

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR**

**LUCIANA VICENTE ROSA PACICCO DE FREITAS**

**PORTO ALEGRE**

**2012**

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR**

**Autor: Luciana Vicente Rosa Pacicco de Freitas**

**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**

**2012**

### CIP - Catalogação na Publicação

Freitas, Luciana Vicente Rosa Pacicco de  
Avaliação do endotélio da córnea de galinhas  
(Gallus gallus domesticus) em diferentes faixas  
etárias utilizando a microscopia especular / Luciana  
Vicente Rosa Pacicco de Freitas. -- 2012.  
56 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Galinhas. 2. Endotélio corneano. 3.  
morfometria. 4. pleomorfismo. 5. microscopia  
especular. I. Pigatto, João Antonio Tadeu, orient.  
II. Título.

Luciana Vicente Rosa Pacicco de Freitas

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*)  
EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR

Aprovada em 27 ABR 2012

APROVADO POR:

---

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

---

Prof. Dr. José Luiz Laus  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araújo  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. André Silva Carissimi  
Membro da Comissão

## DEDICATÓRIA

À minha mãe Jeane e  
Ao meu pai João Carlos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Jeane e João Carlos, por todo amor, apoio, dedicação, ensinamentos e incentivo que me deram ao longo de toda a minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Pigatto, pela oportunidade de realizar este projeto, e também por toda amizade, apoio, paciência, dedicação, orientação e ensinamentos transmitidos.

À minha querida amiga, Luciane de Albuquerque, por toda a amizade sincera e verdadeira, apoio, dedicação e companheirismo, sempre tendo estado ao meu lado, tanto nos momentos bons, quanto nos ruins. Lu, tua amizade é e sempre será muito importante para mim. A tua amizade foi o maior presente que eu ganhei nestes últimos anos. Sem ti a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Sr. Paulo Rogerio Saurin Visentini, proprietário da empresa “Avisui Alimentos”, por ter nos recebido gentilmente em sua propriedade, proporcionando a realização deste trabalho.

À Maria Cristina Caldart de Andrade e à Paula Stieven Hünning, pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

Ao meu colega, Bernardo Stefano Bercht, pela amizade.

Aos meus queridos amigos, Aline Fanti Ajala e Bruno da Cunha Evaldt, por todo apoio, companheirismo e amizade, considero vocês meus irmãos, muito obrigada por sempre estarem ao meu lado.

A todos os meus animais de estimação, por todo o amor, carinho e amizade sincera.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e seu corpo docente, por sua alta qualificação profissional.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (HCV-UFRGS), seus funcionários e médicos veterinários. A oportunidade de vivência da rotina clínica e cirúrgica no Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFRGS foi muito importante para meu aprendizado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos para realização do curso de mestrado.

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

## RESUMO

O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais localizadas na face posterior da córnea e é essencial para a manutenção da transparência corneana. Não foram encontradas referências na literatura a respeito dos parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea de galinhas, apesar destes animais serem amplamente utilizados como modelo experimental em estudos oftálmicos, devido à similitude com a córnea de humanos. O objetivo deste estudo foi o de avaliar os parâmetros morfométricos e o pleomorfismo da região central do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de diferentes faixas etárias, utilizando a microscopia especular de contato. Avaliaram-se a densidade, a área celular média e o pleomorfismo das células do endotélio da córnea de 60 olhos de 30 galinhas da raça Leghorn branca. Os animais foram divididos em três grupos composto por 10 animais cada: G1 (animais com 30 dias de idade), G2 (animais com 45 dias de idade) e G3 (animais com 60 dias de idade). O presente estudo revelou que o endotélio da córnea de galinhas é composto por células poligonais de padrão regular, com predomínio de formato hexagonal. O endotélio corneano de galinhas sofreu alterações decorrentes da idade no que tange a morfometria, mas no que diz respeito ao pleomorfismo, não ocorreram alterações em resposta ao envelhecimento.

**Palavras-chave:** galinhas, endotélio corneano, morfometria, pleomorfismo, microscopia especular, *Gallus gallus domesticus*.

## **ABSTRACT**

*The corneal endothelium is a monolayer of polygonal cells located on the posterior face of the cornea and it is essential for the maintenance of corneal transparency. We found no references in the literature concerning the morphological and morphometric parameters of the corneal endothelium of chickens, although these animals are widely used as experimental model in ophthalmic studies due to the similarity with the human cornea. The objective of this study was to evaluate the morphometric parameters and the pleomorphism of central corneal endothelium of chickens (*Gallus gallus domesticus*) of different ages using the contact specular microscopy. The density, the average cell area and the pleomorphism of the corneal endothelial cells were evaluated on 60 eyes of 30 white Leghorn chickens. The animals were divided into three groups of 10 animals each: G1 (animals with 30 days of age), G2 (animals with 45 days of age) and G3 (animals with 60 days of age). The present study revealed that the corneal endothelium of chickens is composed of regular polygonal cells, with predominance of hexagonal shape. The corneal endothelium of chickens has changed due to age in respect to morphometry, but in regard to pleomorphism, no changes occurred in response to aging.*

**Key-words:** *chickens, corneal endothelium, morphometry, pleomorphism, specular microscopy, Gallus gallus domesticus.*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem

$\mu\text{m}$ : micrômetro

$\mu\text{m}^2$ : micrômetro quadrado

= : igual

ARVO: *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

Células/  $\text{mm}^2$ : células por milímetro quadrado

CEUA-UFRGS: Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Dr.: Doutor

&: e

*et al.*: e outros

G: grupo

HCV-UFRGS: Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

mm: milímetro

$\text{mm}^2$ : milímetro quadrado

Prof.: Professor

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Imagem fotográfica do microscópio especular de contato.....	32
Figura 2-	Imagem fotográfica da lente objetiva do microscópio especular sobre a região central da superfície da córnea do bulbo do olho de galinha fixado em suporte adaptado. ....	32
Figura 3-	Fotomicrografia especular do endotélio da córnea do olho direito de uma galinha com 60 dias de idade. Em A e B notam-se células poligonais com padrão regular e delimitação das bordas. ....	33
Figura 4-	Representação gráfica das médias dos valores de densidade celular endotelial nos grupos 1 (idade de 30 dias): 8526,5 células/mm <sup>2</sup> , 2 (idade de 45 dias): 6124,7 células/mm <sup>2</sup> e 3 (idade de 60 dias): 4623,0 células/mm <sup>2</sup> . ....	34
Figura 5-	Fotomicrografia especular do endotélio corneano normal de galinha, com 30 dias de idade, apresentando densidade celular de 8544 células/mm <sup>2</sup> . Nota-se em A, B e C endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais e predomínio de formato hexagonal. ....	34
Figura 6-	Fotomicrografia especular do endotélio corneano normal de galinha, com 45 dias de idade, apresentando densidade celular de 6281 células/mm <sup>2</sup> . Nota-se em A, B e C endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais e predomínio de formato hexagonal. ....	34
Figura 7-	Fotomicrografia especular do endotélio corneano normal de galinha, com 60 dias de idade, apresentando densidade celular de 4324 células/mm <sup>2</sup> . Nota-se em A, B e C endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais e predomínio de formato hexagonal. ....	35
Quadro 1-	Medidas descritivas da densidade endotelial (células/mm <sup>2</sup> ) e área celular (µm <sup>2</sup> ) do grupo 1 (galinhas com 30 dias de idade), avaliadas à microscopia especular, apresentando valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão.....	35
Quadro 2-	Medidas descritivas da densidade endotelial (células/mm <sup>2</sup> ) e área celular (µm <sup>2</sup> ) do grupo 2 (galinhas com 45 dias de idade), avaliadas à microscopia especular, apresentando valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão.....	35

Quadro 3- Medidas descritivas da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) e área celular (μm<sup>2</sup>) do grupo 3 (galinhas com 60 dias de idade), avaliadas à microscopia especular, apresentando valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão.....36

Figura 8- Representação gráfica da área celular média dos grupos 1 (idade de 30 dias): 118,1 μm<sup>2</sup>, 2 (idade de 45 dias): 164,2 μm<sup>2</sup>, e 3 (idade de 60 dias): 217,2 μm<sup>2</sup>...36

Figura 9- Representação gráfica dos valores médios do pleomorfismo dos grupos 1 (idade de 30 dias): 74,5%, 2 (idade de 45 dias): 71,5%, e 3 (idade de 60 dias): 73,9%. .....37

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVO</b> .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>3.1 Endotélio da Córnea</b> .....	15
<b>3.2 Métodos de Avaliação do Endotélio da Córnea</b> .....	19
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	20
3.2.2 Microscopia com Corantes Vitais .....	21
3.2.3 Microscopia Confocal .....	22
3.2.4 Microscopia Especular .....	23
<b>4 MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS</b> .....	26
<b>4.1 Artigo</b> .....	27
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	33
<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais interligadas, que compõe a superfície posterior da córnea (SVEDBERGH; BILL, 1972; WARING *et al.*, 1982; TUFT; COSTER, 1990). Esta camada apresenta sua face anterior voltada para a membrana de Descemet, enquanto sua face posterior limita-se com o humor aquoso (WARING *et al.*, 1982). Em sua maioria, as células endoteliais dos vertebrados apresentam formato hexagonal (SVEDBERGH; BILL, 1972; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2006).

Esta camada é essencial para a manutenção da transparência da córnea e está constantemente sujeita a alterações fisiológicas decorrentes da idade, traumas, fármacos, doenças oculares e sistêmicas e manipulações cirúrgicas intraoculares. Em casos de comprometimento das células endoteliais, pode ocorrer o desenvolvimento de edema de córnea (WARING *et al.*, 1980; LANDSHMAN *et al.*, 1988; TUFT; COSTER, 1990; ALP *et al.*, 2000; ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; JOYCE, 2003; BOURNE; McLAREN, 2004; PIGATTO *et al.*, 2004; JOYCE, 2012). Na maioria das espécies, quando ocorre perda de células endoteliais, as células remanescentes aumentam de tamanho e migram em direção às margens da lesão para cobrir a superfície posterior da córnea, o que acarreta em um decréscimo na densidade celular (YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; TUFT; COSTER, 1990; COLLIN; COLLIN, 1998).

Na avaliação morfológica e morfométrica do endotélio da córnea de seres humanos e de animais, dois métodos de investigação clínica são principalmente empregados, sendo eles a microscopia especular e a microscopia confocal (GWIN *et al.*, 1982; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CAVANAGH *et al.*, 2000; ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002; JALBERT *et al.*, 2003; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008). Os estudos *in vitro* utilizam a microscopia com corantes vitais e a microscopia eletrônica de varredura (TAYLOR; HUNT, 1981). A microscopia especular tornou-se uma técnica padrão para determinar a densidade das células endoteliais da córnea e a morfologia destas células *in vivo*, podendo esta técnica também ser utilizada para estudos *in vitro* (COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; PIGATTO *et al.*, 2006; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; PIGATTO *et al.*, 2008; FRANZEN *et al.*, 2010).

A estrutura normal do endotélio da córnea tem sido estudada em humanos, macacos, peixes, cães, gatos, coelhos, suínos, lhamas, alpacas, cavalos, pinguins, jacarés, avestruzes, entre outros (SVEDBERGH; BILL, 1972; PEIFFER; DEVANZO; COHEN, 1981; GWIN *et al.*, 1982; TUFT; WILLIAMS; COSTER, 1986; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; HUANG; NELSON; BOURNE, 1989; COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; COLLIN; COLLIN, 2000; ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; ANDREW *et al.*, 2001; ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002; VICENTI, 2004; SEYHMUS *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010). No entanto, apesar da relativa disponibilidade de instrumentos para avaliação do mosaico endotelial, existem poucos estudos sobre o endotélio de outros vertebrados, particularmente das aves (YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; COLLIN; COLLIN, 1998).

As aves são bastante utilizadas como modelo experimental em pesquisas oftálmicas (WAGGONER, 1978; NICKLA; WILDSOET; WALLMAN, 1998; SCHMID *et al.*, 2003; MONTIANI-FERREIRA; CARDOSO; PETERSEN-JONES, 2004; KAFARNIK; FRITSCHKE; REESE, 2007; PRASHAR *et al.*, 2007; AVILA; McFADDEN, 2010; TSUKAHARA *et al.*, 2010; RITCHEY *et al.*, 2011; WAHL *et al.*, 2011). A similitude da córnea de galinhas com a córnea de humanos tem sido relatada (FOWLER *et al.*, 2004; RITCHEY *et al.*, 2011). Entretanto, não foram encontradas referências na literatura sobre estudos a respeito do endotélio da córnea desta espécie.

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros morfométricos e o pleomorfismo da região central do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de diferentes faixas etárias, utilizando a microscopia especular.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros morfométricos e o pleomorfismo da região central do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de diferentes faixas etárias, utilizando a microscopia especular.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Endotélio da Córnea

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que compõe a superfície posterior da córnea, sendo a sua integridade essencial para a manutenção da transparência corneana (SVEDBERGH; BILL, 1972; WARING *et al.*, 1982; TUFT; COSTER, 1990; DeIMONTE; KIM, 2011). Estas células são provenientes da crista neural, durante a fase de desenvolvimento embriológico (TUFT; COSTER, 1990). Nos vertebrados, o formato predominante das células endoteliais é hexagonal (SVEDBERGH; BILL, 1972; DOUGHTY, 1989; COLLIN; COLLIN, 1998; DeIMONTE; KIM, 2011).

O endotélio da córnea tem sido estudado em humanos, macacos, peixes, cães, gatos, coelhos, suínos, lhamas, alpacas, cavalos, pinguins, jacarés, avestruzes, entre outras espécies (SVEDBERGH; BILL, 1972; PEIFFER; DEVANZO; COHEN, 1981; GWIN *et al.*, 1982; TUFT; WILLIAMS; COSTER, 1986; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; HUANG; NELSON; BOURNE, 1989; COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; COLLIN; COLLIN, 2000; ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; ANDREW *et al.*, 2001; ANDREW; WILLIS; ANDERSON, 2002; VICENTI, 2004; SEYHMUS *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN *et al.*, 2010). A microscopia especular é considerada a técnica padrão para determinar a densidade endotelial e a morfologia celular *in vivo*. A microscopia eletrônica de varredura é outro método válido para a avaliação do endotélio, porém, para estudos *in vitro*. Esta técnica é bastante utilizada na comparação da estrutura endotelial dos vertebrados (SVEDBERGH; BILL, 1972; COLLIN; COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2004; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Esses métodos permitem a análise, principalmente, da morfologia e da morfometria das células do endotélio da córnea (ABIB, 2000).

Em seres humanos recém-nascidos a densidade endotelial média é de 3500 a 4000 células/mm<sup>2</sup>. Em adultos, com o avanço da idade, a contagem de células endoteliais diminui para valores próximos de 2500 células/mm<sup>2</sup> (SVEDBERGH; BILL,



1972; YEE *et al.*, 1985; TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000; JOYCE, 2003). A densidade de células endoteliais diminui progressivamente com o avanço da idade (BOURNE; KAUFMAN, 1976; TUFT; COSTER, 1990). Em humanos, ocorre um rápido declínio inicial no primeiro ano de vida, devido ao crescimento da córnea. Nos anos seguintes, a diminuição da densidade celular passa a ser mais lenta e gradual (BAHN *et al.*, 1986; TUFT; COSTER, 1990). A densidade das células endoteliais na área central da córnea diminui a uma taxa média de 0,6% ao ano, durante a fase de vida adulta, com gradual aumento do polimegatismo e do pleomorfismo (BOURNE; NELSON; HODGE, 1997).

Alterações na densidade e no formato das células endoteliais em função do envelhecimento têm sido relatadas em diferentes espécies, incluindo macacos, ratos, gatos, cães e coelhos (SVEDBERGH; BILL, 1972; GWIN *et al.*, 1982; BAHN *et al.*, 1986; BAROODY *et al.*, 1987; MacCALLUM *et al.*, 1983; TUFT; COSTER, 1990; FRANZEN *et al.*, 2010). Nos animais adultos de cada uma destas espécies, a densidade endotelial média apresenta valores próximos de 2500 células/mm<sup>2</sup> (GWIN *et al.*, 1982; BAHN *et al.*, 1986; TUFT; COSTER, 1990).

As dimensões das células endoteliais variam conforme as espécies. A célula endotelial humana normal mede entre quatro e seis  $\mu\text{m}$  de espessura, 18 e 20  $\mu\text{m}$  de largura e apresenta núcleo com sete  $\mu\text{m}$  de diâmetro (TUFT; COSTER, 1990; BOTEON, 2000). Em caninos e felinos, a célula endotelial apresenta diâmetro de 15 a 20  $\mu\text{m}$  (STAPLETON; PEIFFER, 1979; SAILSTAD; PEIFFER, 1981).

Localizadas na membrana endotelial posterior e em número variado estão presentes as microvilosidades, estruturas responsáveis por aumentar a superfície posterior das células endoteliais. As microvilosidades projetam-se entre 0,5 e 0,6  $\mu\text{m}$  em direção à câmara anterior do bulbo do olho (DOUGHTY, 1989; TUFT; COSTER, 1990; BOTEON, 2000).

A presença de cílios nas células endoteliais tem sido reportada em vertebrados. Estas estruturas foram observadas em mamíferos, incluindo macacos e coelhos, e também em aves e peixes. Porém, sua função ainda não está estabelecida (SVEDBERGH; BILL, 1972; GALLAGHER, 1980; COLLIN; COLLIN, 1998; COLLIN; COLLIN, 2000).

Quando as células são vistas da superfície posterior, há um padrão hexagonal com uma dobra marginal fina, porém, histologicamente se observa que há extensas e

irregulares interdigitações entre as células, o que aumenta a superfície de contato entre as mesmas (TUFT; COSTER, 1990; OJEDA *et al.*, 2001).

Nas superfícies internas das membranas laterais e posteriores encontram-se vesículas pinocíticas, formadas a partir da invaginação da membrana celular. Estas vesículas destacam-se da membrana, atravessam o citoplasma e liberam o seu conteúdo no espaço entre as células endoteliais. Sua formação é dependente da temperatura e está relacionada com o transporte ativo de água e metabólitos (TUFT ;COSTER, 1990).

As células endoteliais estão separadas lateralmente por uma abertura de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ , a qual é reduzida para três  $\mu\text{m}$  no local da junção *gap* em direção à câmara anterior. As junções *tight* unem as células em seu terço apical. A ausência de contínuas junções do tipo *tight* entre as células endoteliais permite a livre passagem do humor aquoso para o estroma corneano, gerando opacificação da córnea (TUFT; COSTER, 1990).

A membrana celular anterior de cada célula endotelial está em contato direto com a membrana de Descemet e, devido à ausência de complexos juncionais, as células endoteliais são facilmente deslocadas por lesões mecânicas (WARING *et al.*, 1980).

As células endoteliais possuem citoplasma rico em organelas, sugerindo transporte ativo e síntese de proteínas. Elas apresentam um grande número de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso e um complexo de Golgi bem desenvolvido. Pigmentos são ocasionalmente vistos no citoplasma das células do endotélio (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003).

O endotélio é responsável pela manutenção da transparência da córnea através da regulação da hidratação corneana (TUFT; COSTER, 1990; JOYCE, 2003; JOYCE, 2012). Essas células funcionam como um sistema de bomba fluídica, prevenindo a excessiva passagem de fluidos e solutos, além de promover o transporte ativo para remoção de fluidos e captação de nutrientes (MISHIMA, 1982; TUFT; COSTER, 1990).

O transporte de fluidos pelo endotélio depende do metabolismo aeróbico que pode ser reversivelmente inibido pelo resfriamento da córnea. As mitocôndrias fornecem energia para o funcionamento do sistema, produzindo ATP através do metabolismo da glicose. O oxigênio requerido é difundido para as células endoteliais, proveniente da câmara anterior, e em sua maioria, do filme lacrimal pré-corneano. O movimento de água através do endotélio é passivo e segue o fluxo do transporte ativo de íons através da membrana posterior das células endoteliais (TUFT; COSTER, 1990). A

permeabilidade do endotélio a vários solutos varia em função do peso molecular de cada substância, indicando que os solutos passam por difusão simples, através dos espaços teciduais (MISHIMA, 1982). A bomba ativa de fluidos remove fluidos do estroma corneano para a câmara anterior, através do transporte ativo de íons de bicarbonato, sódio e potássio (HODSON; MILLER, 1976; GEROSKI; EDELHAUSER, 1984; TUFT; COSTER, 1990; BOURNE, 2003; SLATTER, 2005).

A perda endotelial pode ser decorrente de diversos fatores, tais como envelhecimento, inflamação intraocular, trauma, hipertensão intraocular, procedimentos cirúrgicos intraoculares, toxicidade a fármacos, entre outros (WARING *et al.*, 1980; LANDSHMAN *et al.*, 1988; TUFT; COSTER, 1990; ALP *et al.*, 2000; ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; BOURNE; McLAREN, 2004; PIGATTO *et al.*, 2004; SHENG; BULLIMORE, 2007; JOYCE, 2012). No entanto, a regeneração endotelial varia entre as diferentes espécies (YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; HUANG; NELSON; BOURNE, 1989; TUFT; COSTER, 1990; COLLIN; COLLIN, 1998). Em seres humanos, uma lesão endotelial localizada, inicialmente estimula a reparação pelas células próximas a esta lesão. Estas células se dispõem de forma a cobrir o defeito e as células endoteliais danificadas deslocam-se para a câmara anterior (TUFT; COSTER, 1990). Durante a migração, as células rompem suas junções intercelulares e desenvolvem pseudópodos movendo-se em média 0,5 a 1,0 mm por dia em direção à área lesionada. Quando as células atingem o centro da lesão, ocorre um estímulo inibitório pelo contato celular, o que cessa a migração iniciando-se novamente a formação dos complexos juncionais (MISHIMA, 1982; MATSUDA *et al.*, 1985; TUFT; COSTER, 1990). Figuras mitóticas aparecem nas margens da lesão nas primeiras 16 horas, com um pico entre 24 e 36 horas, com término em cinco dias (TUFT; COSTER, 1990).

Para manter a transparência da córnea, a densidade de células endoteliais deve permanecer acima de um determinado número, usualmente entre 400 e 500 células/mm<sup>2</sup> nos seres humanos (JOYCE, 2012). Análises morfométricas da densidade endotelial da córnea em fetos e adultos humanos indicam que, normalmente, as células endoteliais não se dividem *in vivo* em uma taxa suficiente para repor as células mortas ou lesionadas (MURPHY *et al.*, 1984; BOURNE; NELSON; HODGE, 1997; HOLLINGSWORTH *et al.*, 2001). A resposta do endotélio à perda celular gradual em decorrência da idade, bem como as grandes lesões, geralmente, envolve a distribuição e migração de células vizinhas para cobrir a área lesionada. Como resultado desta forma

de recuperação das células do endotélio, ocorre um aumento no tamanho de todas as células e uma alteração na forma hexagonal para um formato pleomórfico (MATSUDA *et al.*, 1985; LEEM; LEE; SHIN, 2011; JOYCE, 2012).

Em felinos, ocorre pouca divisão mitótica e a atividade de regeneração das células endoteliais consiste na hipertrofia e migração das células para a margem da lesão, semelhante aos seres humanos (VAN HORN *et al.*, 1977; LANDSHMAN *et al.*, 1988; HUANG; NELSON; BOURNE, 1989).

Em cães, as células endoteliais apresentam extensiva formação de pseudópodos nas margens da lesão. A reparação ocorre por divisão mitótica, e alongamento e migração das células não lesionadas (BEFANIS; PEIFFER; BROWN, 1981).

Em coelhos, a cicatrização endotelial ocorre por migração e alongamento celulares, acompanhada por intensa mitose celular nas margens da lesão (VAN HORN *et al.*, 1977; MATSUDA *et al.*, 1985).

### **3.2 Métodos de Avaliação do Endotélio da Córnea**

A análise do endotélio da córnea tem se tornado cada vez mais importante devido ao crescente número de cirurgias intraoculares (TUFT; COSTER, 1990; ABIB; BARRETO JÚNIOR, 2001; KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003). Diversas técnicas têm sido utilizadas com o objetivo de se avaliar a morfometria e a morfologia do endotélio de diferentes espécies, incluindo métodos de investigação clínica, como a microscopia especular e a microscopia confocal e os estudos *in vitro*, através da utilização de coloração vital e da microscopia eletrônica de varredura (GWIN *et al.*, 1982; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CAVANAGH *et al.*, 2000; JALBERT *et al.*, 2003; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006; KAFARNIK; FRITSCHKE; REESE, 2007; PIGATTO *et al.*, 2008).

A microscopia confocal permite, além da análise da morfometria endotelial, a avaliação *in vivo* e *in vitro* de todas as camadas da córnea, com excelente resolução de imagem, possibilitando inclusive o exame em córneas edemaciadas (CHIOU *et al.*, 1999; CAVANAGH *et al.*, 2000; HARA *et al.*, 2003; JALBERT *et al.*, 2003; KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003).

A técnica de coloração vital do endotélio da córnea com azul de tripano e vermelho de alizarina foi descrita por Sperling, em 1977. A utilização conjunta dos dois corantes permitiu observar as bordas celulares, o núcleo das células e áreas com ausência de células endoteliais (SPERLING, 1977).

A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada para a avaliação *in vitro* da ultraestrutura do endotélio da córnea de vertebrados e os efeitos de fármacos e procedimentos cirúrgicos sobre o endotélio (DOUGHTY; SPITERI; DILTS, 1997; DOUGHTY, 1998; COLLIN; COLLIN, 1998; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; RODRIGUES, *et al.*, 2006; PIGATTO *et al.*, 2009; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009). Esta técnica possibilita a avaliação da morfologia e das bordas celulares, além do padrão do mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989).

A microscopia especular é uma técnica não invasiva que permite a avaliação *in vivo* da estrutura e da função do endotélio corneano, podendo também se realizada *in vitro* (STAPLETON; PEIFFER, 1979; ABIB, 2000; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na avaliação pré e pós-operatória do endotélio da córnea em casos de procedimentos cirúrgicos no segmento anterior do bulbo do olho, bem como na avaliação dos efeitos de fármacos aplicados internamente ao olho e na avaliação de meios de preservação da córnea, entre outros (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; DOUGHTY, 1989; COLLIN; COLLIN, 1998; ABIB, 2000; DOUGHTY, 2000; KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003).

### 3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura tem sido amplamente utilizada em estudos relacionados à morfologia corneana, à toxicidade de fármacos intracamerulares, à eficácia de meios de preservação da córnea e na avaliação da ultraestrutura do endotélio de diferentes espécies (OJEDA *et al.*, 2001; SVEDBERGH; BILL, 1972; COLLIN; COLLIN, 1998; 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). Esta técnica permite a avaliação da morfologia e das bordas celulares, além do padrão do mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989). Entre os parâmetros de avaliação do endotélio possíveis de serem estudados por esta técnica encontram-se a

área celular média, a densidade de células endoteliais, o coeficiente de variação da área celular média e a porcentagem de células hexagonais (LAING *et al.*, 1976; GWIN *et al.*, 1982; PIGATTO *et al.*, 2004).

Comparações entre avaliações realizadas antes e após a fixação do endotélio corneano de coelhos revelaram uma média de 29,7% de retração celular endotelial, após o processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura (SCHUTTEN; VAN HORN, 1980). Portanto, não se deve fazer comparações diretas entre os valores obtidos pela microscopia eletrônica de varredura e os obtidos pela microscopia especular (PIGATTO *et al.*, 2005b).

A integridade da superfície do endotélio da córnea visibilizada pelo microscópio eletrônico de varredura é dependente da eficácia da preparação da amostra tecidual, a qual por sua vez depende da natureza do fixador e do tempo entre a morte do animal e a fixação do tecido (COLLIN; COLLIN, 1998).

### 3.2.2 Microscopia com Corantes Vitais

Sperling (1977) descreveu a técnica de coloração vital do endotélio da córnea com vermelho de alizarina e azul de tripano. A combinação destes corantes é um método fácil e confiável para a visibilização *in vitro* do núcleo das células endoteliais da córnea e das bordas celulares. Ruiz, Medrano e Alió (1991) afirmaram que esta é uma técnica de fácil e rápida execução, além de possuir baixo custo. Os corantes mais utilizados são o vermelho de alizarina, o nitrato de prata, a hematoxilina e o azul de tripano (SPERLING, 1977; TAYLOR; HUNT, 1981).

Geroski e Edelhauser (1989) compararam dados morfométricos obtidos a partir da técnica de coloração vital e da microscopia especular, de indivíduos da espécie humana e leporina. Os autores observaram considerável retração na área celular do endotélio da córnea de coelhos (14%), porém, a porcentagem de células hexagonais permaneceu inalterada. Nas células endoteliais humanas, não foram observadas diferenças significativas na área ou no formato celular, quando comparados os dados morfométricos obtidos pela coloração vital com os da microscopia especular.

Os métodos histológicos são utilizados para avaliar a viabilidade, os graus de dano à superfície celular e a morfologia endotelial (SPERLING, 1977; DOUGHTY,

1989; RUIZ; MEDRANO; ALIÓ, 1991). As técnicas histológicas podem fornecer dados importantes em casos de córneas edemaciadas, cuja análise não é possível com a microscopia especular (GEROSKI; EDELHAUSER, 1989).

### 3.2.3 Microscopia Confocal

A microscopia confocal permite a visibilização de tecidos corneanos vivos em grandes resoluções, limitando os sistemas de iluminação e de observação para um único ponto (JALBERT *et al.*, 2003). Em 1957, Minsky, descreveu o princípio do primeiro microscópio confocal (MINSKY, 1988).

Na microscopia confocal, os feixes de iluminação e de observação são focados no mesmo plano da córnea e duas fendas são inseridas nos planos de imagem de cada feixe. Este arranjo óptico é chamado de confocal porque ele delimita a luz do plano de foco e reduz a contribuição de luz de fora do foco (KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003). Quando se muda a posição do plano focal, é possível a obtenção de imagens em diferentes profundidades de uma mesma amostra. Assim, a microscopia confocal permite a análise de todos os componentes da córnea, camada por camada, de forma não-invasiva. Imagens de ceratócitos e de fibras nervosas tanto de córneas saudáveis quanto doentes podem ser obtidas pela microscopia confocal (HARA *et al.*, 2003).

Para promover o contato entre a ponta da objetiva e a superfície da córnea utiliza-se um gel refrativo, o qual age como um amortecedor ao prevenir danos ao epitélio ou aplanção da córnea (KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003). Este gel de acoplamento permite a observação dos componentes celulares em córneas acometidas por desordens epiteliais (HARA *et al.*, 2003).

No estudo de Klais, Bühren e Kohnen (2003), imagens do endotélio de córneas normais foram obtidas facilmente, tanto com a microscopia confocal quanto com a especular. Não foram observadas diferenças na densidade celular endotelial mensurada pela microscopia confocal e especular, quando utilizado o mesmo método de análise (KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003). Conforme o estudo de Hara *et al.* (2003), as imagens do endotélio da córnea obtidas pela microscopia confocal aparecem quase idênticas às obtidas pela microscopia especular de não-contato.

De acordo com o estudo de Mímura *et al.* (2008) em humanos foi possível observar claramente, através da microscopia confocal, ceratócitos do estroma corneano, assim como o endotélio da córnea, em córneas cobertas com membrana amniótica.

A microscopia confocal promove cortes ópticos seriados de todas as camadas da córnea, em uma magnificação e resolução suficientes para permitir o exame em córneas com edema (CAVANAGH *et al.*, 2000; JALBERT *et al.*, 2003).

Kafarnik, Fritsche e Reese (2007) avaliaram a aplicabilidade da microscopia confocal *in vivo* na oftalmologia veterinária, além de analisar a morfologia de córneas saudáveis. Este estudo concluiu que a microscopia confocal *in vivo* não-invasiva permite a avaliação precisa das camadas da córnea, da paquimetria corneana, da densidade de células endoteliais e da inervação da córnea em diferentes espécies animais.

#### 3.2.4 Microscopia Especular

O microscópio especular, desenvolvido por Maurice em 1968, possibilitou a observação *in vivo* das células do endotélio da córnea. Este microscópio foi modificado por Laing, Sandstrom e Leibowitz em 1975, permitindo o registro fotográfico das células endoteliais. Desde a introdução da microscopia especular clínica, tem sido dada bastante atenção para a avaliação do endotélio da córnea (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; YEE; EDELHAUSER; STERN, 1987; ABIB, 2000; PIGATTO *et al.*, 2006).

A microscopia especular da córnea baseia-se na reflexão de um feixe luminoso incidente sobre o endotélio da córnea, com superfície regular. Desta forma, parte do feixe luminoso incidente sobre o endotélio reflete de forma especular e é captado pelo microscópio especular, que apresenta a imagem endotelial magnificada (ABIB, 2000). Para isso, diferentes aparelhos podem ser utilizados, desde uma lâmpada de fenda até um microscópio especular propriamente dito. No entanto, a imagem endotelial, a partir da biomicroscopia, possui menor magnificação, o que dificulta a análise das células endoteliais (STURROCK; SHERRARD; RICE, 1978; ABIB, 2000).

Com a evolução dos meios semiológicos oculares surgiu o microscópio especular de grande ampliação, o qual posteriormente passou a utilizar análise



computadorizada para os dados endoteliais (ABIB, 2000). Os parâmetros endoteliais avaliados podem ser divididos em morfológicos e morfométricos. Entre os parâmetros morfológicos utilizados para avaliar o endotélio da córnea estão o polimegatismo e o pleomorfismo (ABIB, 2000; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008). A morfometria inclui avaliação da densidade celular endotelial e da área celular média, sendo que a densidade endotelial é avaliada mediante a estimativa da quantidade de células contidas em um milímetro quadrado (DOUGHTY, 1989; ABIB, 2000; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008).

O polimegatismo refere-se ao termo utilizado para denotar heterogeneidade no tamanho das células endoteliais com formato hexagonal preservado. Já o pleomorfismo, também chamado de polimorfismo, é o termo utilizado para denotar a variação do formato hexagonal das células endoteliais da córnea (ABIB, 2000). Mishima (1982) concluiu que, na espécie humana, o pleomorfismo aumenta com a idade.

Existem diversos tipos de microscópios especulares disponíveis no mercado, os quais podem ser classificados quanto à existência ou não de contato com a córnea em análise (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; ABIB, 2000). O microscópio especular de contato necessita do contato físico entre a córnea e a lente objetiva, já no microscópio especular de não-contato não há necessidade de contato da córnea em análise com a parte óptica da objetiva do aparelho. A microscopia especular de contato tem sido amplamente utilizada para o estudo do endotélio da córnea, através da aplanção da superfície da corneana. Porém, a microscopia especular de não-contato é mais confortável ao paciente (ABIB, 2000).

Ao utilizar-se o microscópio especular de contato, a imagem do mosaico endotelial é obtida deslizando-se a objetiva do aparelho sobre a superfície da córnea. Desta forma, cobre-se toda a superfície corneana, e toda a superfície endotelial pode ser examinada. Com finalidade de fotodocumentação para demonstração endotelial, foca-se uma área específica, representativa da regularidade do mosaico. Já o aparelho de não-contato não permite a visibilização de toda a área endotelial, e sim de áreas específicas, central em alguns equipamentos, e central e paracentral nos equipamentos mais modernos. Devido a este fato, o microscópio especular de contato é o mais efetivo para a análise da regularidade do mosaico endotelial, seguido pelos equipamentos de não-contato, que proporcionam visibilização da área central e paracentral. O aparelho de não-contato que capta somente a imagem da área central da córnea é o menos efetivo (ABIB, 2000).

Quanto ao modo de análise dos dados, os microscópios especulares podem ser classificados como não-automatizados, semi-automatizados ou automatizados. O primeiro não oferece recursos para a análise endotelial, a qual fica a cargo do operador por meio de comparação com grades pré-determinadas, que fornecem padrões de densidade endotelial, pleomorfismo e polimegatismo. O segundo oferece recursos para a análise endotelial, entretanto necessita de interação com o operador do equipamento. No modo automatizado são oferecidos recursos para a análise endotelial, sem que haja necessidade de interação do operador (ABIB, 2000).

Devido ao fato de existirem diversos modelos de microscópio especular, cada qual capturando imagens com diferentes magnificações e calibração, é importante que um mesmo equipamento seja sempre empregado na realização de exames, minimizando assim intercorrências de magnificação e de interpretação de imagens (McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008).

O microscópio especular de contato permite maior versatilidade e objetividade dos exames, em córneas de animais ou em córneas humanas, por propiciar a análise da regularidade da superfície endotelial como um todo, além de focar com precisão determinadas áreas do mosaico endotelial. No aparelho de não-contato, a imagem obtida do endotélio é uma imagem aleatória, no local que o equipamento consegue a reflexão especular, o qual muitas vezes não corresponde ao local desejado para o exame (ABIB, 2000).

A microscopia especular em córneas sem edema apresenta imagem endotelial com bordas celulares nítidas, já na córnea com edema leve a moderado, a imagem endotelial aparece com bordas celulares pouco nítidas. Na córnea com edema severo, não se visibiliza o mosaico endotelial devido ao predomínio da dispersão luminosa e da reflexão não especular (ABIB, 2000).

Os principais fatores que influenciam na densidade e na morfologia do endotélio são a idade, procedimentos cirúrgicos intraoculares, utilização de fármacos intraoculares, doenças sistêmicas, uveíte e glaucoma (GWIN *et al.*, 1982; ABIB, 2000; DOUGHTY; MULLER; ZAMAN, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2006; McCAREY; EDELHAUSER; LYNN, 2008; OLIVEIRA; MOTTA; MUCCIOLI, 2009). Alterações endoteliais são consideradas parâmetros importantes de trauma cirúrgico e são essenciais para estimar a segurança de técnicas cirúrgicas (ABIB, 2000).

#### **4 MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS**

Esta dissertação de mestrado foi elaborada na forma de artigo científico conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Deste modo, a pesquisa realizada, os resultados obtidos, a discussão e a conclusão foram apresentados de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira, para a qual o artigo será submetido.

#### 4.1 Artigo

### **Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens in different ages using specular microscopy<sup>1</sup>**

Luciana V.R.P. Freitas<sup>2</sup>, Luciane Albuquerque<sup>2</sup> and João A.T. Pigatto<sup>2\*</sup>

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira (ISSN 1678-5150) e será convertido para o inglês quando for encaminhado para submissão.

**ABSTRACT.-** Freitas L.V.R.P., Albuquerque L. & Pigatto J.A.T., 2012. **[Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens in different ages using specular microscopy.]** Avaliação do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: pigatto@ufrgs.br

The corneal endothelium is a monolayer of polygonal cells located on the posterior face of the cornea and it is essential for the maintenance of corneal transparency. We found no references in the literature concerning the morphological and morphometric parameters of the corneal endothelium of chickens, although these animals are widely used as experimental model in ophthalmic studies due to the similarity with the human cornea. The objective of this study was to evaluate the morphometric parameters and the pleomorphism of central corneal endothelium of chickens (*Gallus gallus domesticus*) of different ages using the contact specular microscopy. The density, the average cell area and the

pleomorphism of the corneal endothelial cells were evaluated on 60 eyes of 30 white Leghorn chickens. The animals were divided into three groups of 10 animals each: G1 (animals with 30 days of age), G2 (animals with 45 days of age) and G3 (animals with 60 days of age). The present study revealed that the corneal endothelium of chickens is composed of regular polygonal cells, with predominance of hexagonal shape. The corneal endothelium of chickens has changed due to age in respect to morphometry, but in regard to pleomorphism, no changes occurred in response to aging.

INDEX TERMS: Chickens, corneal endothelium, morphometry, pleomorphism, specular microscopy, *Gallus gallus domesticus*.

**RESUMO.- [Análise do endotélio da córnea em olhos de galinhas de diferentes idades utilizando a microscopia especular].** O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais localizadas na face posterior da córnea e é essencial para a manutenção da transparência corneana. Não foram encontradas referências na literatura a respeito dos parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea de galinhas, apesar destes animais serem amplamente utilizados como modelo experimental em estudos oftálmicos, devido à similitude com a córnea de humanos. O objetivo deste estudo foi o de avaliar os parâmetros morfométricos e o pleomorfismo da região central do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular de contato. Avaliaram-se a densidade, a área celular média e o pleomorfismo das células do endotélio da córnea de 60 olhos de 30 galinhas da raça Leghorn branca. Os animais foram divididos em três grupos composto por 10 animais cada: G1 (animais com 30 dias de idade), G2 (animais com 45 dias de idade) e G3 (animais com 60 dias de idade). O presente estudo revelou que o endotélio da córnea de galinhas é composto por células poligonais de padrão regular, com predomínio de formato hexagonal. O endotélio corneano de galinhas sofreu alterações decorrentes da idade no que tange a morfometria, mas no que diz

respeito ao pleomorfismo, não ocorreram alterações em resposta ao envelhecimento.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Galinhas, endotélio corneano, morfometria, pleomorfismo, microscopia especular, *Gallus gallus domesticus*.

## INTRODUÇÃO

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais interligadas, que compõe a superfície posterior da córnea (SVEDBERGH & BILL 1972, WARING et al. 1982; TUFT & COSTER 1990; DelMONTE & KIM 2011). Na maioria dos vertebrados estudados, as células endoteliais apresentam formato principalmente hexagonal (SVEDBERGH & BILL 1972, YEE et al. 1987, PIGATTO et al. 2004, PIGATTO et al. 2006; DelMONTE & KIM 2011). A integridade e a atividade metabólica do endotélio são essenciais para a manutenção da transparência e desidratação da córnea (WARING et al. 1982, TUFT & COSTER 1990, JOYCE 2003, JOYCE 2012).

Alterações nas células endoteliais podem ocorrer em função da idade, fármacos, doenças oculares ou procedimentos cirúrgicos intraoculares (WARING et al. 1980, TUFT & COSTER 1990, ABIB 2000, SHENG & BULLIMORE 2007, JOYCE 2012). Na maioria das espécies, quando ocorre perda de células endoteliais, as células remanescentes se alargam e se espalham para cobrir a superfície posterior da córnea, o que acarreta em um decréscimo na densidade celular (YEE et al. 1987, TUFT & COSTER 1990, COLLIN & COLLIN 1998).

A microscopia especular tornou-se a técnica padrão para se avaliarem os parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea (LAING et al. 1979, COLLIN & COLLIN 1998, ABIB 2000, PIGATTO et al. 2006, McCAREY et al. 2008, PIGATTO et al. 2008). Entre os parâmetros mais utilizados para a avaliação endotelial encontram-se a densidade e a morfologia (DOUGHTY 1989; ABIB 2000, McCAREY et al. 2008). O pleomorfismo, também chamado de polimorfismo, é o

termo utilizado para denotar a variação do formato hexagonal das células endoteliais da córnea (ABIB 2000).

A estrutura normal do endotélio da córnea tem sido estudada em inúmeras espécies, entre elas, humanos, cães, coelhos, suínos, lhamas, alpacas, cavalos e gatos (PEIFFER et al. 1981, GWIN et al. 1982, COLLIN & COLLIN 1998, ABIB 2000, ABIB & BARRETO JÚNIOR 2001, ANDREW et al. 2001, ANDREW et al. 2002, VICENTI 2004, PIGATTO et al. 2008). Entretanto, apesar da relativa disponibilidade de instrumentos para avaliação do mosaico endotelial, há poucos estudos sobre o endotélio dos demais vertebrados, particularmente de aves (YEE et al. 1987, COLLIN & COLLIN 1998, PIGATTO et al. 2005).

Objetivou-se com este estudo, avaliarem-se os parâmetros morfométricos e o pleomorfismo da região central do endotélio da córnea de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de diferentes faixas etárias, utilizando a microscopia especular.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 60 bulbos oculares, de 30 galinhas (*Gallus gallus domesticus*, LINNAEUS, 1758) fêmeas, hípidas, da raça Leghorn branca, de diferentes faixas etárias, provenientes da empresa Avisui Alimentos, Santa Maria, RS, Brasil. Todos os animais foram submetidos à avaliação oftálmica que incluiu a biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa SL-15, Kowa Company, Ltda, Japão), a tonometria de rebote (Tonovet, Tiolat, Finlândia) e a avaliação da integridade do epitélio da córnea utilizando a prova da fluoresceína (Fluoresceína sódica a 1%, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda, Brasil). Nenhum animal apresentou alterações ao exame oftálmico.

A pesquisa foi conduzida conforme as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS). Os animais foram abatidos em matadouro-frigorífico com inspeção federal, de acordo com os preceitos técnicos e humanitários presentes na legislação vigente.

Os animais foram subdivididos em três grupos com 10 animais cada, considerando as idades. Os grupos foram denominados de G1, composto por animais com 30 dias de idade, G2, formado por animais com 45 dias de idade e G3 constituído por animais com 60 dias de idade.

Imediatamente após o abate, realizou-se enucleação subconjuntival. Os bulbos dos olhos foram mantidos em câmara úmida com solução fisiológica a 0,9%. Estas foram armazenadas em embalagem térmica e mantidas refrigeradas até a realização da microscopia especular que foi realizada até três horas *post-mortem*.

Os exames de microscopia especular foram realizados na empresa Avisui Alimentos, Santa Maria, RS, Brasil. Após serem removidos da câmara úmida, os bulbos dos olhos foram fixados em um suporte adaptado ao microscópio especular de contato Celmax<sup>®</sup>, Medical Service, São Carlos, SP, Brasil (Fig. 1), e lubrificados com solução fisiológica. A seguir, posicionou-se a lente objetiva do microscópio sobre a região central da superfície da córnea para a avaliação endotelial e o registro fotográfico digital do endotélio (Fig. 2). De cada amostra, foram obtidas três imagens nítidas, e analisadas 150 células. Para a análise da densidade endotelial, utilizou-se o programa Celmax<sup>®</sup>. Este programa forneceu o dado de densidade endotelial média. Posteriormente, foi realizada a contagem manual do número de lados das células endoteliais de cada imagem. O cálculo da área celular média foi realizado utilizando-se fórmula já estabelecida, na qual a área celular resulta da divisão do número  $10^6$  pela densidade celular média. Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo avaliador.





**Fig.1.** Imagem fotográfica do microscópio especular de contato Celmax®, Medical Service, São Carlos, SP, Brasil.

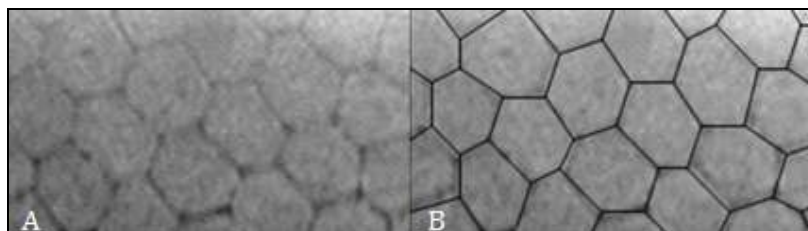


**Fig.2.** Imagem fotográfica da lente objetiva do microscópio especular (Celmax®, Medical Service, São Carlos, SP, Brasil) sobre a região central da superfície da córnea do bulbo do olho de galinha fixado em suporte adaptado.

Os dados obtidos foram comparados entre os grupos, e também entre os dados dos olhos direito e esquerdo de cada grupo. Para a análise estatística utilizou-se o teste de Anova para experimento fatorial cruzado, complementado com o teste de Tukey. Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

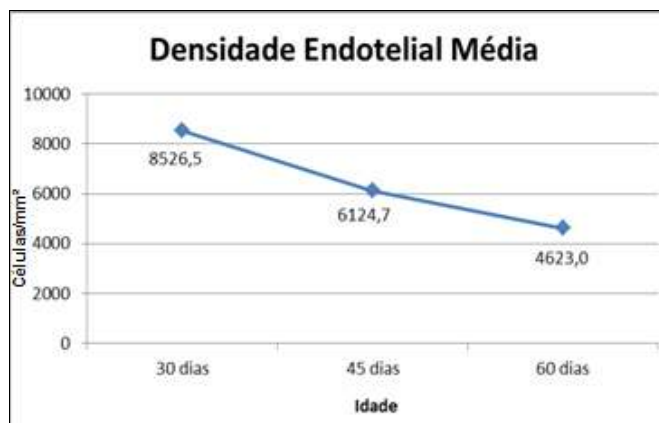
Com a microscopia especular foi possível avaliar o padrão celular, obter e capturar imagens nítidas do endotélio da córnea dos olhos estudados. As imagens obtidas demonstraram que o endotélio da córnea de galinhas possui regularidade no padrão de distribuição das células, em todas as imagens avaliadas. Nenhuma anormalidade nas células endoteliais foi constatada em qualquer das imagens. O endotélio da córnea de galinhas caracterizou-se por ser constituído de uma monocamada de células poligonais de formato uniforme. Observaram-se células poligonais, com bordas nítidas (Fig. 3).



**Fig.3.** Fotomicrografia especular do endotélio da córnea do olho direito de uma galinha com 60 dias de idade. Em A e B notam-se células poligonais com padrão regular e delimitação das bordas.

A densidade celular endotelial nos animais do grupo 1 variou entre 7993,00 e 8983,33 células/mm<sup>2</sup>. Nos animais do grupo 2, os valores variaram entre 5540,33 e 6615,00 células/mm<sup>2</sup>. Nos animais do grupo 3, variaram entre 4320,00 e 5025,67 células/mm<sup>2</sup>.

A densidade endotelial média do grupo 1 foi de 8526,50 células/mm<sup>2</sup>, do grupo 2 foi de 6124,77 células/mm<sup>2</sup> e do grupo 3 foi de 4623,00 células/mm<sup>2</sup> (Fig. 4). A análise descritiva da variável densidade endotelial média dos grupos 1, 2 e 3, indica que houve diferença significativa no comportamento dessa variável entre os grupos 1, 2 e 3.



**Fig.4.** Representação gráfica das médias dos valores de densidade celular endotelial nos grupos 1 (idade de 30 dias): 8526,5 células/mm<sup>2</sup>, 2 (idade de 45 dias): 6124,7 células/mm<sup>2</sup> e 3 (idade de 60 dias): 4623,0 células/mm<sup>2</sup>.

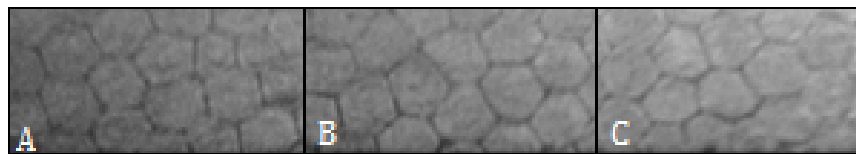
Observou-se diminuição na densidade endotelial média com o aumento da idade das galinhas (Fig. 5, 6 e 7). Não houve diferença significativa na densidade endotelial média entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo do mesmo grupo.



**Fig.5.** Fotomicrografia especular do endotélio corneano normal de galinha, com 30 dias de idade, apresentando densidade celular de 8544 células/mm<sup>2</sup>. Nota-se em A, B e C endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais e predomínio de formato hexagonal.



**Fig.6.** Fotomicrografia especular do endotélio corneano normal de galinha, com 45 dias de idade, apresentando densidade celular de 6281 células/mm<sup>2</sup>. Nota-se em A, B e C endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais e predomínio de formato hexagonal.



**Fig.7.** Fotomicrografia especular do endotélio corneano normal de galinha, com 60 dias de idade, apresentando densidade celular de 4324 células/mm<sup>2</sup>. Nota-se em A, B e C endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais e predomínio de formato hexagonal.

A área celular nos animais do grupo 1 variou entre 111,78 e 126,46  $\mu\text{m}^2$ . Nos animais do grupo 2, variou entre 151,19 e 180,77  $\mu\text{m}^2$ . Nos animais do grupo 3 variou entre 199,11 e 232,38  $\mu\text{m}^2$  (Quadros 1, 2 e 3). A área celular média para as galinhas com 30 dias de idade foi 118,11  $\mu\text{m}^2$ , para as galinhas com 45 dias de idade foi 164,18  $\mu\text{m}^2$  e para as galinhas com 60 dias de idade foi 217,24  $\mu\text{m}^2$  (Fig. 8). Observou-se aumento na área celular média, em todos os grupos, com o avanço da idade. Os grupos 1, 2 e 3 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os valores de área celular média. Não houve diferença significativa entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo do mesmo grupo.

**Quadro 1. Medidas descritivas da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) e área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) do grupo 1 (galinhas com 30 dias de idade), avaliados à microscopia especular, apresentando valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão**

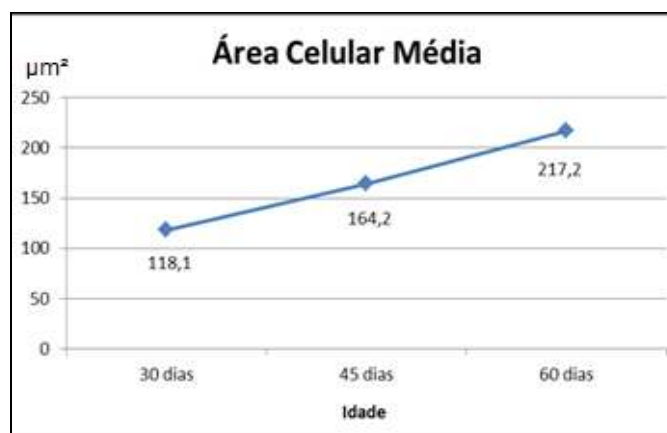
Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Densidade Endotelial	8526,50	341,58	7993,00	8983,33
Área Celular	118,11	4,96	111,78	126,46

**Quadro 2. Medidas descritivas da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) e área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) do grupo 2 (galinhas com 45 dias de idade), avaliados à microscopia especular, apresentando valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão**

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Densidade Endotelial	6124,77	294,13	5540,33	6615,00
Área Celular	164,18	8,13	151,19	180,77

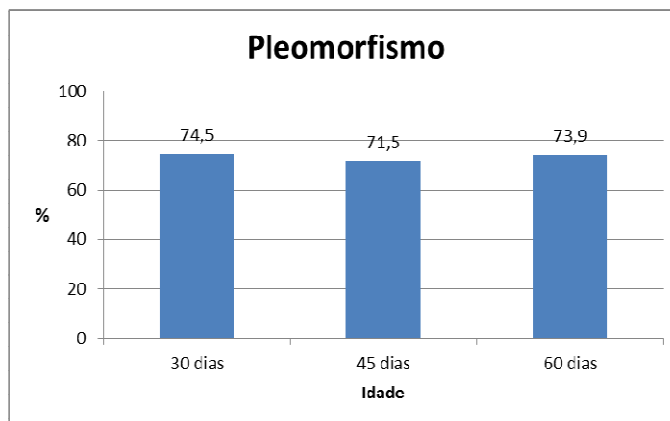
**Quadro 3. Medidas descritivas da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) e área celular (μm<sup>2</sup>) do grupo 3 (galinhas com 60 dias de idade), avaliados à microscopia especular, apresentando valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão**

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Densidade Endotelial	4623,00	178,60	4320,00	5025,67
Área Celular	217,24	8,53	199,11	232,38



**Fig.8.** Representação gráfica da área celular média dos grupos 1 (idade de 30 dias): 118,1 μm<sup>2</sup>, 2 (idade de 45 dias): 164,2 μm<sup>2</sup>, e 3 (idade de 60 dias): 217,2 μm<sup>2</sup>.

Em relação ao pleomorfismo, os animais do grupo 1 apresentaram valores entre 64% e 80%. Nos animais do grupo 2, os valores ficaram entre 64% e 78,7%. E nos animais do grupo 3 os valores variaram entre 66% e 79,3%. Os animais do grupo 1 exibiram valor médio de pleomorfismo de 74,5%. Os animais do grupo 2 apresentaram valor médio de 71,5%. Nos animais do grupo 3, encontrou-se valor médio de 73,9% (Fig. 9). A análise estatística dos dados referentes ao pleomorfismo não evidenciou diferença significativa entre os grupos 1, 2 e 3. Não houve diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo.



**Fig.9.** Representação gráfica dos valores médios do pleomorfismo dos grupos 1 (idade de 30 dias): 74,5%, 2 (idade de 45 dias): 71,5%, e 3 (idade de 60 dias): 73,9%.

## DISCUSSÃO

A microscopia especular é considerada a técnica padrão para se avaliar a densidade celular e a morfologia *in vivo* e *in vitro* sem artefatos nem danos à córnea (PIGATTO et al. 2006). Estudos sobre a avaliação do endotélio da córnea à microscopia especular, além de indivíduos da espécie humana (ABIB & BARRETO JÚNIOR 2001), tem seus relatos limitados a alguns animais, como suínos (VICENTI 2004), cães (GWIN et al. 1982; PIGATTO et al. 2008), gatos (PEIFFER et al. 1981, FRANZEN et al. 2010), coelhos (EDELHAUSER et al. 1981, SAILSTAD & PEIFFER 1981), equinos (ANDREW et al. 2001), lhamas e alpacas (ANDREW et al. 2002). No entanto, a maioria dos estudos não reporta a avaliação dos parâmetros endoteliais e sua relação com o avanço da idade.

As aves têm sido bastante utilizadas como modelo experimental em pesquisas oftálmicas (WAGGONER 1978; NICKLA et al. 1998, SCHMID et al. 2003, MONTIANI-FERREIRA et al. 2004; KAFARNIK et al. 2007, PRASHAR et al. 2007, TSUKAHARA et al. 2010, RITCHEY et al. 2011), uma vez que a similitude da córnea de galinhas com a córnea de humanos tem sido relatada. Isso faz com que as mesmas sirvam de modelo experimental para o estudo da reparação tecidual da córnea (FOWLER et al. 2004, RITCHEY et al. 2011). Neste sentido, a importância do tema, aliada à escassez de informações sobre o endotélio da córnea de aves,

motivaram a realização deste estudo. O modelo experimental selecionado foram galinhas da raça Leghorn branca, de diferentes idades e da mesma linhagem, o que permitiu a padronização das amostras. O fato dos animais serem de faixas etárias diferentes possibilitou a avaliação dos parâmetros endoteliais em função do avanço da idade. Neste estudo, todos os animais foram submetidos a exame oftálmico, tendo sido utilizados somente bulbos oculares hígidos.

Os animais disponibilizados para este estudo foram fêmeas. Estudos prévios em humanos, cães, suínos e coelhos observaram que o endotélio da córnea não sofre influência do sexo, em relação aos parâmetros endoteliais analisados neste estudo (LAULE et al. 1978, GWIN et al. 1982, MORITA 1995, TAMAYO-ARANGO et al. 2009).

A opção pelo estudo *in vitro*, utilizando animais destinados ao abate facilitou a realização do exame de microscopia especular, evitou a necessidade de contenção química e do ponto de vista ético trouxe menor repercussão, comparado ao uso de animais vivos. Estudos prévios, realizados com bulbos oculares enucleados demonstraram ser possível avaliar o endotélio da córnea em até seis horas *post-mortem* sem que ocorram alterações estruturais (ANDREW et al. 2001, VICENTI 2004, RODRIGUES et al. 2006, PIGATTO et al. 2006, PIGATTO et al. 2008, FRANZEN et al. 2010). Neste estudo, logo após o abate, os bulbos dos olhos foram mantidos em câmara úmida com solução salina a 0,9%. A utilização dos olhos em até três horas após a enucleação permitiu a manutenção da ultraestrutura endotelial. Nenhuma anormalidade nas células endoteliais foi constatada em qualquer imagem captada pelo microscópio especular.

O microscópio especular pode ser de contato ou não-contato. O aparelho de contato necessita do contato físico entre a córnea e a lente objetiva, já no microscópio especular de não-contato não há necessidade de contato da córnea em análise com a parte óptica da objetiva do aparelho (ABIB 2000). No presente estudo, optou-se pela microscopia especular de contato devido à disponibilidade deste equipamento. Este possui como vantagens permitir o exame de toda a superfície endotelial, além de focar com precisão determinadas áreas do mosaico endotelial. No equipamento de não-contato, a imagem obtida é uma imagem

aleatória, no local que o equipamento consegue a reflexão especular, o qual muitas vezes não corresponde ao local desejado para o exame (ABIB 2000).

As imagens especulares obtidas podem ser analisadas através de diferentes métodos, entre eles o método do retículo fixo, o método do retículo variável, o método de comparação, o método dos cantos celulares e o método dos centros celulares, (LAING et al. 1979, ABIB 2000, McCAREY et al. 2008). Neste estudo, foi utilizado o método do retículo fixo, no qual se delimita uma quantidade de células em um quadrilátero. Este método foi disponibilizado pelo *software* Celmax®, São Carlos, SP, Brasil. Foram avaliadas três imagens nítidas da região central da córnea de galinhas híbridas de diferentes faixas etárias, totalizando 150 células avaliadas por amostra.

Os estudos encontrados na literatura a respeito da comparação da densidade endotelial das regiões central e periférica da córnea apresentam resultados controversos. Estudos prévios reportaram que em humanos, coelhos e cães, não há diferença significativa nos parâmetros endoteliais entre as regiões central e periférica de córneas saudáveis (GWIN et al. 1982, MORITA 1995, McCAREY et al. 2008). No entanto, Amann et al. (2003) avaliaram, através da microscopia especular e de métodos histológicos, que a córnea de humanos possui uma densidade endotelial maior nas regiões paracentral e periférica quando comparadas com a região central. Estudos prévios, utilizando métodos histológicos de avaliação da densidade celular, demonstraram que na região central do endotélio da córnea a densidade foi de 10% a 15% menor que na região periférica (TAYLOR & HUNT 1981; SCHIMMELPFENNIG 1984). Já no estudo de Binder et al. (1979), que utilizaram a técnica de microscopia eletrônica de varredura e a de microscopia especular em olhos de cadáveres humanos, observaram uma densidade celular na região central do endotélio da córnea 10% superior à da região periférica.

A aplicação da microscopia especular de contato como fora realizada neste trabalho permitiu a análise e registro fotográfico do endotélio da córnea em todos os olhos dos animais estudados. Este exame revelou que o endotélio da córnea de galinhas possui regularidade no padrão de distribuição das células, sendo estas



uniformes em tamanho e formato, em todas as imagens avaliadas. Não se observou anormalidade nas células endoteliais. Os resultados observados mostraram que o endotélio normal de galinhas consistiu em uma monocamada de células hexagonais, em sua maioria, no entanto, também foram observadas células com quatro, cinco, e sete lados. O pleomorfismo entre os grupos estudados não apresentou diferença significativa, uma vez que os três grupos apresentaram valores semelhantes, os quais ficaram entre 71,5% a 74,5%. O padrão regular de células poligonais, avaliado através da microscopia especular, com predomínio de formato hexagonal, foi similar ao descrito em outras espécies (LAING et al. 1975, PEIFFER et al. 1981, SAILSTAD & PEIFFER 1981, YEE et al. 1987, MORITA 1995, VICENTI 2004, PIGATTO et al. 2008, FRANZEN et al. 2010), o que corrobora com o resultado do presente estudo.

No estudo de Pigatto et al. (2008) foram avaliados 20 olhos de 10 cães, machos ou fêmeas, com seis anos de idade e observou-se que o endotélio corneano normal na espécie é constituído por uma monocamada de células poligonais de tamanho e formato uniformes. Em relação ao pleomorfismo das células do endotélio, a maioria das células apresentou seis lados (68%), semelhante aos valores obtidos no presente estudo. Franzen et al. (2010) estudaram o endotélio de felinos domésticos, o qual se caracterizou por uma monocamada de células poligonais de formato e tamanho uniformes. O pleomorfismo variou entre 39% e 74%. Com o avanço da idade ocorreu aumento do pleomorfismo, o que difere do presente estudo, no qual o pleomorfismo permaneceu com valores similares entre os grupos estudados. No estudo de Vicenti (2004), valendo-se da microscopia especular de contato para análise do endotélio da córnea de suínos jovens, foi observado um padrão regular de células poligonais, com o predomínio de formato hexagonal.

Yee et al. (1987) realizaram microscopia especular do endotélio da córnea em diferentes espécies de vertebrados. O ganso, o rato, o coelho, o cão e o humano apresentaram um padrão regular de células endoteliais hexagonais, em sua maioria. Sailstad & Peiffer (1981) avaliaram, através da microscopia especular, o endotélio da córnea de 14 coelhos jovens, da raça Nova Zelândia branca. Como

resultados, obtiveram que as células endoteliais da região central formaram um padrão de mosaico endotelial com células predominantemente hexagonais, também semelhante ao que foi encontrado no presente estudo.

Neste trabalho, a densidade celular endotelial média de galinhas diminuiu com o avançar da idade. Conforme resultados obtidos em outros estudos, à semilidade do homem, outras espécies apresentam diminuição gradativa na densidade das células endoteliais da córnea com o avançar da idade (PEIFFER et al. 1981, GWIN et al. 1982, MORITA 1995, DOUGHTY et al. 2000, ANDREW et al. 2001, FRANZEN et al. 2010).

Gwin et al. (1982) estudaram o endotélio da córnea de 59 cães de diferentes faixas etárias, utilizando a microscopia especular. Os cães com menos de um ano de idade apresentaram densidade celular de 2600 células/mm<sup>2</sup>, sendo, em sua maioria, de formato hexagonal e tamanho uniforme. Cães com idade entre um e nove anos apresentaram uma diminuição da densidade endotelial, variando entre 2300 a 2500 células/mm<sup>2</sup>, sendo as células de formato hexagonal e tamanho uniforme. A avaliação da densidade celular endotelial em seis cães acima de dez anos revelou uma densidade de 1900 a 2100 células/mm<sup>2</sup>. Não foi observada diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo dos animais do mesmo grupo.

Andrew et al. (2001) analisaram com o microscópio especular, 52 olhos de 26 equinos, machos ou fêmeas, com idades variadas. A densidade média das células do endotélio da córnea foi de 3155 ± 765 células/mm<sup>2</sup>. A densidade celular decresceu com o envelhecimento. Não houve diferença significativa neste parâmetro relacionada ao sexo dos animais. Os valores não foram significativamente diferentes entre os olhos direito e esquerdo do mesmo animal. Não foi detectada correlação entre a espessura da córnea e a densidade celular endotelial. A diminuição da densidade endotelial com o avançar da idade está de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Franzen et al. (2010) investigaram o efeito da idade sobre a morfologia e a morfometria do endotélio da córnea de felinos domésticos. O estudo foi realizado utilizando-se um microscópio especular de contato. Um total de 18 gatos, divididos

em três grupos de acordo com a idade, foi avaliado. A densidade celular média de todas as faixas etárias foi de  $4482 \pm 572$  células/mm<sup>2</sup>. A densidade celular média dos animais entre um a três meses de idade foi de  $6493 \pm 771$  células/mm<sup>2</sup>, dos animais entre cinco e doze meses de idade foi de  $4082 \pm 627$  células/mm<sup>2</sup> e a dos animais entre 24 e 40 meses de idade foi de  $2873 \pm 319$  células/mm<sup>2</sup>. Assim, verificou-se que a densidade celular média da córnea normal de gatos diminuiu com a idade. Não se observou diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo de um mesmo animal, nem entre machos ou fêmeas.

Em relação à espécie humana, a densidade endotelial média da córnea de recém-nascidos é de aproximadamente 3500 a 4000 células /mm<sup>2</sup>, enquanto que no adulto esse valor baixa para aproximadamente 2500 células/mm (SVEDBERGH & BILL 1972, TUFT & COSTER 1990, ABIB 2000, JOYCE 2003). A diminuição da densidade endotelial com o avançar da idade corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

No presente trabalho, a área celular média foi avaliada empregando-se fórmula já estabelecida: Área Celular Média =  $10^6$ /Densidade Endotelial Média (ABIB 2000, McCAREY et al. 2008). Observou-se aumento na área celular média com o avanço da idade, entre os grupos estudados. O estudo de Franzen et al. (2010) também mostrou haver aumento na área celular média das células endoteliais com o avanço da idade, em gatos de diferentes faixas etárias, com valores médios de  $154 \mu\text{m}^2$  a  $348 \mu\text{m}^2$ .

No presente estudo, a área celular média aumentou em paralelo à diminuição da densidade celular. Nesta pesquisa, o polimorfismo foi similar em todos os grupos e não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Resultados de estudos anteriores reportaram não haver diferença significativa quanto ao pleomorfismo em função da idade (GWIN et al. 1982, FRANZEN et al. 2010).

Neste estudo não se observaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos parâmetros endoteliais estudados entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo. Estudos prévios relatam a inexistência de diferenças, em relação aos parâmetros endoteliais obtidos entre os bulbos dos olhos direito e esquerdo

(PEIFFER et al. 1981, GWIN et al. 1982, MORITA 1995, ANDREW et al. 2001, TAMAYO-ARANGO et al. 2009, FRANZEN et al. 2010). Já se é estabelecido que a densidade endotelial de ambos os olhos saudáveis de um mesmo paciente apresenta valores similares (STAPLETON & PEIFFER 1979, PEIFFER et al. 1981, GWIN et al. 1982, ANDREW et al. 2001, FRANZEN et al. 2010), logo a avaliação de um olho permite inferir os resultados obtidos para o olho adelfo.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que o endotélio da córnea de galinhas é formado por células poligonais de padrão regular, com predomínio de formato hexagonal. O endotélio da córnea de galinhas sofreu alterações decorrentes da idade no que tange a morfometria, mas no que diz respeito ao pleomorfismo, não ocorreram alterações em resposta ao envelhecimento.

## REFERÊNCIAS

- Abib F.C. 2000. Microscopia especular de córnea: manual e atlas. 1.ed. Rio Med Livros, Rio de Janeiro. 140 p.
- Abib F.C. & Barreto Júnior, J. 2001. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *J. Cataract. Refract. Surg.* 27:1574-1578.
- Amann J., Holley G.P., Lee S-B. & Edelhauser H.F. 2003. Increased Endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am. J. Ophthalmol.* 135:584-590.
- Andrew S.E., Ramsey D.T., Hauptamn J.G. & Brooks D.E. 2001. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *Am. J. Vet. Res.* 62:479-482.
- Andrew S.E., Willis A.M. & Anderson, D.E. 2002. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *Am. J. Vet. Res.* 63:326-329.
- Binder P.S., Akers P. & Zavala E.Y. 1979. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmol.* 86:1831-1847.

- Collin S.P. & Collin H.B. 1998. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clin. Exp. Optom.* 81:245-254.
- DelMonte D.W. & Kim T. 2011. Anatomy and physiology of the cornea. *J. Cataract Refract. Surg.* 37:588-598.
- Doughty M.J. 1989. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application. *Optom. Vis. Sci.* 66:626-642.
- Doughty M.J., Muller A. & Zaman M.L. 2000. Assessment of the reability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. *Cornea.* 19:148-158.
- Edelhauser, H. F. 1981. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Arch. Ophthalmol.* 99:1281-1287.
- Fowler W.C., Chang D.H. & Roberts B.C. 2004. A new paradigm for corneal wound healing research: the white leghorn chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Curr. Eye Res.* 28:241-250.
- Franzen A.A., Pigatto J.A.T., Abib F.C., Albuquerque L. & Laus J.L. 2010. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Vet. Ophthalmol.* 13:222-226.
- Gwin R.M., Lerner I., Warren J.K. & Gum G. 1982. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22:267-271.
- Joyce N.C. 2003. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog. Ret. Eye Res.* 22:359-389.
- Joyce N.C. 2012. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 95:16-23.
- Kafarnik C., Fritsche J. & Reese S. 2007. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet. Ophthalmol.* 10:222-230.
- Laing R.A., Sandstrom M.M. & Leibowitz H.M. 1975. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Arch. Ophthalmol.* 93:143-145.
- Laing R.A., Sandstrom M.M. & Leibowitz H.M. 1979. Clinical specular microscopy. *Arch. Ophthalmol.* 97:1714-1719.

- Laule A., Cable M.K., Hoffmann C.E. & Hanna C. 1978. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch. Ophthalmol.* 96:2031-2035.
- Montiani-Ferreira F., Cardoso F. & Petersen-Jones S. 2004. Postnatal development of central corneal thickness in chicks of *Gallus gallus domesticus*. *Vet. Ophthalmol.* 7:37-39.
- McCarey B.E., Edelhauser H.F. & Lynn M.J. 2008. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea.* 27:1-16.
- Morita H. 1995. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *J. Vet. Med. Sci.* 57:273-277.
- Nickla D.L., Wildsoet C. & Wallman J. 1998. The circadian rhythm in intraocular pressure and its relation to diurnal ocular growth changes in chicks. *Exp. Eye Res.* 66:183-193.
- Peiffer R.L. & Devanzo R.J., Cohen K.L. 1981. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. *Am. J. Vet. Res.* 42:854-855.
- Pigatto J.A.T., Andrade M.C, Laus J.L., Santos J.M., Brooks D.E., Guedes P.M. & Barros P.S.M. 2004. Morphometric analysis of the corneal endothelium of yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Vet. Ophthalmol.* 7:205-208.
- Pigatto J.A.T., Laus J.L., Santos J.M., Cerva C., Cunha L.S., Ruoppolo V. & Barros P.S.M. 2005. Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J. Zoo. Wildl. Med.* 36:702-705.
- Pigatto J.A.T., Abib F.C., Pereira G.T., Barros P.S.M., Freire C.D. & Laus J.L. 2006. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43:476-480.
- Pigatto J.A.T., Cerva C., Freire C.D., Abib F.C., Bellini L.P., Barros P.S.M. & Laus J.L. 2008. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesq. Vet. Bras.* 28:427-430.
- Prashar A., Guggenheim J.A., Erichsen J.T., Hocking P.M. & Morgan J.E. 2007. Measurement of intraocular pressure (IOP) in chickens using a rebound

- tonometer: qualitative evaluation of variance due to position inaccuracies. *Exp. Eye Res.* 85:563-571.
- Ritchey E.R., Code K., Zelinka C.P., Scott M.A. & Fischer A.J. 2011. The chicken cornea as a model of wound healing and neuronal re-innervation. *Mol. Vis.* 17:2440-2454.
- Rodrigues G.N., Laus J.L., Santos J.M., Rigueiro M.P. & Smith R.L. 2006. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet. Ophthalmol.* 9:101-107.
- Sailstad D.M. & Peiffer R.L. 1981. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Lab. Anim.* 15:393-395.
- Schimmelpfennig B.H. 1984. Direct and indirect determination of nonuniform cell density distribution in human corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25:223-229.
- Schmid K.L., Hill T., Abbott M., Humphries M., Pyne K. & Wildsoet C.F. 2003. Relationship between intraocular pressure and eye growth in chick. *Ophthalmol. Physiol. Opt.* 23:25-33.
- Sheng H. & Bullimore M.A. 2007. Factors affecting corneal endothelial morphology. *Cornea.* 26:520-525.
- Stapleton S. & Peiffer R.L. 1979. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *Am. J. Vet. Res.* 40:1803-1804.
- Svedbergh B. & Bill A. 1972. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Act. Ophthalmol.* 50:321-335.
- Tamayo-Arango L.J., Baraldi-Artoni S.M., Laus J.L., Mendes-Vicenti F.A., Pigatto J.A.T. & Abib F.C. 2009. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Cienc. Rural.* 39:117-122.
- Taylor M.J. & Hunt C.J. 1981. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br. J. Ophthalmol.* 65:815-819.
- Tsukahara N., Tani Y., Lee E., Kikuchi H., Endoh K., Ichikawa M. & Sugita S. 2010. Microstructure characteristics of the cornea in birds and mammals. *J. Vet. Med. Sci.* 72:1137-1143.

- Tuft S.J. & Coster .D.J. 1990. The corneal endothelium. *Eye*. 4:389-424.
- Vicenti, F. M. 2004. Morfologia e morfometria do endotélio corneano de suínos (*Sus scrofa domesticus*, LINNAEUS, 1758) à microscopia especular. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 61p.
- Waggoner P.R. 1978. Scanning electron microscopy of the developing chick anterior corneal epithelium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 44:217-225.
- Waring G.O., Krohn M.A., Ford G.E., Harris R.R., Rosenblatt L.S & Waring, G. O. 1980. Four methods of measuring human corneal endothelium cells from specular photomicrographs. *Arch. Ophthalmol.* 98:848-855.
- Waring G.O., Bourne W.M., Edelhauser H.F. & Kenyon K.R. 1982. The corneal endothelium. *Ophthalmol.* 89:531-590.
- Yee R.W., Edelhauser H.F. & Stern M.E. 1987. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Exp. Eye Res.* 44:703-714.



## **5 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que o endotélio da córnea de galinhas é composto por células poligonais de padrão regular, com predomínio de formato hexagonal. O endotélio da córnea de galinhas sofreu alterações decorrentes da idade no que tange a morfometria, porém, no que diz respeito ao pleomorfismo, não ocorreram alterações em resposta ao envelhecimento.

## REFERÊNCIAS

- ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000, 140 p.
- ABIB, F. C.; BARRETO JÚNIOR, J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.27, p.1574-1578, 2001.
- ALP, B. N. *et al.* The effect of povidine iodine on the corneal endothelium. **Cornea**, v.19, n.4, p.546-550, 2000.
- ANDREW, S. E. *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.
- ANDREW, S. E.; WILLIS, A. M.; ANDERSON, D. E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.3, p.326-329, 2002.
- AVILA, N. V.; McFADDEN, S. A. A detailed paraxial schematic eye for the white leghorn chick. **Journal of Comparative Physiology A**, v.196, p.825-840, 2010.
- BAHN, C. F. *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.27, n.1, p.44-51, 1986.
- BAROODY, R. A. *et al.* Ocular development and aging. 1. Corneal endothelial changes in cats and in free-ranging and caged rhesus monkeys. **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.
- 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. M.; KAUFMAN, H. E. Endothelial damage associated with intraocular lens. **American Journal of Ophthalmology**, v.81, p.482-485, 1976.
- BOURNE, W. M.; NELSON, L. R.; HODGE, D. O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.38, n.3, p.779-782, 1997.
- BOURNE, W. M. Biology of the corneal endothelium in health and in disease. **Eye**, v.17, p.912-918, 2003.
- BOURNE, W. M.; McLAREN, J. W. Clinical responses of the corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v.78, p.561-572, 2004.

CAVANAGH, 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.

CHIOU, A. G-Y. *et al.* Confocal microscopy in the iridocorneal endothelial syndrome. **British Journal of Ophthalmology**, v.83, p.697-702, 1999.

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.

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

DeLMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.37, p.588-598, 2011.

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

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

DOUGHTY, M. J. Are there geometric determinants of cell area in rabbit and human corneal endothelial cell monolayers? **Tissue & Cell**, v.30, n.5, p.537-544, 1998.

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

FOWLER, W. C. *et al.* A new paradigm for corneal wound healing research: the white leghorn chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Current Eye Research**, v.28, p.241-250, 2004.

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

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

GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.25, p.1056-1060, 1984.

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

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

HARA, M. *et al.* Comparison of confocal biomicroscopy and noncontact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. **Cornea**, v.22, n.6, p.512-515, 2003.

HODSON, S.; MILLER, F. The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. **The Journal of Physiology**, v.262, p.563-577, 1976.

HOLLINGSWORTH, J. *et al.* A population study of the normal cornea using an *in vivo* slit-scanning confocal microscope. **Optometry & Visual Science**, v.78, p.706-711, 2001.

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.

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

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

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

KAFARNIK, C.; FRITSCHKE, J.; REESE, S. *In vivo* confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n.4, p.222-230, 2007.

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

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

LAING, R. A. *et al.*, Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental Eye Research**, v.22, p.587-594, 1976.

LAING, R. A.; SANDSTROM, M. M.; LEIBOWITZ, H. M. Clinical specular microscopy. **Archives of Ophthalmology**, v.97, p.1714-1719, 1979.

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

LEEM, H. S.; LEE, K. J.; SHIN, K. C. Central corneal thickness and corneal endothelial cell changes caused by contact lens use in diabetic patients. **Yonsei Medical Journal**, v.52, n.2, p.322-325, 2011.

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

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

MAURICE, D. M. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. **Experientia**, v.24, n.11, p.1094-1095, 1968.

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

MIMURA, T. *et al.* In vivo confocal microscopy of human cornea covered with human amniotic membrane. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.52, p.493-496, 2008.

MINSKY, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. **Scanning**, v.10, p.128-138, 1988.

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

MONTIANI-FERREIRA, F.; CARDOSO, F.; PETERSEN-JONES, S. Postnatal development of central corneal thickness in chicks of *Gallus gallus domesticus*. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n.1, p.37-39, 2004.

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

NICKLA, D. L.; WILDSOET, C.; WALLMAN, J. The circadian rhythm in intraocular pressure and its relation to diurnal ocular growth changes in chicks. **Experimental Eye Research**, v.66, p.183-193, 1998.

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.

OLIVEIRA, F.; MOTTA, A. C. O.; MUCCIOLI, C. Corneal specular microscopy in infectious and noninfectious uveitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.72, n.4, p.457-461, 2009.

- PEIFFER, R. L.; DEVANZO, R. J.; COHEN, K. L. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.5, p.854-855, 1981.
- PIGATTO, J. A. T. *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 morfométrica do endotélio corneano do 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 and Animal Science**, v.43, n.4, p.476-480, 2006.
- PIGATTO, J. A. T. *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 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.
- PRASHAR, A. *et al.* Measurement of intraocular pressure (IOP) in chickens using a rebound tonometer: qualitative evaluation of variance due to position inaccuracies. **Experimental Eye Research**, v.85, p.563-571, 2007.
- RITCHEY, E. R. *et al.* The chicken cornea as a model of wound healing and neuronal re-innervation. **Molecular Vision**, v.17, p.2440-2454, 2011.
- 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.
- RUIZ, J. M.; MEDRANO, M.; ALIÓ, J. L. An improved method of vital staining of the corneal endothelium. **Ophthalmic Research**, v.23, v.1, p.27-30, 1991.
- SAILSTAD, D. M.; PEIFFER, R. L. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. **Laboratory Animals**, v.15, p.393-395, 1981.
- SCHMID, K. L. *et al.* Relationship between intraocular pressure and eye growth in chick. **Ophthalmology Physiology and Optics**, v.23, p.25-33, 2003.
- SCHUTTEN, W. H.; VAN HORN, D. L. Corneal endothelial cell shrinkage after critical point drying. **Annals of Ophthalmology**, v.12, 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.
- SHENG, H.; BULLIMORE, M. A. Factors affecting corneal endothelial morphology. **Cornea**, v.26, p.520-525, 2007.
- SLATTER, D. Córnea e esclera. In: **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p.283-338.
- SPERLING, S. Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypan blue. **Acta Ophthalmologica**, v.55, p.573-580, 1977.
- STAPLETON, S.; PEIFFER, R. L. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.12, p.1803-1804, 1979.
- STURROCK, G. D.; SHERRARD, E. S.; RICE, N. S. C. Specular microscopy of the corneal endothelium. **British Journal of Ophthalmology**, v.62, p.809-814, 1978.
- SVEDBERGH, B.; BILL, A. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**, v.50, p.321-335, 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, p.815-819, 1981.
- TSUKAHARA, N. *et al.* Microstructure characteristics of the cornea in birds and mammals. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, n.9, p.1137-1143, 2010.
- TUFT, S. J.; WILLIAMS, K. A.; COSTER, D. J. Endothelial repair in the rat cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.27, p.1199-1204, 1986.
- 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 & Visual Science**, v.16, n.7, p.597-613, 1977.
- VICENTI, F. M. **Morfologia e morfometria do endotélio corneano de suínos (*Sus scrofa domesticus*, LINNAEUS, 1758) à microscopia especular**. 2004. 61 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- WAGGONER, P. R. Scanning electron microscopy of the developing chick anterior corneal epithelium. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.44, p.217-225, 1978.

WAHL, C. *et al.* The effects of light regimes and hormones on corneal growth *in vivo* and in organ culture. **Journal of Anatomy**, v.219, p.766-775, 2011.

WARING, G. O. *et al.* Four methods of measuring human corneal endothelium cells from specular photomicrographs. **Archives of Ophthalmology**, v.98, p.848-855, 1980.

WARING, G. O. *et al.* The corneal endothelium. **Ophthalmology**, v.89, p.531-590, 1982.

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

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