

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

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA PÓS-OPERATÓRIA DAS CÉLULAS DO
ENDOTÉLIO CORNEANO DE COELHOS NA REGIÃO PERIFÉRICA
PERINCISIONAL COMPARATIVAMENTE À REGIÃO CENTRAL**

Paula Stieven Hünning

PORTO ALEGRE

2011

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

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA PÓS-OPERATÓRIA DAS CÉLULAS DO
ENDOTÉLIO CORNEANO DE COELHOS NA REGIÃO PERIFÉRICA
PERINCISIONAL COMPARATIVAMENTE À REGIÃO CENTRAL**

Autora: Paula Stieven Hünning

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

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e esposo

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, João Antonio Tadeu Pigatto, pelos ensinamentos, dedicação e paciência, possibilitando que este trabalho se concretizasse.

Pelo exemplo de profissionalismo e amor à Oftalmologia.

Aos pais, Luisa e Ademir, e irmã, Camila, pelo companheirismo e amor.

Ao esposo, Samuel, pelo amor e apoio.

À Luciane de Albuquerque pela amizade, companheirismo, apoio, dedicação, os quais permitiram a realização deste trabalho.

À Ana Carolina Rodarte de Almeida pela amizade, apoio e colaboração neste estudo.

Ao Ruben Calvalcanti pelo apoio na realização do estudo e amizade.

Aos colegas do setor de Oftalmologia, Luciana Pacicco e Bernardo Bercht, pela amizade e companheirismo.

Ao Rafael Stedile pela realização da estatística do experimento.

Ao meu cão amado, Bobi, pelos bons momentos de distração e carinho.

As minhas gatas rebeldes, Miona e Safi, pela companhia.

À equipe do Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura pelo auxílio no processamento das amostras.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos de que alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

... toda gratidão, gentilmente a resumo com um verdadeiro MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A manutenção da morfologia normal do endotélio da córnea é um importante indicador da integridade funcional. A reparação endotelial frente a um trauma, em coelhos, ocorre por migração, hipertrofia e mitose celular. Objetivou-se comparar a morfologia das células do endotélio, da região periférica perincisional à região central, da córnea de coelhos (Oryctolagus cuniculus) em diferentes períodos pós-operatórios. Foram designados três grupos, com 5 animais cada, para avaliação pós-operatória, sendo G1 (7 dias); G2 (15 dias) e G3 (45 dias). Trinta bulbos dos olhos de coelhos, da raça Nova Zelândia, foram submetidos à incisão de córnea clara uniplanar com 3,2 mm. Ao fim dos períodos determinados, procedeu-se a avaliação da morfologia endotelial valendo-se da microscopia eletrônica de varredura. Realizaram-se seis eletromicrografias de varredura, de cada região da córnea, com aumento de 1000 vezes. Para análise do percentual do número de lados celular, foram analisadas 100 células endoteliais. Na região periférica perincisional, avaliada ao 7º dia de pós-operatório, foram encontradas células com 6 lados (47,8%), 5 lados (31,3%), 7 lados (13,9%), 3 lados (0,1%), 4 lados (4,9%), 8 lados (1,8%) e 9 lados (0,2%). Na avaliação ao 15º dia de pós-operatório, observaram-se células com 6 lados (45,6%), 5 lados (32,6%), 7 lados (17,4%), 4 lados (1,7%) e 8 lados (2,7%). No 45º dia de pós-operatório, verificou-se a presença de células com 6 lados (57%), 5 lados (24%), 7 lados (17,2%), 4 lados (0,1%), 8 lados (1,6%) e 9 lados (0,1%). Na área central, ao 7º dia de pós-operatório, detectaram-se células com 6 lados (75,6%), 5 lados (13,3%), 7 lados (10,8%) e 8 lados (0,3%). Na avaliação, ao 15º dia de pós-operatório, foi possível observar células com 6 lados (78,9%), 5 lados (11,5%) e 7 lados (9,6%). No 45º dia de pós-operatório identificaram-se células com 6 lados (74,8%), 5 lados (13,6%) e 7 lados (11,6%). Os resultados demonstraram que na região periférica perincisional ocorreu diminuição das células com seis lados e aumento do número de células com cinco e sete lados. Na região central manteve-se o padrão regular de hexagonalidade das células endoteliais nos diferentes períodos pós-operatórios. Conclui-se que houve alteração na morfologia das células endoteliais, da região periférica perincisional comparada à região central, da córnea de coelhos nos diferentes períodos pós-operatórios.

Descritores: incisão corneana, endotélio corneano, microscopia eletrônica de varredura, lagomorfos.

ABSTRACT

The maintenance of the normal corneal endothelium morphology is an important indicator of its functional integrity. In rabbits, endothelial repair in the event of traumas is made through cell migration, hypertrophy and mitosis. The purpose of this study was to compare the morphology of endothelial cells of the perincisional area with the central area of the cornea of rabbits (Oryctolagus cuniculus), in different post-operative periods. Three groups containing 5 animals each were designed for post-operative evaluation: G1 (7 days); G2 (15 days) and G3 (45 days). The clear cornea of thirty New Zealand rabbits was subjected to a single-planned incision of 3.2 mm. At the end of the established periods, a morphological evaluation of the endothelium was carried out using scanning electron microscopy. Six scanning electron micrographs of each corneal area were performed using a magnification of 1000 x. One hundred endothelial cells were analyzed to obtain the cell side count percentage. In the perincisional peripheral area, which was evaluated at the 7 post-operative day, 6-sided (47.8%), 5-sided (31.3%) and 7-sided (13.9%) cells were found, in addition to, 3-sided cells (0.1%), 4-sided cells (4.9%), 8-sided cells (1.8%) and 9-sided cells (0.2%). In the evaluation made on the 15th post-operative day, 6-sided (45.6%), 5-sided (32.6%) and 7-sided (17.4%) cells were observed, as well as 4-sided (1.7%) and 8-sided cells (2.7%). On the 45th post-operative day, the presence of 6-sided (57%), 5-sided (24%), 7-sided (17.2%), 4-sided (0.1%), 8-sided (1.6%) and 9-sided cells (0.1%) was verified. On the 7th post-operative day, 6-sided (75.6%), 5-sided (13.3%), 7-sided (10.8%) and 8-sided cells (0.3%) were observed in the central area. Upon evaluation made on the 15th post-operative day, it was possible to observe 6-sided (78.9%), 5-sided (11.5%) and 7-sided (9.6%) cells. Upon evaluation made on the 45th post-operative day, it was possible to identify 6-sided (74.8%), 5-sided (13.6%) and 7-sided (11.6%) cells. Results have shown that there was a reduction of six-sided cells and an increase in the number of five and seven-sided cells in the perincisional peripheral area. The regular hexagonal standard of the endothelial cells was maintained in the central area in different post-operative periods. In comparison to the central area, there was a morphological alteration of the endothelial cells of the peripheral perincisional area in different post-operative periods of the cornea of rabbits.

Key words: corneal incision, corneal endothelium, scanning electron microscopy, lagomorphs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: por cento

&: e

µm: micrômetros

µ: micrón

et al.: e outros

IM: intramuscular

IV: intravenosa

kg: quilogramas

M: molar

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

mg: miligramas

min: minuto

mm: milímetros

p: probabilidade

RPL: reflexo pupilar a luz

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V: volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagem das etapas de realização da incisão de córnea clara uniplanar com bisturi angular de 3.2 mm em coelhos.	28
Figura 2 –	Representação esquemática das regiões perincisional (A) e central (B) da córnea de coelhos.	29
Figura 3 –	Imagem do fragmento de córnea de coelho metalizado com ouro e paládio e acondicionado em porta espécime. Representação esquemática das regiões avaliadas por MEV: periférica perincisional (PP) e central (C).	30
Figura 4-	Eletromicrografia de varredura da região periférica perincisional do endotélio de coelho, submetido à incisão de córnea obtida aos 7 dias de pós-operatório, apresentando hexagonalidade de 47,8%. Aumento original 1000X; Barra = 10µm.....	32
Figura 5 -	Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio de coelho, submetido à incisão de córnea obtida aos 7 dias de pós-operatório, apresentando hexagonalidade de 75,6%. Aumento original de 1000X; Barra = 10µm.....	32
Figura 6 -	Eletromicrografia de varredura da região periférica perincisional do endotélio de coelho submetido, à incisão de córnea obtida aos 15 dias de pós-operatório, apresentando hexagonalidade de 45,6%. Aumento original 1000X; Barra = 10µm.....	33
Figura 7 -	Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio de coelho, submetido à incisão de córnea obtida aos 15 dias de pós-operatório, apresentando hexagonalidade de 78,9%. Aumento original 1000X; Barra = 10µm.....	33
Figura 8 -	Eletromicrografia de varredura da região periférica perincisional do endotélio de coelho submetido, à incisão de córnea obtida aos 45 dias de pós-operatório, apresentando hexagonalidade de 57%. Aumento original 1000X; Barra = 10µm.....	34
Figura 9 -	Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio de coelho, submetido à incisão de córnea obtida aos 45 dias de pós-operatório, apresentando hexagonalidade de 74,8%. Aumento original 1000X; Barra = 10µm.....	34

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1-	Representação gráfica do percentual de células endoteliais com seis lados das regiões periférica perincisional e central de coelhos submetidos à incisão de córnea, correspondente aos períodos pós-operatórios de 7 dias (G1), 15 dias (G2) e 45 dias (G3).....	31
-------------------	--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Número de lados das células endoteliais, expresso em percentual, das regiões periférica perincisional e central de coelhos, submetidos à incisão de córnea, correspondentes aos períodos pós-operatórios de 7 dias (G1), 15 dias (G2) e 45 dias (G3).....	35
-------------------	---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Anatomofisiologia da córnea.....	14
2.1.1 Endotélio corneano.....	15
2.1.2 Fisiologia do endotélio corneano.....	17
2.2 Reparação endotelial.....	18
2.3 Reparação endotelial em resposta a trauma.....	19
2.4 Efeitos da cirurgia de catarata no endotélio corneano.....	21
2.5 Métodos de avaliação do endotélio corneano.....	23
3 ARTIGO.....	25
3.1 Avaliação da morfologia pós-operatória das células do endotélio corneano de coelhos, na região periférica perincisional comparativamente à região central.....	25
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	27
Resultados.....	30
Discussão e conclusão.....	35
Referências.....	39
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea (SVEDBERGH & BILL, 1972; JOHNSTON et al., 1979; TUFT & COSTER, 1990). Em sua maioria, as células endoteliais apresentam formato hexagonal, podendo ter quatro, cinco, sete e oito lados (SVEDBERGH & BILL, 1972; PIGATTO, 2004; PIGATTO et al., 2006).

A camada endotelial é importante na manutenção da transparência da córnea e constantemente está sujeita a alterações fisiológicas decorrentes a idade, a traumas, a uveítes e a manipulações cirúrgicas intraoculares. Estas podem modificar a morfologia do endotélio, podendo levar ao desenvolvendo edemas de córnea (LANDSHMAN et al., 1989; TUFT & COSTER, 1990; ABIB & BARRETO, 2001; PIGATTO, 2004).

Dentre os principais procedimentos cirúrgicos intraoculares está a facoemulsificação, técnica de eleição para remoção de catarata em humanos e cães (WAISWOL, 2004; PIGATTO et al., 2007).

O acesso cirúrgico da catarata inicia-se pela incisão da córnea periférica (WAISWOL, 2004) e a descompensação endotelial com perda da transparência corneana pode ocorrer. A lesão endotelial, provocada cirurgicamente, leva à alteração nos padrões morfológicos normais (WARING et al., 1982; TUFT & COSTER, 1990, SANCTIS et al., 2006; ALMEIDA, 2009).

Após injúria corneana, as células endoteliais sobreviventes preenchem as lacunas resultantes, aumentando em tamanho com perda da regularidade e da forma. Isso culmina no comprometimento funcional do endotélio (WARING et al., 1982; TUFT & COSTER, 1990, SANCTIS et al., 2006) e pode cursar com edema de córnea seguido pela perda parcial ou completa da transparência, sendo irreversível algumas vezes (LANDSHMAN et al., 1988; ABIB, 2000).

A reparação corneana ocorre por hipertrofia e migração de células remanescentes para as margens da lesão em indivíduos da espécie humana e felina (HOFFER, 1979; TREFFERS, 1982; LAING et al., 1983), observando-se alguma atividade mitótica (BAHN et al., 1986; LANDSHMAN et al., 1989; PIGATTO, 2004). Diferentemente nos coelhos, além da hipertrofia e da migração celular, ocorre significativa mitose celular (HIRSCH et al., 1976; OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA et al., 1985; ICHIJIMA et al., 1993). No período de remodelação endotelial em coelhos, verificou-se

aumento da densidade celular, uniformidade no tamanho e configuração hexagonal das células endoteliais após 30 dias do congelamento transcorneal (YEE et al., 1985a).

Na avaliação morfológica e morfométrica do endotélio corneano de olhos de animais e humanos são empregados métodos de investigação clínica, como a microscopia especular e a microscopia confocal (GWIN et al., 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CANAVAGH et al., 2000; JALBERT et al., 2003; PIGATTO et al., 2006; PIGATTO et al., 2008). Dos procedimentos metodológicos de investigação *in vitro* e *ex vivo*, a microscopia eletrônica de varredura é o principal para estimar a densidade endotelial, o tamanho e a forma das células do endotélio, (TAYLOR & HUNT 1981; ABIB, 2000; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a, PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2009), além de fornecer informações sobre a ultraestrutura endotelial (OJEDA, et al., 2001).

Os índices de pleomorfismo, expresso comumente pelo percentual de células hexagonais, e de polimegatismo, dado pelo coeficiente de variação da área celular, também podem ser obtidos pela microscopia especular e eletrônica de varredura (ABIB, 2000; DOUGHTY & DILTS, 1994; JACKSON, GARDINER & ARCHER, 1995; PIGATTO et al., 2005b).

A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada em estudos relacionados à toxicidade de fármacos e de substâncias químicas intracamerulares (ALP et al., 2000; HOLLEY et al., 2002; LIOU, CHIU & WANG, 2004; SEYHMUS et al., 2006), à eficácia de meios de preservação da córnea (ARNDT, REESE & KOSTLIN, 2001) e das superfícies de estruturas, como o epitélio (OJEDA, et al., 2001). Também foi empregada na avaliação do endotélio de diferentes espécies (RODRIGUES et al., 2006; COLLIN & COLLIN, 2000; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2009; TAMAYO-ARANGO et al., 2009).

O conhecimento da morfologia do endotélio corneano, antes do procedimento cirúrgico, é essencial para a segurança da técnica cirúrgica e para o estabelecimento do risco de descompensação endotelial (TUFT & COSTER, 1990; SCHUTTEN & Van HORN, 1980). Além disso, a inexistência de dados sobre a morfologia do endotélio corneano durante a cicatrização após a incisão de córnea, valendo-se da microscopia eletrônica, implica na escolha deste estudo.

Objetiva-se avaliar, após incisão de córnea clara de coelhos, a morfologia pós-operatória das células do endotélio corneano, da região periférica perincisional comparativamente à região central, utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomofisiologia da córnea

A córnea é a extensão transparente da esclera e faz parte da túnica fibrosa do bulbo do olho. A transição entre a esclera opaca e a córnea transparente ocorre abruptamente na junção corneoescleral, também conhecida como limbo (BANKS, 1992).

Localizada na porção anterior do bulbo do olho, a córnea tem como função a refração da luz e a proteção das estruturas intraoculares. Esta estrutura é formada por cinco camadas, incluindo o filme lacrimal pré-corneano, o epitélio, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (SLATTER, 2005). Sailstad & Peiffer (1981), utilizando a paquimetria, observaram periferia mais espessa que o centro da córnea em coelhos com 0,37 mm e 0,45 mm, respectivamente.

A córnea é um tecido avascular, que recebe nutrição através de processos de difusão do plexo venoso perilimbal e também, em menor escala, do humor aquoso e filme lacrimal pré-corneal (BANKS, 1992). É ricamente suprida por nervos sensoriais derivados da ramificação do quinto nervo craniano (SLATTER, 2005).

No limbo existem vasos sanguíneos que assumem importante papel nos processos inflamatórios, na nutrição da córnea e na cicatrização corneal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O metabolismo da glicose fornece a maior parte da requisição energética dos tecidos corneanos. Cerca de dois terços são metabolizados pelo caminho Embden-Meyerhof e pelo ciclo de Krebs e o terço restante pela derivação monofosfato hexose (SLATTER, 2005).

A transparência corneana deve-se a ausência de vasos sanguíneos, linfáticos e de pigmento; superfície epitelial não queratinizada; fibras nervosas amielínicas; controle do estado de deturgescência e disposição regular e altamente organizada das fibras colágenas (SLATTER, 2005).

O endotélio e o epitélio controlam o conteúdo aquoso da córnea, assim, é importante a manutenção da sua função e da sua integridade, caso contrário, poderá ocorrer edema e perda da transparência corneal (MISHIMA, 1982; LANDSHAMAN et al., 1988; TUFT & COSTER, 1990). Em contraste, o edema pode ser resultado de

alterações no endotélio provenientes de doenças degenerativas ou seguidas de cirurgias intraoculares ou relacionadas ao avanço da idade e uveítes (LANDSHMAN et al., 1989; TUFT & COSTER, 1990; ABIB & BARRETO, 2001; PIGATTO, 2004).

2.1.1 Endotélio corneano

O endotélio da córnea é formado por uma monocamada de células poligonais uniformes em forma e tamanho (DOUGHTY, 1998; BOTEON, 2000; SLATTER, 2005). Sua face anterior é voltada para a membrana de Descemet e face posterior voltada para a câmara anterior em contato com o humor aquoso (DOUGHTY, 1989; BOTEON, 2000). Lateralmente, continua como endotélio trabeculado escleral. Esse mosaico celular foi descrito pela primeira vez, em 1920, por Vogt por meio da biomicroscopia (BOTEON, 2000)

As células endoteliais apresentam formato hexagonal, em sua maioria, e ainda encontram-se células com quatro, cinco, sete e oito lados (RAO et al., 1982; TUFT & COSTER, 1990; DOUGHTY, 1998; PIGATTO et al., 2005a). Dessa forma, o padrão hexagonal de 65 a 75%, em córneas normais, forma uma estrutura regular e estável com mínima variação no tamanho celular (AABERG, 1984; RAO et al., 1982; DOUGHTY, 1998).

A membrana celular do endotélio tem uma face posterior formada por microvilosidades e uma face anterior voltada à membrana de Descemet. Estas faces estão relacionadas com a presença de vesículas pinocíticas, contendo substâncias que serão utilizadas pelas células estromais da córnea (BOTEON, 2000).

Prince (1964) descreveu o endotélio da córnea de coelhos como uma camada de células uniformes, desprovida de membrana basal, com núcleo alongado, largo e em formato de rim. Seu citoplasma apresenta grânulos de pigmento, provavelmente melanina, fagocitada da úvea e organelas intracitoplasmáticas (TUFT & COSTER, 1990).

Com relação às dimensões das células endoteliais há diferenças de acordo com as espécies. Assim, nos humanos, a célula endotelial apresenta dimensões de 18 a 20 μm na largura, 4 a 6 μm na espessura e núcleo com 7 μm de diâmetro (BOTEON, 2000; TUFT & COSTER, 1990). Nos felinos, a célula endotelial apresenta o diâmetro de 15 a 20 μm (SAILSTAD & PEIFFER, 1981).

Virtanen et al. (1984), por meio da microscopia especular, descreveram a célula

endotelial de coelhos normais apresentando o diâmetro médio de $20,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$ e área média de $335,1 \pm 71,1 \mu\text{m}^2$.

A densidade endotelial, utilizando a microscopia especular, permitiu o registro da população de células endoteliais por mm^2 em várias espécies (ABIB, 2000).

Os coelhos apresentaram densidade média de 2.998 ± 326 células/ mm^2 (SAILSTAD & PEIFFER, 1981). Nos cães adultos jovens encontraram-se valores de 2.800 células/ mm^2 aproximadamente (BEFANIS, PEIFFER & BROWN, 1981). Também, nos gatos adultos jovens, observaram-se a média de 2.418 ± 151 células/ mm^2 (BOURNE, 1994) enquanto que Franzen et al. (2010) registraram densidade média 2873 células/ mm^2 .

Em humanos recém-nascidos, a densidade endotelial é de 3.500 a 4.000 células/ mm^2 . Entretanto, com o avanço da idade a população de células endoteliais diminui para 1.400 a 2500 células/ mm^2 (BOTEON, 2000).

Estudos descreveram alterações na densidade endotelial em função da idade em diferentes espécies (GWIN et al., 1982; BOTEON, 2000, ABIB & BARRETO, 2001), incluindo macacos, ratos, gatos, cães e coelhos, as quais mantiveram uma média de 2.500 células/ mm^2 e aumento do tamanho da área celular (STAATZ & Van HORN, 1980; BAROODY et al., 1987; BAHN, 1986; TUFT & COSTER, 1990).

Com relação aos aspectos estruturais da superfície da célula endotelial, esta é plana e achatada, com exceção da presença dos cílios, microvilosidades e interdigitações (GALLAGHER, 1980; SCHUTTEN & Van HORN, 1980; GWIN et al., 1982; BOTEON, 2000).

Os cílios são encontrados na superfície posterior da célula endotelial, centralizados e direcionados para a câmara anterior do bulbo do olho (GALLAGHER, 1980; COLLIN & COLLIN, 1998; COLLIN & COLLIN, 2000). Cada célula endotelial apresenta um cílio único, observado por meio da microscopia eletrônica de varredura, com média de $3,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de comprimento em coelhos (GALLAGHER, 1980). Estas estruturas foram observadas em mamíferos incluindo os humanos, macacos e coelhos, e também em aves e peixes (COLLIN & COLLIN, 1998; COLLIN & COLLIN, 2000). Sua função ainda não está estabelecida. Em humanos, parece não estar associada à motilidade e sugere que não ocorra capacidade de mitose, porque este não sofre regeneração (COLLIN & COLLIN, 2000). Outras funções incluem quimiorrecepção, osmorregulação e/ou detecção de pressão (GALLAGHER, 1980).

As microvilosidades, encontradas na membrana celular posterior, são estruturas

que aumentam a superfície posterior das células endoteliais. Em humanos, observou-se 20 a 30 microvilosidades por célula, medindo 0,1 a 0,2 μm de largura por 0,5 a 0,6 μm de altura (BOTEON, 2000). Em coelhos, verificou-se a presença de uma média de 63 microvilosidades por célula endotelial por meio da microscopia eletrônica de varredura (DOUGHTY, 1998).

As interdigitações são tortuosos prolongamentos da membrana lateral das células endoteliais, aumentando a superfície de contato entre elas. As interdigitações podem estar associadas à função de bomba ativa destas células (OJEDA et. al, 2001).

As membranas laterais da célula endotelial são unidas por complexos juncionais. Estes complexos são divididos em *zonula occludens*, a qual une as células do terço posterior próxima à câmara anterior, e em *macula occludens* e *macula adherens*, as quais se encontram nos dois terços anteriores das membranas laterais, sendo raras. A *macula adherens* foi denominada anteriormente de desmossoma (BOTEON, 2000). Hirsch et al. (1986) descreveram a presença de dois tipos de junções intercelulares no endotélio de coelhos. A primeira, de localização mais dorsal, denominada de apical e a segunda, logo abaixo dela, chamada de lateral.

2.1.2 Fisiologia do endotélio

A córnea humana apresenta 75 a 80% de conteúdo aquoso. O equilíbrio osmótico dá-se pela diferença da concentração de íons entre as suas camadas, sendo mantido pela integridade das membranas celulares e, principalmente, pelo endotélio (BANKS, 1992; NASSARALLA, 2000).

O endotélio apresenta grande atividade metabólica devido à presença de inúmeras organelas. Dentre elas inúmeras mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia (ATP) e retículos endoplasmáticos lisos e rugosos bem desenvolvidos. O metabolismo da córnea ocorre por simples difusão através de capilares perilímbicos ou são oriundos do humor aquoso e do filme lacrimal pré-corneano (MISHIMA, 1982).

A manutenção da transparência e espessura da córnea é decorrente da presença de dois mecanismos que permitem estabelecer o estado relativo de deturgescência da córnea. Os mecanismos são a função de barreira e a bomba ativa de fluidos (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985a; TUFT & COSTER 1990). Se a função endotelial é inadequada, a água difunde para o interior do estroma, desorganizando as fibras de colágeno, opacificando a córnea (WARING, 1982) e aumentando a espessura corneal (MISHIMA,

1982; RAO et al., 1982).

A função barreira é dada pela presença dos complexos juncionais, também denominados de junções *gap*, localizados no espaço intercelular. Os complexos mantêm as células endoteliais unidas e impedem a permeabilidade de solutos para o espaço intracelular (TUFT & COSTER 1990; MISHIMA, 1982).

As interdigitações também auxiliam na manutenção da hidratação corneana. No pós-operatório, uma córnea com grande variação na morfologia pode apresentar pobres interdigitações, as quais permitem a entrada de água para dentro do estroma, corroborando para o aumento da espessura corneal (RAO et al., 1982).

A bomba ativa de fluidos funciona removendo fluidos do estroma corneano para a câmara anterior, através do transporte ativo de íons de bicarbonato, sódio e potássio (YEE et al., 1985a; SLATTER, 2005). O requerimento de energia para esse transporte necessita da quebra da glicose via glicólise e via ciclo do ácido tricarboxílico, gerando ATP necessário para a atividade da bomba (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985a).

2.2 Reparação endotelial

Em coelhos a reparação endotelial acontece por hipertrofia e por migração das células endoteliais, acompanhadas por significativa mitose celular (WEIMAR, SQUIRES & KNOX, 1980). Ao contrário, em humanos e felinos a reparação ocorre essencialmente por hipertrofia e migração celular, sendo mínima a atividade de mitose (LAULE et al., 1978; JACKSON, GARDINER & ARCHER, 1995).

Inúmeros estudos, valendo-se da microscopia especular, corantes vitais e microscopia eletrônica de varredura, demonstraram o processo de reparação endotelial em diversas espécies animais (REHANY et al., 2000; SAILSTAD & PEIFFER, 1981; HOFFMAN et al., 2009).

Avaliações do endotélio corneano foram realizadas em humanos, camundongos, macacos, gatos, peixes, equinos, cães, coelhos, pingüins, jacarés, avestruzes, ratos e suínos entre outros (BOURNE & KAUFMAN, 1976; SVEDBERGH B, & BILL, 1972, Van HORN et al., 1977; GWIN et al., 1982; Mac CALLUM et al., 1983; COLLIN & COLLIN, 2000; ANDREW et al., 2001; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2006; SEYHMUS et al., 2006; TAMAYO ARANGO et al., 2009). Diversas são as causas de perda endotelial como idade, inflamações intraoculares, traumas, hipertensão intraocular e procedimentos cirúrgicos

intraoculares, toxicidade a fármacos intracamerulares e diabetes mellitus (CHENG et al., 1985; REHANY et al., 2000; BROOKS et al., 1987; INOMATA & SMELSER, 1969; PRIYA, SARADA & NIHAL, 2010).

Assim, verificou-se que, com o avançar da idade, em humanos e animais, a densidade endotelial diminuía e as células remanescentes alteravam-se em forma e tamanho (GWIN et al., 1982; Van HORN et al., 1977; LAULE et al., 1978; MacCALLUM et al., 1983). As células endoteliais hipertrofiam e migram, a fim de ocupar o espaço deixado pela perda celular ao longo da vida (TUFT & COSTER, 1990; NASSARALA, 2000).

MacCallum et al. (1983) demonstraram, em estudo com microscopia especular e eletrônica de varredura, pleomorfismo intenso e células, em menor tamanho, no endotélio de felinos jovens. A presença de mitose, nesta espécie, um mês após o nascimento, supõe-se que ocorra devido ao crescimento da córnea em filhotes. Na vida adulta desses felinos, o padrão de hexagonalidade torna-se vigente, assim como ocorre em coelhos adultos (Von SALLMANN, CARACAGGIO & GRIMES, 1961). Em cães, estudos corroboram, demonstrando por meio da microscopia eletrônica de varredura que, com o avançar da idade, ocorre aumento do polimegatismo e do pleomorfismo (RODRIGUES et al., 2006).

2.3 Reparação endotelial em resposta a trauma

Após lesão endotelial, células próximas ao local lesado tornam-se hipertrofiadas e migram para recobrir a área desnuda de células endoteliais (HIRSCH et al., 1976; WEIMAR, SQUIRES & KNOX, 1980; OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA et al., 1985; TUFT & COSTER, 1990). Para a migração, as células rompem suas junções intercelulares e desenvolvem pseudópodos para movimentarem-se em média de 0,5 a 1 mm por dia em direção a lesão (BEFANIS, PEIFFER & BROWN, 1981; MATSUDA et al., 1985; TUFT & COSTER, 1990). Quando as células encontram-se no centro da lesão ocorre um estímulo inibitório pelo contato celular, cessando a migração (TUFT & COSTER, 1990) e os complexos juncionais são refeitos (HIRSCH et al., 1976; MISHIMA et al., 1982).

Concomitante à migração, ocorre mitose das células endoteliais da margem da lesão na tentativa de recobrir a membrana de Descemet exposta (Van HORN et al., 1977; TREFFERS, 1982; BEFANIS, PEIFFER & BROWN, 1981). Estudo comparativo

entre coelhos e gatos, com lesão de congelamento transcorneal de 10 e 50% da superfície corneana, verificou por meio da microscopia eletrônica de varredura que a área desnuda de coelhos era reparada em cinco dias e aos 10 dias respectivamente, observando-se densidade endotelial semelhante à anterior da lesão. Em gatos, a regeneração foi mais tardia com presença de alongamento e migração endotelial (Van HORN et al., 1977). Olsen & Davanger (1984) observaram que, em 21 dias após lesão por congelamento em córneas de coelhos jovens, revelou pela MEV o estabelecimento do padrão hexagonal do endotélio, porém as células tornaram-se mais desiguais e menos regulares que o normal.

Weimar, Squires & Knox (1980) identificaram, em estudo experimental com coelhos, após congelamento transcorneal, o aparecimento de figuras mitóticas em aproximadamente 48 horas após lesão, um progressivo aumento em quatro dias, seguido por um rápido declínio, a quase zero, em sete dias. Tuft & Coster (1990) verificaram a mitose nas primeiras 16 horas, com maior prevalência de figuras mitóticas nas margens da lesão em 24 a 36 horas, e término em cinco dias, aproximadamente. Quatro a sete dias após lesão, as células endoteliais periféricas começam a retomar sua forma e tamanho originais (TUFT & COSTER, 1990).

À microscopia especular realizada em humanos, macacos, gatos e coelhos observaram-se presença de células, com tamanho em torno de duas vezes maior que uma célula endotelial normal, ou seja, aproximadamente $300 \mu\text{m}^2$. Estas células, denominadas de células gigantes, são encontradas em córneas normais de coelhos e apenas em córneas traumatizadas das espécies humana, primata e felina, sendo visíveis a partir de 48 horas após lesão endotelial. A presença das células gigantes sugere ser uma resposta compensatória à ausência de mitose nestas espécies, demonstrando hipertrofia celular associada a uma menor densidade e a um maior pleomorfismo celular (JACKSON, GARDINER & ARCHER, 1995).

Efeitos sobre a cicatrização, como idade e inflamação intraocular podem reduzir a habilidade de replicação das células endoteliais. Estudo em coelhos revelou redução de 50% da regeneração em adultos se comparados aos jovens. Os animais idosos sintetizariam, mais lentamente e em menor quantidade, proteínas gênicas necessárias para a mitose (STAATZ & Van HORN, 1980).

2.4 Efeitos da cirurgia de catarata no endotélio corneano

A opacificação da lente é a principal causa de cegueira em cães, sendo o tratamento cirúrgico a única forma de manejo. Incluem-se, como técnicas de extração a intracapsular, a extracapsular e a facoemulsificação (GILGER, 1997; PIGATTO, 2004; PIGATTO et al., 2007).

A remoção da catarata, pela facoemulsificação, tem se mostrado uma técnica de eleição com inúmeras vantagens se comparada às técnicas manuais. A facoemulsificação prima com incisão pequena, manutenção da pressão intraocular trans-operatório, menor manipulação das estruturas internas do bulbo do olho, menor contaminação, menor risco desenvolvimento de inflamação intraocular pós-operatória, menor tempo cirúrgico e restabelecimento precoce da visão (GWIN et al., 1982; KECOVÁ & NECAS, 2004; PIGATTO et al., 2007).

O passo inicial da cirurgia de catarata é a incisão, a qual deve ser confeccionada de maneira adequada. Uma incisão mal realizada poderá dificultar as etapas seguintes, aumentando o risco de complicações. Dentre as complicações relacionadas à confecção da incisão citam-se endoftalmites, estafiloma, atalamia, astigmatismo e hifema (NAGAKI et al., 2003).

A incisão em córnea clara é comumente utilizada na facoemulsificação. Em 1992, promoveu-se o uso desta incisão tunelizada autosselante (RAO et al., 2003; WAISWOL, 2004), realizada no canto temporal (FADEL, 2004). Observa-se que as incisões corneanas apresentam maior prevalência de endoftalmites do que as corneoesclerais, não estando associadas ao implante de lente intraocular (NAGAKI et al., 2003).

Estudo *ex vivo* conduzido com olhos de humanos e de coelhos, demonstraram maior risco de endoftalmites nas incisões de córnea clara, pois a pressão intraocular é baixa no pós-operatório, propiciando inadequada coaptação das bordas da lesão e permitindo a entrada de microorganismo na câmara anterior. A hipotonia pós-operatória da cirurgia de catarata é transitória e comum nas primeiras horas após a facoemulsificação, podendo levar ao desenvolvimento endoftalmites (McDONNELL, et al., 2003).

Com as modernas técnicas de facoemulsificação, a incisão corneana teve preferência sobre a limbal, escleral e corneoescleral, pois oferece diversas vantagens como uma rápida recuperação visual no pós-operatório, menor astigmatismo, ausência

de hemorragia, menor cicatriz, permite implante de lentes intraoculares e adequado selamento da câmara anterior nas técnicas autosselantes (McDONNELL, et al., 2003).

O ângulo da incisão em córnea clara para cirurgia de catarata é de extrema importância para o seu selamento e manutenção da estabilidade na câmara anterior, pois evita flutuações da pressão intraocular. Corroborando, estudo com tomografia de coerência óptica, demonstrou que as incisões uniplares em olhos humanos com ângulos de 30° a 40° propiciaram maior estabilidade. Ainda, em córneas de coelhos, ângulos de 30° e 33° correspondem aos melhores valores para a coaptação das bordas da incisão (RAO et al., 2003).

Os tamanhos das incisões na cirurgia de remoção da catarata são diferentes entre as técnicas operatórias. Na facoemulsificação, podem-se confeccionar incisões de aproximadamente 3.2 mm, bem como as microincisões com 1,5 mm de largura ou incisões ainda menores, (KECOVÁ & NECAS, 2004; ELKADY, PIÑERO & ALIÓ, 2009; LICHTINGER et al. 2011) e uma incisão acessória de 1 mm. Entretanto, nas facectomias intra e extracapsulares as incisões são extensas, em torno de 180 a 190° de diâmetro, as quais correspondem a 20 a 22 mm (INABA et al., 1985; KECOVÁ & NECAS, 2004;). A cirurgia de remoção da catarata leva a mudanças na densidade endotelial, na morfologia endotelial e na espessura da córnea (INABA et al., 1985; CHENG et al., 1985; SCHULTZ et al., 1986; RAVALICO, BOTTERI & BACCARA 2003; LICHTINGER et al. 2011). Dentre as alterações morfológicas observa-se diminuição no percentual de células hexagonais, aumento no número de células hipertrofiadas e no coeficiente de variação do tamanho celular, caracterizando a perda endotelial com diminuição da densidade celular. Essas alterações são localizadas, principalmente, na porção superior da córnea devido ao acesso e a manipulação cirúrgica da remoção da catarata (SCHULTZ et al., 1986, PIGATTO, 2004).

Perdas celulares foram avaliadas, por meio da microscopia eletrônica de varredura em cães, ao comparar as técnicas manuais de facoemulsificação e extração extracapsular. Esse estudo verificou maior perda celular na região superior da córnea, seguida pela central e inferior, com maior relevância para a técnica extracapsular. Isso se deve a maior incisão, localizada na região superior e contato da lente com o endotélio, durante a sua remoção. A facoemulsificação propiciou a manutenção do padrão regular do mosaico endotelial, e pequena perda endotelial nas regiões central e inferior. Na região superior, próximo à incisão, constatou-se maior perda celular (PIGATTO, 2004).

Estudos relacionados à perda endotelial cirúrgica também foram realizados em cães, gatos e coelhos (GWIN et al., 1982, PIGATTO , 2004). Nos humanos, os estudos se detiveram principalmente ao uso da microscopia especular por ser *in vivo* e não invasivo, demonstrando, após cirurgia de catarata em olhos normais, uma perda endotelial média de 10 a 20%, independente da técnica de remoção (DIAZ-VALLE et al., 1998) e uma perda crônica progressiva anual de 2,5% durante 10 anos de pós-cirúrgico aproximadamente (BOURNE, NELSON, HODGE, 1994). Comparativamente, em olhos não operados, observou-se uma perda endotelial em torno de 0,9 a 1% por ano (BOURNE et al., 2004). Atualmente, melhoramentos tecnológicos e novas técnicas para a remoção da catarata propiciam menores perdas endoteliais registradas em torno de 3,2% a 23,2% (RAVALICO, BOTTERI & BACCARA, 2003; RICHARD et al., 2008). No entanto, a densidade endotelial ainda deve ser estimada devido o risco corneano inerente ao procedimento, podendo levar à descompensação endotelial e a perda da transparência corneana.

2.5 Métodos de avaliação do endotélio corneano

Na avaliação morfológica e morfométrica do endotélio corneano de humanos e de animais, são empregados vários métodos de investigação clínica como a microscopia especular e a microscopia confocal (GWIN et al., 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CANAVAGH et al., 2000; JALBERT et al., 2003; PIGATTO et al., 2006; PIGATTO et al., 2008). Os estudos *in vitro* utilizam a coloração vital e a microscopia eletrônica de varredura (TAYLOR & HUNT 1981). Binder, Akers & Zavala (1979), valendo-se da microscopia eletrônica de varredura, observaram densidade celular endotelial significativamente maior quando comparada a encontrada pela microscopia especular.

Esses métodos permitem analisar, principalmente, a densidade endotelial, o tamanho e a forma de das células do endotélio (DOUGHTY & DILTY, 1994; ABIB, 2000; McCAREY, EDELHAUSER & LYNN, 2008). O polimegatismo é o termo utilizado para denotar as diferenças no tamanho das células endoteliais com formato hexagonal preservado. O pleomorfismo é dado como a variação do formato hexagonal das células endoteliais da córnea. Esses índices são importantes indicadores do estado funcional do endotélio corneano (ABIB, 2000; McCAREY, EDELHAUSER & LYNN, 2008; PIGATTO et al., 2008).

A microscopia eletrônica de varredura é o método de avaliação mais comumente utilizado para obter informações sobre a ultraestrutura endotelial (OJEDA, et al., 2001). Tem sido utilizada em estudos relacionados à morfologia corneana (OJEDA, et al., 2001), à toxicidade de fármacos intracamerulares (ALP et al., 2000; HOLLEY et al., 2002; LIOU, CHIU & WANG, 2004; SEYHMUS et al., 2006), à eficácia de meios de preservação da córnea (ARNDT, REESE & KOSTLIN, 2001) e das superfícies de estruturas, como o epitélio (OJEDA, et al., 2001) e na avaliação do endotélio de diferentes espécies (COLLIN & COLLIN, 2000; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2009; TAMAYO-ARANGO et al., 2009).

Durante a etapa de preparo celular, a amostra pode sofrer graus variados de retração (PIGATTO, 2004). Em estudo com córneas de coelhos verificou-se ocorrência de até 50% de retração celular, levando a uma diminuição da área celular e aumento na densidade endotelial (BINDER, AKERS & ZAVALA 1979; SCHUTTEN & Van HORN, 1980; DOUGHTY, BERGMANSON & BLOCKER, 1997). A retração ocorrida durante a preparação da córnea demonstra uniformidade (DOUGHTY, BERGMANSON & BLOCKER, 1997). Devido a isto, valores morfométricos não podem ser correlacionados com dados da microscopia especular (SCHUTTEN & Van HORN, 1980, MISHIMA, 1982; DOUGHTY, SPITERI & DILTS 1997; DOUGHTY, 2006).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, Pigatto et al. (2005) em estudo com coelhos normais, visibilizaram células hexagonais na sua maioria (75%), células pentagonais (14%) e heptagonais (11%).

3 ARTIGO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista Journal of Cataract and Refractive Surgery (ISSN 0886-3350) e será traduzido para o inglês no momento da sua submissão.

3.1 Avaliação da morfologia pós-operatória das células do endotélio corneano de coelhos na região periférica perincisional comparativamente à região central

Post-operative evaluation of the morphology of corneal endothelial cells of rabbits in the peripheral perincisional area, in comparison to the central area

Hünning Paula S¹, Albuquerque Luciane de¹, Cavalcanti, Ruben¹, Almeida Ana Carolina VR¹, Pigatto João AT¹.

Abstract

Purpose: To evaluate the corneal endothelial morphology in rabbits, comparing the peripheral perincisional and central areas in different post-operatives periods through scanning electron microscopy.

Setting: Hospital of Veterinary Clinics of the College of Veterinary, Federal University of Rio Grande of Sul, Brazil.

Design: Experimental study.

Methods: Three groups containing 5 animals each were designed for post-operative evaluation: G1 (7 days); G2 (15 days) and G3 (45 days). The clear cornea of thirty New Zealand rabbits was subjected to a single-planned incision of 3.2 mm. At the end of the established periods, a morphological evaluation of the endothelium was carried out using scanning electron microscopy. Six scanning electron micrographs were taken from each corneal area, with a magnification of 1000 x. One hundred endothelial cells were analyzed to obtain the cell side count percentage.

Results: In the perincisional peripheral area, which was evaluated at the 7 post-operative day, 6-sided (47.8%), 5-sided (31.3%) and 7-sided (13.9%) cells were found, in addition to, 3-sided cells (0.1%), 4-sided cells (4.9%), 8-sided cells (1.8%) and 9-sided cells (0.2%). In the evaluation made on the 15th post-operative day, 6-sided (45.6%), 5-sided (32.6%) and 7-sided (17.4%) cells were observed, as well as 4-sided (1.7%) and 8-sided cells (2.7%).

On the 45th post-operative day, the presence of 6-sided (57%), 5-sided (24%), 7-sided (17.2%), 4-sided (0,1%), 8-sided (1.6%) and 9-sided cells (0.1%) was verified. On the 7th post-operative day, 6-sided (75.6%), 5-sided (13.3%), 7-sided (10.8%) and 8-sided cells (0.3%) were observed in the central area. Upon evaluation made on the 15th post-operative day, it was possible to observe 6-sided (78.9%), 5-sided (11.5%) and 7-sided (9.6%) cells. Upon evaluation made on the 45th post-operative day, it was possible to identify 6-sided (74.8%), 5-sided (13.6%) and 7-sided (11.6%) cells. The areas studied were statistically compared ($P < 0.05$).

Conclusion: In comparison to the central area, there was a morphological alteration of the endothelial cells of the peripheral perincisional area in different post-operative periods of the cornea rabbits.

Introdução

Com as modernas técnicas de facoemulsificação, a incisão em córnea clara teve preferência sobre a limbal, escleral e corneoescleral, pois oferece diversas vantagens como uma rápida recuperação visual no pós-operatório, menor astigmatismo, ausência de hemorragia e menor cicatriz. Além disso, permite adequado implante de lente intraocular e selamento da câmara anterior.^{1,2}

A facoemulsificação é a técnica de eleição para remoção de catarata em humanos e em animais.^{1,4} No entanto, podem ocorrer descompensação endotelial e perda da transparência corneana.⁵⁻⁸ Assim, alterações endoteliais são consideradas importantes parâmetros no trauma cirúrgico e são essenciais para a segurança da técnica cirúrgica.⁶

Para a avaliação do endotélio da córnea, métodos de investigação são empregados comumente como a microscopia especular e a microscopia eletrônica de varredura. Esses métodos permitem avaliar dados morfométricos e morfológicos, os quais incluem a área celular média, a densidade endotelial, o polimegatismo expresso pelo coeficiente de variação e o pleomorfismo dado pelo percentual de células com seis lados. Os índices de pleomorfismo e de polimegatismo são importantes indicadores do estado funcional do endotélio corneano.⁹⁻¹²

A reparação corneana ocorre por hipertrofia e migração de células remanescentes para as margens da lesão em indivíduos da espécie humana e felina,^{13,14,15} observando-se alguma atividade mitótica.¹⁶⁻¹⁸ Diferentemente, nos coelhos, além da hipertrofia e da migração celular, ocorre significativa mitose celular.¹⁹⁻²¹

Atualmente, sabe-se que a cirurgia remoção da catarata leva a alterações na morfologia e morfometria endotelial pós-operatória.^{11,18,22,24} Córneas de coelhos têm sido utilizadas em pesquisa oftálmica para avaliar a incisão de córnea.^{2,3,23} No entanto estudos relacionados ao dano perincisional após incisão de córnea não foram encontrados na literatura. Objetiva-se comparar a morfologia pós-operatória das células do endotélio corneano, da região periférica perincisional comparativamente à região central, em coelhos, utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

Materiais e métodos

Foram estudados 30 bulbos dos olhos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, albinos, machos ou fêmeas, com 90 dias de idade, pesando entre 2 e 2,5 kg e hípidos.

Todos os animais foram submetidos ao exame oftálmico, que incluiu avaliação dos reflexos, teste da lágrima de Schirmer¹, biomicroscopia com lâmpada de fenda², tonometria de rebote³ e prova da fluoresceína⁴ para avaliar dano epitelial. Foram descartados animais com alterações oculares.

A pesquisa foi conduzida conforme as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS).

Para a avaliação da morfologia pós-operatória da córnea de coelhos foram designados três grupos com cinco animais cada. Os grupos foram denominados de G1, com avaliação aos 7 dias, G2 com avaliação aos 15 dias e G3 com avaliação aos 45 dias de pós-operatório

O procedimento cirúrgico foi realizado em ambos os bulbos dos olhos. Para tanto, os animais foram submetidos a jejum alimentar prévio de quatro horas e hídrico de duas horas.

A contenção dos animais foi feita com a administração da associação de midazolam (2 mg.kg⁻¹), meperidina (4 mg.kg⁻¹) e cetamina (20 mg.kg⁻¹), por via IM. Os animais foram pré-oxigenados, durante 5 minutos, e a complementação da indução anestésica foi realizada com máscara de isoflurano a 5 V%. Após intubação, o plano cirúrgico de

¹ Teste da lágrima de Schirmer strips, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

² Portable Slit lamp Kowa S115, Kowa Company, Ltd,

³ Tonovet, Tiolat, Helsinki, Finlândia.

⁴ Prova da Fluoresceína strips, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

anestesia foi mantido com isoflurano. Empregou-se sistema não-reinalatório de Baraka. Além disso, foi instilado anestésico de tetracaína a 1%.

Previamente ao procedimento cirúrgico, foi instilada uma gota de cloridrato de fenilefrina a 10%, em ambos os bulbos dos olhos. O procedimento operatório foi realizado com auxílio de um microscópio cirúrgico⁵, instrumental oftálmico adequado e por um mesmo cirurgião. A anti-sepsia foi realizada com polivinilpirrolidona, diluído em solução salina (1:100) e aplicação do campo cirúrgico estéril descartável e aderente sobre o bulbo do olho.

Após blefarostase, a incisão na córnea clara uniplanar foi realizada com um bisturi de lâmina metálica angular de 3,2 mm de largura⁶, na posição entre 11 e 12 horas (**Figuras 1**). As bordas da ferida cirúrgica foram aproximadas com ponto simples interrompido com fio náilon inabsorvível 8-0. Ao final do procedimento cirúrgico, administrou-se, por via subconjuntival, 0,1 ml de acetato de prednisolona a 1%; 0,1 ml de gentamicina a 4% e cetoprofeno na dosagem 2 mg.kg⁻¹ por via IM.

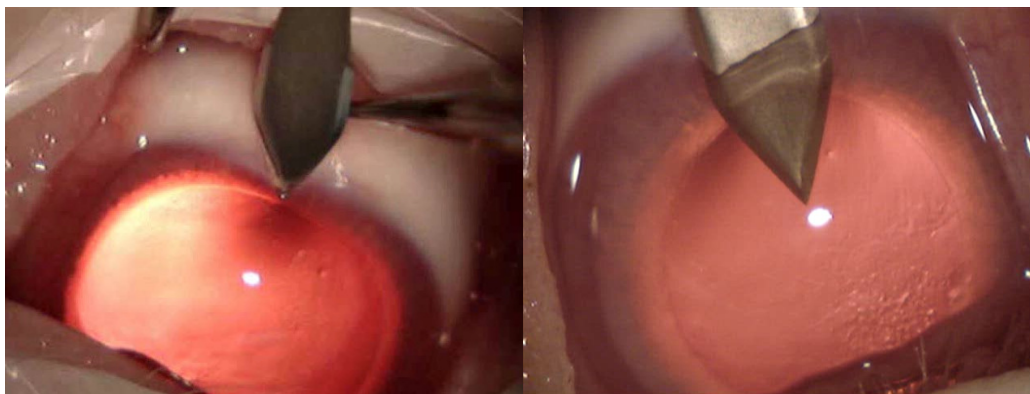


Figura 1 – Imagem das etapas de realização da incisão de córnea clara uniplanar com bisturi angular de 3.2 mm em coelhos.

No tratamento pós-operatório foram instilados colírios de tobramicina 0,3%, de dexametasona a 0,1% e de diclofenaco de sódio 0,1%, a cada 6 horas, em ambos os olhos, durante 15 dias; e cloridrato de fenilefrina a 10% colírio, a cada 12 horas, em ambos os olhos, no período de 7 dias. Utilizou-se colar elisabetano para evitar autotraumatismo.

Durante os períodos de pós-operatório, realizou-se exame oftálmico a intervalos de 24 horas até o sétimo dia, e posteriormente a cada 7 dias. Subjetivamente, avaliou-se

⁵ Modelo SM-2002 com microfocalização, OPTO, São Paulo.

⁶ Clear cutTM, Alcon Laboratories, Texas, EUA.

o prurido, a fotofobia, o blefarospasmo e o reflexo pupilar (RPL). Ainda, realizou-se tonometria de rebote³ e a prova da fluoresceína.

Ao término dos períodos pós-operatórios determinados, foi realizada a eutanásia dos animais. Primeiramente os coelhos foram anestesiados com cetamina, na dosagem de 60 mg/kg, e xilazina, na dosagem de 8 mg/kg, associadas na mesma seringa, por via IM. Após os animais adotarem decúbito esternal, realizou-se venóclise da veia auricular para a administração de tiopental sódico, na dosagem de 50 mg/kg, por via IV e posteriormente, cloreto de potássio por via IV, provocando a parada cardiorrespiratória.

Realizou-se fixação prévia das córneas, instilando-se 1 gota de glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,4, a cada minuto, durante 5 minutos. Em seguida, os bulbos dos olhos foram enucleados e as córneas foram excisadas em 360°, tomando-se a região límbica como referência, a uma distância de 2 a 3 mm em direção à esclera. As amostras foram mantidas na solução de glutaraldeído, a 2,5%, tamponado com cacodilato sódico e acondicionadas em frascos de vidro, com tampa de rosca, sendo fixadas pelo período mínimo de 36 horas.

O processamento e a análise do material foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As amostras foram seccionadas em 4 quadrantes, mantendo o local da incisão corneana em um fragmento, e definindo-se a região periférica perincisional e central da córnea (**Figura 2**). A seguir, realizou-se a lavagem das amostras em solução tampão de cacodilato, e desidratadas, em séries crescentes de álcool etílico (30, 50, 70, 85, 90, 95 e 100%), durante 15 minutos respectivamente, e três vezes, na concentração de 100%.

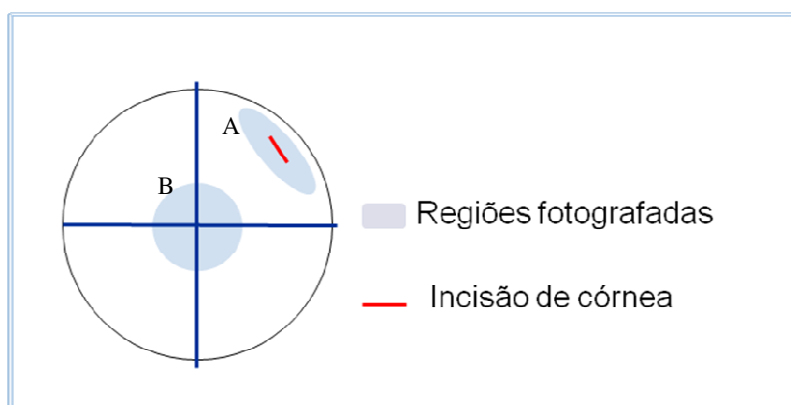


Figura 2 – Representação esquemática das regiões perincisional (A) e central (B) da córnea de coelhos.

Procedeu-se a secagem, em secador de ponto crítico⁷, utilizando dióxido de carbono líquido. Acondicionou-se o tecido em porta-espécime, com fita condutiva de carbono e metalizadas no metalizador⁸ com uma camada de ouro e paládio de 35 nm de espessura (**Figura 3**).

Para a avaliação da morfologia endotelial utilizou-se microscópio eletrônico de varredura⁹, operado com 15 kV. Realizaram-se seis eletromicrografias de varredura de forma aleatória e uniforme com aumento de 1000 vezes. Foram avaliadas 100 células endoteliais de cada região. Como parâmetro morfológico analisou-se o número de lados celulares.

Os dados sobre o número de lados celulares das regiões analisadas foram submetidos ao teste de Tukey para comparação das médias utilizando o aplicativo ASSISTAT 7.5 beta. Adotou-se para todas as análises o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

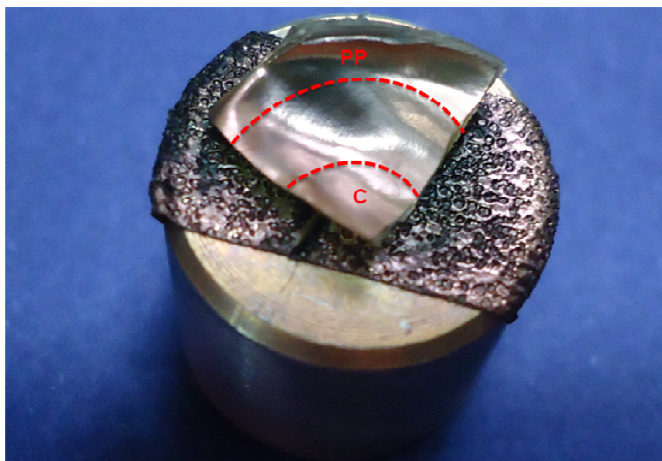


Figura 3 – Imagem do fragmento de córnea de coelho metalizado com ouro e paládio e acondicionado em porta espécime. Representação esquemática das regiões avaliadas por MEV: periférica perincisional (PP) e central (C).

Resultados

Na avaliação oftálmica todos os coelhos apresentaram RPL positivo, valores normais de pressão intra-ocular, prova da fluoresceína negativa e ausência de sinais de

⁷ Critical Point Dryer, Baltec, CPD 030

⁸ Sputer Coater, Baltec, SCD 050

⁹ Microscópio eletrônico de varredura-JSM 6060, JEOL, Tóquio, Japão.

desconforto ocular.

Nas eletromicrografias de varredura da região periférica perincisional foram encontradas, aos 7 dias de pós-operatório, células com 6 lados (47,8%), 5 lados (31,3%), 7 lados (13,9%), 3 lados (0,1%), 4 lados (4,9%), 8 lados (1,8%) e 9 lados (0,2%) (**Figura 4**). No período pós-operatório de 15 dias foram verificadas células com 6 lados (45,6%), 5 lados (32,6%), 7 lados (17,4%), 4 lados (1,7%) e 8 lados (2,7%) (**Figura 6**). Na avaliação após 45 dias de pós-operatório foram observadas de células com 6 lados (57%), 5 lados (24%), 7 lados (17,2%), 4 lados (0,1%), 8 lados (1,6%) e 9 lados (0,1%) (**Figura 8**).

Comparativamente, na região central, as eletromicrografias de varredura do período pós-operatória de 7 dias demonstraram células de 6 lados (75,6%), 5 lados (13,3%), 7 lados (10,8%) e 8 lados (0,3%) (**Figura 5**). Aos 15 dias de pós-operatório foram verificadas células com 6 lados (78,9%), 5 lados (11,5%) e 7 lados (9,6%) (**Figura 7**). Na avaliação após 45 dias de pós-operatório foram observadas células com 6 lados (74,8%), 5 lados (13,6%) e 7 lados (11,6%) (**Figura 9**).

A região periférica perincisional comparada à região central apresentou menor percentual de células hexagonais (**Gráfico 1**).

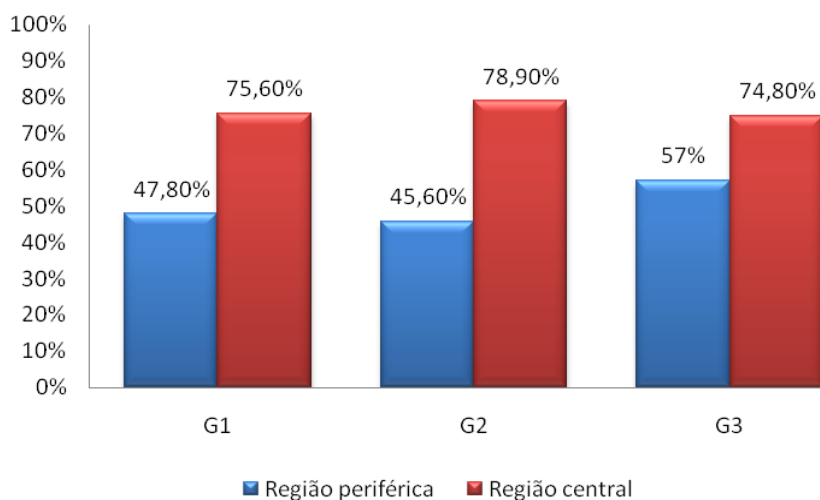


Gráfico 1- Representação gráfica do percentual de células endoteliais com seis lados das regiões periférica perincisional e central de coelhos submetidos à incisão de córnea, correspondente aos períodos pós-operatórios de 7 dias (G1), 15 dias (G2) e 45 dias (G3).

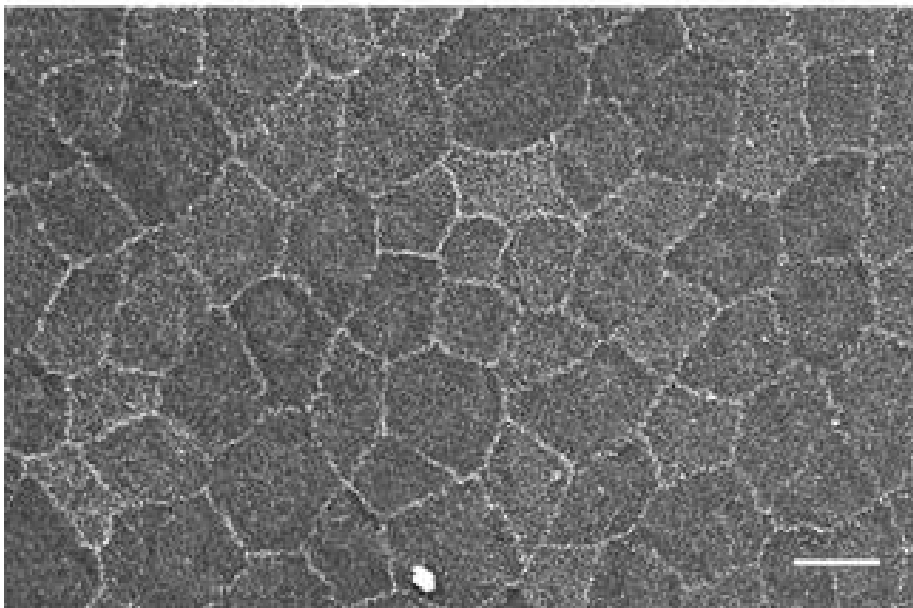


Figura 4 - Eletromicrografia de varredura da região periférica perincisional do endotélio corneano de coelhos submetidos à incisão de córnea aos 7 dias de pós-operatório. Observou-se hexagonalidade de 47,8%. Aumento original 1000X; Barra = 10 μ m.

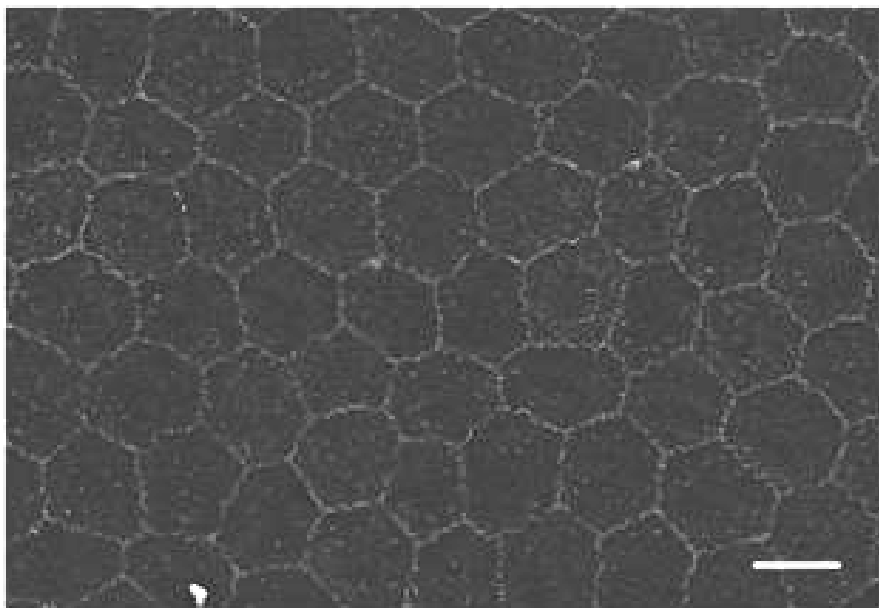


Figura 5 - Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio corneano de coelhos submetidos à incisão de córnea aos 7 dias de pós-operatório. Observou-se hexagonalidade de 75,6%. Aumento original 1000X; Barra = 10 μ m.

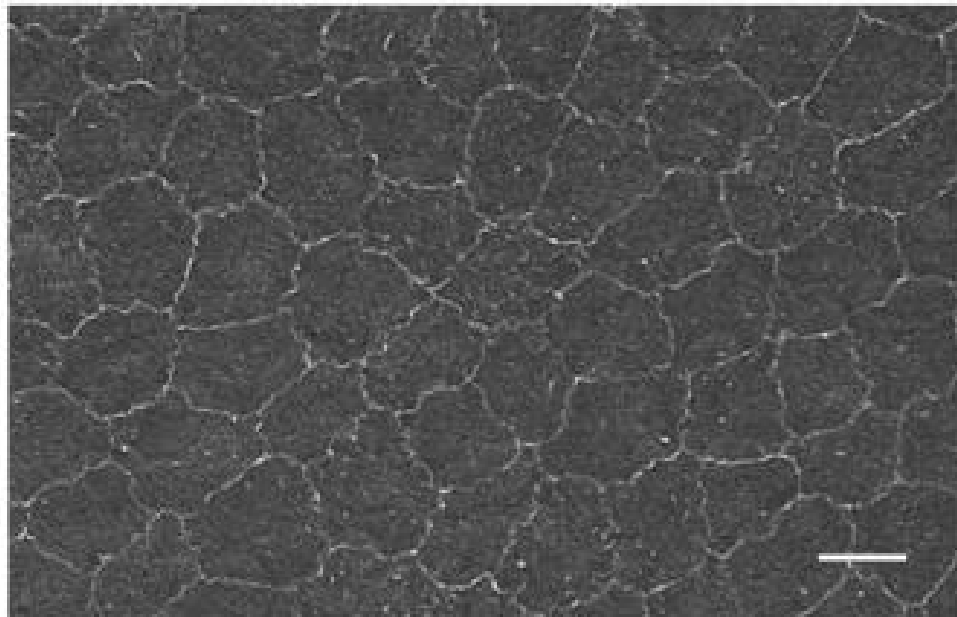


Figura 6 - Eletromicrografia de varredura da região periférica perincisional do endotélio corneano de coelhos submetidos à incisão de córnea aos 15 dias de pós-operatório. Observou-se hexagonalidade de 45,6%. Aumento original 1000X; Barra = 10 μ m.

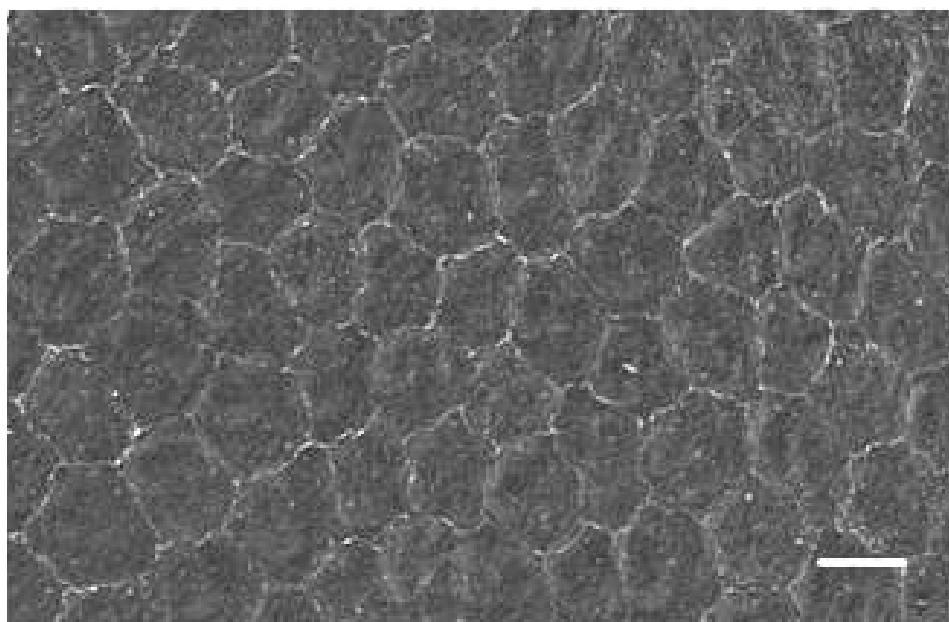


Figura 7 - Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio corneano de coelhos submetidos à incisão de córnea aos 15 dias de pós-operatório. Observou-se hexagonalidade de 78,9%. Aumento original 1000X; Barra = 10 μ m.

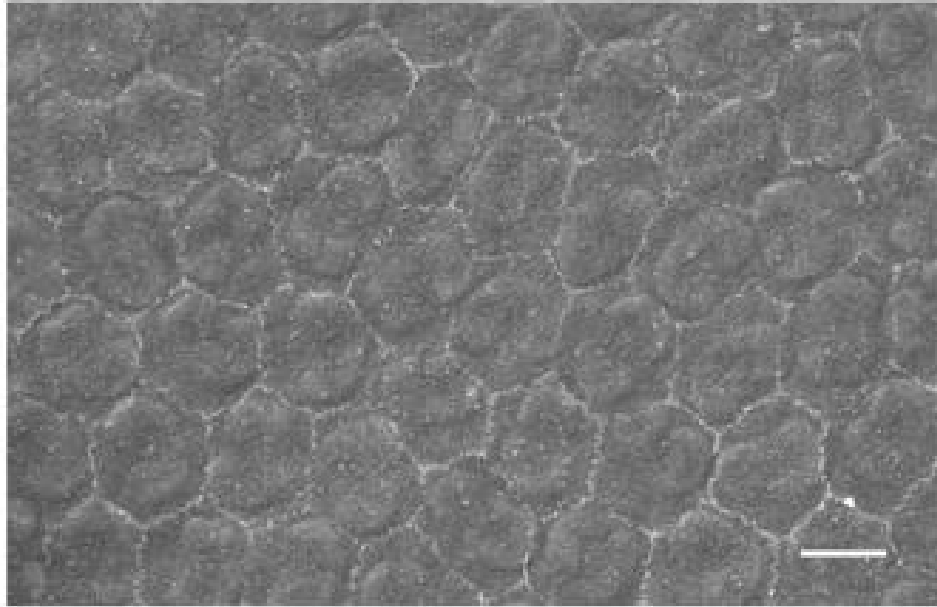


Figura 8 - Eletromicrografia de varredura da região periférica perincisional do endotélio corneano de coelhos submetidos à incisão de córnea aos 45 dias de pós-operatório. Observou-se hexagonalidade de 57%. Aumento original 1000X; Barra = 10 μ m.

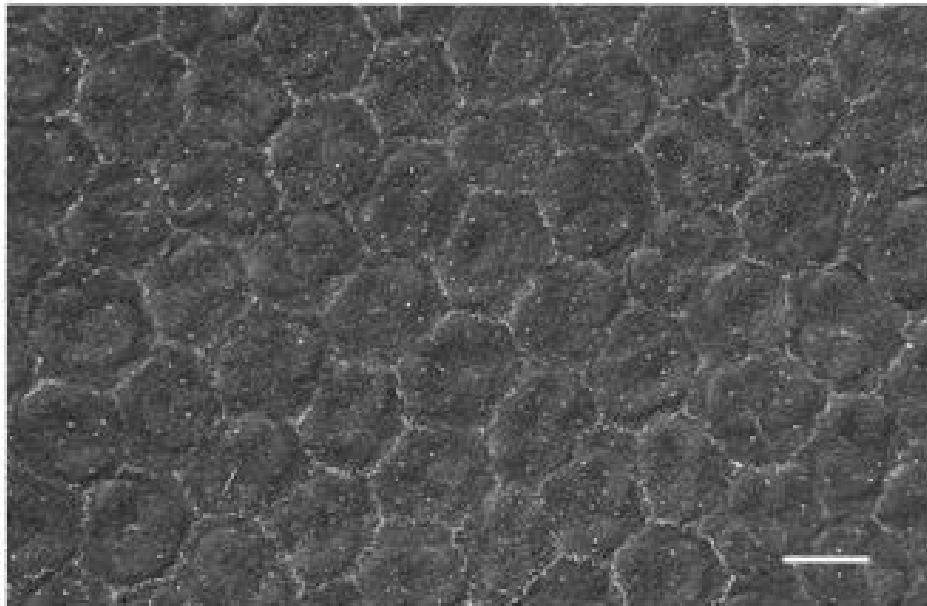


Figura 9 - Eletromicrografia de varredura da região central do endotélio corneano de coelhos submetidos à incisão de córnea aos 45 dias de pós-operatório. Observou-se hexagonalidade de 74,8%. Aumento original 1000X; Barra = 10 μ m.

Estatisticamente, as regiões periférica perincisional e central da córnea de coelhos são significativamente diferentes ($P < 0,05$) (**Tabela 1**).

Tabela 1- Número de lados das células endoteliais, expresso em percentual, das regiões periférica perincisional e central de coelhos, submetidos à incisão de córnea, correspondentes aos períodos pós-operatórios de 7 dias (G1), 15 dias (G2) e 45 dias (G3).

Grupos	Número de lados	Região Central (%)	Região Periférica (%)
G1	5	13,3d	31,3c
	6	75,6a	47,8b
	7	10,8e	13,9d
G2	5	11,5e	32,6c
	6	78,9a	45,6b
	7	9,6e	17,4d
G3	5	13,6e	23,2c
	6	74,8a	57,0b
	7	11,6c	17,2b

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Entre os grupos pós-operatórios da região periférica perincisionais ocorreu uma diminuição das células hexagonais aos sete dias, se comparado ao período de 45 dias, bem como maior presença de células com cinco e sete lados, e uma minoria de células com três, quatro, oito e nove lados. Diferentemente, a região central apresentou percentual maior de células hexagonais e em menor proporção células com cinco e sete lados.

Discussão e conclusão

Estudos demonstram que as análises da forma e do tamanho celular são melhores indicativos da função e da integridade endotelial do que somente a densidade endotelial,^{9,23} em vista disso, dá-se a importância deste estudo. Diante da perda

endotelial provocada pela cirurgia de catarata em humanos e animais deve-se levar em consideração esta alteração morfológica, bem como a insignificante presença de mitose na espécie humana.^{18,23,25-27}

A reparação do endotélio de coelhos ocorre por hipertrofia, migração e mitose celular.^{13, 21,28} Este processo ocorre próximo ao local da lesão, dessa forma alterando os padrões morfológicos na tentativa de restabelecer a regularidade e a função da camada endotelial.^{19,28}

Neste estudo, observou-se que o endotélio corneano de coelhos, em diferentes períodos pós-operatórios, apresentou variação no número de lados das células endoteliais da córnea. Nas eletromicrografias de varredura da região periférica perincisional, avaliadas ao 7º dia de pós-operatório, ocorreu uma menor presença de células hexagonais, ou seja, maior pleomorfismo. Ao 15º dia, observou-se uma estabilização das células e, ao 45º dia, verificou-se início da reorganização das células, apresentando maior hexagonalidade e diminuição das células com 3, 4, 8 e 9 lados. Entretanto, na região central estudada, observaram-se 74,8 a 78,9% de células com seis lados. Estes valores foram semelhantes aos obtidos em córneas normais de diferentes espécies animais.

Pigatto et al.²⁹ em estudo com coelhos normais, visibilizaram por meio da microscopia eletrônica de varredura, células hexagonais (75%), células pentagonais (14%) e heptagonais (11%). Corroborando, Matsuda et al.²⁰ observaram-se pela microscopia especular hexagonalidade de 73%.

Em indivíduos da espécie humana, o percentual de células hexagonais apresenta-se em torno de 70%,^{23,30} enquanto que, pela microscopia especular, observou-se em humanos e primatas hexagonalidade de 77 ± 7 e $76,6\pm 6$, respectivamente³¹. Ainda, em espécie de limitada capacidade mitótica, como os felinos, encontrou-se hexagonalidade de $80\pm 8,5\%$ utilizando a microscopia especular,^{32,33} diferentemente Franzen et al.³⁴ relataram média de 66% em indivíduos adultos.

Em caninos observaram-se células com seis lados (68%), cinco lados (17%), sete lados (11%), quatro lados (2%) e oito lados (2%).¹² Além destes mamíferos, os bovinos adultos apresentam $73,3\pm 4,7\%$ de células com seis lados.³⁵

Estudo com répteis, também demonstrou valores semelhantes aos mamíferos. Dessa forma, identificou-se por meio da microscopia eletrônica de varredura presença de células hexagonais (78%), com células de 4 lados (2%), de cinco lados (13,2%), de sete lados (5,8%) e oito lados (1%).³¹

O endotélio das aves, também foi estudado por meio da microscopia eletrônica de varredura, sendo similar aos mamíferos e répteis. Nestes estudos, o avestruz apresentou células hexagonais (75%), pentagonais (14%) e heptagonais (11%) e, em pingüins, observaram-se células hexagonais (80%), pentagonais (14,2%) e heptagonais (5,8%).^{37,38} Em peixes foi proposto que o endotélio tem padrão irregular com predominância de células hexagonais e pentagonais.³⁹

Os dados são similares entre as espécies com aproximadamente 65 a 80% de hexagonalidade, não ocorrendo diferença entre as regiões central e periférica da córnea e entre um olho e seu contra-lateral.^{29-32,40} Assim, neste experimento, pode-se comparar as regiões periférica perincisional e central, mantendo a região central como padrão regular do mosaico endotelial. Entretanto, comparativamente à região periférica perincisional observou-se maior pleomorfismo.

A microscopia especular realizada em córneas de coelhos, 7 dias após trauma endotelial, demonstrou redução na hexagonalidade (<60%) e aumento das células pentagonais de 12% para 33%.³¹ Estes achados correspondem aos resultados obtidos na avaliação pós-operatória da região periférica perincisional ao 7º dia, demonstrando decréscimo das células hexagonais e aumento das células pentagonais de 13,3% para 31,3%, se comparada à região central. Concomitantemente, comparando os períodos pós-operatórios de 15 e 45 dias da região periférica perincisional, observou-se redução do pleomorfismo com diminuição das células pentagonais e heptagonais com o passar do tempo. Contudo, verificou-se padrão endotelial mais desigual e menos regular do que o normal. Igualmente foi verificado por Olsen & Davanger,¹⁹ em estudo com coelhos, avaliando o endotélio a partir da microscopia eletrônica de varredura.

ILMONEN et al.⁴¹ conduziram experimento provocando trauma penetrante em cobaias e verificaram por meio da MEV, que uma pequena perfuração corneana provocada por uma agulha com 0,4 mm de diâmetro altera o padrão regular do mosaico endotelial próximo a lesão. As células perderam o formato hexagonal, mantendo a irregularidade aos 14 dias de pós-operatório. Similaridade ocorreu neste estudo com manutenção da irregularidade do padrão endotelial ao fim dos períodos pós-operatórios avaliados. Nesta espécie de roedores não foi visualizado figuras mitóticas e o recobrimento completo da lesão ocorreu por migração das células endoteliais aos 7 dias de pós-operatório.⁴¹

A reparação endotelial difere entre as espécies de animais e este processo depende do tipo e tamanho do trauma.^{42,43} Em coelhos a reparação dá-se também pela mitose, porém ao 45º dia de pós-operatório ocorreu diminuição das células hexagonais comparada

à região central. Além disso, a incisão de 3,2 mm provocada na córnea de coelhos não foi totalmente recoberta por células endoteliais. Em contrapartida, nos coelhos as lesões por congelamento não perfurantes com diâmetros de 4 mm, mostraram recobrimento da lesão em 3 dias de pós-operatório e restabelecimento do padrão hexagonal em 21 dias por meio da MEV.¹⁹

Embora a literatura cite somente a presença no endotélio de células com seis, cinco, quatro, sete e oito lados,^{18,29,44,45} foram visibilizadas células com três e nove lados.

As técnicas de remoção da catarata despertaram a realização de inúmeros estudos por pesquisadores, avaliando a perda e a variação da morfologia endotelial.^{22-24,34} A facoemulsificação permite a realização de uma incisão de 3,2 mm na córnea, tornando rápida a cicatrização com pequena cicatriz.^{1,2,46} Estudos por meio da microscopia especular avaliando a córnea por regiões (superior, central e periférica) demonstram maior perda celular, pleomorfismo e polimegatismo na região superior onde se realiza a incisão. Isso se deve a maior manipulação do material cirúrgico e contato dos fragmentos lenticulares em cirurgias intra e extra-capsulares.^{22-24,34} Porém, dados sobre a morfologia periférica perincisional pós-operatória ainda não havia sido avaliados por meio da microscopia eletrônica de varredura.

Entre os métodos para a avaliação da morfologia e morfometria endotelial encontram-se a microscopia especular e a microscopia eletrônica de varredura. A microscopia especular faz parte da semiologia endotelial *in vivo* e *ex vivo*, tendo como vantagens a simplicidade operacional, procedimento não invasivo e ausência de artefatos de preparação. Como desvantagem inclui-se o alto custo do equipamento e dificuldades de imagens nítidas em áreas com edema de córnea.^{10,11}

Como alternativa existem técnicas de estudo *in vitro*, como a microscopia eletrônica de varredura, utilizada em estudos relacionados à toxicidade de fármacos intracamerulares, à eficácia de meios de preservação da córnea e das superfícies de estruturas, como o epitélio e na avaliação do endotélio da córnea de diferentes espécies.^{18,29,37-39,48,49}

Citam-se como desvantagens da microscopia eletrônica de varredura o grau variável de retração celular e a necessidade de treinamento prévio do pesquisador diante da complexidade de conservação e preparo das amostras, as quais podem gerar resultados sem significância para outros estudos.^{50,51} Desse modo, neste estudo não analisou-se dados referentes à densidade endotelial e área celular do endotélio da córnea

de coelhos.

A preparação da córnea para a microscopia eletrônica de varredura provoca retração média da amostra de 29,7% (3,6 a 49,15%), conseqüentemente a avaliação do endotélio corneano revelará maior variação na densidade e no tamanho celular.⁵⁰ Desse modo, os resultados morfométricos não podem ser comparados entre a microscopia especular e a eletrônica de varredura. No entanto, dados relacionados ao pleomorfismo são confiáveis, pois não ocorre modificação na forma da célula, podendo ser relacionados com a microscopia eletrônica de varredura.⁵²

A visibilização de cílios, nas amostras micrografadas, indica o adequado processamento da amostra.⁵³ O treinamento prévio e conhecimento da técnica de preparação da amostra permitiram tais resultados. Observou-se ainda presença de microvilosidades, interdigitações e aberturas das vesículas pinocíticas na superfície endotelial, corroborando com os descritos na literatura.²⁹

De acordo com as condições experimentais propostas para este estudo, concluiu-se que houve diferença na morfologia das células endoteliais da região periférica perincisional comparada à região central da córnea de coelhos submetidos à incisão de córnea.

Referências

1. WAISWOL M. Técnicas cirúrgicas - Incisões In: FREITAS LL. Cristalino e Catarata: Diagnóstico e Tratamento. São Paulo, Santos, 2004, 83-85
2. McDONNELL PJ, TABAN M, SARAYBA M et al. Dynamic morphology of clear corneal cataract incisions. *Ophthalmol* 2003; 110:2342-2348
3. RAO B, ZHANG J, TABAN M et al. Imaging and investigating the effects of incision angle of clear corneal cataract surgery with optical coherence tomography. *Opt Express* 2003; 11:3254-3261
4. PIGATTO JAT, PEREIRA FQ, ALMEIDA ACVR, et al. Avanços e benefícios da facoemulsificação. *Acta Sci Vet* 2007; 35:248-249
5. WARING GO, BOURNE WM, EDELHAUSER HF, et al. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmol* 1982; 89:531-590

6. TUFT SJ, COSTER DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4:389-424
7. SANCTIS U, MACHETTA F, RAZZANO L, et al. Corneal endothelial evaluation with 2 noncontact specular microscopes and their semiautomated methods of analysis. *Cornea* 2006; 25:501-506
8. ALMEIDA ACRV. Avaliação clínica e pela microscopia eletrônica de varredura do adesivo de fibrina, comparativamente ao fio de sutura na oclusão da incisão de córnea: estudo experimental. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009
9. DOUGHTY MJ, DILTS MD. Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer-application to corneal endothelium. *Tissue Cell* 1994; 26:621-636
10. ABIB FC. Microscopia especular de córnea: manual e atlas. Rio de Janeiro, Rio Med. Livros, 2000
11. McCAREY BE, EDELHAUSER HF, LYNN M. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive produces, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea* 2008; 27:1-16
12. PIGATTO JAT, CERVA C, FREIRE C, et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesq Vet Bras* 2008; 28:427-430
13. HOFFER KJ. Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. *Am J Ophthalmol* 1979; 87:252-253
14. TREFFERS WF. Human corneal endothelial wound repair. In vitro and in vivo. *Ophthalmol* 1982; 6:605-615
15. LAING RA, NEUBAURER L, LEIBOWITZ HM, et al. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:1712-1715
16. BAHN CF, GLASSMAN RM, MacCALLUM DK, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27:44-51
17. LANDSHMAN N, SOLOMON A, BELKIN M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. *Arch Ophthalmol* 1989; 107:1804-1808
18. PIGATTO JAT. Extração extracapsular do cristalino, comparativamente à facoemulsificação, com enfoque nas repercussões endoteliais corneanas em cães (*Canis familiaris* - Linnaeus, 1758). 2004, 112 f. Tese (Doutorado em Medicina

- Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004
19. OLSEN EG, DAVANGER M. The healing of rabbit corneal endothelium. *Acta Ophthalmol* 1984; 62:796-807
 20. MATSUDA M, SAWA M, EDELHAUSER HF, et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26:443-449
 21. ICHIJIMA H, PETROLL WM, JESTER JV, et al. In vivo confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit cornea. *Cornea* 1993; 12:369-378
 22. GLASSER DB, MATSUDA M, GAGER WE, et al. Corneal endothelial morphology after anterior chamber lens implantation. *Arch Ophthalmol* 1985; 103:1347-1349
 23. SCHULTZ RO, GLASSER DB, MATSUDA M, et al. Response of the corneal endothelium to cataract surgery. *Arch of Ophthalmol* 1986; 104:1164-1169
 24. SUZUKI HE, TAKAHASHI K, SHIWA T, et al. Functional evaluation of corneal endothelium by measurement of corneal volume alteration and cell density after phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:2077-2082
 25. MENCUCCI R, AMBROSINI S, PONCHIETTI C, et al. Ultrasound thermal damage to rabbit corneas after stimulated phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31:2180-2186
 26. BOURNE WM, NELSON LR, BULLER CR, et al. Long-term observation on morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:891-899
 27. DIAZ-VALLE D, BENÍTEZ JM, CASTILLO A, et al. Endothelial damage with cataract surgery techniques. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24:951-955
 28. SVEDBERGH B, BILL, A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmol* 1972; 50:321-336
 29. PIGATTO JAT, ABIB FC, PIZZETI JC, et al. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci Vet* 2005a; 33:41-45
 30. YEE RW, MATSUDA M, SCHULTZ RO, et al. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985b; 4:671-678
 31. JACKSON AJ, GARDINER T, ARCHER DB. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. *Ophthalmic Physiol Opt*

- 1995; 15:305-310
32. HUANG PT, NELSON LR, BOURNE WM. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:1794-1801
 33. BOURNE W, NELSON BA, HODGE MS, Continued endothelial cell loss ten years after lens implantation. *Ophthalmol* 1994; 101:1014-1023
 34. FRANZEN A, PIGATTO JA, ABIB FC, et al. Use of microscope specular to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cats. *Vet Ophthalmol* 2010; 13:222-226
 35. DOUGHTY MJ, SPITERI M, DILTS DM. Determination of the unit size of the corneal endothelial cell mosaic form Fourier component image analysis. *Tissue Cell* 1997; 29:229-238
 36. PIGATTO JA, ANDRADE MC, LAUS JL, et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Vet Ophthalmol* 2004; 7:205-208
 37. PIGATTO JAT, LAUS JL, SANTOS JM, et al. Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Zoo Wildl Med* 2005b; 36:702-705
 38. PIGATTO JAT FRANZEN AA, PEREIRA FQ, et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciênc Rural* 2009; 39:926-929
 39. COLLIN SP, COLLIN HB. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. *Cornea* 2000; 19:218-230
 40. YEE RW, GEROSKI DH, MATSUDA M, et al. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function and morphology in wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985a; 46:1191-1201
 41. ILMONEN M, LEHTOSALO JI, VIRTANEN J, et al. Initial healing of the posterior corneal surface following perforation trauma in guinea pig: a scanning electron microscope study. *Acta Ophthalmol* 1984; 62:787-795
 42. Van HORN DL, SENDELE DD, SEIDEMAN S, et al. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:597-613
 43. BEFANIS PJ, PEIFFER RL, BROWN D. Endothelial repair of the canine cornea. *Am J Vet Res* 1981; 42:590-595
 44. DOUGHTY MJ. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: A review of techniques and their application. *Optom Vis Sci* 1989; 66:626-642

45. PIGATTO, JAT, ABIB FC, PEREIRA GT, et al. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2006; 43:476-480
46. FADEL P. Técnicas cirúrgicas - Incisões In: FREITAS LL. *Cristalino e Catarata: Diagnóstico e Tratamento*. São Paulo, Santos, 2004; 85-88
47. LIOU SW, CHIU MD, WANG IJ. Effect of intracameral injection of lidocaine and cabachol on the rabbit corneal endothelium. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30:1351-1356
48. ARNDT C, REESE S, KOSTLIN R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. *Vet Ophthalmol* 2001; 4:175-182
49. TAMAYO-ARANGO LJ, HAILÚ L, ARTONI B, et al. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciênc Rural* 2009; 39:117-122
50. SCHUTTEN WH, Van HORN DL. Corneal endothelial cell shrinkage after critical point drying. *Annals of Ophthalmol* 1980; 12:1165-1167
51. DOUGHTY MJ, BERGMANSON JP, BLOCKER Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. *Tissue Cell* 1997; 29:533-547
52. VIRTANEN J, UUSITALO H, PALKAMA A, et al. The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and morphology in scanning electron microscopy. *Acta Ophthalmol* 1984; 62:577-585
53. COLLIN SP, COLLIN HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clin Exp Optom* 1998; 81:245-254

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A microscopia eletrônica de varredura permitiu a análise da morfologia pós-operatória do endotélio corneano da região periférica perincisional, comparativamente à região central.
- O modelo experimental adotado nesta investigação poderá, também, ser utilizado para outros estudos relacionados a morfologia das células endoteliais da córnea de coelhos após cirurgia de catarata.

REFERÊNCIAS

- AABERG, T.M. Correlation between corneal endothelial morphology and function. **American Journal of Ophthalmology**, v.98, n.4, p.510-512, 1984.
- ABIB, F.C. In: **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000, p.140.
- ABIB, F.C.; BARRETO, J.R. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.27, p.1574-78, 2001.
- ALMEIDA, A.C.R.V. **Avaliação clínica e pela microscopia eletrônica de varredura do adesivo de fibrina, comparativamente ao fio de sutura na oclusão da incisão de córnea: estudo experimental**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- ALP, B.N. et al. The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. **Cornea**, v.19, n.4, p.546-550, 2000.
- ANDREW et al. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.4, p.479-482, 2001.
- ARNDT, C.; REESE, S. & KOSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary Ophthalmology**, v.4, n.3, p.175-182, 2001.
- BAHN, C.F. et al. Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.27, p.44-51, 1986.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.
- BAROODY, R.A. et al. Ocular development and aging. Corneal endothelial changes in cats and in free-racing and caged rhesus. **Experimental Eye Research**, v.45, n.4, p.607-622, 1987.
- BEFANIS, P.J.; PEIFFER, R.L. & BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.4, p.590-595, 1981.
- BINDER, P.S.; AKERS, P. & ZAVALA, E.Y. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. **Ophthalmology**, v.86, n.10, p.1831-1847, 1979.
- BOTEON, J.E. Histologia do Endotélio Corneano. In: ABIB, F.C. **Microscopia Especular de Córnea: Manual e Atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000. cap.1, p.3-5.

BOURNE, W.H. & KAUFMAN, H.E. Endothelial damage associated with intraocular lens. **American Journal of Ophthalmology**, v.81, p.482-485, 1976.

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

BOURNE, W.; NELSON, B.A. & HODGE, M.S. Continued endothelial cell loss ten years after lens implantation. **Ophthalmology**, v.101, n.6, p.1014-1023, 1994.

BOURNE et al. Effect of cataract surgery on the corneal endothelium. Modern phacoemulsification compared with extracapsular cataract surgery. **Ophthalmology**, v.11, n.4, p.679-685, 2004.

BROOKS, A.M.V. Progressive corneal endothelial cell changes in anterior segment disease. **Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology**, v.15, p.71-78, 1987.

CANAVAGH, H.D. et al. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. **Cornea**, v.19, n.5, p.712-722, 2000.

CHENG, H. et al. Precision of cell density estimates and endothelial cell loss with age. **Archives of Ophthalmology**, v.103, p.1478-1482, 1985.

COLLIN, S.P. & COLLIN, H.B. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. **Cornea**, v.19, n.2, p.218-230, 2000.

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

DIAZ-VALLE, D. et al. Endothelial damage with cataract surgery techniques. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.24, p.951-955, 1998.

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

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

DOUGHTY M.J. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy-a comparison of two different methods of corneal fixation. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.2, p.127-135, 2006.

DOUGHTY, M.J.; BERGMANSON, J.P.& BLOCKER, Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. **Tissue and Cell**, v.29, n.5, p.533-547, 1997.

DOUGHTY, M.J. & DILTS, M.D. Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer-application to corneal endothelium. **Tissue and Cell**, v.26, p.621-636, 1994.

DOUGHTY, M.J.; SPITERI, M. & DILTS, D.M. Determination of the unit size of the corneal endothelial cell mosaic form Fourier component image analysis. **Tissue and Cell**, v.29, n.2, p.229-238, 1997.

EDELHAUSER, H.F. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery, **Cornea**, v.19, n.3, p.263-273, 2000.

ELKADY, B.; PIÑERO, D. & ALIÓ, J.L. Corneal incision quality: microincision cataract surgery versus microcoaxial phacoemulsification. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v.35, n.3, p.466-474, 2009.

FADEL, P. Técnicas cirúrgicas - Incisões In: FREITAS, L.L. **Cristalino e Catarata: Diagnóstico e Tratamento**. 1.Ed. São Paulo: Santos, 2004. cap. 9, p.85-88.

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

GALLAGHER, B.C. Primary cilia of the corneal endothelium. **The American Journal of Anatomy**, v.159, n.4, p.475-484, 1980.

GILGER, B.C. Phacoemulsification. Technology and fundamentals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.27, n.5, p.1131-1134, 1997.

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

GWIN, R.M. et al. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.22, n.2, p.267-271, 1982.

HIRSCH, M. et al. Formation of intercellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v.23, n.4, p.385-397, 1976.

HOFFER, K.J. Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. **American Journal of Ophthalmology**, v.87, n.2, p.252-253, 1979.

HOFFMANN, A. et al. Light electron microscopic evaluation of canine corneal endothelium following CO₂ photokeratotomy, **Veterinary Ophthalmology**, v.12 (Supl 1), p.28-34, 2009.

HOLLEY, G.P. et al. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability. An in vitro study. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.28, n.6, p.1027-1033, 2002.

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

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

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

INABA, M. et al. Regional specular microscopy of endothelial cell loss after intracapsular cataract extraction: a preliminary report. **Acta Ophthalmologica**, v.63, p.232-235, 1985.

INOMATA, H. & SMELSER, G.K. Fine structural alterations of corneal endothelium during experimental uveitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.9, n.4, p.272-285, 1969.

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

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

JOHNSTON, M.C. et al. Origins of avian ocular and periocular tissues. **Experimental Eye Research**, v.29, n.1, p.27-43, 1979.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

LAING, R.A. et al. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. **Archives of Ophthalmology**, v.101, n.11, p.1712-1715, 1983.

LANDSHMAN, N. et al. Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.29, p.1100-1109, 1988.

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

LAULE A. et al. Endothelial cell population changes of human cornea during life. **Archives of Ophthalmology**, v.96, n.11, p.2031-2035, 1978.

LICHTINGER, M.D. et al. Corneal endothelial safety after ultraviolet light treatment of the light-adjustable intra-ocular lens. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.37, p.324-327.2011.

LIU, S.W.; CHIU, M.D. & WANG, I.J. Effect of intracameral injection of lidocaine

and cabachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.30, p.1351-1356, 2004.

MacCALLUM, D.K. et al. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.24, p.247-250, 1983.

MATSUDA, M. et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.26, n.4, p.443-449, 1985.

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

McDONNELL, P.J. et al. Dynamic morphology of clear corneal cataract incisions. **Ophthalmology**, v.110, p.2342-2348, 2003.

MENCUCCI, R. et al. Ultrasound thermal damage to rabbit corneas after stimulated phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.31, p.2180-2186, 2005.

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

NAGAKI, Y et al., Bacterial endophthalmitis after small-incision cataract surgery. Effect of incision placement and intraocular lens type. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.29, p.20-26, 2003.

NASSARALLA, B.A. Fisiologia do endotélio corneano. In: ABIB, F.C. **Microscopia Especular de Córnea: Manual e Atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000. cap.2, p.7-17.

KECOVÁ, H. & NECAS, A. Review Article. Phacoemulsification and intraocular lens implantation: Recent trends in cataract surgery. **Acta Veterinaria Brno**, n.73, p.85-92, 2004.

OJEDA, J.L. et al. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. **Journal of Anatomy**, v.199, n.5, p.567-576, 2001.

OLSEN, E.G. & DAVANGER, M. The healing of rabbit corneal endothelium. **Acta Ophthalmologica (Copenh)**, v.62, n.5, p.796-807, 1984.

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

PIGATTO, J.A.T. et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary**

Ophthalmology, v.7, n.3, p.205-208, 2004.

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

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

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

PIGATTO, J.A.T. et al. Avanços e benefícios da facoemulsificação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl 2), p.248-249, 2007.

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

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

PRINCE, J.H. Cornea Trabecular Region, and Sclera. In: PRINCE, J.H. **The Rabbit in Eye Research**, Cap 6. Ed Charles C Thomas, Publisher, Illinois USA. p.86-139, 1964.

PRIYA, T.M.; SARADA, D. & NIHAL, T. Endothelial cell loss and central corneal thickness in patients with and without Diabetes after manual small incision cataract surgery **Cornea**, v.0, n.0, p.1-5, 2010.

RAVALICO, G., BOTTERI, E. & BACCARA, F. Long-term endothelial changes after implantation of anterior chamber intraocular lenses in cataract surgery. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.29, p.1918-1923, 2003.

RAO, G. et al. Cell size-shape relationships in corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.22, n.2, p.271-274, 1982.

RAO, B. et al. Imaging and investigating the effects of incision angle of clear corneal cataract surgery with optical coherence tomography. **Optics Express**, v.11, n.24, p.3254-3261, 2003.

REHANY, U. et al. Ultrastructural changes in corneas of diabetic patients. An electron-microscopy study. **Cornea**, v.19, n.4, p.534-538, 2000.

RICHARD, J. et al. Corneal endothelial cell lost after cataract extraction by using ultrasound phacoemulsification versus a fluid-based system. **Cornea**, v.27, n.1, p.17-21, 2008.

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

- SAILSTAD, D.M. & PEIFFER, R.L. Specular microscopic observation of the corneal endothelium in the normal rabbit. **Laboratory Animals**, v.15, p.393-395, 1981.
- SANCTIS, U. et al. Corneal endothelial evaluation with 2 noncontact specular microscopes and their semiautomated methods of analysis. **Cornea**, v.25, n.5, p.501-p.506, 2006.
- SCHULTZ, R.O. et al. Response of the corneal endothelium to caratact surgery. **Archives of Ophthalmology**, v.104, p.1164-1169, 1986.
- SCHUTTEN, W.H. & Van HORN, D.L. Corneal endothelial cell shrinkage after critical point drying. **Annals of Ophthalmology**, v.12, n.10, p.1165-1167, 1980.
- SEYHMUS, A. et al. Effects of trypan blue on corneal endothelium and anterior lens capsule in albino Wistar rats: an investigator-masked, controlled, two-period, experimental study. **Current Therapeutic Research**, v.6, p.366-377, 2006.
- SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.11, p.283-338.
- STAATZ, W.D. & VAN HORN, D.L. The effects of aging and inflammation on corneal endothelial wound healing in rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.19, n.8, p.983-986, 1980.
- SUZUKI, H. et al. Functional evaluation of corneal endothelium by mensurement of conreal volume alteration and cell density after phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.33, p.2077-2082, 2007.
- SVEDBERGH, B. & BILL, A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica (Copenh)**, v.50, n.3, p.321-336, 1972.
- TAMAYO-ARANGO, L.J. et al. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.117-122, 2009.
- TAYLOR, M.J.; HUNT, C.J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of PH for the dye – lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v.65, n.12, p.815-819, 1981.
- TREFFERS, W.F. Human corneal endothelial wound repair. *In vitro* and *in vivo*. **Ophthalmology**, v.6, n.89, p.605-615, 1982.
- TUFT, S.J. & COSTER, D.J. The corneal endothelium. **Eye**, v.4, p.389-424, 1990.
- Van HORN, D.L et al. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.16, n.7, p.597-613, 1977.
- VIRTANEN, J. et al. The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and

morphology in scanning electron microscopy. **Acta Ophthalmologica**, v.62, n.4, p 577-585, 1984.

Von SALLMANN, L.; CARAVAGGIO, L.L & GRIMES, P. Studies on the corneal endothelium of the rabbit. Cell division and growth. **American Journal of Ophthalmology**, n.51, p.955, 1961.

WAISWOL, M. Técnicas cirúrgicas - Incisões In: FREITAS, L.L. **Cristalino e Catarata: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Santos, 2004. cap.9, p.83-85.
WARING, G.O. et al. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. **Ophthalmology**, v.89, n.6, p.531-590, 1982.

WEIMAR, V.; SQUIRES, E.L. & KNOX, J.L. Acceleration of healing of rabbit endothelium by mesodermal growth factor. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.19, n.4, p.350-361, 1980.

YEE, R.W. et al. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function and morphology in wound repair. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.46, n.9, p.1191-1201, 1985a.

YEE, R.W. et al. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. **Current Eye Research**, v.4, n.6, p.671-678, 1985b.