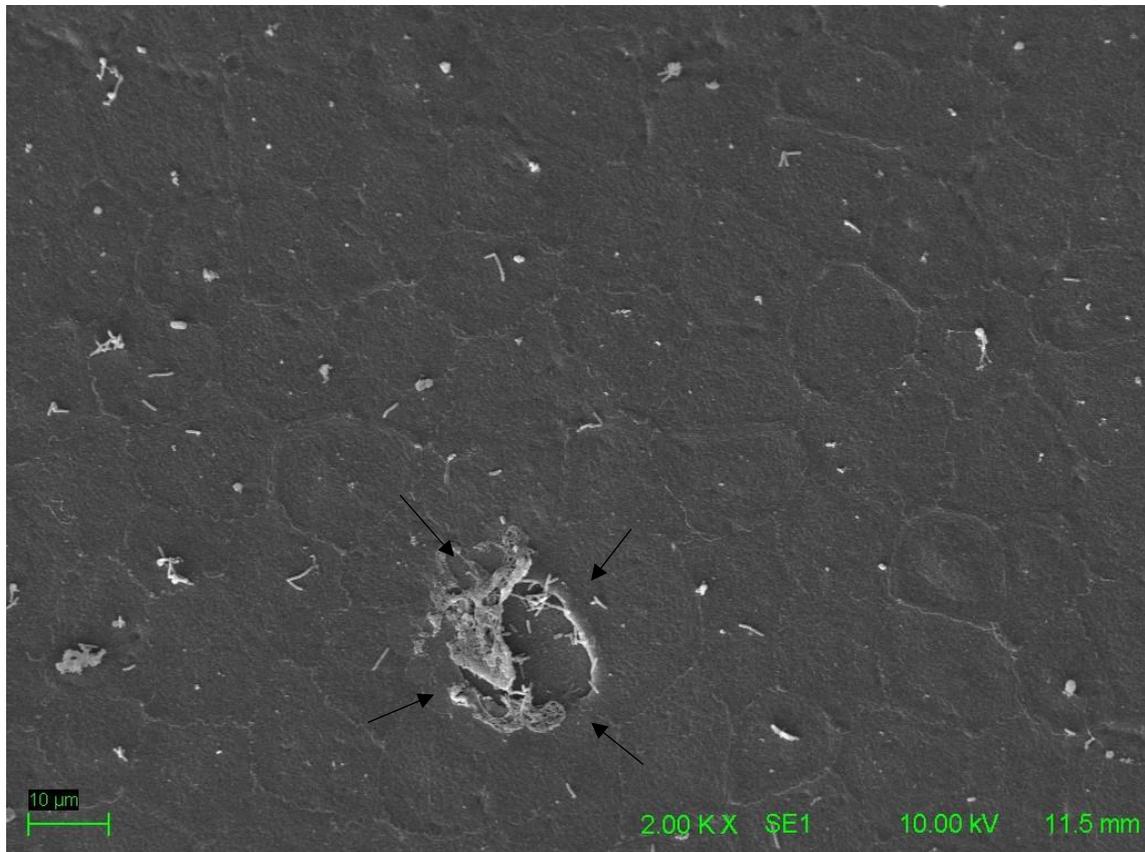


Figura 3b



Fonte: CMM UFRGS (2023).

Figura 4 – Eletromicrografia obtida pelo microscópio eletrônico de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo teste. Aumento de 2000x. Notar área de perda endotelial (setas).



Fonte: CMM UFRGS (2023).

## Tabela

Tabela 1 - Comparação do percentual de perda celular entre os grupos e entre regiões.

	G1 n=6	G2 n=6	p entre grupos*
I -Central	0 (0-0,47)	1,65 (1,55-1,94) <sup>a</sup>	<b>0,002</b>
II – Superior	0 (0-0,56)	2,94 (2,25-4,62)	<b>0,002</b>
III – Inferior	0 (0-0)	3,21 (2,25-3,92)	<b>0,002</b>
IV – Lateral	0 (0-0)	3,70 (2,83-4,07) <sup>b</sup>	<b>0,002</b>
V - Medial	0 (0-0)	3,55 (2,36-4,46)	<b>0,002</b>
p entre regiões**	0,558	<b>0,007</b>	

Dados apresentados pela mediana (mínimo-máximo); \*teste de Mann Whitney; \*\*teste de Friedman seguido do teste post hoc de Dunn Bonferroni; <sup>ab</sup>letras diferentes destacam grupos estatisticamente diferentes.

Fonte: A própria autora (2024).

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este é o primeiro estudo associando avaliação do endotélio da córnea de suínos preservado em meio hipotérmico Eusol-C® com auxílio da MEV. Os resultados obtidos indicaram uma preservação satisfatória no período analisado, com perda celular comparável a outros estudos, mesmo que com métodos de análise diferentes. Mais estudos que utilizem MEV na análise endotelial são necessários com amostras maiores e outros tempos de armazenamento, uma vez que as córneas suínas representam fonte promissora para xenotransplante em humanos e animais, e servem como modelo de estudo já consolidado. Em conclusão, o meio hipotérmico Eusol-C® preservou satisfatoriamente as córneas suínas por 14 dias.

## REFERÊNCIAS

- ABIB, F.C.; BARRETO JÚNIOR; J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, Abingdon. v. 27, n. 10, p. 1574-1578, Oct. 2001.
- 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**, Londrina. v. 36, n. 2, p. 4199-4205, Mar. 2016.
- ALBUQUERQUE, L.; PIGATTO, A.M.; PIGATTO, J.A.T. Evaluation of equine (*Equus caballus*) corneal endothelium stored in EUSOL-C® preservation medium. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v. 41, n. 6, p. 3155-3164, jun. 2020.
- ALMEIDA, F. Preparação das amostras biológicas para MEV. **Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CMM-UFRGS)**. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/cmm/wp-content/uploads/2019/11/PREPARA%C3%87%C3%83O-DE-AMOSTRAS-BIOL%C3%93GICAS-PARA-MEV.pdf>. Acesso em: 09 de novembro de 2023.
- 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**, Belo Horizonte. v. 71, n. 4, p. 1158-1164, July-Aug. 2019.
- ANDREW, S.E. *et al.* Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 2, n. 3, p. 155-161, Sept. 1999.
- ANDREW, S.E. *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg. v. 62, n. 4, p. 479-482, Apr. 2001.
- ANDREW, S.E. *et al.* Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg. v. 63, n. 3, p. 326-329, Mar. 2002.

- AQUAVELLA, J.V.; VAN HORN, D.L.; HAGGERTY, C.J. Corneal preservation using M-K medium. **American Journal of Ophthalmology**, Amsterdam. v. 80, n. 5, p. 791-799, Nov. 1975.
- ARDJOMAND, N.; BERGHOLD, A.; REICH, M.E. Loss of corneal Langerhans cells during storage in organ culture medium, Optisol and McCarey-Kaufman medium. **Eye**, London. v. 12, p. 134-138, Jan. 1998.
- ARNDT, C.; REESE, S.; KÖSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 4, n. 3, p. 175-182, Sept. 2001.
- AZEVEDO, M.G. *et al.* Specular microscopy of the corneal endothelial cells of bovines: na *ex vivo* study. **Open Veterinary Journal**, Tripoli. v. 13, n. 12, p. 1554-1561, Dec. 2023.
- BAROODY, R.A. *et al.* Ocular development of ageing 1. Corneal endothelial changes in cats and in free-ranging and caged rhesus monkeys. **Experimental Eye Research**, Abingdon. v. 45, n. 4, p. 607-622, Oct. 1987.
- BERCHT, B.S. *et al.* Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 48, p. 137-142, Jan. 2015.
- BLITZER, A.L. *et al.* Primary cilia dynamics instruct tissue patterning and repair of corneal Endothelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, Whashington. v. 108, n. 7, p. 2819-2824, Feb. 2011.
- BORCHERDING, M.S. *et al.* Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. **Experimental Eye Research**, Abingdon. v. 21, n. 1, p. 59-70, July 1975.
- BOURNE, R.R.A. *et al.* Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, Amsterdam. v. 5, n. 9, p. 888-897, Sept. 2017.
- BRAMBATTI, G. *et al.* Corneal endothelial cell density and morphology in rabbits' eyes using contact specular microscopy. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 47, n. 12, p. 1-5, Dec. 2017.

BROOKS, D.E. *et al.* Corneal transplantation for inflammatory keratopathies in the horse: Visual outcome in 206 cases (1993–2007). **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 11, n. 2, p. 123-133, Mar. 2008.

BRUNETTE, I. *et al.* Comparison of the pig and feline models for full thickness corneal transplantation. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 14, n. 6, p. 365-377, Nov. 2011.

BRYAN, G.S. *et al.* Eusol-C effectiveness as a corneal storage media. *In: FEDERATED SCIENTIFIC SESSION, 15 October 2005, Chicago. Abstracts.* Chicago: Eye Bank Association of America and the Cornea Society, 2005, p. 24.

BURGOS-BLASCO, B. *et al.* Clinical outcomes of long-term corneas preserved frozen in Eusol-C used in emergency tectonic grafts. **Cell and Tissue Banking**, New York. v. 24, p. 351-356, Sept. 2022.

CAMBER, O. *et al.* Morphology of the Pig Cornea in Normal Conditions and after Incubation in a Perfusion Apparatus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen. v. 28, n. 2, p. 127-134, 1987.

CHAN, K.Y.; CHO, P.; BOOST, M. Corneal epithelial cell viability of an ex vivo porcine eye model. **Clinical and Experimental Optometry**, Melbourne, Victoria. v. 97, n. 4, p. 337-340, July 2014.

CHAN-LING, T.; CURMI, J. Changes in corneal endothelial morphology in cats as a function of age. **Current Eye Research**, Abingdon. v. 7, n. 4, p. 387-392, Feb. 1988.

CHAURASIA, S. Thirty years of eye bank experience at a single centre in India. **International Ophthalmology**, Abu Dhabi. v. 40, p. 81-88, Aug. 2019.

CHAURASIA, S.; VANATHI, M. Specular microscopy in clinical Practice. **Indian Journal of Ophthalmology**, Philadelphia. v. 69, n. 3, p. 517-524, Mar. 2021.

CHOI, H.J. *et al.* Protocol for the first clinical trial to investigate safety and efficacy of corneal xenotransplantation in patients with corneal opacity, corneal perforation, or impending corneal perforation. **Xenotransplantation**, Hoboken. v. 26, n. 1, p. 1-11, July 2018.

CLEROT, L.L. *et al.* Morphology of Endothelial Cells from Different Regions of the Swine Cornea. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre. v. 47, n. 1623, p. 1-6, Jan. 2019.

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

COSTA, D. *et al.* Cryopreservation ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) of feline corneoscleral tissue: histologic, microbiologic, and ultrastructural study. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 19, n. S1, p. 97-104, July 2016.

COSTA, D. *et al.* Cryopreservation ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) of canine corneoscleral tissue: histological, microbiological, and ultrastructural study. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 21, n. 6, p. 556-564, Nov. 2018.

COSTA, D. *et al.* Cryopreservation ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) of equine corneoscleral tissue: Microbiological, histological, and ultrastructural study. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 22, n. 4, p. 493-501, July 2019.

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**, Schaumburg. v. 79, n. 10, p. 1087-1092, Oct. 2018.

COYO, N. *et al.* Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 19, n. 5, p. 367-372, Sept. 2016.

CRAWFORD, A.Z.; PATEL, D.V.; MCGHEE, C.N.J. A brief history of corneal transplantation from ancient to modern. **Oman Journal of Ophthalmology**, Mumbai, v. 6, p. 12-17, Sept. 2013.

CRESPO-MORAL, M. *et al.* Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. **PLOS One**, San Francisco. v. 15, n. 1, p. 1-17, Jan. 2020.

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. 60 p. Disponível em: <https://editora.pucrs.br/edipucrs/acessolivro/livros/microscopia.pdf>. Acesso em: 04 de novembro 2023.

DIKSTEIN, S.; MAURICE, D.M. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. **The Journal of Physiology**, Hoboken. v. 221, n.1, p. 29-41, Feb. 1972.

DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Amsterdam. v. 23, n. 3, p. 223-229, July 2015.

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**, Hoboken. v. 9, n. 2, p. 127-135, Mar. 2006.

DOUGHTY, M.J. Toward a Quantitative Analysis of Corneal Endothelial Cell Morphology: A Review of Techniques and Their Application. **Optometry and Vision Science**, Philadelphia. v. 66, n. 9, p. 626-642, Sept. 1989.

DOWNIE, L.E. *et al.* Anatomy and physiology of the anterior eye. **Contact Lens and Anterior Eye**, Abingdon, v. 44, n. 2, p. 132-156, Apr. 2021.

DUA, H.S. *et al.* Human Corneal Anatomy Redefined A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). **Ophthalmology**, Abingdon. v. 120, n. 9, p. 1778-1785, Sept. 2013.

DUBIELZIG, R.R. *et al.* Diseases of the cornea and sclera. *In*: DUBIELZIG, R. R. *et al.* **Veterinary Ocular Pathology: a comparative review**. 1. Ed. Abingdon: Elsevier, 2010. cap. 8, p. 201-243.

EDELHAUSER, H.F. *et al.* Intraocular irrigating solutions. **The Journal of the American Medical Association**, New York. v. 93, n. 8, p. 648-657, Aug. 1975.

ELLIS, M.F.; MCGHEE, C.N.J.; LEE, W.R. A Scanning Electron Microscope Study of Porcine Corneal Endothelium Stored in Chondroitin Sulphate. **Cornea**, Philadelphia. v. 11, n. 2, p. 127-132, Mar. 1992.

FAGANELLO, C.S. *et al.* Morphology of endothelial cells from different regions of the equine cornea. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 46, n. 12, p. 2223-2228, Dec. 2016.

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

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

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

FREIRE, L. A. *et al.* Donor Cornea Quality Preserved in two different Media: Eusol-C® and Optisol-GS®. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 59, n. 9, p. 4332, July 2018.

FRIEDLAND, B.R.; FOSTER, R.K. Comparison of corneal storage in McCarey-Kaufman medium, moist chamber, or standard eye-bank conditions. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 15, n. 2, p. 143-147, 1976.

FUJITA, M. *et al.* Comparison of Proliferative Capacity of Genetically-Engineered Pig and Human Corneal Endothelial Cells. **Ophthalmic Research**, Basel. v. 49, n. 3, p. 127-138, Mar. 2013.

GIMENES, I. *et al.* Cold Storage Media versus Optisol-GS in the Preservation of Corneal Quality for Keratoplasty: A Systematic Review. **Applied Sciences**, Basel. v. 12, n. 14, p. 1-30, July 2022.

GIURGOLA, L. *et al.* Assessment of performance and safety of corneal chamber hypothermic storage and PSS-L corneal rinsing in human and porcine corneas. *In*: ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN EYE BANK ASSOCIATION, 2-4 March 2023, Aachen, Germany. **Abstracts**. London: BMJ Open Ophthalmology, 2023. v. 8, Suppl. 2, p. A6.

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

GWIN, R.M. *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 22, p. 267-271, Feb. 1982.

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

HASSEL, J.R.; BIRK, D.E. The molecular basis of corneal transparency. **Experimental Eye Research**, Abingdon. v. 91, n. 3, p. 326-335, Sept. 2010.

HEICHEL, J. *et al.* Topographic findings of the porcine cornea. **Medical Hypothesis Discovery and Innovation in Ophthalmology**, [S.l.]. v. 5, n. 4, p. 125-131, 2016.

HENRIKSEN, M.L. *et al.* Visual outcome after corneal transplantation for corneal perforation and iris prolapse in 37 horses: 1998–2010. **Equine Veterinary Journal**, Amsterdam. v. 44, p. 115-119, Dec. 2012.

HÜNNING, P.S. *et al.* Morphology of endothelial cells from different regions of the cornea of dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria. 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 of Ophthalmology**, New York. v. 53, p. 523-530, Sept. 2009.

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

ISIDAN, A. *et al.* Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives. **Xenotransplantation**, Hoboken. v. 26, n. 6, e12564, Nov./Dec. 2019.

JAVADI, M.A. *et al.* Sinasol versus Optisol-GS for cold preservation of human cornea: a prospective ex vivo and clinical study. **Cell and Tissue Banking**, New York. v. 22, p. 563-574, May 2021.

JENG, B.H. Preserving the cornea: corneal storage media. **Current Opinion in Ophthalmology**, Philadelphia. v. 17, n. 4, p. 332-337, Aug. 2006.

JONUSCHEIT, S.; DOUGHTY, M.J.; RAMAESH, K. In vivo confocal microscopy of the corneal endothelium: comparison of three morphometry methods after corneal transplantation. **Eye**, London. v. 25, p. 1130-1137, June 2011.

JOYCE, N.C. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. **Experimental Eye Research**, Abingdon. v. 95, n. 1, p. 16-23, Feb. 2012.

KADONOSONO, K. *et al.* Effect of intracameral anesthesia on the corneal Endothelium. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, Philadelphia. v. 24, n. 10, p. 1377-1381, Oct. 1998.

KANAVI, M.R. Comparing quantitative and qualitative indices of the donated corneas maintained in Optisol-GS with those kept in Eusol-C. **Cell and Tissue Banking**, New York. v. 16, p. 243-247, Aug. 2014.

KAUFMAN, H.E. *et al.* K-sol corneal preservation. **American Journal of Ophthalmology**, Amsterdam. v. 100, n. 2, p. 299-304, Aug. 1985.

KAUFMAN, S.C. *et al.* Confocal Microscopy: A report by the American Academy of Ophthalmology. **Ophthalmology**, San Francisco. v. 111, n. 2, p. 396-406, Feb. 2004.

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**, Hoboken. v. 23, n. 3, p. 202-210, May/June 2016.

KIM, K.S. *et al.* Corneal Endothelial Permeability of Human Tissue After Storage in Optisol. **American Journal of Ophthalmology**, Amsterdam. v. 117, n. 3, p. 385-393, Mar. 1994.

KIM, S.Y.; PARK, Y.H.; LEE, Y.C. Comparison of the effect of intracameral moxifloxacin, levofloxacin and cefazolin on rabbit corneal endothelial cells. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, Hoboken. v. 36, n. 4, p. 367-370, May/June 2008.

KOULOURI, I. *et al.* A new storage solution for the hypothermic preservation of corneal grafts: an experimental study. **Cell and Tissue Banking**, New York. v. 21, p. 507-521, May 2020.

KUNZMANN, B.C. *et al.* Establishment of a porcine corneal endothelial organ culture model for research purposes. **Cell and Tissue Banking**, New York. v. 19, p. 269-276, Oct. 2017.

LACERDA, R.P. *et al.* Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: a review of 50 cases. **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 20, n. 3, p. 222-231, May 2017.

LAGALI, N.S. *et al.* Innervation of Tissue-Engineered Corneal Implants in a Porcine Model: A 1-Year In Vivo Confocal Microscopy Study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 48, n. 8, p. 3537-3544, Aug. 2007.

LAGUNA, F. *et al.* Corneal grafting for the treatment of feline corneal sequestrum: a retrospective study of 18 eyes (13 cats). **Veterinary Ophthalmology**, Hoboken. v. 18, n. 4, p. 291-296, July 2015.

LEE, S.E. *et al.* Characterization of Porcine Corneal Endothelium for Xenotransplantation. **Seminars in Ophthalmology**, Abingdon. v. 29, n. 3, p. 127-135, June 2013.

LINDSTROM, R.L. *et al.* Corneal preservation at 4°C with chondroitin sulfate containing medium. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, Bethesda. v. 85, p. 332-349, 1987.

LINDSTROM, R.L. *et al.* Optisol Corneal Storage Medium. **American Journal of Ophthalmology**, Amsterdam. v. 114, n. 3, p. 345-356, Sept. 1992.

LINDSTROM, R.L. *et al.* Minnesota system corneal preservation. **British Journal of Ophthalmology**, London. v. 70, n. 1, p. 47-54, Jan. 1986.

LIU, S.W.; CHIU, C.J., WANG, I.J. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, Abingdon. v. 30, n. 6, p. 1351-1355, June 2004.

LOPEZ-GUAJARDO, L.; BENITEZ-HERREROS, J.; SILVA-MATO, A. Experimental Model to Evaluate Mechanical Closure Resistance of Sutureless Vitrectomy Sclerotomies Using Pig Eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 52, n. 7, p. 4080-4084, June 2011.

MADDEN, P.W. The evaluation of endothelial damage following corneal storage: a comparison of staining methods and the value of scanning electron microscopy. **Current Eye Research**, Abingdon. v. 6, n. 12, p. 1441-1452, Nov. 1987.

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**, Philadelphia. v. 27, n. 1, p. 1-6, Jan. 2008.

MCCAREY, B.E.; KAUFMAN, H.E. Improved corneal storage. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 13, n. 3, p. 165-173, Mar. 1974.

MEANS, T.L. *et al.* Viability of Human Corneal Endothelium Following Optisol-GS Storage. **Archives of Ophthalmology**, Chicago. v. 113, n. 6, p. 805-809, June 1995.

MEEKINS, J.M.; RANKIN, A.J.; SAMUELSON, D.A. Ophthalmic Anatomy. *In*: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 6 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2021. v. 1, cap. 2, p. 41-123.

MENA-LINARES, E.E. *et al.* Endothelial cell viability comparing Eusol-C vs Optisol-GS as corneal preservation medium. **Revista médica del Hospital General de México**, Ciudad de México. v. 86, n. 4, p. 129-134, sep. 2023.

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

MISTÒ, R. *et al.* A new storage medium containing amphotericin B versus Optisol-GS for preservation of human donor corneas. **British Journal of Ophthalmology**, London. v. 106, n. 2, p. 1-6, 2020.

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

MUCCILLO, M.S. *et al.* Acute effects of ropivacaine hydrochloride on corneal endothelial cell ultrastructure of horses: ex vivo study. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 51, n. 10, p. 1-7, June 2021

MURPHY, C. *et al.* Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 25, n. 3, p. 312-322, Mar. 1984.

NAGATSUYU, C.E. *et al.* Non-contact specular microscopy in aphakic and pseudophakic dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 44, n. 4, p. 682-687, Apr. 2014.

NEUBAUER, L.; LAING, R.A.; LEIBOWITZ, H.M. Specular microscopic appearance of damaged and dead endothelial cells in corneas following short-term storage. **Archives of Ophthalmology**, Chicago. v. 102, n. 3, p. 439-444, Mar. 1984.

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

OH, J.O. Changes with age in the cornea of normal rabbits. **Acta Ophthalmologica**, Hoboken. v. 41, n. 5, p. 568-573, Oct. 1963.

PAREKH, M. *et al.* A quantitative method to evaluate the donor corneal tissue quality used in a comparative study between two hypothermic preservation media. **Cell and Tissue Banking**, New York. v. 15, p. 543-554, Feb. 2014.

PARK, S. *et al.* Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelial Cells. **Cornea**, Philadelphia. v. 31, n. 12, p. 1476-1479, Dec. 2012.

PELS, E.; BEELE, H.; CLAERHOUT, I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. **International Ophthalmology**, New York. v. 28, p. 155-163, May 2007.

PERKEL, J.M. Xenotransplantation makes a comeback. **Nature Biotechnology**, Berlin. v. 34, n. 1, p. 3-4, Jan. 2016.

PETROPOULOS, I.N. *et al.* Corneal confocal microscopy: ready for prime time. **Clinical and Experimental Optometry**, Melbourne, Victoria. v. 103, n. 3, p. 265-277, Jan. 2019.

PIGATTO, A.M. *et al.* Sheep Corneal Endothelium Morphology - Evaluation with Trypan Blue and Alizarin Red. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre. v. 50, n. 1873, p. 1-6, June 2022.

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

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

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

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

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

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

PRICE, N.C.; CHENG, H. Contact and noncontact specular microscopy. **British Journal of Ophthalmology**, London. v. 65, n. 8, p. 568-574, Aug. 1981.

REDDY, T.S. *et al.* Endothelial cell damage in human and rabbit corneas stored in K-Sol without antioxidants. **British Journal of Ophthalmology**, London. v. 73, n. 10, p. 803-808, Oct. 1989.

RODELLA, U. *et al.* A porcine cornea and lamellar tissue model to investigate effects of storage conditions on corneal preservation. *In: EUROPE EYE BANKING ASSOCIATION VIRTUAL MEETING, 3-5 March 2022. Abstracts*. London: BMJ Open Ophthalmology, 2022. v. 7, Suppl. 2, p. A8.

RODELLA, U. *et al.* Porcine Cornea Storage Ex Vivo Model as an Alternative to Human Donor Tissues for Investigations of Endothelial Layer Preservation. **Translational Vision Science & Technology**, Rockville. v. 12, n. 4, p. 1-13, Apr. 2023.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, S. *et al.* Analysis of Cryopreservation Protocols and Their Harmful Effects on the Endothelial Integrity of Human Corneas. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel. v. 22, n. 22, p. 1-14, Nov. 2021.

RUIZ-EDERRA, J. *et al.* The pig eye as a novel model of glaucoma. **Experimental Eye Research**, Abingdon. v. 81, n. 5, p. 561-569, Nov. 2005.

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**, Philadelphia. v. 27, n. 7, p. 818-824, Aug. 2008.

SAGGAU, D.D.; BOURNE, W.M. A Comparison of Two Preservation Media (CSM and K-Sol) by Scanning Electron Microscopy of Preserved Corneal Endothelium. **Archives of Ophthalmology**, Chicago. v. 107, n. 3, p. 429-432, Mar. 1989.

SANCHEZ, I. *et al.* The parameters of porcine eyeball. **Graefe's Archive for Clinical Experimental Ophthalmology**, New York. v. 249, p. 475-482, Feb. 2011.

SHARMA, N. *et al.* Evaluation of various preservation media for storage of donor corneas. **Indian Journal of Ophthalmology**, Philadelphia. v. 69, n. 9, p. 2452-2456, Sept. 2021.

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

SILVA, V.R.M. *et al.* Evaluation of equine corneal endothelium after exposure to 0.5% indocyanine green - *in vitro* study. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v. 39, n. 2, p. 613-620, Mar./Abr. 2018.

SIMON, M. *et al.* Influence of donor storage time on corneal allograft survival. **Ophthalmology**, Abingdon. v. 111, n. 8, p. 1534-1538, Aug. 2004.

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

SINGH, R. *et al.* Corneal transplantation in the modern era. **Indian Journal of Medical Research**, New Dehli. v. 150, n. 1, p. 7-22, July 2019.

SMITH, T.M. *et al.* Efficacy and safety of gentamicin and streptomycin in Optisol-GS: a preservation medium for donor corneas. **Cornea**, Philadelphia. v. 14, n. 1, p. 49-55, Jan. 1995.

STEIN, R.M.; BOURNE, W.M.; CAMPBELL, R.J. Chondroitin sulfate for corneal preservation at 4°C. **Archives of Ophthalmology**, Chicago. v. 104, n. 9, p. 1358-1361, Sept. 1986.

STEIN, R.M.; LAIBSON, P.R. Comparison of chondroitin sulfate to McCarey-Kaufman medium for corneal storage. **American Journal of Ophthalmology**, Amsterdam. v. 104, n. 5, p. 490-493, Nov. 1987.

STEINMETZ, J. *et al.* Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet Global Health**, Amsterdam. v. 9, n. 2, p. 144-160, Feb. 2021.

SVEDBERGH, B.; BILL, A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**, Hoboken. v. 50, n. 3, p. 321-336, June 1972.

SZAFLIK, J.; LIBEREK, I.; BRIX, M. Corneal storage methods. **Transplantation proceedings**, Amsterdam. v. 32, n. 6, p. 1424-1425, Sept. 2000.

SZALAI, E. *et al.* Evaluation of the Corneal Endothelium Using Noncontact and Contact Specular Microscopy. **Cornea**, Philadelphia. v. 30, n. 5, p. 567-570, May 2011.

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

TAN, D.T.H. *et al.* Corneal transplantation. **The Lancet**, London. v. 379, n. 9827, p. 1749-1761, May 2012.

TAYLOR, M.J.; HUNT, C.J. A new preservation solution for storage of corneas at low temperatures. **Current Eye Research**, Abingdon. v. 4, n. 9, p. 963-973, Aug. 1985.

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

TUFT, S.J.; COSTER, D.J. The Corneal Endothelium. **Eye**, London. v. 4, p. 389-424, May 1990.

VAN HORN, D.L.; SCHULTZ, R. Endothelial survival in cryopreserved human corneas: a scanning electron microscopic study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 13, n. 1, p. 7-16, June 1974.

VARGAS, E.V.B. Specular microscopy of the different regions of the cornea in enucleated swine eyes – *ex vivo* evaluation. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia. v. 24, p. 1-6, 2023.

VIRTANEN, J. *et al.* The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and morphology in scanning electron microscopy. **Acta Ophthalmologica**, Hoboken. v. 62, n. 4, p. 577-585, Aug. 1984.

VOGT, A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels im Lichtbuschel der gullstrandschen Spaltlampe. **Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde**, Stuttgart. v. 63, p. 233-234, 1919.

WALKENBACH, R.J.; CORWIN, J.G.; YE, G.S. Corneal Function After Storage in Commercial Eye Bank Media. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville. v. 32, n. 5, p. 1551-1557, Apr. 1991.

WILSON, S.E.; BOURNE, W.M. Corneal Preservation. **Survey of Ophthalmology**, Amsterdam. v. 33, n. 4, p. 237-259, Jan./Feb. 1989.

WORNER, C.H. *et al.* Cell pattern in adult human corneal endothelium. **PLOS One**, San Francisco. v. 6, n. 5, p. 1-5, May 2011.

YOERUEK, E. *et al.* Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. **Acta Ophthalmologica**, Hoboken. v. 90, n. 3, p. 206-210, May 2012.

YOON, C.H. *et al.* Long-term survival of full-thickness corneal xenografts from  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene-knockout miniature pigs in non-human primates. **Xenotransplantation**, Hoboken. v. 27, n. 1, p. 1-13, Jan./Feb. 2020.

YOON, C.H., CHOI, H.J.; KIM, M.K. Corneal xenotransplantation: Where are we standing? **Progress in Retinal and Eye Research**, Amsterdam. v. 80, p. 1-40, Jan. 2021.

YUKSEL, M.B.; UZUNEL, U.D.; KÜSBECI, T. Endothelial Cell Viability of Donor Corneas Preserved in Eusol-C Corneal Storage Medium. **Experimental and Clinical Transplantation**, Ankara. v. 14, n. 4, p. 441-444, Aug. 2016.