

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

**AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA
ESPECULAR**

Gustavo Brambatti

PORTO ALEGRE
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR

Autor: Gustavo Brambatti

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

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Brambatti, Gustavo

Avaliação do endotélio da cornea de coelhos
(*Oryctolagus cuniculus*) em diferentes faixas etárias
utilizando a microscopia especular / Gustavo
Brambatti. -- 2013.
46 f.

Orientador: João Antoni Tadeu Pigatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2013.

1. Lagomorfo. 2. Córnea. 3. Morfologia. 4.
Parâmetros endoteliais. 5. Microscopia especular. I.
Pigatto, João Antoni Tadeu, orient. II. Título.

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

AVALIAÇÃO DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ESPECULAR

Aprovado em 30 de maio de 2013.

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. André Silva Carissimi
Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck
Membro da Comissão

Prof. Dr. Luciano Porto Bellini
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

**Primeiramente dedico a Deus,
a minha amada esposa
e aos meus pais.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a oportunidade de aprendizado e crescimento profissional dado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a Faculdade de Veterinária e ao programa de pós graduação em ciências veterinárias.

Agradeço ao Médico Veterinário Irany S. Zolin por disponibilizar os animais seus conhecimentos quanto a criação e manutenção dos coelhos utilizados neste projeto.

Ao Professor Evandro Ficagna, pelo auxílio com os dados estatísticos e por se mostrar sempre solícito as minhas questões.

Agradeço ao professor e orientador João Antonio Tadeu Pigatto por todos os conhecimentos a mim cedidos e horas de paciência com minhas dificuldades.

Agradeço a toda equipe do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS por toda a parceria tida neste tempo, pelos colegas que incessantemente passavam seus conhecimentos e sempre estavam prontos para nos ouvir nas dificuldades, e as estagiárias e estagiários que sempre tiveram paciência e sempre prontos para auxiliar independente do dia e horário.

Agradeço a Luciane de Albuquerque por todo auxílio a mim dado, que se iniciou antes mesmo de cursar o mestrado e terminou como peça chave deste projeto.

Agradeço a Carolina Neumann e Mariana Soares, que também sempre estiveram prontas quando precisei e foram exemplares em suas funções, tanto no dia-a-dia quanto durante a execução deste projeto.

Agradeço a amizade e companheirismo, cujo sem este talvez não tivesse chego até aqui, dos queridos residentes, colegas de mestrado e doutorado e principalmente a Michelli W. Ataíde, Kaue D. Reis, Miúriel A. Goulart, Paula S. Hünning, Fabiana Quartiero, Mariana Tessarioli e Flor Claros por muitas vezes serem mais do que amigos, e sim uma verdadeira família.

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

Aos meus Pais, a todo amo e carinho e a sempre acreditarem em mim e não pouparem um mínimo esforço para que eu realiza-se meus sonhos. Sem eles, nem ao menos teriam começado.

A minha esposa Maiara, por toda a paciência entre tantas idas e vindas, viagens e longos períodos distantes, por sempre estar ao meu lado e apoiar-me nos momentos

mais difíceis.

A minha gatinha Pantufa, por estar sempre me fazendo companhia nas madrugadas adentro durante a redação deste trabalho.

Finalmente gostaria de agradecer sinceramente a banca examinadora, que disponibilizou o seu precioso tempo para avaliar este trabalho de pesquisa e colabora com seu conhecimento para que o mesmo seja aprimorado.

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. Apesar dos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) serem amplamente utilizados em pesquisas oftálmicas, não existem avaliações detalhadas referentes ao endotélio da córnea desta espécie em diferentes idades. Objetivou-se estudar os parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea de coelhos de diferentes idades, utilizando-se a microscopia especular. Foram estudados 36 bulbos oculares de 18 coelhos, machos ou fêmeas, de diferentes faixas etárias divididos em três grupos com seis animais cada, designados por: G I (animais com idade de seis meses); G II (animais com 1 ano 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 $2307,16 \pm 319,04$, $1894,75 \pm 170,81$ e $1818,66 \pm 245,11$ células/mm². A área celular média foi de respectivamente $364,43 \pm 39,36$, $374,79 \pm 48,46$ e de $378,50 \pm 02,97$ µm² para G I, G II e G III. O pleomorfismo médio ou porcentagem de células hexagonais no endotélio central do olho direito e esquerdo de coelhos foi respectivamente de $65,40 \pm 23,39\%$ e de $75,15 \pm 10,44\%$, com variação de 42,01 a 88,80% e de 60,71 a 81,60%. Os resultados apontam decréscimo da densidade, do pleomorfismo, e aumento da área celular média com o aumento da idade. O endotélio da córnea de coelhos sofre alterações decorrentes do avanço da idade.

Descritores: lagomorfo, 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 rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) it's ophthalmic widely used in research, no data relating to corneal endothelium in this species correlating their age. Therefore aimed to assess cell density, the average cell area and morphology of the corneal endothelium of rabbits at different ages. It was studied 36 eyes of 18 rabbits, male or female, of different ages. Rabbits were divided into three groups with 6 animals each, designated by: G I (animals aged six months), G II (animals with 1 year) 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 $2307,16 \pm 319,04$, $1894,75 \pm 170,81$ e $1818,66 \pm 245,11$ células/mm². The average cell area was respectively $364,43 \pm 39,36$, $374,79 \pm 48,46$ e de $378.50 \pm 02,97$ μm² for GI, G II and G III. The pleomorphism medium or percentage of hexagonal cells in the endothelium of the central right and left eyes of rabbits was respectively $65.40 \pm 23.39\%$ and $75.15 \pm 10.44\%$, ranging from 42.01 to 88.80 %, and 60.71 to 81.60%. The results indicate a decrease in density, pleomorphism, and increased in average cell area with increasing age. The corneal endothelium of rabbits changes with advancing age.

Keywords: lagomorph, cleft, cornea, morphology, endothelial parameters, contact specular microscopy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACM : área celular endotelial central

Células/ mm²: células por milímetro quadrado

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DCE: densidade celular endotelial

Dr.: Doutor

et al.: e outros

G: grupo

MEC: microscopia especular de contato

MEV: microscopia eletrônica de varredura

mg: miligramas

min: minuto

mm: milímetros

mm²: milímetro quadrado

OD: olho direito

OE: olho esquerdo

p: probabilidade

Prof.: Professor

RPL: reflexo pupilar a luz

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V: volume

μm²: micrômetros quadrados

%: por cento μ: micron

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem fotográfica do microscópio especular de contato.	24
Figura 2 -	Imagem fotográfica da lente objetiva do microscópio especular de contato sobre a região central da córnea do bulbo do olho de um coelho com quatro anos de idade.	24
Figura 3 -	Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um coelho com seis meses de idade, com densidade celular de 2307,17 células/mm ² .	25
Figura 4 -	Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um coelho com 1 ano de idade, com densidade celular de 1894,75 células/mm ² .	26
Figura 5 -	Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um coelho com quatro anos de idade, com densidade celular de 1818,67 células/mm ² .	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Gráfico da densidade endotelial média do OD de coelhos, expressa em células/mm ² , para os grupos I, II e III.	27
Gráfico 2 -	Gráfico da densidade endotelial média do OE de coelhos, expressa em células/mm ² , para os grupos I, II e III.	28

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Valores médios da densidade celular (células/mm ²) e desvio padrão de células endoteliais da região central e da córnea de coelhos nas diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular.	26
Tabela 2 -	Valores médios da área celular (µm ²) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de coelhos nas diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular.	29
Tabela 3 -	Valores médios de pleomorfismo celular (%) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de coelhos nas diferentes faixas etárias avaliados por microscopia especular.	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Córnea.....	16
2.2 Endotélio corneano.....	16
2.3 Reparação endotelial.....	18
2.4 Métodos de avaliação do endotélio corneano.....	19
2.5 Microscopia especular.....	19
3 ARTIGO: Avaliação do endotélio da córnea de coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular	20
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e métodos.....	22
Resultados.....	24
Discussão e conclusão.....	29
Referências.....	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Os coelhos são amplamente empregados como modelo experimental em pesquisas oftálmicas (THOFT, FRIEND, MURPHY, 1979; CONNOR, FUEZALINDA-PUELMA, 1990; HADDOX, PFISTER, SLAUGHER, 1996; FRANZCO, et. al. 2004; KOMPA et. al., 2005; BOCACCIO, 2006).

A camada endotelial tem fundamental importância na manutenção da transparência da córnea. Constitui-se numa camada de células bastante frágeis, sendo constantemente sujeita a alterações fisiológicas decorrente do envelhecimento, traumas, uveítes e manipulações cirúrgicas intraoculares (LANDSHMAN *et al.*, 1989; TUFT, COSTER, 1990;). Assim, caso as células remanescentes não componham um mosaico suficiente para manter um equilíbrio entre a troca de líquidos da córnea com o humor aquoso, modificar-se-á sua ultraestrutura, levando a um edema corneano (LANDSHMAN *et al.*, 1989; TUFT, COSTER, 1990; ABIB, BARRETO, 2001; PIGATTO, 2004). O endotélio da córnea possui suas delimitações a membrana de Descemet, na sua face anterior, e o humor aquoso, na sua face posterior (WARING *et al.*, 1982). Este é composto de uma monocamada de células achatadas e poligonais interligadas, nas quais são encontradas células de quatro, cinco, sete e oito lados (SVEDBERGH, BILL, 1972; COLLIN, COLLIN, 1998; PIGATTO, 2004; PIGATTO *et al.*, 2006).

Na espécie humana e felina, as células endoteliais possuem uma mínima capacidade mitótica (HOFFER, 1979; TREFFERS, 1982; LAING, *et al.* 1983). Ao sofrerem qualquer dano que implique em perda celular suas células remanescentes hipertrofiam alterando sua regularidade e de forma. Desta forma, muitas vezes, o perfeito funcionamento do endotélio acaba por ser comprometido, causando edema corneano que pode ser irreversível, levando a perda da transparência da córnea (WARING *et al.*, 1982; LANDSHMAN *et al.*, 1988; TUFT, COSTER, 1990; ABIB, 2000; SANCTIS *et al.*, 2006). Diferentemente destas espécies, os lagomorfos, além de hipertrofia e migração celular também possuem a capacidade de realizar mitose celular (HIRSCH *et al.*, 1976; OLSEN, DAVANGER, 1984; MATSUDA *et al.*, 1985; ICHIJIMA *et al.*, 1993).

A avaliação do endotélio da córnea utilizando as microscopias especular e confocal é considerada importante e fidedigna na avaliação de lesões nas células endoteliais e avaliação pré operatória de procedimentos intraoculares (GWIN *et al.*, 1982; COLLIN, COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CANAVAGH *et al.*, 2000; JALBERT *et al.*, 2003;

PIGATTO *et al.*, 2006; KFARNIK *et al.*, 2007; MCCAREY *et al.*, 2008; PIGATTO *et al.*, 2008 ABIB, 2000).

Os parâmetros mais utilizados para avaliação do endotélio corneano são a densidade endotelial, a área celular média e a morfologia celular (ABIB, 2000; MCCAREY *et al.*, 2008).

Os parâmetros endoteliais já foram estudados em várias espécies, incluindo: suínos, lagomorfos, caninos, lhamas, equinos, alpacas, felinos e humanos (LAULE, *et al.*, 1978; SAILSTAD, PEIFER, 1981; PEIFFER *et al.*, 1981; GWIN, *et al.*, 1982;; ALP *et al.*, 2000; ABIB, BARRETO, 2001; ANDREW *et al.*, 2001; ANDREW *et al.*, 2002; OJEDA *et al.*, 2001; PIGATTO *et al.*, 2004; PIGATTO *et al.*, 2005a; PIGATTO *et al.*, 2005b; PIGATTO *et al.*, 2006; RODRIGUES, 2006; PIGATTO *et al.*, 2008; TAMAYO-ARANGO *et al.*, 2009; FRANZEN, 2010;).

A quantificação dos parâmetros endoteliais, previamente aos procedimentos cirúrgicos, minimiza os riscos de descompensação endotelial frente a procedimentos cirúrgicos (TUFT, S.J., COSTER, 1990; ABIB, 2000).

Existem estudos, realizados em coelhos utilizando as microscopias eletrônica de varredura e especular estabelecendo o padrão morfológico na espécie, sem distinção entre faixas etárias (VON SALLMANN *et al.*, 1961; SAILSTAD, PEIFFER, 1981; OLSEN, 1984; ICHIJIMA , 1993; DOUGHTY *et al.*, 1997; DOUGHTY , 1998; PIGATTO *et al.*, 2005; DOUGHTY , 2006). No entanto, ao se recorrer à literatura não foram encontradas referências relacionadas aos parâmetros do endotélio da córnea e sua relação com a idade em coelhos. Neste sentido, objetiva-se avaliar a densidade celular, a área celular média e a morfologia das células do endotélio da córnea de coelhos de diferentes idades.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Córnea

A córnea é formada por cinco camadas distintas, sendo elas: endotélio, membrana de Descemet, estroma e epitélio e filme lacrimal, e encontra-se localizada na porção anterior do bulbo do olho, tendo sua delimitação com a esclera ocupada pelo limbo (SLATTER, 2005). Esta estrutura é avascular e recebe sua nutrição através do filme lacrimal, do humor aquoso e principalmente por um processo de difusão proveniente do plexo venoso perilimbal (BANKS, 1992), o qual também tem extrema importância nos processos inflamatórios, nutricionais e cicatriciais da córnea. Esta, em coelhos, tem uma espessura média entre 0,37mm e 0,45mm na periferia e no centro, respectivamente (SAILSTAD, PEIFFER, 1981).

A córnea é desprovida de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e pigmentos, tem fibras nervosas amielínicas, regularmente dispostas e organizadas, e devido à sua deturgescência é um meio transparente de alta refração (SLATTER, 2005).

2.2 Endotélio corneano

Localizado na face posterior da córnea, delimitado pelo humor aquoso em sua parte mais posterior e pela membrana de Descemet em sua parte mais anterior. O endotélio corneano é uma das camadas responsáveis pela manutenção da transparência da córnea, sendo derivado embriologicamente da crista neural (DOUGHTY, 1998; BOTEON, 2000). Para isto, ele é responsável pelo controle de entrada e saída de fluidos do interior dessa estrutura, caso contrário, um edema poderia causar até uma ausência total de transparência, e por consequência a perda da visão (MISHIMA, 1982; LANDSHAMAN, *et al.*, 1988; TUFT, COSTER, 1990).

Este é composto de um mosaico de células poligonais dispostos em uma monocamada uniforme em forma e tamanho, continuando lateralmente como endotélio trabeculado escleral. Esta camada é formada por microvilosidades na parte posterior e voltada à membrana de Descemet na parte anterior. Estas estão relacionadas com a presença de vesículas pinocíticas, as quais contêm substâncias que serão utilizadas pelas células estromais (BOTEON, 2000).

As células, em sua maioria, tem formato hexagonal, sendo encontradas também

células de quatro a oito lados (RAO *et al.*, 1982, PIGATTO *et al.*, 2005a). Dessa forma o padrão normal é composto por 65 a 75% de células hexagonais, com mínima variação de outras formas celulares (AABERG, 1984; DOUGHTY, 1998). Ainda em relação ao seu aspecto estrutural, as células endoteliais são achatadas, providas de cílios na sua região central, possuem microvilosidades e interdigitações (GALLAGHER, 1980; VAN HORN *et al.*, 1977; GWIN *et al.*, 1982; BOTEON, 2000).

As dimensões das células endoteliais possuem diferenças significativas entre as espécies, sendo a humana provida de um padrão de 18 a 20 μm de largura, 4 a 6 μm na espessura e núcleo com 7 μm de diâmetro (BOTEON, 2000; TUFT, COSTER, 1990). Já nos felinos observam-se diâmetros celulares de 15 a 10 μm (SAILSTAD, PEIFFER, 1991).

Diretamente relacionado aos lagomorfos, encontram-se células uniformes, desprovidas de membrana basal e com núcleo alongado, largo e em formato de rim, como descrito por Prince (PRINCE, 1964), tendo um citoplasma composto por grânulos de pigmento, provavelmente melanina fagocitada da úvea e organelas intracitoplasmáticas (TUFT, DOSTER, 1990). Em relação as suas dimensões, o endotélio da córnea de coelhos apresenta diâmetro médio de $20,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$ (VIRTANEN *et al.*, 1984).

Com a finalidade de unir as células, através dos complexos juncionais, as membranas laterais da célula endotelial são subdivididas em *zonula occludens*, *macula occludens* e *macula acherens*, sendo as últimas duas estruturas mais raras (BOTEON, 2000). No entanto, em coelhos, foram descritos dois únicos tipos de junções celulares, apical e lateral, localizando-se a primeira na parte mais dorsal e a outra logo abaixo (HIRSCH *et al.*, 1976).

Encontradas na membrana celular posterior, tendo a função de aumentar a superfície posterior da célula endotelial, as microvilosidades podem ser observadas pela microscopia de varredura, apresentando-se nos coelhos em número de aproximadamente 63 vilosidades por célula (DOUGHTY, 1998). Diferentemente do que foi observado em humanos, as quais seriam em torno de 20 a 30 microvilosidades (BOTEON, 2000).

Somente observados por microscopia de varredura, os cílios das células endoteliais são localizados no centro destas, sendo direcionados à câmara anterior do bulbo ocular (GALLAGHER, 1980; COLLIN, COLLIN, 1998; COLLIN, COLLIN, 2000). Estes são encontrados em número único em cada célula e não possuem função definida, acreditando-se que possam ter a função de quimiorrecepção, osmorregulação

e/ou detecção de pressão. Foram observados em coelhos possuindo o comprimento aproximado de $3,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (GALLAGHER, 1980).

As interdigitações aumentam a superfície de contato das células, geralmente associadas à função de bomba ativa, e são formadas por prolongamentos tortuosos da membrana lateral das células (OJEDA et al., 2001).

2.3 Reparação endotelial

Apesar das pequenas variações a reparação endotelial é semelhante na maioria das espécies estudadas (TUFT, COSTER, 1990). Após as células sofrerem trauma ocorre estímulo para a cicatrização e as células vizinhas achatam-se e deslizam para cobrir o defeito descartando a célula lesada para a câmara anterior (WEIMAR et al., 1980; OLSEN, DAVANGER 1984; MATSUDA et al., 1985; TUFT, COSTER, 1990). Para que isto aconteça, as células vizinhas desenvolvem pseudópodos que migram em média 0,5 a 1,0 mm por dia, a fim de cobrir o defeito. Ao chegarem ao centro da lesão, cessa-se a movimentação e ocorre uma onda inversa de células a fim de se reposicionarem (WEIMAR, et al., 1980; MISHIMA, 1982; TUFT, COSTER, 1990). Segundo estudo realizado por Olsen e Davanger (1984), após o endotélio da córnea de coelhos sofrer uma lesão, em 14 dias já foi observada menor deturgência na córnea e também menor espessamento.

Já nos primatas e felinos, ocorre essencialmente a hipertrofia e migração celular, apresentando-se quase nulamente a atividade de mitose, sendo possível ocorre migração celular por um tempo prolongado (LAULE et al., 1978; LANDSHMAN et al., 1989; HUANG et al., 1989; BOURNE *et al.*, 1994; JACKSON et al, 1995). A presença destas células associada a uma densidade menor e a um maior pleomorfismo pode ser um indicativo de lesões endoteliais (LANDSHMAN et al., 1989).

Tem sido observado que os processos inflamatórios reduzem a habilidade cicatricial de replicação e migração celular (VAN HORN, 1977).

2.4 Métodos de avaliação do endotélio corneano

Estudos realizados *in vivo*, utilizam principalmente os métodos de microscopia especular e a confocal, biomicroscopia com lâmpada de fenda, paquimetria e fluorofotometria. Cada uma dessas técnicas possui vantagens e desvantagens para um melhor emprego dentro da avaliação da morfologia e morfometria do endotélio de humanos e animais (COLLIN, COLLIN, 1998; ABIB, 2000; CANAVAGH et al., 2000;

PIGATTO et al., 2006; PIGATTO et al., 2008).

Das técnicas *in vitro* a mais utilizada é a microscopia eletrônica de varredura (TAYLOR, HUNT, 1981). Com esta técnica é possível quantificar a densidade celular, a área celular média e a forma das células endoteliais (DOUGHTY, DILTY, 1994; ABIB, 2000; MCCAREY, EDELHAUSER, LINN, 2008).

Sendo parâmetros importantes, o pleomorfismo e o polimegatismo, são bastante analisados para avaliação da função endotelial. Além destes, a função metabólica do endotélio, a função da bomba, a integridade do efeito barreira e a paquimetria corneana. Tendo assim, cada um destes, o objetivo de avaliar de alguma forma a função endotelial (MISHIMA, 1982; TUFT, COSTER, 1990; ABIB, 2000).

2.5 Microscopia especular

Desenvolvida por Maurice em 1968, a microscopia especular é um dos métodos mais valiosos para análise *in vivo* das células endoteliais. Ao refletir uma pequena parcela de sua luz no endotélio corneano (cerca de 0,02%), esta, forma um ângulo de reflexão igual ao de incidência, sendo assim transmitida ao microscópio e formando uma imagem do endotélio que poderá ser capturado, armazenado e analisado (LAING et al., 1979; ABIB, 2000).

Os microscópios especulares podem ser encontrados no modelo de contato e não contato, em relação ao epitélio da córnea (LAING et al., 1983; ABIB, 2000; MCCAREY et al., 2008), o microscópio especular é amplamente utilizado para avaliações pré e pós-cirúrgicas (MCCAREY et al., 2008), também sendo utilizado para determinar toxicidades endotelial a fármacos e em pesquisas de cicatrização (LAULE et al., 1978; LANDSHMAN et al., 1989; HUANG et al., 1989; BOURNE, 1994; JACKSON et al., 1995; LIOU et al., 2004).

Os equipamentos também podem ser subdivididos entre não-automatizados, semi-automatizados e automatizados (JURKUNAS, COUBY, 2005). Todos os microscópios vem acompanhados de um *software* o qual permite a análise das imagens obtidas. Entre os métodos utilizados para avaliação do endotélio da córnea encontram-se o método retículo, o método da marcação dos centros celulares, o método de comparação e o método de marcação dos cantos celulares (ABIB, 2000; MCCAREY et al., 2008).

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 coelho (*Oryctolagus cuniculus*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular

Gustavo Brambatti[‡], Luciane de Albuquerque[‡], Carolina Neumman[‡], Mariana Soares[‡],
João A. T. Pigatto[‡]

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. Sendo o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) amplamente utilizadas em pesquisas oftálmicas, não existem dados referentes ao endotélio da córnea nesta espécie correlacionando sua idade. Portanto, objetivou-se avaliar a densidade celular, a área celular média e a morfologia do endotélio da córnea de coelhos em diferentes faixas etárias. **Procedimentos:** Foram estudados 36 bulbos oculares de 18 coelhos, machos ou fêmeas, de diferentes faixas etárias. Os coelhos foram subdivididas em três grupos com 6 animais cada, designados por: G I (animais com idade de seis meses); G II (animais com 1 ano 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 $2307,16 \pm 319,04$, $1894,75 \pm 170,81$ e $1818,66 \pm 245,11$ células/mm². A área celular média foi de respectivamente $364,43 \pm 39,36$, $374,79 \pm 48,46$ e de $378,50 \pm 02,97$ μm² 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 coelhos sofre alterações com o avanço da idade.

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

[‡] Veterinary College, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Cx Postal 15004, 91540-000, Brazil.

INTRODUÇÃO

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais interligadas que compõem a superfície posterior da córnea ⁹.

A camada endotelial tem fundamental importância na manutenção da transparência da córnea e alterações nas células endoteliais podem ocorrer em função do envelhecimento, doenças oculares e de fármacos ou cirurgias intraoculares ^{8,9,10,11}.

Na maioria das espécies, quando ocorre perda celular endotelial as células remanescentes aumentam de tamanho para cobrir a superfície posterior da córnea lesada acarretando diminuição da densidade endotelial. Em casos de perda endotelial onde as células remanescentes não consigam manter o equilíbrio entre a troca de líquidos da córnea com o humor aquoso poderá ocorrer edema corneano irreversível ^{8,9,10,11}.

A microscopia especular esta entre as técnicas mais fidedignas para analisar o endotélio da córnea ^{13,15,16,17,18,19,20,21}.

Os parâmetros endoteliais normais já foram estabelecidos em algumas espécies, incluindo: humanos ^{10, 19}, suínos ⁶⁶, jacarés ¹¹, caninos ^{13, 20, 21}, macacos ⁶⁵, avestruz ⁶⁴, pinguim ⁶⁷, aves ²⁰ e felinos ^{20,31,39}.

Os coelhos têm sido amplamente empregados como modelo experimental em pesquisas oftálmicas ^(2,3,4,5,6). Apesar do amplo emprego dos coelhos em pesquisas oculares, principalmente relacionadas à córnea e da necessidade do conhecimento dos parâmetros endoteliais ao longo da vida, os estudos realizados com esta espécie estão limitados aos animais de uma mesma idade ¹⁻⁷.

Objetivou-se avaliar a densidade celular, a área celular média e a morfologia das células do endotélio da córnea de coelhos de diferentes idades utilizando a microscopia especular de contato.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 36 bulbos oculares, de 18 coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), machos ou fêmeas, de diferentes idades. Todos os animais foram submetidos ao exame oftálmico, que incluiu avaliação dos reflexos pupilares, biomicroscopia com lâmpada de fenda¹, tonometria de rebote² e prova da fluoresceína³. Foram descartados animais com alterações oculares.

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

Considerando as faixas etárias dos animais foram designados três grupos com seis animais cada. Os grupos foram denominados de G I (animais com seis meses de idade), G II (animais com 1 ano de idade) e G III (animais com quatro anos de idade).

Para análise endotelial foi utilizado microscópio especular de contato⁴ (Fig. 1), com o *software* disponível para determinação da densidade endotelial. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador utilizando-se o método do retículo fixo.

Após anestesia dissociativa injetável, contendo midazolam (1 mg/kg), cetamina (25 mg/kg) e cloridrato de petidina (2 mg/kg), posicionou-se a lente objetiva do microscópio sobre a região central da córnea para avaliação endotelial e registro fotográfico digital do endotélio (Fig. 2). De cada amostra, foram capturadas três imagens nítidas. De cada imagem, foram analisadas, pelo menos, 60 células endoteliais.

¹ Portable Slit lamp Kowa SL15, Kowa Company, Ltd, Japan.

² Tonovet, Tiolat, Helsinki, Finlândia.

³ Fluoresceína sódica a 1%, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

⁴ Celmax, Medical Service, São Carlos, SP, Brasil.



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 um coelho de 4 anos.

Para a análise da densidade endotelial utilizou-se o programa CELMAX® que forneceu a densidade celular média. O cálculo da área celular média foi realizado

utilizando-se a fórmula:

Densidade de células endoteliais (células/mm²) = 1 000 000/área celular (µm²)

Posteriormente, foi realizada a contagem manual do número de lados das células endoteliais de cada imagem.

Para análise estatística utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguido do teste *post hoc* de Tukey com nível de significância inferior a 5% ($p < 0,05$) para comparação das médias dos parâmetros analisados entre os grupos.

RESULTADOS

Com o microscópio especular de contato foi possível avaliar o endotélio da córnea e obter imagens nítidas de todos os olhos analisados. Nenhum dos olhos submetidos à avaliação foi excluído do estudo. Nas imagens obtidas foi possível visibilizar que o endotélio da córnea de coelhos possui padrão regular de células poligonais uniformes e contínuas (Fig. 3,4,5)

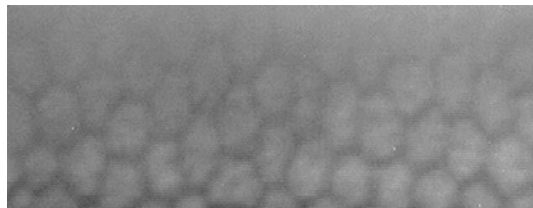


Fig. 3: Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um coelho com 6 meses de idade, com densidade celular de 2307,17 células/mm².

A densidade celular endotelial para o olho direito (OD) dos coelhos foi de 2025,66±268,79, variando entre 1865,83±283,29 e 2336,00±367,99 e de 1988,05±261,33 células/mm² para o olho esquerdo (OE), variando entre 1771,50±215,84 e 2278,33±294,15 células/mm² com os respectivos desvios padrões. (Tab. 1).

A densidade celular endotelial média, considerando ambos os olhos, nos animais dos grupos G I, G II e G III foi de 2006,86±327,74 células/mm².

Tab. 1. Valores médios da densidade celular (células/mm²) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de coelhos nas diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular.

	DCE OD	DCE OE
Grupos		
I*	2336,00± 367,99 ^a	2278,33± 294,15 ^a
I*	1875,16± 164,26 ^b	1914,33± 190,5 ^b III*
	1865,83± 283,29 ^c	1771,50±215,84 ^c
Média	2025,66± 268,79	1988,05±261,33

*Cada grupo apresentando 6 animais cada. Houve diferença estatisticamente significativa entre GI e GII, GI e GIII quando comparado os mesmos olhos direito e esquerdo ($p < 0,05$), entre GII e GIII não houve. Não houve entre olho direito e esquerdo.

No grupo I, obteve-se uma DCE de $2336 \pm 367,99$ células/mm² para o olho direito, variando entre 1968 e 2703 células/mm², e de $2278,33 \pm 294,15$ células/mm² para o olho esquerdo, variando entre 1984 e 2572 células/mm² (FIG. 3).

No grupo II, valores para o olho direito foram de $1875,17 \pm 164,26$ células/mm², variando entre 1710 e 2039 células/mm² e para o olho esquerdo, a DCE foi de $1914,33 \pm 190,50$, com variação de 1723 até 2104 células/mm² (Fig. 4).



Fig. 4: Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um coelho com 1 ano de idade, com densidade celular de 1894,75 células/mm².

No grupo III, a densidade endotelial central média foi de $1865,83 \pm 283,29$, com variação de 1582 a 2149 células/mm² no olho direito e $1771,50 \pm 215,84$, com variação de 1555 a 1987 células/mm² no olho esquerdo (Fig. 5).

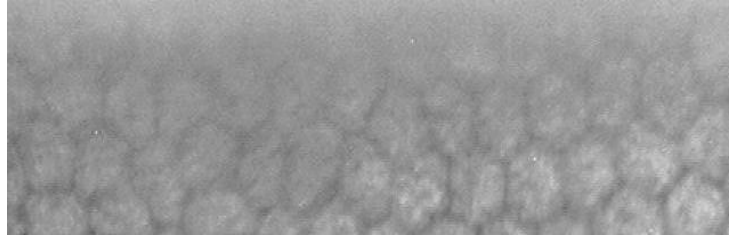


Fig. 5: Fotomicrografia especular do endotélio da córnea de um coelho com quatro anos de idade, com densidade celular de 1818,67 células/mm².

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de DCE entre o olho direito e olho esquerdo nos grupos I, II e III ($p=0,399$). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo GI, GII e GIII ($p<0,01$). No entanto comparando-se II e III não observou-se diferença significativa em relação à média da densidade celular entre os dois grupos ($p<0,01$), 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 ($p<0,01$).

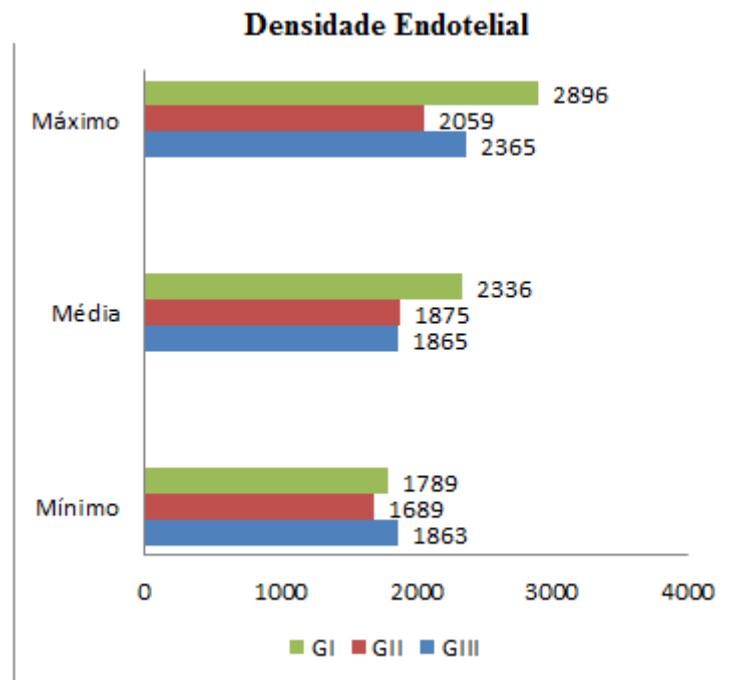


Gráfico 1: Gráfico da densidade endotelial média do OD de coelhos, expressa em células/mm², para os grupos I, II e III.

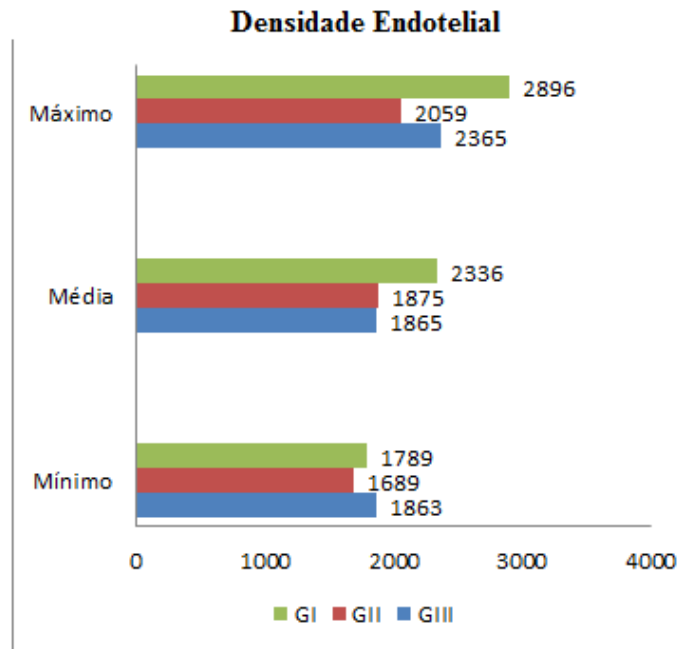


Gráfico 2: Gráfico da densidade endotelial média do OE de coelhos, expressa em células/mm², para os grupos I, II e III.

A área celular endotelial média (ACM) foi de $502,26 \pm 52,82 \mu\text{m}^2$ para o OD e de $492,78 \pm 79,38 \mu\text{m}^2$ para o OE, com respectiva variação de $441,45 \pm 228,13 \mu\text{m}^2$ a $528,63 \pm 223,35 \mu\text{m}^2$ para o olho direito e de $402,06 \pm 220,80 \mu\text{m}^2$ a $549,53 \pm 230,11 \mu\text{m}^2$ para o olho esquerdo.

A ACM do grupo I para o OD foi de $441,45 \pm 37,82$ com variação de $394,63 \mu\text{m}^2$ a $558,97 \mu\text{m}^2$, e para o OE a ACM foi de $402,06 \pm 220,80 \mu\text{m}^2$ com variação de $381,09 \mu\text{m}^2$ a $549,14 \mu\text{m}^2$. No grupo II a ACM foi de $526,71 \pm 47,03 \mu\text{m}^2$ e de $536,75 \pm 53,07 \mu\text{m}^2$ para os olhos direito e esquerdo, respectivamente, com variação entre $485,67 \mu\text{m}^2$ e $592,06 \mu\text{m}^2$ para o OD e entre $489,95 \mu\text{m}^2$ e $609,75 \mu\text{m}^2$ para o OE. Com relação ao grupo III a ACM foi de $528,63 \pm 223,35 \mu\text{m}^2$ e de $549,53 \pm 230,11 \mu\text{m}^2$ para os olhos direito e esquerdo, com variação respectiva de $422,83 \mu\text{m}^2$ a $657,89 \mu\text{m}^2$, e de $514,66 \mu\text{m}^2$ a $685,87 \mu\text{m}^2$ (Tab. 2).

Foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparada a área celular média dos GI e GII, e GI e GIII, porém não observados entre os grupos II e III. Não houve diferença significativa entre o OD e OE nos mesmos grupo ($p=0,399$).

Tab. 2. Valores médios da área celular (μm^2) e desvio padrão de células endoteliais da região central da córnea de coelhos nas diferentes faixas etárias avaliados utilizando a microscopia especular.

Grupos	Área celular central média	
	OD	OE
I*	441,45 \pm 228,13 ^a	402,06 \pm 220,80 ^a
II*	526,71 \pm 47,03 ^b	536,75 \pm 53,07 ^b
III*	528,63 \pm 223,35 ^c	549,53 \pm 230,11 ^c
Média	502,26 \pm 52,82	492,78 \pm 79,38

*Cada grupo apresentando 6 animais cada. Houve diferença estatisticamente significativa entre GI e GII, entre GI e GIII, no entanto não houve entre GII e GIII, quando comparado os mesmos olhos direito e esquerdo ($p < 0,01$).

O pleomorfismo médio ou porcentagem de células hexagonais no endotélio central do olho direito e esquerdo de coelhos foi respectivamente de $65,40 \pm 23,39\%$ e de $75,15 \pm 10,44\%$, com variação de 42,01 a 88,80% e de 60,71 a 81,60%. No grupo I obteve-se uma média de $60,23 \pm 26,92\%$ para o olho direito e de $68,25 \pm 10,08\%$ para o olho esquerdo, com respectiva variação entre 33,81 e 87,65%, e de 58,17 a 78,33%. No grupo II, a média encontrada foi de $68,91 \pm 2$ para o OD, e de $71,83 \pm 11,38$ para o OE, com variação respectiva de 66,91 a 70,92% e de 60,49 a 83,27%. No grupo III, obteve-se média de $64,02 \pm 28,80\%$ e de $73,33 \pm 11,10\%$ para o OD e OE, com variação de 35,21 a 92,82% e de 62,22 a 84,44% (Tab. 3).

Em relação ao pleomorfismo celular, foi observada diferença estatisticamente significativa quando foi comparado o grupo I ao grupo III ($p < 0,01$), e o grupo II com o grupo III ($p < 0,01$) dos olhos direito e esquerdo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre GI 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 coelhos nas diferentes faixas etárias avaliados utilizando a microscopia especular.

Grupos	Células hexagonais OD	Células hexagonais OE
I*	60,23 \pm 26,92 % ^a	68,25 \pm 10,08% ^a
II*	68,91 \pm 2 % ^a	71,83 \pm 11,38 % ^a
III*	64,02 \pm 28,80 % ^b	73,33 \pm 11,10% ^b
Média	64,38 \pm 4,35%	71,13 \pm 2,61%

*Cada grupo apresentando 6 animais cada. Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferença não significativas ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Diferentes métodos têm sido utilizados para a avaliação do endotélio da córnea, entre eles, a microscopia especular^{10,13, 14,18,17,39,44,45,47, 55,62} e a microscopia eletrônica de varredura^{10,11, 25, 36, 50,51}.

Há consenso de que o preparo de córneas para estudos à microscopia eletrônica de varredura suscita graus variáveis de retração celular, com diminuição da área celular original e aumento da densidade endotelial^{25,36}. Além disso, com esta técnica não são possíveis estudos *in vivo*.

A microscopia especular é considerada a técnica padrão para avaliar o endotélio da córnea e tem sido empregada em humanos^{10,14} e em algumas espécies animais, incluindo caninos, felinos, equinos, lhamas e coelhos^{15,9,27, 29, 39-41}. Neste sentido, a importância do tema, aliada a ausência de dados em coelhos, de diferentes faixas etárias, utilizando o microscópio especular motivaram a realização deste estudo.

A microscopia especular é amplamente utilizada na avaliação de córneas para transplantes, no exame de pacientes em períodos pré e pós operatórios, no monitoramento de doenças corneanas e no estudo da repercussão de fármacos e procedimentos cirúrgicos sobre a córnea^{10,17, 39,44,45}. A técnica de microscopia especular foi escolhida por permitir estudo *in vivo* e não causar deforma ou distorce o endotélio durante seu processo, diferente de algumas técnicas que o podem fazer durante seu processo de fixação ou coloração^{25,36}. Outra vantagem da microscopia especular é sua simplicidade operacional e não ser um procedimento invasivo^{10,14}. Além disto, é uma ferramenta muito utilizada em diversos trabalhos, demonstrando-se extremamente confiável, tanto *in vivo* quanto *in vitro*^{10,13, 14,18,17,39,44,45,47, 55,62}.

Entre as desvantagens da microscopia especular encontram-se o alto custo de aquisição do aparelho e a dificuldade para obtenção de imagens nítidas em áreas com edema corneano^{14,17}. No presente estudo, todos os animais selecionados foram submetidos a exame oftálmico prévio e selecionados somente animais com bulbos oculares hígidos sendo possível a obtenção de imagens nítidas do mosaico endotelial da região central da córnea em todas as córneas analisadas.

O microscópio especular pode ser de contato ou de não contato. Para utilização do aparelho de contato é necessário o contato entre a córnea e alente da objetiva havendo a necessidade de sedação ou anestesia dos animais^{44,45}. No presente estudo, o protocolo anestésico adotado mostrou-se seguro e intercorrências não foram observadas.

Os coelhos têm sido amplamente utilizados como modelo experimental para em pesquisas oftálmicas^{1,3,6,23-26,33,59}.

O modelo experimental selecionado foram coelhos de diferentes idades e da raça Nova Zelândia o que permitiu a padronização das amostras e avaliação dos parâmetros endoteliais em função da idade.

Para a presente análise foram quantificados a densidade celular, a área celular média e a forma das células endoteliais por serem os parâmetros mais confiáveis para avaliação da integridade do endotélio corneano^{36, 46}. São diversos os métodos utilizados pelos *softwares* de cada microscópio a fim de realizar-se a análise da densidade celular e da área endotelial, sendo os principais o de retículo fixo e móvel, a marcação dos centros celulares e o método de marcação de bordas celulares¹⁴. O método que empregado foi o de retículo fixo semi-automatizado, onde a definição das células endoteliais é realizada pelo operador. A precisão deste método se detém a experiência do operador em fazer a marcação das células contidas dentro do retículo de área conhecida (sendo considerado uma variação máxima de 0.5 e 5%), sendo então convertidas automaticamente para células/mm²¹⁴.

Alguns estudos definiram que para ter uma precisão adequada na análise, são necessárias, no mínimo, 30 células analisadas, no entanto outros recomendaram 60, 75 e até 100 células por imagem, alguns ainda indicaram a contagem do máximo de células possível^{44, 47-50}. Nesta pesquisa optou-se por utilizar um padrão de 60 células por imagem, sendo captadas três imagens da mesma região. Foram obtidos como resultados a média destas três contagens.

No presente estudo, somente células da região central da córnea de coelhos foram analisadas. Como, em animais com córnea hígida, a distribuição celular é uniforme entre as regiões central e periférica, o estudo da área central apenas é suficiente para se estimar os parâmetros¹⁴.

Neste estudo, foi possível observar que a densidade endotelial celular obtida para o GI foi de 2336,00± 367,99 células/mm². Já para os grupos GII e GIII, observou-se uma queda desse valor sendo 1914,33± 190,5 células/mm² e 1865,83± 283,29 células/mm², respectivamente. Conforme estatística realizada, observou-se uma diferença significativa entre os grupos GI e GIII, o que comprova uma diminuição no número de células em relação à idade. Este fator pode ser observado em várias espécies, caninos, felinos e leporinos, onde também se observou o aumento da ACM conforme o avanço da idade (10, 39, 51-54). Também foi possível observar este comportamento do

endotélio em seres humanos, onde uma pesquisa descreve que a densidade endotelial de um recém nascido é de 3500 a 4000 células/mm² e em um indivíduos adultos é e 1400 a 2500 células/mm² ⁵⁵.

BAHN (1986) descreveu que apesar da variação entre o tamanho corneano de felinos, bovinos, caninos, cervos, coelhos e humanos, ambos apresentam uma contagem endotelial central similar de aproximadamente 2500 células/mm². Resultados semelhantes também foram observados neste trabalho, sendo observada uma DCE, variando de 6 meses a 4 anos, um valor de 2025,66± 268,79 células/mm² para o olho direito e 1988,05±261,33 células/mm² para o olho esquerdo, o que comparativamente com o trabalho citado, não apresenta diferença estatisticamente significativa.

Quando ao ACM, observamos que o trabalho corrobora com o descrito na literatura, onde podemos observar que conforme a idade aumenta, também temos um aumento da ACM. Conforme descrito neste trabalho observamos que no GI a ACM tem o valor de 360,13 ± 37,82µm² para o olho direito e no olho esquerdo 368,52 ± 43,98 µm² , em contrapartida o GIII apresenta o olho direito com 385,12±37,57µm² e olho esquerdo 371,88 ±09,13µm², o que se mostra uma diferença significativa, no entanto não observada entre os grupo GII e GIII. Este trabalho também corrobora com o de Virtanen et al. (1984) (³⁶), o qual descreve uma ACM de 335,1±75 µm² como sendo o padrão normal para a espécie leporina.

Esta diferença entre a DCE e ACM conforme o aumento da idade é observada em outras espécies, e simplesmente associada a perda de células ao avanço da idade. Sabe-se que no homem este fator estabiliza-se por volta do 20 anos de idade, no entanto em animais não foram encontrados quaisquer dados correlacionando a diferença entre DCE e ACM ^{10, 15}.

Normalmente a córnea apresenta 65 a 75% de células endoteliais com formato hexagonal, o que forma uma estrutura regular e estável, tendo um mínimo de variação no tamanho celular ^{26, 42, 57}.

Este aumento no pleomorfismo das células observado entre o GI e GII, pode ser explicado pelo alargamento destas em resposta a uma perda endotelial que ocorre normalmente com o avançar da idade, sendo observado em humanos e animais^{10,39}. Estas células remanescentes alteram seu tamanho e formato, ou seja, migram e hipertrofiam a fim de ocupar o espaço deixado pelas células perdidas ^{9, 15, 58-62}. Outro estudo realizado em cães através da microscopia eletrônica de varredura, corrobora com esta pesquisa, onde também demonstram o polimegatismo e pleomorfismo em relação

ao avanço da idade ⁶³.

Com relação ao pleomorfismo foram encontradas em todos os gupos células com quatro, cinco, seis e sete lados. Os valores médios encontrados foram entre 60,23% e 73,33%. Na maioria dos mamíferos o endotélio é caracterizado por uma monocamada de células poligonais uniforme em tamanho e forma, sendo as células predominantes de formato hexagonal e pentagonal ^{10, 12, 13, 15, 37, 39, 41, 51, 63}.

Foi observado aumento do percentual de células hexagonais no G II em relação ao GI. No entanto houve diminuição no pleomorfismo no GIII quando comparado ao GII. Normalmente com o envelhecimento ocorre diminuição do pleomorfismo ⁵⁸. No entanto cai em desencontro com outros autores que não observaram o mesmo comportamento em cães e gatos, fato não explicado pelos autores ^{15, 39}. Além da hipertrofia celular a reparação endotelial em coelhos também dá-se por mitose ^{37, 38, 40, 64}. Talvez devido à atividade mitótica das células endoteliais de coelhos não tenha ocorrido diminuição do pleomorfismo nos GII e GIII em relação ao GI.

Estudos realizados em suínos, cães e humanos demonstraram que o endotélio corneano de machos e fêmeas, não apresenta uma diferença significativa entre si ^{9, 12, 15, 37, 39, 41}. Neste estudo o fator sexo não foi analisado.

Não foram observadas diferenças entre os olhos direito e esquerdo quanto a todos os parâmetros estudados. Estudos prévios em humanos, equinos, caninos, felinos, suínos informaram a inexistência de diferenças em relação aos parâmetros endoteliais obtidos entre os olhos direito e esquerdo ^{27, 56}.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que o endotélio da córnea de coelhos é formado por células poligonais com predomínio do formato hexagonal. O endotélio da córnea de coelhos sofre alterações decorrentes do avanço da idade.

REFERÊNCIAS

- (1) Conners, MS.; Urbano, F.; Vafeas, C.; Stoltz, RA.; Dunn, MW.; Schwartzman, M. L.; Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Visual Science*, 1997; 38(10): 1963-71.
- (2) Connor, SS.; Fuezalinda-puelma, HL. *Bioethicis: issues and perspectives*. Washington DC: Paho, 1990, 226-229.
- (3) Franzco, LM.; Summers, PM.; Franzca, DG.; Bamcroft, J.; Franzco, GRL. Controlled trial of hyperbaric oxygen treatment for alkali corneal burn in the rabbit. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2004, 32:67-70.
- (4) Haddox, JL.; Pfister, RR.; Slaughter, SG. Na excess of topical calcium and magnesium reverses the therapeutic effect of citrate on the development of corneal ulcers after alkali injury. *Cornea*, 1996, 15(2):191-5.
- (5) Kompa, S.; Redbrake, CL Hilgers, CI Wustermeyer, H.; Schrage, N.; Remky,A.; Effect of different irrigating solutions on aqueous humor pH changes, intraocular pressure and histological findings after induced alkali burns. *Acta Ophthalmology Scandinavica.*, 2005, 83:467-70.
- (6) Thoft, RA.; Friend, J.; Murohy, H.S. Ocular surface epithelium corneal vascularization in rabbits. I, the role of wounding. *Investigate Ophthalmology Visual Science*, 1979, 18(1):85-92.
- (7) Bocaccio, FJL. Novo modelo experimental de queimadura química alcalina, da superfície ocular. 2006, 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina). Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- (8) Landshman, N. et al. Relationship between morphology and functional ability of regenerated corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1988, 29:1100-1109.
- (9) Tuft, SJ. & Coster, DJ. The corneal endothelium. *Eye*, 1990, 4:389-424.
- (10) Abib, FC.; Barreto, JR. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 2001, 27:1574-78.
- (11) Pigatto, JAT. et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Veterinary Ophthalmology*, 2004,7(3):205-208.
- (13) Pigatto, JAT. Et al. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, 2006, 43(4):476-480.

- (14) Mccarey, BE.; Edelhauser, HF. & Lynn, M. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive produces, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea*, 2008, 27(1):1-16.
- (15) Gwin, RM. et al. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as function of age. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1982, 22(2):267-271.
- (16) Collin, SP. & Collin, HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry*, 1998, 81(6):245-254.
- (17) Abib, FC. In: *Microscopia especular de córnea: manual e atlas*. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000, p.140.
- (18) Canavagh, HD. et al. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea*, 2000, 19(5):712-722.
- (19) Jalbert, I. et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *British Journal of Ophthalmology*, 2003, 87(2):225-236.
- (20) Kafarnik, C.; Fritsche, JRS. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Veterinary Ophthalmology*, 2007,10(4):222-230.
- (21) Pigatto, J.A.T. et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2008,28(9):427-430.
- (22) Von Sallmann, L.; Caravaggio, LL & Grimes, P. Studies on the corneal endothelium of the rabbit. Cell division and growth. *American Journal of Ophthalmology*, 196,151:955.
- (23) Weimar, V.; Squires, E.L. & Knox, J.L. Acceleration of healing of rabbit endothelium by mesodermal growth factor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1980,19(4):350-361.
- (24) 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*, 1998,30:634-643.
- (25) 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*, 2006,9(2):127-135.
- (26) 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*, 1997,29(5):533-547.

- (27) Bercht, BS., Avaliação do endotélio da córnea de chinchilas (*Chinchilla lanigera*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular. 2012, 56f. . Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- (28) Hünning, PS., Avaliação da morfologia pós-operatória das células do endotélio corneano de coelhos na região periférica peri-incisional comparativamente com a região central. 2011, 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- (29) Pigatto JAT. Extração Extracapsular Do Cristalino, Comparativamente À Facoemulsificação, Com Enfoque Nas Repercussões Endoteliais Corneanas Em Cães (*Canis Familiaris* - Linnaeus, 1758). 2004, 112 F. Tese (Doutorado Em Medicina Veterinária). Programa De Pós-Graduação Em Cirurgia Da Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia, Universidade De São Paulo, 2004.
- (30) MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *American Journal of Ophthalmology*, 1982, 93(1):1-29.
- (31) 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.
- (32) Schultz, R.O.; Glasser, D.B.; Matsuda, M. et al. Response of the corneal endothelium to cataract surgery. *Archives of Ophthalmology*. 1986, 104:1164-69.
- (33) Mencucci, R.; Ambrosini, S.; Ponchiatti, C. et al. Ultrasound termal damage to rabbit córneas after stimulated phacoemulsification. *Journal Cataract Refractive Surgery*. 2005, 31:2180-86.
- (34) Bourne, WM.; Nelson, LR.; Buller, CR.; et al. Long-term observation on morphologic and functional teatures of cat corneal endothelium after wounding. *Invest Ophthalmol. Vis. Sic*. 1994, 35:891-899.
- (35) Diaz-Valle, D.; Benitez, JM.; Castillo, A. et al. Endothelial damage with cataract surgery techniques. *J. Cataract Refractive Surgery*. 1998, 50:321-36.
- (36) 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.
- (37) Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels S, Neufeld A, Kenyon K. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1985;26(4):443-449.

- (38) HIRSCHT, M. et al., Formation of intracellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. *Experimental Eye Research*, 1976, 23(4):385-97.
- (39) 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.
- (40) OLSEN, EG. & DAVANGER, M. The healing of rabbit corneal endothelium. *Acta Ophthalmologica*, 1984,62(5):796-807.
- (41) Alp, BN, Elibol O, Sargon MF, Aslan OS; et al. The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. *Cornea*. 2000;19(4):546-550.
- (42) Rao, G. et al. Cell size-shape relationships in corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1982, 22(2):271-274.
- (43) 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.
- (44) 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.
- (45) Modis, L.J.R., Langenbucher, A.; Seitz, B. Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and noncontact specular microscopy. *Journal Cataract Refractive Surgery*. 2002, 28(10):1763-1769.
- (46) Doughty, M.J. & Dilts, M.D. Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer-application to corneal endothelium. *Tissue and Cell*. 1994, 26:621-36.
- (47) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Archives of Ophthalmology*. 1979;97(9):1714-1719.
- (48) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Archives of Ophthalmology*. 1976;93(2): 143-145.
- (49) Laing, RA. et al. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. *Archives of Ophthalmology*. 1983, 101(11):1712-15.
- (50) Binder P, Akers P, Zavala E. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmology*. 1979;86(10):1831-1847.
- (51) Pigatto, JAT. et al. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005, 33(1):41-5.

- (52) 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.
- (53) 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.
- (54) 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.
- (55) 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.
- (56) Freitas, L.V.R.P. Avaliação do endotélio corneano de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular. 2012, 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- (57) AABERG, T.M. Correlation between corneal endothelial morphology and function. *American Journal of Ophthalmology*, 1984, 98(4):510-512.
- (58) Waring 3rd G, Bourne W, Edelhauser H, Kenyon K. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 1982;89(6):531-590.
- (59) Van Horn, DL et al. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1977, 16(7):597-613.
- (60) Laule, A. et al. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Archives of Ophthalmology*. 1978, 96(11):2031-35.
- (61) McCallum, DK. et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Investigative phthalmology and Visual Science*. 2008, 26(4):443-49.
- (62) Nassaralla, BA. 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.
- (63) 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.
- (64) Pigatto, JAT. et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural*, 2009, 39(3):926-929.
- (65) 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.

(66) Tamayo-Arango, L.J. *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural*, 2009, 39(1):117-122.

(67) Pigatto, JAT. *et al.* Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2005, 36(4):702-705.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo observou-se que é possível utilizar a microscopia especular para avaliar, documentar e quantificar os parâmetros do endotélio da córnea. Além disso, os dados obtidos poderão ser utilizados futuras avaliações oculares de coelhos.

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, p.140, 2000.
- 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.
- BAHN, C.F. *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.27, p.44-51, 1986.
- BERCHT, B.S., **Avaliação do endotélio da córnea de chinchilas (*Chinchilla lanigera*) em diferentes faixas etárias utilizando a microscopia especular**. 2012, 56f. . Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BOCACCIO, F.J.L. **Novo modelo experimental de queimadura química alcalina, da superfície ocular**. 2006, 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina). Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.
- 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.M.; NELSON, L.R.; BULLER, C. R.; *et al.* Long-term observation on morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. **Investigate Ophthalmology Visual Science**, v.35, p.891-99, 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.
- CONNERS, M. S.; URBANO, F.; VAFEAS, C.; STOLTZ, R. A.; DUNN, M W.; SCHWARTZMAN, M. L.; Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. **Invest Ophthalmol Visual Science**, v.38, n. 10, p. 1963-71, 1997.
- CONNOR, S.S.; Fuezalinda-puelma, h.l. Bioethicis: issues and perspectives. Washington DC: Paho, p.226-229 1990.
- DIAZ-VALLE, D.; BENITEZ, J.M.; CASTILLO, A. *et al.* Endothelial damage with cataract surgery techniques. **J. Cataract Rfractive Surgery**, v.50, p.321-36, 1998.
- DOUGHTY M.J. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium *ex vivo*. **Tissue and Cell**, v.30, p.634-643, 1998.
- DOUGHTY M.J. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy-a comparison of two different methods of corneal fixation. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.2, p.127-135, 2006.
- DOUGHTY, M.J.; BERGMANSON, J.P.& BLOCKER, Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. **Tissue and Cell**, v.29, n.5, p.533-547, 1997.
- DOUGHTY, M.J. & DILTS, M.D. Identification of topographical variations in the sizes of cells in a monolayer-application to corneal endothelium. **Tissue and Cell**, v.26, p.621-36, 1994.
- DOUGHTY MJ, MÜLLER A, ZAMAN ML. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. **Cornea**, v..19, n.2, p.148, 2000.
- DOUGHTY, M.J.; SPITERI, M. & DILTS, D.M. Determination of the unit size of the corneal endothelial cell mosaic from Fourier component image analysis. **Tissue and Cell**, v.29, n.2, p.229-238, 1997.

FRANZCO, L.M.; SUMMERS, P.M.; FRANZCA, D.G.; BAMCROFT, J.; FRANZCO, G.R.L. Controlled trial of hyperbaric oxygen treatment for alkali corneal burn in the rabbit. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.32, p.67-70, 2004.

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.

HADDOX, J.L.; PFISTER, R.R.; SLAUGHER, S.G. Na excess of topical calcium and magnesium reverses the therapeutic effect of citrate on the development of corneal ulcers after alkali injury. **Cornea**, v.15, n.2, p.191-5, 1996.

HENRIKSSON JT, MCDERMOTT AM, BERGMANSON JPG. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.50, n.8, p.3648-3654, 2009.

HIRSCHT, M. *et al.*, Formation of intracellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v.23, n.4, p.385-97, 1976.

HIRSCHT, L.W.; FERRIS, F.L.; STARK, W.J.; FLEISHMAN, J.A. Clinical specular microscopy. **Invest Ophthalmol Visual Science**, v.19, p.2-4, 1980.

HOFFER, K. J. Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. **American Journal of Ophthalmology**, v.87, n.2, p.252-3, 1979.

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.

HÜNNING, P.S., **Avaliação da morfologia pós-operatória das células do endotélio corneano de coelhos na região periférica peri-incisional comparativamente com a região central**. 2011, 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ICHIJIMA, H. *et al.*, *In vivo* confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit cornea, **Cornea**, v.12, n.5, p.369-78, 1993.

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.; FRITSCHKE, 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.

KOMPA, S.; REDBRAKE, C.L HILGERS, CL WUSTERMEYER, H.; SCHRAGE, N.; REMKY,A.; Effect of different irrigating solutions on aqueous humor pH changes, intraocular pressure and histological findings after induced alkali burns. **Acta Ophthalmology Scandinavica.**, v.83, p.467-70, 2005.

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.

LIU, S.W.; CHIU, M.D.; WANG, I.J.; Effect of intracameral injection of lidocaine and cabachol on the rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract Refractive Surgery**. v.30 p1351-56, 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.

MENCUCCI, R.; AMBROSINI, S.; PONCHIETTI, C. *et al.* Ultrasound thermal damage to rabbit corneas after stimulated phacoemulsification. **J. Cataract Refractive Surgery**, v.3, p.2180-86, 2005.

MCCALLUM, D.K. *et al.* Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. **Investigative phthalmology and Visual Science**. v.26, n.4, p.443-49, 2008.

- 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. **Journal Cataract Refract Surg**, v.28, n.10, p.1763-1769, 2002.
- MODIS, L.J.R., LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Scanning-slit and specularmicroscopic 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.
- 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-p.506, 2006.
- SCHULTZ, R.O.; GLASSER, D.B.; MATSUDA, M. *et al.* Response of the coreneal endothelium to cataract surgery. **Archives of Ophthalmol.** v.104, p.1164-69, 1986.
- SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.11, p.283-338.
- 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.
- TAYLOR, M.J.; HUNT, C.J.; Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye – lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v.65, n.12, p.815-19, 1981
- TREFFERS, W.F. Human corneal endothelial wound repair. In vitro and in vivo. **Ophthalmology**, v.6, n.89, p.605-615, 1982.

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

TREFFERS, W.F. Human corneal endothelial wound repair. *In vivo* and *in vitro*. **Ophthalmology**, v.6, n.89, p.605-15, 1982.

THOFT, R. A.; FRIEND, J.; MUROHY, H.S. Ocular surface epithelium corneal vascularization in rabbits. I, the role of wounding. **Invest Ophthalmology. Visual Science**, v.18, n.1, p.85-92, 1979.

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.

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.

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.