

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE CHINCHILAS (*Chinchilla lanigera*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR**

Bernardo Stefano Bercht

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 CHINCHILAS (*Chinchilla lanigera*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR**

Autor: Bernardo Stefano Bercht

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

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araújo

PORTO ALEGRE  
2012

## CIP - Catalogação na Publicação

Stefano Bercht, Bernardo  
AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE CHINCHILAS  
(Chinchilla lanigera) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS  
UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR / Bernardo  
Stefano Bercht. -- 2012.  
56 f.

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto.  
Coorientadora: Ana Cristina Pacheco de Araújo.

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. roedor. 2. córnea. 3. parâmetros endoteliais. 4.  
microscopia especular de contato. I. Tadeu Pigatto,  
João Antonio, orient. II. Pacheco de Araújo, Ana  
Cristina, coorient. III. Título.

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

Bernardo Stefano Bercht

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE CHINCHILAS (*Chinchilla lanigera*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR

Aprovado em

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>. Dr Carlos Afonso de Castro Beck  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. André Silva Carissimi  
Membro da Comissão

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho a minha amada esposa.**

## **AGRADECIMENTOS**

Este autor pretende primeiramente demonstrar o seu total agradecimento e apreciação pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a Faculdade de Veterinária e ao programa de pós graduação em ciências veterinárias que durante o passar do anos sempre teve como objetivo manter o nível da educação do estado e do país, formando sempre profissionais capacitados.

Agradeço ao Médico Veterinário Rogério Oliveira por disponibilizar a estrutura e a equipe da Chillacenter para viabilizar a realização deste projeto.

Agradeço ao professor e orientador João Antonio Tadeu Pigatto por disponibilizar seu tempo e principalmente seu conhecimento, sem os quais este projeto não poderia ser realizado.

Agradeço a toda equipe do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS pela dedicação e vontade com que realizam os atendimentos, procedimentos cirúrgicos e projetos de pesquisa.

Agradeço as amigas Luciane de Albuquerque, Paula S. Hünning, Luciana Paccico e Fabiana Quartiero pelo companheirismo sempre demonstrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de recursos e equipamento utilizado para a realização da pesquisa.

Finalmente gostaria de agradecer sinceramente a banca examinadora, que disponibilizou o seu precioso tempo para avaliar este trabalho de pesquisa.

## RESUMO

O endotélio é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea, sendo fundamental na manutenção da transparência desta estrutura. Embora as chinchilas (*Chinchilla lanigera*) sejam utilizadas em pesquisas oftálmicas, não existem dados referentes ao endotélio da córnea nesta espécie. Portanto, objetivou-se avaliar a densidade celular, a paquimetria, a área celular média e a morfologia do endotélio da córnea de chinchilas em diferentes faixas etárias. Foram estudados 60 bulbos oculares de 30 chinchilas, machos ou fêmeas, de diferentes faixas etárias. As chinchilas foram subdivididas em três grupos com 10 animais cada, designados por: G I (animais com idade entre dois a quatro meses); G II (animais com 11 meses de idade) e G III (animais com quatro anos de idade). A densidade celular endotelial média nos animais dos grupos G I, G II e G III foi de respectivamente  $3385,39 \pm 507,53$ ,  $2565,51 \pm 220,46$  e  $1812,82 \pm 117,92$  células/mm<sup>2</sup>. A área celular média foi de respectivamente  $301,51 \pm 43,94$ ,  $392,46 \pm 33,34$  e de  $553,79 \pm 35,70$  μm<sup>2</sup> para G I, G II e G III. Os resultados apontam decréscimo da densidade, do pleomorfismo, e aumento da área celular média com o aumento da idade. A espessura da córnea aumentou em animais mais velhos. Conclui-se que o endotélio da córnea de chinchilas sofre alterações com o avanço da idade.

**Palavras chave:** roedor, córnea, morfologia, parâmetros endoteliais, microscopia especular de contato.

## ABSTRACT

The corneal endothelium is a monolayer of interconnected flattened polygonal cells that cover the back surface of the cornea, it is essential for the maintenance of its transparency. Due to the complete lack of data on the endothelial cells of chinchilla (*Chinchilla lanigera*) and its possible use as an animal model in ophthalmic research, the objective was to evaluate the cellular density, pachymetry, the average cell area and morphology of the corneal endothelium of chinchillas in different age groups. It was studied 60 eyes of 30 chinchillas, male or female, of different ages. Chinchillas were divided into three groups with 10 animals each, designated by: G I (animals aged two to four months), G II (animals with 11 months) and G III (animals with four years of age). The mean endothelial cell density in the animals of G I, G II and G III were respectively  $3385,39 \pm 507,53$ ,  $2565,51 \pm 220,46$  and  $1812,82 \pm 117,92$  cells/mm<sup>2</sup>. The average cell area was respectively  $301,51 \pm 43,94$ ,  $392,46 \pm 33,34$  and  $553,79 \pm 35,70$   $\mu\text{m}^2$  for GI, G II and G III. The results indicate a decrease in density, pleomorphism, and increased in average cell area with increasing age. Corneal thickness increased in older animals. The corneal endothelium of chinchillas changes with advancing age.

**Keywords:** *rodent, cornea, morphology, endothelial parameters, contact specular microscopy.*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: por cento

&: e

$\mu\text{m}^2$ : micrômetros quadrados

$\mu$ : micrômetro

et al.: e outros

G: grupo

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

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MEC: microscopia especular de contato

DEC: densidade endotelial central

DEP: densidade endotelial periférica

ECCT: espessura corneana central total

ECPT: espessura corneana periférica total

ACM : área celular endotelial central

APM: área celular endotelial periférica

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

OD: olho direito

OE: olho esquerdo

mg: miligramas

min: minuto

mm: milímetros

p: probabilidade

RPL: reflexo pupilar a luz

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V: volume

Dr.: Doutor

Prof.: Professor

$\text{mm}^2$ : milímetro quadrado

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Imagem fotográfica do microscópio especular de contato.	33
<b>Figura 2 -</b>	Imagem fotográfica da lente objetiva do microscópio especular de contato sobre a região central da córnea do bulbo do olho de chinchila com quatro meses de idade..	33
<b>Figura 3 -</b>	Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de uma chinchila com dois meses de idade, com densidade celular de 4020 células/mm <sup>2</sup> .	34
<b>Figura 4 -</b>	Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de uma chinchila com 11 meses de idade, com densidade celular de 2788 células/mm <sup>2</sup> .	35
<b>Figura 5 -</b>	Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de uma chinchila com quatro anos de idade, com densidade celular de 1930 células/mm <sup>2</sup> .	36

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Diagramas de caixa da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) do OD para os grupos I, II e III, indicando que a variação da idade tem um efeito estatisticamente significativo sobre a densidade endotelial. 37
- Gráfico 2 -** Diagramas de caixa da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) do OE para os grupos I, II e III, indicando que a variação da idade tem um efeito estatisticamente significativo sobre a densidade endotelial. 37

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1 -</b>	Valores médios da densidade celular (células/mm <sup>2</sup> ) e desvio padrão de células endoteliais da região central e periférica da córnea de chinchilas nas diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular.	35
<b>Tabela 2 -</b>	Valores médios da área celular (µm <sup>2</sup> ) e desvio padrão de células endoteliais da região central e periférica da córnea de chinchilas nas diferentes faixas etárias avaliados utilizando a microscopia especular.	38
<b>Tabela 3 -</b>	Valores médios de pleomorfismo celular (%) e desvio padrão de células endoteliais da região central de chinchilas nas diferentes faixas etárias avaliados utilizando a microscopia especular.	39
<b>Tabela 4 -</b>	Valores médios da paquimetria corneana média (µm) e desvio padrão de células endoteliais da região central e periférica de chinchilas nas diferentes faixas etárias avaliados utilizando a microscopia especular.	40
<b>Tabela 5 -</b>	Valores médios do diâmetro da córnea (mm) e desvio padrão da córnea de chinchilas nas diferentes faixas etárias.	41

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Endotélio corneano</b> .....	16
<b>2.1.1 Fisiologia endotelial</b> .....	19
<b>2.2 Reparação endotelial</b> .....	21
<b>2.3 Métodos de avaliação do endotélio corneano</b> .....	23
<b>2.3.1 Microscopia especular</b> .....	24
<b>2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	27
<b>3 ARTIGO: Avaliação do endotélio da córnea de chinchilas</b> <b>(<i>Chinchilla lanigera</i>) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia</b> <b>especular</b>	29
Abstract.....	30
Introdução.....	30
Material e métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão e conclusão.....	42
Referências.....	46
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea (TUFT & COSTER, 1990; MCCAREY et al., 2008). Na maioria dos vertebrados, o mosaico endotelial consiste em células com formato hexagonal, embora também possam ser encontradas células com quatro, cinco, sete e oito lados (SVEDBERGH & BILL, 1972; COLLIN & COLLIN, 1998, PIGATTO, 2004; PIGATTO et al., 2006).

A camada endotelial é fundamental na manutenção da transparência da córnea e está sujeita a alterações fisiológicas e a lesões traumáticas ou inflamatórias decorrentes de afecções ou da manipulação cirúrgica intraocular. Quando as perdas endoteliais não forem compensadas pelas células remanescentes pode ocorrer alteração no mosaico endotelial ocasionando diversos graus de edema de córnea (LANDSHMAN et al., 1989; TUFT & COSTER, 1990; ABIB & BARRETO, 2001; PIGATTO, 2004).

Na avaliação morfológica e morfométrica do endotélio corneano de animais e humanos podem ser empregados métodos de investigação clínica, como a microscopia especular e a microscopia confocal (GWIN et al., 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CANAVAGH et al., 2000; JALBERT et al., 2003; PIGATTO et al., 2006; KAFARNIK et al., 2007; PIGATTO et al., 2008). A microscopia especular tem sido considerada uma ferramenta confiável e padronizada na realização da morfometria do mosaico endotelial em diversas espécies. As alterações endoteliais são consideradas parâmetros importantes para a avaliação de lesões endoteliais, e para a determinação da segurança das técnicas cirúrgicas intraoculares (ABIB, 2006; PIGATTO et al., 2006; MCCAREY et al., 2008).

Os principais parâmetros avaliados em estudos relativos ao endotélio corneano utilizando a microscopia especular são: a densidade celular, a área celular, e a variação no tamanho e na forma das células do mosaico endotelial (ABIB, 2006; MCCAREY et al., 2008). Os índices de pleomorfismo, expresso comumente pelo percentual de células hexagonais, e de polimegatismo, dado pelo coeficiente de variação da área celular, são obtidos de forma mais fidedigna pela microscopia especular, visto que o processo de fixação das células para microscopia de varredura pode ocasionar distorções do mosaico endotelial (DOUGHTY, 2006).

Os parâmetros endoteliais normais de algumas espécies já foram estudados, incluindo: humanos (LAULE A. et al, 1978; ABIB & BARRETO, 2001), suínos

(TAMAYO-ARANGO et al., 2009), coelhos (SAILSTAD & PEIFFER, 1981; ALP et al., 2000, OJEDA et al., 2001), cães (GWIN et al., 1982; RODRIGUES 1999; PIGATTO et al., 2006), equinos (ANDREW et al., 2001), lhamas, alpacas (ANDREW et al., 2002) e gatos (PEIFFER et al., 1981; FRANZEN, 2010).

A chinchila é um termo que se refere indistintamente a duas espécies de roedores noturnos intimamente relacionados com cobaias: a chinchila de cauda curta, *Chinchilla brevicaudata*, e a de cauda longa *Chinchilla lanigera*. Ocorrem naturalmente apenas na América do Sul, principalmente na região da Cordilheira dos Andes, no Chile. Atualmente sua criação ocorre para fins comerciais com finalidade principal de produção de peles para o vestuário (LIMA et al., 2010; MÜLLER et al., 2010).

Quando comparado com outras espécies de roedores, o tempo de vida da chinchila é longo, atingindo por vezes duas décadas de idade. As chinchilas têm o corpo curto, cabeça grande, pernas delicadas, grandes orelhas sem pêlos, e uma espessa cauda longa (LIMA et al., 2010; MÜLLER et al., 2010).

Nos últimos anos, a procura por chinchilas, como animais de estimação, vem aumentando. Além disso, no âmbito da oftalmologia as chinchilas têm sido empregadas em pesquisas experimentais (HASSUL et al., 1976; DANIELS et al., 1978; HULLAR & WILLIAMS, 2006; LIMA et al., 2010; MÜLLER et al., 2010).

Várias características fazem deste animal um modelo de pesquisa desejável, entre elas a facilidade de manuseio, o tamanho pequeno o que permite a reprodução em ambientes menores, o fato de possuírem olhos e corpo relativamente grandes para um roedor, são animais que podem ser treinados, fazem poucos ruídos, as fezes e a urina têm baixo odor e são relativamente baratos para criação e aquisição (LIMA et al., 2010; MÜLLER et al., 2010). O fato das chinchilas possuírem olhos relativamente grandes, com medida axial em torno de 11.5 cm, e córnea ocupando quase 40% da superfície ocular total, com curvatura acentuada, evidencia a demanda por mais pesquisas no âmbito da oftalmologia (LIMA et al, 2010).

Uma compreensão das características morfológicas específicas e parâmetros fisiológicos do bulbo do olho normal destes animais são fundamentais para facilitar o diagnóstico de doenças oculares e aumentar as referências para a pesquisa.

Devido à popularidade crescente como animais de estimação, o seu uso na pesquisa, e frente à inexistência de dados referentes à morfologia endotelial desta espécie, o presente trabalho tem como objetivo estudar os parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea das chinchilas (*Chinchilla lanigera*) nas

diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular.

Das regiões central e periférica da córnea foram avaliadas a densidade celular média, a área celular média, o pleomorfismo e a espessura da córnea. Ainda, foi determinada a relação entre a idade e os parâmetros endoteliais mencionados.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Nos tópicos seguintes serão abordados os aspectos funcionais e estruturais do endotélio corneano, bem como as técnicas de avaliação deste.

### **2.1 Endotélio corneano**

O endotélio constitui-se na estrutura mais posterior da córnea, sendo embriologicamente derivado da crista neural. Na maioria dos vertebrados é formado por uma monocamada de células poligonais uniformes em forma e tamanho (DOUGHTY, 1998; BOTEON, 2000; SLATTER, 2005). Sua face anterior é voltada para a membrana de Descemet e a face posterior voltada para a câmara anterior em contato com o humor aquoso (TUFT & COSTER, 1990; BOTEON, 2000). Lateralmente, continua como endotélio trabeculado escleral. O mosaico endotelial foi descrito pela primeira vez em 1920 por Vogt utilizando-se a biomicroscopia com lâmpada de fenda (BOTEON, 2000).

As células endoteliais apresentam em sua maioria formato hexagonal, porém, podem-se ser encontradas células com quatro, cinco, sete e oito lados (RAO et al., 1982; TUFT & COSTER, 1990; DOUGHTY, 1998; PIGATTO et al., 2005a). Na maioria das espécies, o padrão hexagonal das células endoteliais varia entre 65 e 75%, formando uma estrutura regular e estável, com pequena variação no tamanho celular (AABERG, 1984; RAO et al., 1982; DOUGHTY, 1998).

A membrana celular do endotélio tem uma face posterior formada por microvilosidades e uma face anterior voltada à membrana de Descemet. Estas faces possuem vesículas pinocíticas, contendo substâncias que serão utilizadas pelas células estromais da córnea (TUFT & COSTER, 1990; BOTEON, 2000).

Prince (1964) descreveu o endotélio da córnea de coelhos como uma camada de células uniformes, desprovida de membrana basal, com núcleo alongado, largo e em formato de rim.

Com relação às dimensões das células endoteliais, existem diferenças que



variam de acordo com as espécies. Assim, nos humanos, a célula endotelial apresenta dimensões de 18 a 20  $\mu\text{m}$  na largura, 4 a 6  $\mu\text{m}$  na espessura e núcleo com 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro (BOTEON, 2000; TUFT & COSTER, 1990). Nos felinos, a célula endotelial apresenta diâmetro de 15 a 20  $\mu\text{m}$  (SAILSTAD & PEIFFER, 1981). Virtanen e colaboradores (1984), por meio da microscopia especular, descreveram a célula endotelial de coelhos normais que apresentavam diâmetro médio de  $20,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$  e área média de  $335,1 \pm 71,1 \mu\text{m}^2$ .

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

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

A superfície celular anterior do endotélio está em contato direto com a membrana de Descemet, não havendo complexos juncionais. Isto explica o fato das células endoteliais serem facilmente deslocadas por traumas mecânicos ou de forma proposital durante cirurgias intraoculares (TUFT & COSTER, 1990).

As microvilosidades, encontradas na membrana celular posterior, são estruturas que aumentam a superfície posterior das células endoteliais. Em humanos, observou-se a existência de 20 a 30 microvilosidades por célula, medindo entre 0,1 e 0,2  $\mu\text{m}$  de largura, entre 0,5 e 0,6  $\mu\text{m}$  de altura, e projetam-se para a câmara anterior (BOTEON, 2000). Em coelhos, verificou-se a presença de uma média de 63 microvilosidades por célula endotelial por meio da microscopia eletrônica de varredura (DOUGHTY, 1998).

As interdigitações são tortuosos prolongamentos da membrana lateral das células endoteliais, responsáveis pelo aumentando da superfície de contato entre elas. As

interdigitações podem estar associadas à função de bomba ativa destas células (OJEDA et al., 2001).

As membranas laterais da célula endotelial são unidas por complexos juncionais. Estes complexos são divididos em *zonula occludens*, a qual une as células do terço posterior próxima à câmara anterior, e em *macula occludens* e *macula adherens*, as quais se encontram nos dois terços anteriores das membranas laterais, porém são raras. A *macula adherens* foi denominada anteriormente de desmossoma (BOTEON, 2000). Hirsch e colegas (1976) relataram a presença de dois tipos de junções intercelulares no endotélio de coelhos, a primeira, de localização mais dorsal, denominada de apical e a segunda, logo abaixo dela, chamada de lateral.

O citoplasma da célula endotelial é rico em organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, bem como um desenvolvido aparato de golgi perinuclear. Isto sugere transporte ativo e produção de proteínas. As vesículas pinocíticas passam da membrana celular posterior para serem liberadas tanto no espaço celular lateral ou na membrana celular anterior (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990). A sua formação é dependente da temperatura e estão presumidamente ligadas com o transporte ativo de água e metabólitos. Grânulos de pigmento podem aparecer no citoplasma, provavelmente provenientes da melanina fagocitada que fora liberada pelo estroma da íris ou epitélio pigmentar (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990).

A técnica de microscopia especular permitiu avaliação da densidade endotelial e documentação fotográfica das células do endotélio de humanos e animais (ABIB, 2000; PIGATTO et al., 2006). Os coelhos apresentaram densidade endotelial média de  $2.998 \pm 326$  células/mm<sup>2</sup> (SAILSTAD & PEIFFER, 1981). Nos cães adultos jovens encontraram-se valores aproximados de 2.800 células/mm<sup>2</sup> (BEFANIS, PEIFFER & BROWN, 1981; PIGATTO et al., 2006). Também, nos felinos adultos jovens, observaram-se uma média de  $2.418 \pm 151$  células/mm<sup>2</sup> (BOURNE, 1994), enquanto que Franzen et al. (2010) registraram nesta espécie densidade média de 2.873 células/mm<sup>2</sup>.

Diversos estudos prévios observaram alterações na densidade endotelial em função da idade em humanos, macacos, ratos, gatos, cães e coelhos. E nestas espécies, a densidade celular endotelial é maior em indivíduos jovens e decresce com o envelhecimento (GWIN et al., 1982; BOTEON, 2000, ABIB & BARRETO, 2001; STAATZ & VAN HORN, 1980; BAROODY et al., 1987; BAHN, 1986; TUFT & COSTER, 1990).

Em humanos recém-nascidos, a densidade endotelial pode ser de até 7.500

células/mm<sup>2</sup>. Ocorre um rápido declínio da densidade no primeiro ano de vida, refletindo a hipertrofia celular de uma população endotelial fixa, em resposta ao crescimento do tecido corneano. Até os 20 anos de idade ocorre diminuta perda endotelial, a partir de então estima-se perda média de 0.52% até os 80 anos de vida. (YEE et al, 1985<sup>b</sup>; TUFT & COSTER, 1990; ABIB, 2000).

BAHN (1986) valendo-se da microscopia especular, afirmou que apesar da grande variação no tamanho da córnea de felinos, bovinos, caninos, cervos, coelhos e humanos adultos, todos apresentaram uma contagem endotelial central similar de 2.500 células/mm<sup>2</sup>.

### **2.1.1 Fisiologia endotelial**

A passagem dos raios luminosos até a retina depende de uma córnea transparente. Esta transparência é decorrente de fatores como a ausência de pigmentos e vasos sanguíneos, inervação não mielinizada e encontra-se em um estado de relativa deturgescência (ABIB, 2000).

A matrix de proteoglicano que envolve as fibras colágenas do estroma corneano produz uma pressão de embebição em torno de 60mmhg, o que tende a atrair a água para a córnea. As junções entre as células do epitélio corneano promovem uma barreira mecânica contra a passagem da água do filme lacrimal para o estroma. O mosaico endotelial por sua vez não apresenta junções celulares contínuas o que permite a transferência de fluidos da câmara anterior para a córnea, produzindo edema corneano (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990).

O endotélio é responsável pela manutenção da transparência da córnea devido a presença de dois mecanismos principais: a função mecânica de barreira e a bomba ativa de íons. Este estado de relativa deturgescência ocorre pela manutenção do equilíbrio dinâmico da córnea através do transporte ativo de íons pela bomba endotelial, forçando a saída de água da córnea e contrariando a tendência natural do estroma em absorvê-la (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985a; TUFT & COSTER 1990).

A saída de fluido da córnea depende do metabolismo aeróbico realizado pelas bombas endoteliais, principalmente por meio do transporte ativo de íons de bicarbonato, sódio e potássio. A energia utilizada na forma de ATP é produzida a partir da glicose nas mitocôndrias, através do ciclo de Krebs e da via das pentoses-fosfato. O oxigênio requerido pelas células endoteliais é difundido primariamente através da câmara

anterior. O movimento de fluido através do endotélio acontece de forma passiva e segue o fluxo dos íons que são ativamente transportados pela membrana posterior das células endoteliais (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985<sup>a</sup>; SLATTER, 2005).

A função barreira acontece pela presença das interdigitações e dos complexos juncionais, também chamados de junções *gap*, localizados no espaço intercelular. Os complexos mantêm as células endoteliais unidas e impedem a permeabilidade de solutos para o espaço intracelular. (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER 1990; ABIB, 2000).

A densidade das células endoteliais diminui com aumento da idade em diversas espécies. A perda celular é mais intensa nos primeiros anos de vida, em parte devido ao aumento do bulbo ocular e crescimento da córnea, ocorrendo nos primeiros cinco anos de vida no homem (YEE, 1985<sup>b</sup>; TUFT & COSTER 1990; ABIB, 2000).

Após avaliação da densidade endotelial de indivíduos da espécie humana, nas várias faixas etárias, Laule e colaboradores (1978) relataram que esta apresenta decréscimo gradativo desde o nascimento até a morte, surgindo áreas endoteliais com aparência de ausência de células na região central em 12% dos indivíduos na terceira década de vida e 67% nos indivíduos na nona década de vida.

Waring et al. (1982) relataram que no homem com o aumento da idade a perda celular não consegue ser suprida pela divisão das células remanescentes, com o objetivo de restabelecer a barreira funcional. As células endoteliais se alargam de forma desigual, causando irregularidade no seu tamanho e na sua forma.

## 2.2 Reparação endotelial

Ao longo da vida acontece uma perda fisiológica na densidade endotelial. Entretanto, diversas afecções também podem reduzir a densidade endotelial abaixo do limite mínimo para a manutenção da deturgescência corneana, levando ao edema de córnea. Traumas mecânicos, químicos, hipertensão ocular, cirurgias intraoculares e inflamação intraocular podem ocasionar diversos graus de lesão endotelial. Foi estimado ser necessário ao menos 10 a 15% da contagem endotelial total para preservar o equilíbrio dinâmico da córnea, cerca de 600 células/mm<sup>2</sup> (MISHIMA et al.,1985; TUFT & COSTER, 1990).

A reparação endotelial foi estudada em diversas espécies, embora tenha sido mais detalhadamente pesquisada nos leporinos e felinos (SAILSTAD & PEIFFER, 1981; MATSUDA et al.,1985; HUANG et al.,1989; HOFFMAN et al., 2009). Apesar de algumas importantes variações referentes à resposta endotelial a lesões, o processo cicatricial é semelhante em muitas espécies (TUFT & COSTER, 1990).

Uma lesão inicialmente estimula o processo cicatricial através de estímulos direcionados às células vizinhas, estas, se achatam e deslizam para cobrir o defeito e descartam as células lesionadas para a câmara anterior (WEIMAR et al., 1980; OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA et al., 1985; TUFT & COSTER, 1990). As células adjacentes quebram suas ligações intercelulares e desenvolvem pseudópodos, migrando em média 0.5 a 1.0 mm por dia, para cobrir o defeito, permanecendo achatadas e atenuadas durante este processo. Este movimento celular é mediado pela f-actina que se polimeriza no citoplasma celular. Células endoteliais em processo de migração apresentam mais organelas e menos vesículas endocíticas, não aparentando estarem cobertas por fibronectina. Quando acontece o encontro no centro da lesão à movimentação é inibida pelo contato celular, ocorrendo então uma onda inversa de células se reposicionando (WEIMAR et al., 1980; MISHIMA et al.,1985; TUFT & COSTER, 1990).

Em coelhos a reparação endotelial também acontece por mitose celular, havendo o aparecimento de figuras mitóticas na margem da lesão após 16 horas, com pico em 26 horas e reduzem-se a zero após cinco dias. (WEIMAR et al., 1980). Ao contrário, em primatas e felinos a reparação ocorre essencialmente por hipertrofia e migração celular,

sendo mínima a atividade de mitose. Nestas espécies, o processo de migração celular pode ocorrer por períodos prolongados de tempo (LAULE et al., 1978; LANDSHMAN et al., 1989; HUANG et al., 1989; BOURNE, 1994; JACKSON et al., 1995). Embora já tenha sido demonstrada a presença de figuras mitóticas tanto *in vitro* quanto *in vivo* no endotélio humano, a mitose não parece acontecer em níveis suficientes para repor as células danificadas, seja pelo processo natural de envelhecimento ou por lesões endoteliais. Desta forma, o endotélio humano é considerado finito e com reservas celulares limitadas. A distribuição celular do endotélio pode permanecer alterada mesmo após 20 anos da lesão inicial, havendo densidade celular reduzida próximo do foco lesional. Os coeficientes de variação celular e de hexagonalidade tendem a normalidade após cinco meses da lesão, indicando estabilidade do mosaico endotelial (TREFFERS, 1982; TUFT & COSTER, 1990; ABIB, 2000).

Em um estudo comparativo entre coelhos e gatos, com lesão provocada por congelamento transcorneal de 10 e 50%, verificou-se com a utilização da microscopia eletrônica de varredura que a região endotelial lesionada de coelhos foi recoberta em cinco e 10 dias respectivamente, observando-se densidade endotelial semelhante à anterior da lesão. Devido à pequena capacidade de mitose do endotélio de felinos a regeneração foi mais tardia com presença de alongamento e migração endotelial (VAN HORN et al., 1977).

A funcionalidade do endotélio retorna de forma mais lenta e gradual quando comparado ao restabelecimento celular. Em coelhos, após congelamento transcorneano, o endotélio não retém mais fluoresceína após 14 dias, embora sejam necessários 21 dias para a deturgescência da córnea e diminuição da sua espessura. O mesmo estudo mostrou que após 21 dias da lesão endotelial houve o restabelecimento do padrão hexagonal do endotélio, porém as células tornaram-se mais irregulares (OLSEN & DAVANGER, 1984). Nos gatos, e presumivelmente nos primatas, com pouca capacidade mitótica, a funcionalidade endotelial poderá demorar vários meses até ser restabelecida (LANDSHMAN et al., 1989).

As células gigantes possuem o dobro do tamanho de uma célula endotelial normal. Em humanos, macacos, gatos e coelhos, com o uso da microscopia especular, observou-se que estas células são encontradas em córneas normais de coelhos e apenas em córneas traumatizadas das espécies humana, primata e felina, sendo visíveis a partir

de 48 horas após lesão endotelial. A presença das células gigantes aparenta ser uma resposta compensatória à ausência de mitose nestas espécies, demonstrando hipertrofia celular associada a uma menor densidade e a um maior pleomorfismo celular (JACKSON, GARDINER & ARCHER, 1995).

Tanto o envelhecimento, quanto os processos inflamatórios podem reduzir a habilidade de replicação e a migração das células endoteliais, interferindo no processo cicatricial. Estudo em coelhos revelou redução de 50% da regeneração em adultos se comparados aos jovens. Os animais idosos sintetizariam, mais lentamente e em menor quantidade, proteínas gênicas necessárias para a mitose (STAATZ & VAN HORN, 1980).

### **2.3 Métodos de avaliação do endotélio corneano**

Em 1920, Vogt relatou, pela primeira vez, a observação do mosaico endotelial pela biomicroscopia com lâmpada de fenda. Tal observação foi possível realizando-se a microscopia especular pela técnica de iluminação direta focal com grande magnificação. Na prática, esse exame é limitado, pois a magnificação insuficiente e o movimento do olho examinado comprometem a avaliação (JURKUNAS & COLBY, 2005).

Jurkunas e Colby (2005) relataram que as principais técnicas e instrumentos para avaliação clínica do endotélio corneal são: biomicroscopia com lâmpada de fenda, microscopia especular, microscopia confocal, paquimetria e fluorofotometria. Após avaliação das vantagens e desvantagens de cada técnica, concluíram que cada uma delas tem sua indicação e modalidade clínica na prática oftalmológica diária. Na avaliação morfológica e morfométrica do endotélio corneano de humanos e de animais, podem ainda ser empregados métodos de análise *in vitro*, como a microscopia eletrônica de varredura, de transmissão e a utilização de colorações vitais (GWIN et al., 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CANAVAGH et al., 2000; JALBERT et al., 2003; PIGATTO et al., 2006; PIGATTO et al., 2008).

A análise do pleomorfismo e do polimegatismo são parâmetros importantes para a determinação da função endotelial e para a análise do endotélio como tecido vivo. Pode ser determinada também a função metabólica do endotélio, a função da bomba endotelial, da integridade do efeito barreira e da paquimetria corneana. Todos estes métodos têm o objetivo de avaliar de alguma forma a função endotelial (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990; ABIB, 2000).

A fluorofotometria indica de forma quantitativa, através da análise da passagem da fluoresceína pelo endotélio, a integridade do efeito barreira. De forma geral, a permeabilidade a fluoresceína está aumentada após lesões endoteliais, assim como em doenças endoteliais como a distrofia endotelial de Fuchs (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990).

A microscopia confocal permite a análise *in vivo*, em alta resolução e a nível celular de praticamente todas as camadas da córnea, isto inclui o filme lacrimal pré corneano e a inervação estromal e subepitelial. O microscópio confocal já foi utilizado para avaliação *in vivo* da córnea de cães, gatos e pássaros (KAFARNIK et al., 2007). A análise endotelial mostrou boa correlação com os dados obtidos utilizando a microscopia especular (JALBERT et al., 2003; KAFARNIK et al., 2007).

A relação linear entre a hidratação estromal e a sua espessura indica que a avaliação da espessura corneana pode ser utilizada como índice de dano endotelial após, por exemplo, procedimentos intraoculares (MISHIMA, 1982; ABIB, 2000). A paquimetria da córnea pode ser realizada através da paquimetria ultrassônica, bem como utilizando o microscópio especular de contato e de não contato, havendo boa correlação entre estes métodos (MODIS et al., 2001). A medida de espessura da córnea pela paquimetria mostra de modo indireto a função endotelial, porque esta reflete o estado de sua deturgescência. A média da espessura central da córnea no homem é de, aproximadamente, 500  $\mu\text{m}$  e aumenta gradativamente em direção à periferia, ficando ao redor de 700  $\mu\text{m}$  (MODIS et al., 2002). Em felinos foi relatada uma paquimetria central média de 508  $\mu\text{m}$  (FRANZEN et al., 2010). Já em camundongos foi relatada uma espessura corneana média de 130  $\mu\text{m}$ , diferentemente do homem, nestes roedores a córnea apresenta um afinamento em relação à periferia com paquimetria média de 90  $\mu\text{m}$  (HENRIKSSON et al., 2009).

### **2.3.1 Microscopia especular**

O microscópio especular, desenvolvido por Maurice em 1968, é um dos métodos mais validados para análise clínica e como fonte de dados para pesquisa de parâmetros endoteliais. Este projeta uma fenda de luz na superfície corneana posterior em incidência quase normal. A maioria desta luz é transmitida para o humor aquoso, entretanto, uma pequena parcela de 0,02% é refletida pela porção posterior da córnea em direção as lentes do microscópio. Esta luz é refletida de forma especular, ou seja, em



uma imagem semelhante a um espelho, em que o ângulo da reflexão é igual ao ângulo da incidência. A luz especular é transmitida ao microscópio, formando então uma imagem do endotélio corneano, que pode ser capturada, armazenada e analisada (LAING et al., 1979; ABIB, 2000).

Laing et al. (1975) modificaram o microscópio especular descrito em 1968, permitindo não só a execução de exames *in vivo*, como o registro fotográfico do mosaico endotelial. Em 1976 ocorreram melhoramentos na técnica da microscopia especular *in vivo*, permitindo melhor resolução das imagens obtidas, sendo confirmada a segurança do exame em humanos (BOURNE, et al., 1976).

O microscópio especular é utilizado de forma rotineira na avaliação pré e pós-operatória do endotélio da córnea em indivíduos que passarão por cirurgias intraoculares (ABIB, 2000; MCCAREY et al., 2008). Ainda, é utilizado para determinar a toxicidade endotelial de diversos fármacos e foi amplamente utilizado para pesquisa da cicatrização endotelial (LAULE et al., 1978; LANDSHMAN et al., 1989; HUANG et al., 1989; BOURNE, 1994; JACKSON et al., 1995; LIOU et al., 2004).

Neubauer e colaboradores (1984) descreveram a aparência de células endoteliais danificadas quando visibilizadas pelo microscópio especular, correlacionando com a coloração endotelial utilizando o azul de trypan. Foi verificado que áreas escurecidas, do tamanho de 3 a 4 células endoteliais estão relacionadas com lesão endotelial. Diferente de pontos intracelulares escurecidos, e bordos celulares pouco visíveis, mais relacionados à baixa temperatura de armazenagem.

A microscopia especular pode ser realizada através da utilização de microscópios de contato e de microscópios de não contato. Na microscopia de contato, ocorre o contato da objetiva do microscópio com o epitélio da córnea do paciente, o que não ocorre nos microscópios de não contato (LAING et al., 1983; ABIB, 2000; MCCAREY et al., 2008).

A microscopia de contato requer a utilização de colírio anestésico. O contato da córnea com a objetiva do equipamento proporciona uma aplanção da curvatura corneana, levando a um aumento do reflexo especular, sendo possível a obtenção de uma imagem com até 800 células endoteliais. O exame é de execução potencialmente mais difícil, demorada e requerer um operador experiente (TUFT & COSTER, 1990; MCCAREY et al., 2008).

A microscopia de não contato é considerada de execução mais fácil, mais rápida e com menor possibilidade de lesão corneana, não necessitando o uso de colírios. Estes

equipamentos utilizam uma tecnologia de focalização automática, proporcionando um reflexo especular menor, por não aplainar a curvatura corneana, sendo normalmente possível a obtenção de imagens com 150-170 células (TUFT & COSTER, 1990; MCCAREY et al., 2008).

Jurkunas & Couby (2005) relataram que os microscópios espaciares podem ser classificados quanto ao modo de análise dos dados em: não-automatizados, semi-automatizados e automatizados. Nos microscópios não-automatizados a avaliação endotelial fica a cargo do operador. Nos semi-automatizados são oferecidos recursos para análise endotelial, porém é necessário que o operador interaja com o software e a imagem endotelial captada. Os automatizados oferecem recursos informatizados para a análise do mosaico endotelial, havendo mínima necessidade de interação do operador com o equipamento. Os equipamentos semi-automatizados foram considerados mais precisos pelos autores.

A análise da densidade endotelial celular, realizada normalmente por diferentes *softwares* contidos nos microscópios espaciares, pode ser dividida em: método do retículo (fixo ou variável), método da marcação dos centros celulares, método de comparação e método da marcação dos cantos celulares (ABIB, 2000; MCCAREY et al., 2008).

O método da marcação dos centros celulares é considerado o mais empregado em diferentes microscópios espaciares para avaliação da densidade endotelial. Consiste na marcação do centro da célula endotelial de um grupo de células vizinhas, com o cálculo da densidade celular por  $\text{mm}^2$  pela divisão do número de células contadas pela área ocupada por elas. É considerado um método de marcação celular fácil e rápido de ser realizado pelo operador. O erro da metodologia pode variar entre 0.5 e 5%, dependendo da habilidade do operador e da qualidade da imagem endotelial (ABIB, 2000; MCCAREY et al., 2008). O método do retículo fixo permite a avaliação da densidade endotelial por meio da contagem das células endoteliais contidas em um retículo de tamanho conhecido. Como forma de ajustar para as células que se encontram parcialmente fora do retículo, estas são contadas como células inteiras em apenas duas margens do retículo. Este método não permite a avaliação da área celular média ou da área celular individual (ABIB, 2000; MCCAREY et al., 2008).

Após estudo do endotélio corneal central e periférico pela microscopia especular de contato em pacientes submetidos à facectomia, foi encontrado um padrão celular diferente na periferia em relação à córnea central. Foi concluído que a microscopia

especular não deve ficar confinada à região central, com risco de produzir resultados que não representam o mosaico endotelial (RAO et al, 1978; MCCAREY et al., 2008).

Hirst (1980) fez algumas considerações sobre a microscopia especular e levantou alguns pontos de discussão que dizem respeito à padronização, reprodutibilidade, documentação e aplicação dos resultados dos exames clínicos.

McCarey (2008), em artigo de revisão, sugeriu que devem ser contadas diversas áreas do endotélio, com o maior número de células possíveis. De forma mais específica, ainda sugere avaliar três imagens endoteliais da região central e três da região periférica.

### **2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é o método de avaliação mais comumente utilizado para obter informações sobre a ultraestrutura endotelial (OJEDA, et al., 2001). Esta técnica tem sido utilizada em estudos relacionados à morfologia corneana (OJEDA, et al., 2001), à toxicidade de fármacos intracamerulares (ALP et al., 2000; HOLLEY et al., 2002; LIOU, CHIU & WANG, 2004; SEYHMUS et al., 2006) e à eficácia de meios de preservação da córnea (ARNDT, REESE & KOSTLIN, 2001). Foi amplamente utilizada na avaliação ultraestrutural e morfométrica do endotélio de aves, caninos, felinos, roedores, peixes, anfíbios e primatas (COLLIN & COLLIN, 2000; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; RODRIGUES et al, 2006; PIGATTO et al., 2009; TAMAYO-ARANGO et al., 2009).

Em um estudo comparativo do endotélio de diversos vertebrados, através do uso da microscopia eletrônica de varredura, foi avaliada a densidade endotelial, o polimegatismo, polimorfismo, bem como aspectos ultraestruturais do endotélio como a presença e tamanho dos cílios, das microvilosidades e interdigitações (COLLIN & COLLIN, 2000).

Durante a etapa de preparo celular, a amostra pode sofrer graus variados de retração (PIGATTO, 2004). Em estudo com córneas de coelhos verificou-se ocorrência de em média 31% de retração celular, levando a uma diminuição da área celular e aumento na densidade endotelial (BINDER, AKERS & ZAVALA 1979; SCHUTTEN & Van HORN, 1980; DOUGHTY, BERGMANSON & BLOCKER, 1997). A retração do endotélio varia conforme o método de fixação da córnea utilizado e pode ser reduzida através do método descrito por Doughty (2006). A retração ocorrida durante a

preparação da córnea não é uniforme e, portanto valores morfométricos obtidos com o MEV não podem ser correlacionados com os dados obtidos com a microscopia especular (SCHUTTEN & Van HORN, 1980; DOUGHTY, BERGMANSON & BLOCKER, 1997; DOUGHTY, 2006).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, Pigatto et al. (2005) estudando córneas de coelhos saudáveis, observaram predominantemente células hexagonais (75%), células pentagonais (14%) e heptagonais (11%).

### 3 ARTIGO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista Veterinary Ophthalmology (ISSN 1463-5224) e será traduzido para o inglês no momento da sua submissão.

#### **AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE CHINCHILAS (*Chinchilla lanigera*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR**

Bercht Bernardo S<sup>1</sup>, Albuquerque Luciane de<sup>1</sup>, Pigatto João AT<sup>1</sup>.

#### **Resumo**

**Objetivo:** O endotélio é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea, sendo fundamental na manutenção da transparência desta estrutura. Embora as chinchilas (*Chinchilla lanigera*) sejam utilizadas em pesquisas oftálmicas, não existem dados referentes ao endotélio da córnea nesta espécie. Portanto, objetivou-se avaliar a densidade celular, a paquimetria, a área celular média e a morfologia do endotélio da córnea de chinchilas em diferentes faixas etárias. **Procedimentos:** Foram estudados 60 bulbos oculares de 30 chinchilas, machos ou fêmeas, de diferentes faixas etárias. As chinchilas foram subdivididas em três grupos com 10 animais cada, designados por: G I (animais com idade entre dois a quatro meses); G II (animais com 11 meses de idade) e G III (animais com quatro anos de idade). **Resultados:** A densidade celular endotelial média nos animais dos grupos G I, G II e G III foi de respectivamente  $3385,39 \pm 507,53$ ,  $2565,51 \pm 220,46$  e  $1812,82 \pm 117,92$  células/mm<sup>2</sup>. A área celular média foi de respectivamente  $301,51 \pm 43,94$ ,  $392,46 \pm 33,34$  e de  $553,79 \pm 35,70$  µm para G I, G II e G III. Os resultados apontam decréscimo da densidade, do pleomorfismo, e aumento da área celular média com o aumento da idade. A espessura da córnea aumentou em animais mais velhos. **Conclusão:** O endotélio da córnea de chinchilas sofre alterações com o avanço da idade.

*Descritores: roedor, córnea, morfologia, parâmetros endoteliais, microscopia especular de contato.*

### Abstract

**Objective:** The corneal endothelium is a monolayer of interconnected flattened polygonal cells that cover the back surface of the cornea, it is essential for the maintenance of its transparency. Due to the complete lack of data on the endothelial cells of chinchilla (*Chinchilla lanigera*) and its possible use as an animal model in ophthalmic research, the objective was to evaluate the cellular density, pachymetry, the average cell area and morphology of the corneal endothelium of chinchillas in different age groups. **Procedures:** It was studied 60 eyes of 30 chinchillas, male or female, of different ages. Chinchillas were divided into three groups with 10 animals each, designated by: G I (animals aged two to four months), G II (animals with 11 months of age) and G III (animals with four years of age) **Results:** The mean endothelial cell density in the animals of G I, G II and G III were respectively  $3385.39 \pm 507.53$ ,  $2565.51 \pm 220.46$  and  $1812.82 \pm 117.92$  cells/mm<sup>2</sup>. The average cell area was respectively  $301.51 \pm 43.94$ ,  $392.46 \pm 33.34$  and  $553.79 \pm 35.70$   $\mu\text{m}^2$  for GI, G II and G III. The results indicate a decrease in density, pleomorphism, and increased in average cell area with increasing age. Corneal thickness increased in older animals. **Conclusion:** The corneal endothelium of chinchillas changes with advancing age.

*Keywords: rodent, cornea, morphology, endothelial parameters, contact specular microscopy.*

### INTRODUÇÃO

O endotélio corneano é uma monocamada de células achatadas, poligonais e interligadas que recobrem a superfície posterior da córnea. A camada endotelial é fundamental na manutenção da transparência da córnea e está sujeita a alterações fisiológicas e a lesões traumáticas ou inflamatórias decorrentes de afecções ou da manipulação cirúrgica intraocular<sup>(1,2,3)</sup>.

A microscopia especular de contato e de não contato tem sido uma ferramenta confiável e padronizada na avaliação do mosaico endotelial. Os parâmetros endoteliais normais já foram estudados em várias espécies, incluindo: humanos, suínos, coelhos, cães, equinos, lhamas, alpacas e gatos<sup>(3-14)</sup>.

As alterações endoteliais são consideradas importantes parâmetros na avaliação de lesões endoteliais, e na determinação da segurança dos procedimentos cirúrgicos intraoculares<sup>(2,3,4,11)</sup>. A microscopia especular não causa distorções ou alterações do endotélio da córnea, diferente de outras técnicas, como a microscopia eletrônica de varredura, cuja fixação e preparo da amostra pode distorcer de forma não homogênea o mosaico endotelial, sendo mais utilizada para avaliação da ultraestrutura celular<sup>(15,16)</sup>.

A chinchila é um termo que se refere indistintamente a duas espécies de roedores noturnos intimamente relacionados com cobaias: a chinchila de cauda curta *Chinchilla brevicaudata*, e a de cauda longa *Chinchilla lanigera*. Atualmente sua criação ocorre principalmente para fins comerciais com finalidade principal de produção de peles para o vestuário<sup>(17,18)</sup>.

Nos últimos anos, a procura por chinchilas, como animais de estimação, vem aumentando. Além disso, no âmbito da oftalmologia as chinchilas têm sido empregadas para pesquisas experimentais<sup>(17-20)</sup>. Várias características fazem deste animal um modelo de pesquisa desejável: a facilidade de manuseio, tamanho pequeno, o fato de possuírem olhos e corpo relativamente grandes para um roedor, podem ser treinados, fazem poucos ruídos, as fezes e a urina têm pouco odor e são relativamente baratos para criação e aquisição<sup>(17,18)</sup>. Por apresentarem olhos relativamente grandes, com medida axial em torno de 11.5 cm, e córnea ocupando quase 40% da superfície ocular total, com curvatura acentuada, mais pesquisas no âmbito da oftalmologia são necessários pra essa espécie<sup>(17)</sup>. A compreensão das características morfológicas específicas e dos parâmetros fisiológicos do olho normal destes animais é essencial para aumentar a base de conhecimentos<sup>(17,18)</sup>.

Devido à popularidade crescente como animais de estimação, o seu uso na pesquisa e à ausência de dados referentes ao endotélio desta espécie, este estudo tem como objetivo avaliar a paquimetria, a densidade celular endotelial, o diâmetro da córnea e a morfologia do endotélio da córnea de chinchilas (*Chinchilla lanigera*) de diferentes idades, utilizando a microscopia especular de contato. Ainda, pretende-se determinar a relação entre idade e os parâmetros endoteliais mencionados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 60 bulbos dos olhos de chinchilas (*Chinchilla lanigera*) com a pelagem Standart, machos ou fêmeas, de diferentes idades. Todos os animais foram submetidos ao exame oftálmico, que incluiu avaliação dos reflexos pupilares, biomicroscopia com lâmpada de fenda<sup>1</sup>, tonometria de rebote<sup>2</sup> e prova da fluoresceína<sup>3</sup>. Foram descartados animais com alterações oculares.

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).

Para a avaliação especular de contato do endotélio da córnea das chinchilas foram designados três grupos com 10 animais cada (20 olhos). As chinchilas foram subdivididas em três grupos com 10 animais cada, designados por: G I (animais com idade entre dois a quatro meses); G II (animais com 11 meses de idade) e G III (animais com quatro anos de idade).

Para análise endotelial foi utilizado microscópio especular de contato<sup>4</sup> (Fig. 1), tendo sido utilizado o software disponível com o aparelho para contagem da densidade endotelial. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador utilizando-se o método do retículo fixo.

Imediatamente após o óbito, realizou-se enucleação subconjuntival e acondicionamento dos bulbos oculares em câmara úmida até a realização da microscopia especular.

Concebeu-se estudarem-se os olhos à microscopia especular decorridas duas horas do abate dos animais. Assim, após serem removidos da câmara úmida, foram fixados em um suporte adaptado ao microscópio especular de contato e lubrificados com solução fisiológica. Ato contínuo, posicionou-se a lente objetiva do microscópio sobre as regiões central e periférica da superfície corneana para o registro fotográfico digital do endotélio e paquimetria, em três locais distintos de cada região (Fig. 2). De cada amostra, foram capturadas três imagens nítidas. De cada imagem, foram analisadas, pelo menos, 60 células endoteliais.

---

<sup>1</sup> Portable Slit lamp Kowa SL15, Kowa Company, Ltd,

<sup>2</sup> Tonovet, Tiolat, Helsinki, Finlândia.

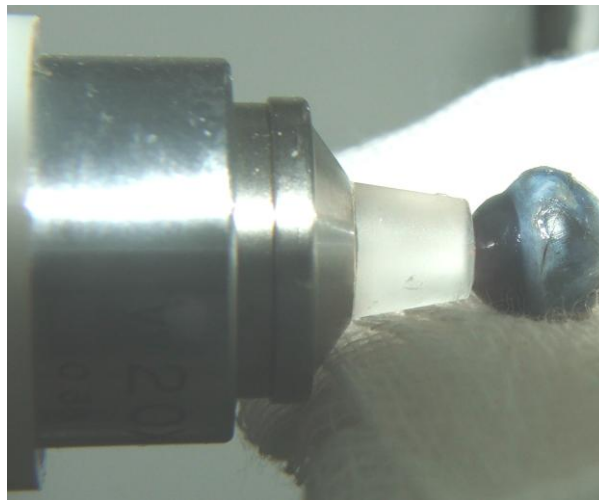
<sup>3</sup> Fluoresceína sódica a 1%, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

<sup>4</sup> Celmax, Medical Service, São Carlos, SP.





**Fig.1.** Imagem fotográfica do microscópio especular de contato.



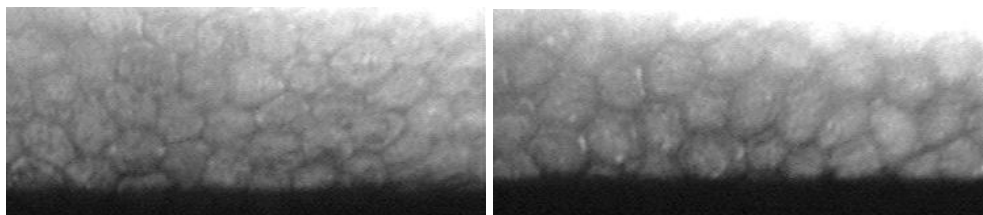
**Fig.2.** Imagem fotográfica da lente objetiva do microscópio especular de contato sobre a região central da córnea do bulbo do olho de chinchila com quatro meses de idade.

Foram avaliados os seguintes dados: densidade endotelial central (DEC) e periférica (DEP), pleomorfismo celular, área celular média, paquimetria da córnea central e periférica e diâmetro corneano. Foram realizadas três avaliações das regiões centrais e periféricas, tendo sido contato um mínimo de 60 células por região para obtenção da densidade endotelial e do pleomorfismo celular. A densidade endotelial foi obtida de forma semi-automatizada através do software Celmax, enquanto que o pleomorfismo foi obtido mediante avaliação manual do número de lados de cada célula. A paquimetria da córnea central e periférica foi avaliada utilizando-se de paquímetro acoplado ao microscópio especular. A área celular média foi calculada a partir da fórmula:  $10^6 = \text{densidade endotelial} / \text{área celular média}$ .

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguido do teste post hoc de Tukey com significância de  $p < 0,05$ , para comparação das médias dos parâmetros analisados entre os grupos.

## RESULTADOS

A microscopia especular possibilitou visibilizar um padrão regular de células poligonais uniformes e contínuas (Fig. 3,4,5) Nenhum dos olhos submetidos à avaliação foi excluído.



**Fig. 3:** Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de uma chinchila com dois meses de idade, com densidade celular de 4020 células/mm<sup>2</sup>.

A densidade endotelial central média (DEC) para o olho direito (OD) das chinchilas foi de  $2577,35 \pm 713,44$ , variando entre 1645 e 4233 células/mm<sup>2</sup>, e de  $2599,40 \pm 753,53$  células/mm<sup>2</sup> para o olho esquerdo (OE), variando entre 1625 e 4200 células/mm<sup>2</sup> com os respectivos desvios padrões. A densidade endotelial periférica média (DEP) para o olho direito foi de  $2655,31 \pm 810,53$  células/mm<sup>2</sup>, variando entre 1630 e 4482 células/mm<sup>2</sup> (Tab. 1). A densidade celular endotelial média, considerando ambos os olhos, nos animais dos grupos G I, G II e G III foi de respectivamente

3385,39 ± 507,53, 2565,51 ± 220,46 e 1812,82 ± 117,92 células/mm<sup>2</sup>.

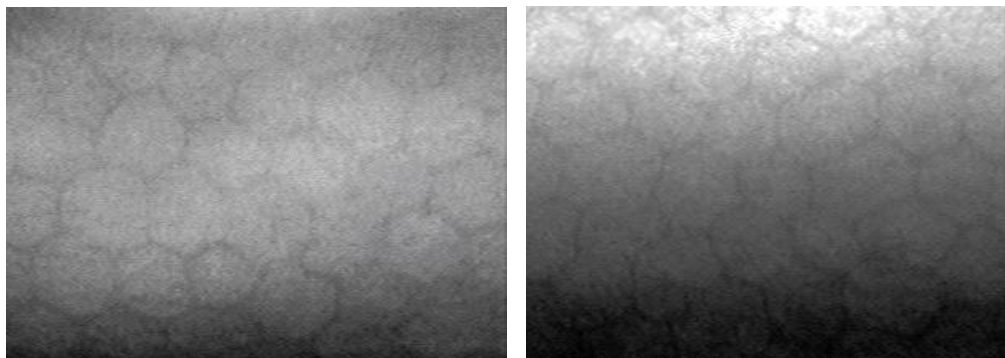
**Tab. 1.** Valores médios da densidade celular (células/mm<sup>2</sup>) e desvio padrão de células endoteliais da região central e periférica da córnea de chinchilas nas diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular.

	DEC OD	DEC OE	DEP OD	DEP OE
<b>Grupos</b>				
I*	3419,12 ± 500,74 <sup>a</sup>	3351,66 ± 546,49 <sup>a</sup>	3462 ± 533,88 <sup>a</sup>	-
II*	2471,27 ± 182,22 <sup>b</sup>	2659,75 ± 225,05 <sup>b</sup>	2695 ± 265,20 <sup>b</sup>	2778,8 ± 218,1 <sup>b</sup>
III*	1838,91 ± 123,62 <sup>c</sup>	1786,72 ± 113,84 <sup>c</sup>	1823,83 ± 129,9 <sup>c</sup>	-
<b>Média</b>	<b>2577,35 ± 713,44</b>	<b>2599,35 ± 753,53</b>	<b>2655,31 ± 810,53</b>	

\*Cada grupo apresentando 10 animais cada. Houve diferença estatisticamente significativa entre GI, GII e GIII quando comparado os mesmos olhos direito e esquerdo (p<0,001). Não houve diferença entre região central e periférica.

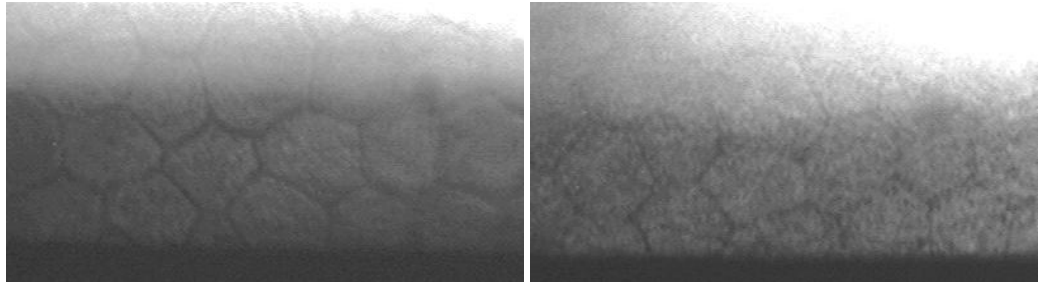
No grupo I, obteve-se uma DEC de 3419,12 ± 500,74 células/mm<sup>2</sup> para o olho direito, variando entre 2720 e 4233 células/mm<sup>2</sup>, e de 3351,66 ± 546,49 células/mm<sup>2</sup> para o olho esquerdo, variando entre 2785 e 4200 células/mm<sup>2</sup>. Ainda, os valores da DEP para olho direito foram de 3462 ± 533,88, com valores variando de 2987 até 4482 células/mm<sup>2</sup> (FIG. 3).

No grupo II, valores para o olho direito foram de 2471,27 ± 182,22 células/mm<sup>2</sup>, variando entre 2286 e 2730 células/mm<sup>2</sup> e para o olho esquerdo, a DEC foi de 2659,75 ± 225,05, com variação de 2352 até 2940 células/mm<sup>2</sup> (Fig. 4). Os valores da DEP foram respectivamente de 2695 ± 265,20 e 2778,8 ± 218,161 para os olhos direito e esquerdo, com variação de 2319 a 3013 células/mm<sup>2</sup> para o OD e de 2488 a 2940 células/mm<sup>2</sup> no OE (Fig. 4).



**Fig. 4:** Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de uma chinchila com 11 meses de idade, com densidade celular de 2788 células/mm<sup>2</sup>.

No grupo III, a densidade endotelial central média foi de  $1838,91 \pm 123,62$ , com variação de 1645 a 2040 células/mm<sup>2</sup> no olho direito e  $1786,72 \pm 113,84$ , com variação de 1625 a 1984 células/mm<sup>2</sup> no olho esquerdo. A DEP do olho direito foi de  $1823,83 \pm 129,90$ , com variação entre 1630 e 2028 células/mm<sup>2</sup> (Fig. 5).

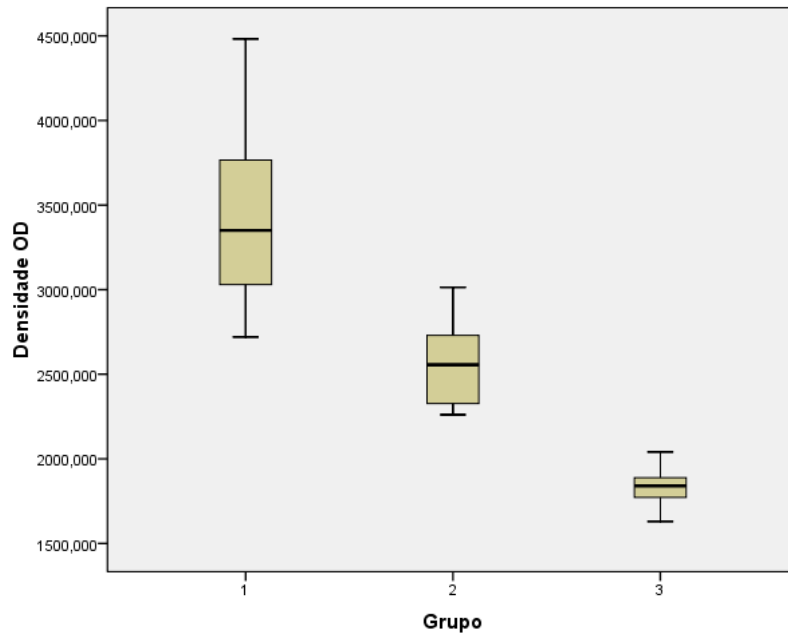


**Fig. 5:** Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de uma chinchila com quatro anos meses de idade, com densidade celular de 1930 células/mm<sup>2</sup>.

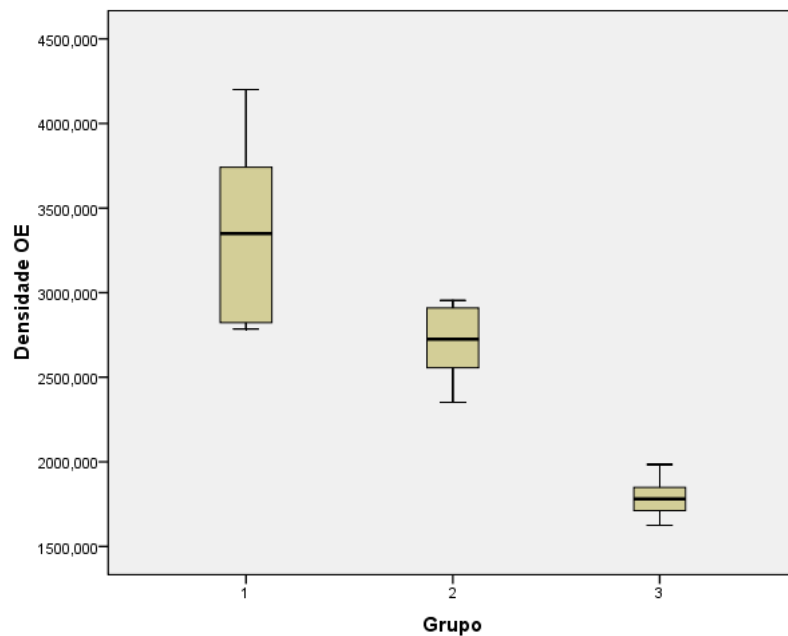
Não foi possível determinar a DEP do olho esquerdo nos grupos I e III devido à obtenção de imagens de baixa qualidade da periferia do endotélio nestes grupos, comprometendo a análise estatística.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de DEC entre o olho direito e olho esquerdo nos grupos I, II e III ( $p=0,449$ ). Houve diferença estatisticamente significativa em relação à média da densidade celular entre os três grupos ( $p<0,001$ ) quando comparados os mesmos olhos direito e esquerdo (gráficos 1 e 2). A diferença entre os olhos de G I, G II e G III foi estatisticamente significativa ( $p<0,001$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre região central e região periférica ( $p = 0,107$ ).



**Gráfico 1:** Diagramas de caixa da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) do OD para os grupos I, II e III, indicando que a variação da idade tem um efeito estatisticamente significativo sobre a densidade endotelial.



**Gráfico 2:** Diagramas de caixa da densidade endotelial (células/mm<sup>2</sup>) do OE para os grupos I, II e III, indicando que a variação da idade tem um efeito estatisticamente significativo sobre a densidade endotelial.

A área celular endotelial central média (ACM) foi de  $416,79 \pm 109,47$  para o OD e de  $415,05 \pm 116,37$  para o OE, com respectiva variação de 236,22 a  $607,90 \mu\text{m}^2$  e de 238,09 a  $615,38 \mu\text{m}^2$ . A área celular endotelial periférica (APM) média do olho direito foi de  $404,27 \pm 119,54$ .

A ACM do grupo I para o OD foi de  $297,89 \pm 42,75$  com variação de 236,22 a 367,64, e para o OE a ACM foi de  $305,12 \pm 47,75$  com variação de 238,09 a 359,06. No grupo II a ACM foi de  $406,55 \pm 29,51$  e de  $378,37 \pm 32,52$  para os olhos direito e esquerdo, respectivamente, com variação entre 366,30 e 442,15 para o OD e entre 344,53 e  $425,10 \mu\text{m}^2$  para o OE. Com relação ao grupo III a ACM foi de  $545,94 \pm 36,64$  e de  $561,64 \pm 35,34$  para os olhos direito e esquerdo, com variação respectiva de 490,03 a 607,90, e de 503,90 a  $615,38 \mu\text{m}^2$ .

A APM no grupo I para o olho direito foi de  $294,28 \pm 40,57$  com variação de 223,11 a  $334,78 \mu\text{m}^2$ . Para o grupo II obteve-se APM de  $374,06 \pm 38,26$  e de  $361,71 \pm 29,45$  para os olhos direito e esquerdo, que apresentaram variação respectiva de 366,30 a 442,15 e de 340,13 a  $425,10 \mu\text{m}^2$ . Com relação ao último grupo se observou ACM de  $550,67 \pm 39,98$  para o olho direito, com variação de 493,09 a  $613,49 \mu\text{m}^2$  (Tab. 2).

Observamos uma diferença estatisticamente significativa quando se comparou a área celular média dos grupos I, II e III entre os mesmos olhos direito e esquerdo ( $p < 0,001$ ). Porém, não houve diferença significativa entre o OD e OE no mesmo grupo ( $p = 0,449$ ) e entre regiões central e periférica ( $p = 0,107$ ).

**Tab. 2.** Valores médios da área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) e desvio padrão de células endoteliais da região central e periférica da córnea de chinchilas nas diferentes faixas etárias avaliados utilizando a microscopia especular.

Grupos	Área celular central média		Área celular periférica média	
	OD	OE	OD	OE
I*	$297,89 \pm 42,75^a$	$305,12 \pm 47,75^a$	$294,28 \pm 40,57^a$	-
II*	$406,55 \pm 29,51^b$	$378,37 \pm 32,52^b$	$374,06 \pm 38,26^b$	$361,71 \pm 29,45^b$
III*	$545,94 \pm 36,64^c$	$561,64 \pm 35,34^c$	$550,67 \pm 39,98^c$	-
<b>Média</b>	<b><math>416,79 \pm 109,47</math></b>	<b><math>415,05 \pm 116,37</math></b>	<b><math>404,27 \pm 119,54</math></b>	

\*Cada grupo apresentando 10 animais cada. Houve diferença estatisticamente significativa entre GI, GII e GIII quando comparado os mesmos olhos direito e esquerdo ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre região central e periférica.

O pleomorfismo médio ou porcentagem de células hexagonais no endotélio central do olho direito e esquerdo de chinchilas foi respectivamente de  $70,05 \pm 7,14\%$  e de  $68,78 \pm 7,39\%$ , com variação de 56,35 a 80,80% e de 52,00 a 79,23%. No grupo I obteve-se uma média de  $72,70 \pm 2,74\%$  para o olho direito e de  $72,05 \pm 2,27\%$  para o olho esquerdo, com respectiva variação entre 68,80 e 76,50%, e de 69,74 a 74,50%. No grupo II, a média encontrada foi de  $75,18 \pm 3,91$  para o OD, e de  $74,05 \pm 3,57$  para o OE, com variação respectiva de 69,50 a 80,80% e de 68,45 a 79,23%. No grupo III, obteve-se média de  $62,28 \pm 6,15\%$  e de  $60,23 \pm 5,84\%$  para o OD e OE, com variação de 52 a 70,35% e de 52,20 a 71,52% (Tab. 3).

Em relação ao pleomorfismo celular, foi observada diferença estatisticamente significativa quando foi comparado o grupo I ao grupo III ( $p < 0,001$ ), e o grupo II com o grupo III ( $p < 0,001$ ) dos olhos direito e esquerdo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre G I e GII no olho direito ( $p = 0,527$ ) e esquerdo ( $p = 0,613$ ).

**Tab. 3.** Valores médios do pleomorfismo celular (%) e desvio padrão de células endoteliais da região central de chinchilas nas diferentes faixas etárias avaliados utilizando a microscopia especular.

	Células hexagonais OD	Células hexagonais OE
Grupos		
I*	$72,70 \pm 2,74\% ^a$	$72,05 \pm 2,27\% ^a$
II*	$75,18 \pm 3,91\% ^a$	$74,05 \pm 3,57\% ^a$
III*	$62,28 \pm 6,15\% ^b$	$60,23 \pm 5,84\% ^b$
<b>Média</b>	<b><math>70,05 \pm 7,14\%</math></b>	<b><math>68,78 \pm 7,39\%</math></b>

\*Cada grupo apresentando 10 animais cada. Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferença não significativas ( $p > 0,05$ ).

A paquimetria central de córnea ou espessura corneana central total (ECCT) média foi de  $233,06 \pm 35,42\ \mu\text{m}$  para o olho direito e de  $259,95 \pm 50,05\ \mu\text{m}$  para o olho esquerdo, com variação respectiva de 175 a 310 e de 175 a 290  $\mu\text{m}$ . A paquimetria periférica da córnea ou espessura corneana total periférica (ECPT) média, realizada na porção periférica medial da córnea foi de  $206,65 \pm 28,06$  para o OD com variação de 172 a 250  $\mu\text{m}$  (Tab. 4).

Para o grupo I a ECCT foi de respectivamente  $210,5 \pm 24,77$  e de  $212,5 \pm 22,83$  para o OD e OE, com variação de 175 a 235 e de 175 a 236  $\mu\text{m}$ . Referente ao grupo II

os valores médios da ECCT para o olho direito e esquerdo foram respectivamente de  $216,56 \pm 8,52$  e de  $210,75 \pm 13,52$  com variação de 209 a 233 e de 187 a 231  $\mu\text{m}$ . O grupo III apresenta CCT média de  $272,125 \pm 28,27$  com variação de 212 a 310  $\mu\text{m}$  para o OD e de  $264 \pm 25,50$  com variação de 217 a 290  $\mu\text{m}$  para o OE (Tab. 4).

Os valores médios de ECPT para o OD do grupo I foram de  $194,12 \pm 31,51$  com variação de 172 a 235  $\mu\text{m}$ . Referente ao grupo II, temos ECPT média de  $197,4 \pm 14,71$  com variação de 180 a 219 para o OD e de  $187,5 \pm 6,12$  com variação de 185 a 192  $\mu\text{m}$ . A análise do grupo III revelou ECPT média de  $226,125 \pm 23,66$  com variação de 184 a 250  $\mu\text{m}$  (Tab. 4).

A análise estatística revelou diferença significativa entre os olhos do G I com o G III ( $p < 0,001$ ) e entre G II e G III ( $p < 0,001$ ). Não se observou diferença significativa entre CCT OD do G I com o G II ( $p = 0,808$ ) e OE do G I com G II ( $p = 0,592$ ). Entretanto existiu diferença significativa entre a paquimetria periférica do OE com a paquimetria central do OE no G II ( $p < 0,001$ ).

**Tab. 4.** Valores médios da paquimetria corneana média ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão de células endoteliais da região central (ECCT) e periférica (ECPT) de chinchilas nas diferentes faixas etárias avaliadas utilizando a microscopia especular.

	ECCT OD	ECCT OE	ECPT OD	ECPT OE
Grupos				
I*	$210,5 \pm 24,77^a$	$212,5 \pm 22,83^a$	$194,12 \pm 31,51^a$	-
II*	$216,56 \pm 8,52^a$	$210,75 \pm 13,52^a$	$197,4 \pm 14,71^a$	$187,5 \pm 6,12^{a**}$
III*	$272,125 \pm 28,27^b$	$264 \pm 25,50^b$	$226,125 \pm 23,66^b$	-
<b>Média</b>	<b><math>233,06 \pm 35,42</math></b>	<b><math>259,95 \pm 50,05</math></b>	<b><math>206,65 \pm 28,06</math></b>	

\*Cada grupo apresentando 10 animais cada. Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferença não significativas ( $p > 0,05$ ).

Os valores médios do diâmetro da córnea em chinchilas são de  $10,75 \pm 1,03$  para o OD e de  $10,75 \pm 1,03$  para o OE no grupo I. Já em animais com 11 meses do grupo II temos valores médios de diâmetro de  $12,25 \pm 0,70$  para OD e de  $12,25 \pm 0,70$  para OE. No último grupo, composto por animais com quatro anos, se observou um diâmetro de  $15,00 \pm 0,75$  em ambos os olhos (Tab. 5). Houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre o diâmetro da córnea dos grupos ( $p < 0,001$ ).



**Tab. 5.** Valores médios do diâmetro da córnea (mm) e desvio padrão do bulbo dos olhos de chinchilas nas diferentes faixas etárias.

	OD	OE
Grupos		
I*	10,75 ± 1,03 <sup>a</sup>	10,75 ± 1,03 <sup>a</sup>
II*	12,25 ± 0,70 <sup>b</sup>	12,25 ± 0,70 <sup>b</sup>
III*	15,00 ± 0,75 <sup>c</sup>	15,00 ± 0,75 <sup>c</sup>
<b>Média</b>	<b>12,6 ± 1,97</b>	<b>12,6 ± 1,97</b>

\*Cada grupo apresentando 10 animais cada. Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferença não significativas ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A técnica de microscopia especular é uma ferramenta semiológica confiável e padronizada na realização da avaliação do mosaico endotelial em diversas espécies, tanto *in vivo* quanto *ex vivo* (<sup>2, 3, 4, 7, 9, 18</sup>). Diferente de outras técnicas de pesquisa, não deforma ou distorce o endotélio durante processos de fixação ou coloração (<sup>15, 16</sup>). A microscopia especular foi utilizada no estudo da cicatrização do endotélio e para quantificar o tamanho, a forma e a densidade das células endoteliais nas espécies anteriormente mencionadas (<sup>3-11, 19, 20</sup>). Embora a chinchila apresente diversas características favoráveis como modelo experimental animal para pesquisas oftálmicas, quando se recorreu à literatura não foram encontradas informações sobre as características do endotélio da córnea desta espécie, fato que motivou a realização deste estudo.

A enucleação subconjuntival e a manutenção dos olhos em câmara úmida permitiu a realização dos exames, sem interferir com a reflexão especular, preservando a estrutura endotelial. Esta metodologia já foi utilizada em outros estudos e mostrou-se eficaz (<sup>3, 11</sup>).

Foi possível a obtenção de imagens nítidas do mosaico endotelial da região central da córnea das chinchilas utilizando-se o microscópio especular de contato em todos os bulbos oculares avaliados. Nos animais do grupo I, com córnea medindo em média 10,75 mm de diâmetro, não foi possível a avaliação da região periférica do endotélio, possivelmente devido ao fato do tamanho ocular ser pequeno. Nos grupos II e III com córneas com diâmetro a partir de 12 mm foi possível à avaliação da periferia do endotélio nos olhos avaliados.

Dentre os diferentes métodos utilizados pelos *softwares* de cada microscópio para analisar a densidade endotelial pode-se citar: o método do retículo fixo e móvel, o método de marcação dos centros celulares e o método da marcação das bordas celulares (<sup>21</sup>). Neste estudo, o *software* para análise da imagem endotelial utilizou o método do retículo fixo com definição das células endoteliais realizadas pelo operador (método semi-automatizado). A precisão deste método depende da decisão subjetiva da criação de um retículo, e da marcação das células contidas neste retículo de área conhecida, sendo então as células convertidas automaticamente para células/mm<sup>2</sup> (<sup>21</sup>).

A quantidade de células a serem contatadas por imagem para a obtenção de uma

precisão adequada varia de acordo com o estudo analisado. Alguns autores recomendam que sejam contadas pelo menos 30 células, outros recomendam 50, 75 e 100 células por imagem (<sup>24-27</sup>). Ainda, outro estudo mencionou que o ideal seria contar o máximo de células possíveis em três diferentes imagens por quadrante (centro e periferia) sendo realizada a média destas imagens (<sup>26</sup>). No presente trabalho foram capturadas três imagens de cada área avaliada, sendo contadas 60 células endoteliais por imagem, os resultados são apresentados como a média destas imagens.

Respectivamente, a densidade celular e a área celular média os valores encontrados neste estudo foram similares a outras espécies de mamíferos, incluindo humanos, caninos, felinos e leporinos, havendo decréscimo da DEC e aumento da área celular média com o avanço da idade (<sup>3, 4, 8, 18, 25</sup>). No G I foi obtida a DEC mais elevada, apresentando até 4200 células/mm<sup>2</sup>, conforme crescimento da córnea o grupo II com animais de 11 meses apresentou média de 2400 células/mm<sup>2</sup> e finalmente, animais com 4 anos de idade do grupo III apresentaram média de 1800 células/mm<sup>2</sup> e maior diâmetro corneano. Estes dados corroboram com os dados obtidos por outros estudos que mencionaram a existência de uma população relativamente fixa de células no endotélio, havendo rápido declínio da DEC conforme o crescimento da córnea e então uma perda estável de células endoteliais a partir da idade adulta (<sup>4, 18, 28, 29</sup>).

Não houve diferença significativa entre a densidade endotelial da região central quando comparada a região periférica. Embora a literatura seja contraditória a este respeito, a tendência atual é aceitar, ao menos no homem uma diferença na densidade endotelial do centro para a periferia, com densidade maior nas regiões periféricas e paracentrais (<sup>30-33</sup>).

O valor médio da DEC em chinchilas, variando de dois meses a quatro anos foi de 2577,35 ± 713,44 para o OD e de 2599,35 ± 753,53 para o OE. Estes valores são bastante similares a outras espécies e corroboram o que foi descrito por BAHN (1986) que através da microscopia especular, afirmou que apesar da grande variação no tamanho da córnea de felinos, bovinos, caninos, cervos, coelhos e humanos apresentam uma contagem endotelial central similar, em torno de 2500 células/mm<sup>2</sup>.

O mesmo aconteceu com o tamanho celular médio, onde foi obtido ACM de respectivamente 301,51 ± 43,94, 392,46 ± 33,34 e de 553,79 ± 35,70 µm para G I, G II e G III, quando considerado ambos os olhos, revelando que conforme a DEC diminui a área celular média cresce, havendo hipertrofia das células remanescentes, ocupando o espaço das células perdidas. Neste estudo não foi estimada a perda celular com relação à

variação de idade. Foi determinado que no homem ocorra estabilização da morte endotelial aos 20 anos e a partir de então estima-se uma perda média de 0.52% até os 80 anos de idade (<sup>4, 29</sup>).

Os resultados observados neste estudo demonstraram que o endotélio corneano de chinchilas foi caracterizado por uma monocamada de células poligonais uniformes em tamanho e forma, sendo as células predominantemente hexagonais. Na maioria dos vertebrados a forma normal das células endoteliais é composta principalmente por células hexagonais e pentagonais. As características pleomórficas observadas no endotélio da chinchila são semelhantes às encontradas em humanos, felinos, caninos e outros vertebrados, onde se observa que entre 65 e 80% do endotélio corneano é composto por células hexagonais (<sup>3-11, 21</sup>).

No presente estudo observou-se no olho direito, pleomorfismo ou porcentagem de células hexagonais médias de  $72,70 \pm 2,74$  % para o G I, de  $75,18 \pm 3,91$  % para o G II e de  $62,28 \pm 6,15$  % para o G III, com diferença estatística entre G I e G III e entre G II e G III. Logo, nas chinchilas utilizadas neste estudo, podemos inferir que o pleomorfismo diminui com o avanço da idade, o que vem de encontro com o mencionado por Waring e colaboradores (1982), que relataram que no homem, ocorre perda celular com o aumento da idade, e que essa perda não consegue ser suprida pela divisão das células remanescentes. Para restabelecer a barreira funcional, ocorre hipertrofia de forma desigual, causando irregularidade do tamanho e da forma (<sup>34</sup>). De forma contraditória em alguns estudos com cães e gatos houve aumento no pleomorfismo celular com a idade, fato não explicado pelos autores (<sup>3, 9</sup>).

O método de análise do retículo fixo, realizado pelo *software* do equipamento utilizado neste estudo, não realiza a análise do pleomorfismo ou do polimegatismo. O pleomorfismo neste estudo foi definido pelo operador de forma manual, com a contagem de 60 células, e este foi calculado pela porcentagem de células com seis lados.

A relação linear entre a hidratação estromal e a sua espessura significa que a avaliação da espessura corneana pode ser utilizada como índice de dano endotelial indireto, pois esta reflete o estado de sua deturgescência (<sup>2, 35, 36</sup>). A paquimetria da córnea pode ser realizada valendo-se da paquimetria ultrassônica ou do microscópio especular de contato e de não contato, havendo boa correlação entre estes métodos (<sup>37</sup>).

Neste estudo, foi utilizado o microscópio especular de contato para determinar a ECCT e a ECPT. Os valores médios da ECCT para o OD de chinchilas foram de  $210,5 \pm 24,77$   $\mu\text{m}$  para animais com até 4 meses (G I),  $216,56 \pm 8,52$   $\mu\text{m}$  para chinchillas com

11 meses (G II) e de  $272,125 \pm 28,27 \mu\text{m}$  para animais com 4 anos (G III). Notou-se uma tendência de aumento da espessura corneana estatisticamente significativamente com o aumento da idade quando comparados animais de dois a onze meses com animais de quatro anos. Este dado é similar ao encontrado em caninos, cujo aumento da idade revelou ECCT maior, principalmente em animais com mais de seis anos de idade (<sup>9</sup>). Especula-se que o aumento da ECCT seja devido a maior deposição de fibras de colágeno no estroma corneano de chinchilas mais velhas, embora estudos histológicos sejam necessários para essa confirmação. Estudo recente realizado em chinchilas, utilizando a paquimetria ultrassônica, revelou uma ECCT média de  $340 \pm 30 \mu\text{m}$ , embora não tenha mencionado a idade dos animais avaliados, a paquimetria foi realizada através de paquímetro ultrassônico (<sup>14</sup>). Os resultados da ECCT em cães, felinos e no homem mostram que nestas espécies varia em torno de 500-600  $\mu\text{m}$  (<sup>3,9,36</sup>).

Com relação à espessura corneana do centro da córnea para a periferia, este estudo obteve resultados de espessura menores quando comparado centro e periferia, indicando um afinamento da córnea para a região periférica, embora este resultado tenha sido estatisticamente significativo apenas com relação à média da ECCT do OE e média da ECPT do OE. O tamanho amostral é possivelmente responsável por essa variação estatística somente no olho esquerdo. Este resultado é bastante similar ao encontrado em roedores, especificamente em camundongos, ocorrendo afinamento do centro da córnea, medindo de 130  $\mu\text{m}$ , e com periferia de 90  $\mu\text{m}$  (<sup>35</sup>). Os dados para as espécies humanas e caninas mostram o inverso, onde há um aumento da espessura da córnea periférica, sendo em média de 657  $\mu\text{m}$  na periferia e 535  $\mu\text{m}$  no centro (<sup>36</sup>).

Estudos em humanos, cães e suínos não relatam diferenças entre o endotélio da córnea de fêmeas e de machos (<sup>2-7, 9</sup>). Neste estudo o parâmetro sexo não foi considerado uma variável.

No presente estudo foram avaliadas córneas que variaram de 10 mm de diâmetro em animais com dois meses de idade até 15 mm em animais com quatro anos. Logo o endotélio da córnea da chinchila seguiu os padrões de envelhecimento endotelial similar ao homem e outros mamíferos, com crescimento da córnea e diminuição da DEC e pleomorfismo e aumento da área celular média. Não foram obtidas diferenças significativas entre DEC do olho esquerdo e direito, resultado corroborado pelas citações presentes na literatura (<sup>3,8,11</sup>).

Conclui-se que o endotélio da córnea de chinchilas sofre alterações com o avanço da idade. Ocorre decréscimo da densidade endotelial e diminuição do

pleomorfismo, embora ocorra aumento da área celular média e da espessura da córnea. Os dados obtidos neste estudo fornecem parâmetros que podem ser utilizados na avaliação da repercussão das doenças oftálmicas no endotélio de chinchilas.

## REFERÊNCIAS

- (1) SVEDBERGH B, BILL A. Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmologica*. 1972;50(3):321-236.
- (2) Tuft S, Coster D. The corneal endothelium. *Eye*. 1990;4(3):389-424.
- (3) Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13(4):222-226.
- (4) Abib FC, Barreto J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2001;27(10):1574-1578.
- (5) Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL, Vicenti FAM, Pigatto JA, Abib FC. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural*. 2009;39(1):117-122.
- (6) Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels S, Neufeld A, Kenyon K. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1985;26(4):443-449.
- (7) Alp BN, Elibol O, Sargon MF, Aslan OS, Yanyali A, Karabas L, et al. The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. *Cornea*. 2000;19(4):546-550.
- (8) Pigatto JAT, Abib FC, Pizzeti JC, Laus JL, Maia J. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005;33(1):33-39.
- (9) Gwin R, Lerner I, Warren J, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1982;22(2):267-271.
- (10) Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Rigueiro MP, Smith RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology*. 2006;9(2):101-107.
- (11) Pigatto JAT, Abib FC, Pereira GT, Barros PSM, Freire CD, Laus JL. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2006;43(4):476-480.

- (12) Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2001;62(4):479-482.
- (13) Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *American Journal of Veterinary Research*. 2002;63(3):326-329.
- (14) Peiffer Jr R, DeVanzo R, Cohen K. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research*. 1981;42(5):854-855.
- (15) VIRTANEN J, UUSITALO H, PALKAMA A, KAUFMAN H. The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and morphology in scanning electron microscopy. *Acta Ophthalmologica*. 1984;62(4):577-585.
- (16) Doughty MJ. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy – a comparison of two different methods of corneal fixation. *Veterinary Ophthalmology*. 2006;9(2):127-135.
- (17) Lima L, Montiani-Ferreira F, Tramontin M, Leigue dos Santos L, Machado M, Ribas Lange R, et al. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary ophthalmology*. 2010;13:14-25.
- (18) Müller K, Mauler DA, Eule JC. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests and clinical characteristics of chinchilla eyes (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13:29-34.
- (19) Daniels P, Hassul M, Kimm J. Dynamic analysis of the vestibulo-ocular reflex in the normal and flocculectomized chinchilla. *Experimental Neurology*. 1978;58(1):32-45.
- (20) Hullar TE & Williams CD Geometry of the semicircular canals of the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Hearing research*. 2006; 213:17-24.
- (21) McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular drugs and solutions. *Cornea*. 2008;27(1):1-16.
- (22) Neubauer L, Laing RA, Leibowitz HM. Specular microscopic appearance of damaged and dead endothelial cells in corneas following short-term storage. *Archives of Ophthalmology*. 1984;102(3):439-444.
- (23) Landshman N, Solomon A, Belkin M. Cell division in the healing of the corneal endothelium of cats. *Archives of Ophthalmology*. 1989;107(12):1804-1808.
- (24) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Archives of Ophthalmology*. 1979;97(9):1714-1719.

- (25) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Archives of Ophthalmology*. 1976;93(2): 143-145.
- (26) Binder P, Akers P, Zavala E. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmology*. 1979;86(10):1831-1847.
- (27) Doughty MJ, Müller A, Zaman ML. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. *Cornea*. 2000;19(2):148.
- (28) Bahn CF, Glassman R, MacCallum D, Lillie J, Meyer R, Robinson B, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1986;27(1):44-51.
- (29) Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Current Eye Research*. 1985;4(6):671-678.
- (30) Schimmelpfennig B. Direct and indirect determination of nonuniform cell density distribution in human corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1984;25(2):223-229.
- (31) Daus W, Voelcker H, Meysen H. Clinical significance of age-related regional differences in distribution of human corneal endothelium. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 1990;196(6):449-455.
- (32) Amann J, Holley GP, Lee SBM, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *American Journal of Ophthalmology*. 2003;135(5):584-90.
- (33) Blackwell W, Gravenstein N, Kaufman H. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. *American Journal of Ophthalmology*. 1977;84(4):473-476.
- (34) Waring 3rd G, Bourne W, Edelhauser H, Kenyon K. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 1982;89(6):531-590.
- (35) Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JPG. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009;50(8):3648-3654.
- (36) Doughty MJ, Zaman ML. Human Corneal Thickness and Its Impact on Intraocular Pressure Measures: A Review and Meta-analysis Approach. *Survey of ophthalmology*. 2000;44(5):367-408.
- (37) Módis Jr L, Langenbacher A, Seitz B. Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. *Cornea*. 2001;20(7):711-714.



#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi possível com a microscopia especular de contato avaliar, documentar e analisar o endotélio da córnea de chinchilas de diferentes faixas etárias. Os dados obtidos com o presente estudo servirão como referência na avaliação do endotélio da córnea de chinchilas.

## REFERÊNCIAS

- AABERG, T.M. Correlation between corneal endothelial morphology and function. **American Journal of Ophthalmology**, v.98, n.4, p.510-512, 1984.
- ABIB, F.C. In: **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000, p.140.
- ABIB, F.C.; BARRETO, J.R. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.27, p.1574-78, 2001.
- ALP, B.N. et al. The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. **Cornea**, v.19, n.4, p.546-550, 2000.
- ANDREW et al. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p.479-482, 2001.
- 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, p.326-329, 2002.
- ARNDT, C.; REESE, S. & KOSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. **Veterinary Ophthalmology**, v.4, n.3, p.175-182, 2001.
- BAHN, C.F. et al. Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.27, p.44-51, 1986.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.
- BAROODY, R.A. et al. Ocular development and aging. Corneal endothelial changes in cats and in free-ranging and caged rhesus. **Experimental Eye Research**, v.45, n.4, p.607-622, 1987.
- BEFANIS, P.J.; PEIFFER, R.L. & BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.4, p.590-595, 1981.
- BINDER, P.S.; AKERS, P. & ZAVALA, E.Y. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. **Ophthalmology**, v.86, n.10, p.1831-1847, 1979.
- BOTEON, J.E. Histologia do Endotélio Corneano. In: ABIB, F.C. **Microscopia Especular de Córnea: Manual e Atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000. cap.1, p.3-5.
- BOURNE, W.; NELSON, B.A. & HODGE, M.S. Continued endothelial cell loss ten years after lens implantation. **Ophthalmology**, v.101, n.6, p.1014-1023, 1994.

- BOURNE, W.M. et al. Long-term observation on morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.35, n.3, p.891-899, 1994.
- BOURNE, W.M.; KAUFMAN, H.E. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. **Am J Ophthalmol**, v. 81, n. 3, p. 319-323, 1976.
- BOURNE, W.M.; NELSON, L.R.; BULLER, C.R. et al. Long-term observation on morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.35, p. 891-899, 1994.
- CANAVAGH, H.D. et al. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. **Cornea**, v.19, n.5, p.712-722, 2000.
- COLLIN, S.P. & COLLIN, H.B. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. **Cornea**, v.19, n.2, p.218-230, 2000.
- COLLIN, S.P. & COLLIN, H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v.81, n.6, p.245-254, 1998.
- DANIELS, P.; HASSUL, M. & KIMM, J. Dynamic analysis of the vestibulo-ocular reflex in the normal and flocculectomized chinchilla. **Experimental Neurology**, v. 58, p. 32-45, 1978.
- DOUGHTY M.J. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium ex vivo. **Tissue and Cell**, v.30, p.634-643, 1998.
- DOUGHTY M.J. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy-a comparison of two different methods of corneal fixation. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.2, p.127-135, 2006.
- DOUGHTY, M.J.; BERGMANSON, J.P.& BLOCKER, Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. **Tissue and Cell**, v.29, n.5, p.533-547, 1997.
- DOUGHTY, M.J.; SPITERI, M. & DILTS, D.M. Determination of the unit size of the corneal endothelial cell mosaic form Fourier component image analysis. **Tissue and Cell**, v.29, n.2, p.229-238, 1997.
- FRANZEN, A. et al. Use of microscope specular to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cats. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.4, p.222-226, 2010.
- GALLAGHER, B.C. Primary cilia of the corneal endothelium. **The American Journal of Anatomy**, v.159, n.4, p.475-484, 1980.

- GWIN, R.M. et al. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.22, n.2, p.267-271, 1982.
- HASSUL, M.; DANIELS, P. & KIMM, J. Effects of bilateral flocculectomy on the vestibulo-ocular reflex in the chinchilla. **Brain research**, v. 118, p.339-343, 1976.
- HIRSCH, M. et al. Formation of intercellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v.23, n.4, p.385-397, 1976.
- HIRST, L.W.; FERRIS, F.L.; STARK, W.J.; FLEISHMAN, J.A. Clinical specular microscopy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.19, p.2-4, 1980.
- HOFFMANN, A. et al. Light electron microscopic evaluation of canine corneal endothelium following CO<sub>2</sub> photokeratotomy, **Veterinary Ophthalmology**, v.12, p.28-34, 2009.
- HOLLEY, G.P. et al. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability. An in vitro study. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.28, n.6, p.1027-1033, 2002.
- HUANG, P. T.; NELSON, L. R.& BOURNE, W. M. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.30, n.8, p.1794-1801, 1989.
- HULLAR, T.E. & WILLIAMS, C.D. Geometry of the semicircular canals of the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). **Hearing research**, v. 213, p. 17-24, 2006.
- JACKSON, A.J.; GARDINER, T. & ARCHER, D.B. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v.15, n.4, p.305-310, 1995.
- JALBERT, I. et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. **British Journal of Ophthalmology**, v.87, n.2, p.225-236, 2003.
- JURKUNAS, U.; COLBY, K. Evaluation of the Corneal Endothelium. **Techniques in Ophthalmology**, v.3, p. 19-26, 2005.
- KAFARNIK, C.; FRITSCH, J. R.S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. **Veterinary ophthalmology**, v.10, n.4, p.222-230, 2007.
- LAING, R.A. et al. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. **Archives of Ophthalmology**, v.101, n.11, p.1712-1715, 1983.
- LAING, R.A.; SANDSTROM, M.M.; LEIBOWITZ, H.M. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. **Archives of Ophthalmology**, v.97, n.9, p.1714-1719, 1979.
- LAING, R.A.; SANDSTROM, M.M.; LEIBOWITZ, H.M. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v.93, n. 2, p. 143-145, 1975.

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

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

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

LIMA, L. et al. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. **Veterinary ophthalmology**, v. 13, p. 14-25, 2010.

LIOU, S.W.; CHIU, M.D. & WANG, I.J. Effect of intracameral injection of lidocaine and cabachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.30, p.1351-1356, 2004.

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

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

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

MODIS, L.J.R., LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and noncontact specular microscopy. **J Cataract Refract Surg**, v.28, n.10, p.1763-1769, 2002.

MODIS, L.J.R., LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. **Cornea**, v.20, n. 7, p. 711-714, 2001.

MÜLLER, K.; MAULER, D.A. & EULE, J.C. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests and clinical characteristics of chinchilla eyes (*Chinchilla lanigera*). **Veterinary ophthalmology**, v. 13, p. 29-34, 2010.

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

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

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

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

PEIFFER, J.R.R; DEVANZO, R & COHEN, K. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American journal of veterinary research**, v.42, p. 854-855, 1981.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAILSTAD, D.M. & PEIFFER, R.L. Specular microscopic observation of the corneal

endothelium in the normal rabbit. **Laboratory Animals**, v.15, p.393-395, 1981.

SANCTIS, U. et al. Corneal endothelial evaluation with 2 noncontact specular microscopes and their semiautomated methods of analysis. **Cornea**, v.25, n.5, p.501-506, 2006.

SCHUTTEN, W.H. & Van HORN, D.L. Corneal endothelial cell shrinkage after critical point drying. **Annals of Ophthalmology**, v.12, n.10, p.1165-1167, 1980.

SEYHMUS, A. et al. Effects of trypan blue on corneal endothelium and anterior lens capsule in albino Wistar rats: an investigator-masked, controlled, two-period, experimental study. **Current Therapeutic Research**, v.6, p.366-377, 2006.

SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.11, p.283-338.

STAATZ, W.D. & VAN HORN, D.L. The effects of aging and inflammation on corneal endothelial wound healing in rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.19, n.8, p.983-986, 1980.

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

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

TREFFERS, W.F. Human corneal endothelial wound repair. In vitro and in vivo. **Ophthalmology**, v.6, n.89, p.605-615, 1982.

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

VAN HORN, D.L et al. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.16, n.7, p.597-613, 1977.

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

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

WARING, G.O. et al. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. **Ophthalmology**, v.89, n.6, p.531-590, 1982.

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

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

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