

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CELULARIDADE ENDOTELIAL NA CERATOPLASTIA  
PENETRANTE EM COELHOS**

**Fábio Andrade Marinho**

Médico Veterinário

UNESP-Jaboticabal

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CELULARIDADE ENDOTELIAL NA CERATOPLASTIA  
PENETRANTE EM COELHOS**

**Fábio Andrade Marinho**

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

UNESP-Jaboticabal

2013

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

FÁBIO ANDRADE MARINHO - nascido em 12 de janeiro de 1983, em Natal, Rio Grande do Norte. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela UFCG – Universidade Federal de Campina Grande em Patos - PB, em dezembro de 2007. Concluiu a Residência Veterinária, na área de Clínica Médica e Cirurgia de Pequenos Animais, na UFV – Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa - MG em março de 2010. Atualmente, é aluno regular do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, nível de mestrado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço...

Ao meu querido Prof. Dr. José Luiz Laus, pelo apoio em todo esse tempo e confiança depositada em minha pessoa, mostrando a cada conversa o quanto é especial para todos que orienta, muito obrigado por fazer parte do meu crescimento profissional e pessoal. Sou muito grato professor ao senhor.

A minha co-orientadora Bianca Martins pelo apoio durante todo o mestrado.

Ao meu pai Baltazar Manuel José Marinho e minha mãe Eulália Maria de Andrade Marinho que fizeram de tudo (possível e impossível) para o meu crescimento profissional e me fortaleceram em todos os momentos da minha vida.

A todos os meus irmãos (Baltazar, Carolina e Fabricio) que sempre me deram força para enfrentar as circunstâncias da vida.

Aos meus sobrinhos (Mel e Lucca) por proporcionar uma sensação única de ser tio “coruja” e deixar minha vida mais feliz e da minha família.

Aos meus Avós e Avôs pelo afeto.

Ao meu tio Arnaldo de Andrade Junior por ter me guiado na minha profissão.

A todos da minha família que de uma forma direta e indireta me ajudaram para me tornar uma pessoa cada vez melhor.

Ao grande parceiro Ivan Ricardo Martinez Padua, Colômbiano, mas pela minha humilde opinião mais Brasileiro que muitos outros ai, por ter me ensinado e ajudado todo esse tempo, se tornando para mim um membro da família. E também ao seu irmão Pedro Pablo Martinez pela parceria também formada. Obrigado aos dois de coração. Essa família colombiana é especial.

Ao doutor Luciano Nogueira e sua esposa tia Carmen por ter me ajudado todo esse tempo me acolhendo como membro da família. Muito obrigado por tudo!

A Marcelão e a sua esposa patricinha (Ana Lúcia) e filhas, por tudo que me fez esse tempo todo (atenção, carinho, preocupação...).

A Thiago e a sua esposa mastruz (Alessandra) por tudo que me fez esse tempo todo (atenção, carinho, preocupação...).

A Tia Fátima, Professor Camacho e filhos (Raquel e Rafael) por me acolherem de uma forma tão especial. Muito grato a família camacho.

Ao professor Aúreo Evangelista por ter aberto as portas da Unesp-Jaboticabal na época que ainda era graduando. Obrigado professor.

Ao professor Antônio Haddad da FMRB-USP-Ribeirão Preto, pela grande ajuda concedida na interpretação da microscopia eletrônica de varredura.

A professora Paula Galera pela ajuda para obtenção dos resultados da histologia.

Ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAVJ/UNESP.

A todos os pós-graduandos, em especial da Oftalmologia, Luciano, Luciana, minha Patty nafstrom (Patrícia Jordão, parceira), Séfora (minha parceira no projeto), Roberta, Kethy, Thiago, Germana, Bya, Alexandre, tititi, Tchaina, Miguel, Alexandre (dedo), Dúnia. Todosss que passaram pelo serviço!!

A todos os meus pacientes que me ajudaram nessa jornada tão importante na minha vida e aos seus proprietários.

Aos funcionários da pós-graduação, pela paciência de tirar todas as dúvidas finais.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, pelo acolhimento e auxílio na realização da pesquisa.

A todas as pessoas, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos professores componentes da banca de qualificação pelas correções e sugestões realizadas (Bruno Minto e Andriago Barboza).

A FAPESP, pelo auxílio concedido para a execução da pesquisa (Processo: 2011/17665-0).

A CAPES, pela bolsa concedida.

.

A Deus, o grande inspirador de tudo.

.

E a todos que por ventura tenha deixado de citar por esquecimento.

## SUMÁRIO

|                                                   | Página     |
|---------------------------------------------------|------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                | <b>ii</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                             | <b>iii</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                      | <b>iv</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                      | <b>v</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....</b> | <b>1</b>   |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>                      | <b>5</b>   |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                          | <b>5</b>   |
| 3.1 Objetivos gerais .....                        | 5          |
| 3.2 Objetivos específicos.....                    | 5          |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                | <b>5</b>   |
| 4.1 Aspectos Éticos .....                         | 5          |
| 4.2 Animais .....                                 | 6          |
| 4.3 Delineamento Experimental.....                | 6          |
| 4.4 Obtenção das Córneas .....                    | 6          |
| 4.5 Procedimento Cirúrgico.....                   | 7          |
| 4.6 Procedimentos pós-operatórios .....           | 8          |
| 4.7 Avaliação clínica .....                       | 8          |
| 4.8 Colheita do material .....                    | 9          |
| 4.9 Microscopia especular de não contato .....    | 9          |
| 4.10 Histologia.....                              | 9          |
| 4.11 Microscopia eletrônica de varredura.....     | 10         |
| 4.12 Estatística .....                            | 10         |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>                         | <b>10</b>  |
| 5.1 Avaliação Clínica.....                        | 10         |
| 5.2 Microscopia especular de não contato .....    | 17         |
| 5.3 Histologia.....                               | 17         |
| 5.4 Microscopia eletrônica de varredura.....      | 22         |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>                          | <b>24</b>  |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>                          | <b>27</b>  |
| <b>8. REFERÊNCIAS.....</b>                        | <b>28</b>  |

## **CELULARIDADE ENDOTELIAL NA CERATOPLASTIA PENETRANTE EM COELHOS**

**RESUMO** - Afecções que afligem o estroma corneal profundo, como as distrofias, o ceratocone, os abscessos e os sequestros da córnea são de relativa frequência. Visando ao seu tratamento, tais desordens podem ser manejadas empregando-se os transplantes corneais penetrantes. Buscou-se, com a pesquisa, avaliarem-se as condições da celularidade endotelial, à microscopia especular de não contato, à histologia e à microscopia eletrônica de varredura, na ceratoplastia penetrante em coelhos. Foram utilizados 18 animais, sadios, adultos, machos e fêmeas, com peso médio de 3,0 kg, da raça Nova Zelândia Branco. Seis grupos foram constituídos, contendo 3 animais cada. A microscopia especular foi empregada. As avaliações foram realizadas diariamente, até se completarem 30 dias e a cada três dias, até se completarem 60 dias das ceratoplastias. Colhidas, as córneas foram avaliadas à histologia e à microscopia eletrônica de varredura. Empregou-se análise de variância para medidas repetidas, com posterior avaliação pelo teste Tukey, considerando-se o nível mínimo de significância  $p \leq 0,05$ . No pós-operatório, em face das alterações na superfície ocular, a realização da microscopia especular de não contato foi prejudicada. À histologia, evidenciaram-se edema acentuado e discreta organização estromal nas córneas receptora e doadora, ao início das avaliações. À microscopia eletrônica de varredura, não se evidenciou migração de células endoteliais do leito receptor para o doador.

**Palavras chave:** coelho, córnea, endotélio, ceratoplastia penetrante.



## ENDOTHELIAL CELLULARITY FOLLOWING PENETRATING KERATOPLASTY IN RABBITS

**ABSTRACT-** Diseases affecting the deep corneal stroma such as dystrophies, keratocone, abscesses and corneal sequestrum occur frequently. Those alterations may be managed by penetrating corneal transplants. On the present research the endothelial cellularity of rabbits submitted to penetrating keratoplasty was evaluated by non-contact specular microscopy, histology and scanning electron microscopy. Eighteen adult, healthy, males and females rabbits, weighting around 3.0 kg, breed New Zealand White were used. Animals were randomly assigned on 6 groups composed of 3 individuals each. Specular microscopy was employed. The animals were daily evaluated for 30 days, and every third day, until 60 days following the keratectomies. Following harvesting, the corneas were submitted to histology and scanning electron microscopy. Repeated measures Anova and Tukey's test were used for statistical analysis. Results were considered significant if  $p \leq 0.05$ . Non-contact specular microscopy was not possible if alterations of the ocular surface were present during the post-operative period. Histological evaluation exhibited severe edema and mild stromal organization of the recipient and donor cornea during the initial post-operative period. The scanning electron microscopy, there was no endothelial cells migration from the recipient to the donor corneas.

**Key words:** rabbit, cornea, endothelial, penetrating keratoplasty.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                     | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Tabela 1.</b> Parâmetros referentes aos eventos, blefaroespasma e secreção do 1º ao 60º dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Branco. Jaboticabal, SP, 2013.....                               | 11     |
| <b>Tabela 2.</b> Parâmetros referentes aos eventos, quemose e hiperemia conjuntival do 1º ao 60º dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, SP, 2013.....                | 12     |
| <b>Tabela 3.</b> Parâmetros referentes aos eventos, edema e vascularização nas córneas receptoras, do 1º ao 60º dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, SP, 2013..... | 13     |
| <b>Tabela 4.</b> Parâmetros referentes aos eventos, edema, opacidade e vascularização do enxerto, do 1º ao 60º dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, SP, 2013.....  | 14     |

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratoplastia penetrante. Em A, severa opacidade do enxerto corneal (seta amarela), ao 3º dia da avaliação. Em B, discreta opacidade do enxerto (seta amarela) e moderada hiperemia conjuntival (\*), ao 3º dia da avaliação. Em C, moderada opacidade do enxerto (seta amarela) e discreta hiperemia conjuntival ao 7º dia de pós-operatório. Em D, severa opacidade do enxerto (seta amarela), adjunto à discreta hiperemia conjuntival (\*), ao 14º dia de pós-operatório. Em E, moderada opacidade do enxerto (seta amarela), associada à vascularização corneal (seta preta), ao 21º dia de pós-operatório. Em F, moderada vascularização corneal (setas pretas) ao 30º dia de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2013..... 15
- Figura 2.** Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratoplastia penetrante. Em A, moderada opacidade em enxerto (seta amarela), hipópio (#) e discreta hiperemia conjuntival (\*), ao 7º dia de pós-operatório. Em B, severa opacidade do enxerto (seta amarela), adjunto a discreta vascularização corneal (setas pretas), ao 7º dia de pós-operatório. Em C, severa vascularização corneal (setas pretas), invadindo a área do enxerto, que se apresenta com moderada opacidade (seta amarela) ao 14º dia de pós-operatório. Em D, severa opacidade do enxerto (seta amarela), associada à severa vascularização corneal (setas pretas), aos 30º dia de pós-operatório. Em E, protrusão de lente e de parte do vítreo (seta preta), decorrentes da perda

do enxerto, ao 30º dia de avaliação. Em F, severa vascularização corneal (setas pretas), invadindo a região do enxerto, que se apresenta com severa opacidade (seta amarela), ao 60º dia de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2013.....

16

**Figura 3.** Fotomicrografias de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, notar edema acentuado e discreta organização estromal na córnea receptora (#), assim como na córnea doadora (\*); infiltração neutrofílica na córnea doadora (\*) e, no detalhe (seta), ao 3º dia de pós-operatório (HE,40x). Em B, notar área de reorganização na borda da córnea receptora (#) e na da doadora (\*). No detalhe, observam-se fibroblastos, aos 7º dias de pós-operatório (HE, 40x). Jaboticabal, SP, 2013.....

18

**Figura 4.** Fotomicrografias de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, notar organização na córnea doadora (\*), em contraste com a receptora (#), e evidenciar presença da membrana de Descemet e endotélio (seta amarela) na córnea receptora (#) e ausência (seta vermelha) na doadora (\*). No detalhe, observam-se infiltrado inflamatório e área de neovascularização (seta preta), aos 14º dias de pós-operatório (HE, 40x). Em B, notar processo de re-epitelização (seta preta) e ausência da membrana de Descemet e endotélio (seta vermelha) na córnea doadora (\*) e, no detalhe, moderado infiltrado inflamatório na borda da córnea receptora (#), aos 21 dias de pós-operatório (HE, 40x). Jaboticabal, SP, 2013.....

20

- Figura 5.** Fotomicrografias de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório na ceratectomia penetrante. Em A, notar área de hiperplasia epitelial (seta dupla) na córnea receptora (#), junto a presença da membrana de Descemet e endotélio (seta amarela), aos 30 dias de pós-operatório (HE, 40x). Em B, notar avançado processo de re-epitelização (seta) na córnea doadora (\*), aos 60 dias de pós-operatório (HE, 100x). Jaboticabal, SP, 2013..... 21
- Figura 6.** Eletronfotomicrografia de varredura de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, aos 3 dias de pós-operatório (1000X); Em B, aos 7 dias de pós-operatório (350X); Em C, aos 30 dias (350X) e em D, aos 60 dias de pós-operatório (350X). Observar ausência de endotélio na córnea doadora (\*), em relação à receptora (#), sem qualquer evidência de migração de células endoteliais. Jaboticabal, SP, 2013..... 22
- Figura 7.** Eletronfotomicrografia de varredura de córnea de coelho da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, aos 7 dias de pós-operatório (2000X) e em B, aos 21 dias de pós-operatório (2000X). Observar a presença de células endoteliais na córnea receptora. Jaboticabal, SP, 2013..... 23

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A córnea, nos animais domésticos, representa um quinto da túnica fibrosa do bulbo do olho. Entre as funções mais importantes que desempenha, incluem-se o suporte do conteúdo intra-ocular, a transmissão e a refração da luz (por sua transparência e curvatura, respectivamente). O filme lacrimal pré-corneal, o epitélio, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio constituem as camadas que a compõem (SAMUELSON, 1999; WHITLEY e GILGER, 1999; SLATTER, 2007).

O epitélio corneal é composto por células pavimentosas estratificadas não queratinizadas, dispostas sobre uma lâmina basal, e a ela firmemente aderidas por hemidesmossomos (SAMUELSON, 1999).

O estroma corresponde cerca de 90% da espessura corneal. Ele é formado por fibras colágenas organizadas, por uma matriz celular, por linfócitos, por macrófagos, por ceratócitos e por outros constituintes, em menor quantitativo (SAMUELSON, 1999; SLATTER, 2007).

A membrana de Descemet, constituída por fibras delgadas de colágeno, é considerada a membrana basal do endotélio. Caracteriza-se por ser acelular, homogênea e elástica. O endotélio é formado por uma única camada de células poligonais. Situado adjacente e posterior à membrana de Descemet, exibe limitada capacidade de regeneração. Não obstante, promove barreira mecânica à passagem do humor aquoso e, juntamente com o epitélio, atua na manutenção da deturgescência corneal, por transporte ativo de íons (bomba ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) (SAMUELSON, 1999; WHITLEY e GILGER, 1999).

Dentre as condições que mantém a transparência da córnea, amontam-se a ausência de vasos sanguíneos e de pigmentos, a presença de epitélio anterior não queratinizado, de fibras nervosas amielinizadas, o nível de organização e o pequeno diâmetro das fibras colágenas estromais, somados ao relativo grau de deturgescência do estroma (WHITLEY e GILGER, 1999).

A espessura corneal varia entre espécies, raças, indivíduos e quanto à localização topográfica onde habitam. Em geral, nos animais domésticos, ela não ultrapassa a 1,5mm. Em leporinos, ela varia de 0,37 a 0,43 mm (CHAN et al., 1983).

Transplantes corneais são procedimentos efetuados rotineiramente em medicina, estando, relativamente a todas as modalidades de transplante, entre os mais realizados no mundo. Em animais, contudo, eles são menos empreitados (BROOKS, 2005). Podem ser praticados por razões ópticas, terapêuticas, tectônicas ou cosméticas.

Com os transplantes ópticos, visa-se, principalmente, à melhoria ou ao restabelecimento da visão, quando há opacidades corneais. Os terapêuticos são realizados para o controle de afecções corneais refratárias, a partir da remoção de tecido necrótico ou infectado. Com tectônicos, preserva-se ou restabelece-se a integridade estrutural. Com cosméticos, visa-se à melhoria da estética, sem proporcionar benefícios à visão (BROOKS et al., 2008).

Em face do privilégio imunogênico da córnea, obtém-se sucesso em cerca de 75% dos transplantes corneais, decorridos até cinco anos do procedimento. Ceratites, infecções, vascularização corneal e a necessidade de reoperação, em alguns casos, reduzem estatisticamente os índices de sucesso em pacientes humanos (KAISERMAN, 2009).

A perda contínua das células endoteliais constitui preocupação após ceratoplastia penetrante. Ing et al. (1998) relataram que a densidade endotelial diminui por até 10 anos das ceratoplastias penetrantes, em níveis bem mais elevados que os em indivíduos normais.

Na dependência do tamanho e da localização da afecção, as ceratoplastias podem envolver toda a espessura corneal ou serem lamelares (PLUMMER et al., 2008). A ceratoplastia penetrante, historicamente, é anterior à lamelar (ANWAR e TEICHMANN, 2002a; ANWAR e TEICHMANN, 2002b).

No âmbito da Veterinária, transplantes corneais têm sido, também, bem sucedidos em equinos. Realizados por motivos terapêuticos ou tectônicos, proporcionam bons resultados no tratamento de ceratopatias inflamatórias, de ceratomalácias, de abscessos corneais, de prolapsos de íris e para neoplasias (WHITTAKER et al., 1997; BROOKS et al., 2008). Em pacientes humanos, condições que afetam o estroma corneal, tais como o ceratocone, sequelas de ceratites e distrofias estromais, representam mais de um terço das indicações para as ceratoplastias (MURAINÉ et al., 2007).

Estudos revelaram que a sobrevida do enxerto, após 10 anos de pós-operatório, pode chegar a 89% para casos de ceratocone, a 73% nas distrofias

corneais de Fuchs, a 70% nas cicatrizes não-herpéticas, e a 60% nas herpéticas (WILLIAMS et al., 2008).

Em países menos desenvolvidos, tem-se como fator limitante a pouca disponibilidade de doadores (DONALD et al., 2012). Transplantes de córnea em animais têm sido realizados com enxertos frescos ou com material congelado. Enxertos frescos maximizam a preservação das células endoteliais, minimizando a ocorrência de opacidades no pós-operatório. Enxertos congelados oferecem riscos de alterações endoteliais induzidas pela criopreservação. Tecidos frescos podem não estar disponíveis no momento desejado, obrigando à utilização de enxertos congelados (BROOKS et al., 2008).

Na preservação de córneas, visa-se à manter o endotélio viável e à minimizar o edema estromal (STAINER et al., 1981). Meios de preservação as mantêm viáveis por mais tempo (McCAREY e KAUFMAN, 1974). Meios ideais, além das qualidades referidas, devem ser de custo acessível, podendo preservar córneas por até duas semanas (KAUFMAN et al., 1991; LINDSTROM et al., 1992).

Dentre as técnicas em ceratoplastia utilizadas, destacam-se a penetrante, para afecções envolvendo toda a espessura corneal. A lamelar anterior, utilizada para afecções que acometem o epitélio e o estroma anteriores. A lamelar posterior, para afecções do estroma posterior axial e a endotelial lamelar profunda, para condições que afligem o estroma posterior periférico (ANDREW et al., 2000; BROOKS, 2005; BROOKS et al., 2008; PLUMMER et al., 2008).

Sinéquias anterior e posterior, edema e vascularização no enxerto, granulação, deiscência e úlceras são algumas das complicações associadas à aplicação da ceratoplastia penetrante (ANDREW et al., 2000). Dentre as principais causas de insucesso, apontam-se a rejeição e a diminuição da celularidade endotelial (FUNNELL et al., 2006; NOBLE et al., 2007).

A rejeição aguda ao endotélio corneal resulta em rápida e permanente perda da sua celularidade. Para a sua patência funcional, o endotélio demanda a existência de quantitativo mínimo de células (cerca de 2.500 por  $\text{mm}^2$ ). Quando os valores caem para cerca de 500 por  $\text{mm}^2$ , decorrem edema e alterações na transparência corneal (CLAERHOUT et al., 2008). Na perda de



células endoteliais, células remanescentes aumentam em tamanho para ocupar a área desnuda (FRANZEN et al., 2010). Entre as espécies estudadas, a leporina é uma das que mais exibem regeneração endotelial (HONEGGER, 1962; CHI e KELMAN, 1966; STOCKER, 1971; VAN HORN et al., 1976). Estudos em coelhos mostraram que no interregno de 10 dias, já são factíveis a divisão e a migração celulares (KANAI, 1976; KHOUDAHOUST e GREEN, 1976; VAN HORN et al., 1976). Embora se considere que a rejeição proporcione perda permanente de células endoteliais, autores relataram retorno temporal à transparência (PLSKOVÁ et al., 2002; BROOKS et al., 2005; GONG et al., 2009).

Transplantes de córnea permanecem como os principais meios para se conseguir a reabilitação visual, em casos de perda da transparência corneal (DONALD et al., 2012). Não obstante à disponibilidade de instrumentos para se acessar o mosaico endotelial, relatos detalhados sobre a sua morfologia, estão aquém do que poderiam, em animais (PIGATTO et al., 2008), notadamente nos transplantes.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A córnea esta entre os mais importantes meios refringentes do olho. Danos endoteliais podem resultar em opacidade corneal irreversível, com diminuição da percepção visual. Procedimentos cirúrgicos, em ceratoplastias penetrantes, não são realizados rotineiramente em animais, embora o sejam em pacientes da espécie humana.

Com a pesquisa, avaliaram-se as condições corneais na ceratoplastia penetrante, valendo-se de técnicas laboratoriais e de imagem.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivos gerais**

Estudarem-se condições corneais na ceratoplastia penetrante.

### **3.2 Objetivos específicos**

Fazê-lo empregando-se a microscopia especular de não contato, a histologia e microscopia eletrônica de varredura em leporinos albinos de laboratório.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Éticos**

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas *Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)*, de consoante com o código de NÜREMBERG (Goldin, 1995) e às da Comissão de Ética no Uso de Animais, sob o número de protocolo 015763/12, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus Jaboticabal, SP.

## 4.2 Animais

Após exame físico, por semiotécnica oftálmica balizada no teste da lágrima de Schirmer<sup>1</sup>, na biomicroscopia com luz em fenda<sup>2</sup>, na tonometria digital de aplanção<sup>3</sup>, na oftalmoscopia binocular indireta<sup>4</sup> e na prova da fluoresceína<sup>5</sup>, para exclusão de alterações oftálmicas concorrentes com a realização da pesquisa, selecionaram-se 18 animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus* - LILLGEBORG, 1874), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos ou fêmeas, com peso médio de 3,0 kg, que foram mantidos em gaiolas apropriadas, em ambiente ventilado, limpo, seco e protegido, recebendo ração comercial e água potável à vontade.

## 4.3 Delineamento Experimental

Os indivíduos foram submetidos a transplante corneal alógeno (ceratoplastia penetrante). Para tal, foram aleatoriamente separados em seis grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), compostos por três animais, para avaliação pós-operatória aos 3, 7, 14, 21, 30 e 60 dias, respectivamente.

## 4.4 Obtenção das Córneas

Córneas doadoras foram obtidas de animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus* - LILLGEBORG, 1874), da raça Nova Zelândia Branco, oriundos de aulas práticas de Técnica Cirúrgica do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV UNESP - Câmpus de Jaboticabal. Para tal, elas foram excisadas assepticamente e acondicionadas, uma a uma, em frascos estéreis contendo solução à base de tobramicina à 0,3%<sup>6</sup>, à temperatura de -20°C (BROOKS et al., 2008).

---

<sup>1</sup> Teste da Lágrima de Schirmer – Ophthalmos Ltda

<sup>2</sup> Slit Lamp SL-14 – Kowa Company Ltd.

<sup>3</sup> TonoPen XL - Reichert®

<sup>4</sup> Oftalmoscópio binocular indireto FOH-5 – Eyetec S.A

<sup>5</sup> Fluoresceína strips – Ophthalmos Ltda

<sup>6</sup> Tobrex colírio® - Cristália, São Paulo, Brasil

#### 4.5 Procedimento Cirúrgico

Após a indução da anestesia, pela associação de quetamina<sup>7</sup> com midazolam<sup>8</sup>, nas doses de 40 e 0,2 mg/kg, respectivamente, pela via intramuscular, procedeu-se à sua manutenção com anestesia inalatória à base de Isoflurano<sup>9</sup>, fornecido em máscara facial, diluído em 100% de oxigênio, em circuito com reinalação parcial de gases, dotado de vaporizador universal. Imediatamente antes das intervenções cirúrgicas, realizou-se a microscopia especular de não contato (basal). Instilou-se uma gota de colírio anestésico de tetracaína, com 0,1% de fenilefrina<sup>10</sup>. As ceratoplastias foram efetuadas empregando-se microscópio cirúrgico<sup>11</sup>, em aumento de 10 vezes.

Guardadas as medidas rotineiras de antisepsia, proteção do campo operatório e da blefarostase, procedeu-se à fixação do bulbo do olho com fio monofilamentar encastado<sup>12</sup>, empregando-se pontos escleroconjuntivais em número mínimo de quatro. Com trépano calibrado<sup>13</sup>, de 5 mm de diâmetro, criou-se um botão corneal lamelar, na região central da córnea, envolvendo, aproximadamente, 80% da sua espessura. Empregando-se bisturi de 15 graus<sup>14</sup>, realizou-se incisão vertical na porção remanescente do estroma, penetrando-se na câmara anterior. Com tesoura de córnea universal<sup>15</sup>, o botão corneal foi recortado e excisado.

Córneas doadoras foram descongeladas à temperatura ambiente, simultaneamente à realização das ceratectomias. Atendendo ao proposto por Brooks et al. (2008), utilizaram-se botões corneais de diâmetro superior em 1mm, comparativamente ao leito receptor. Para a sua confecção, empregou-se trépano<sup>16</sup> de 6 mm de diâmetro.

O botão corneal doador foi transferido para o leito receptor e suturado com fio absorvível sintético multifilamentado 8-0<sup>17</sup>, em pontos simples separados (BROOKS et al., 2008). Foram confeccionados, inicialmente, quatro

---

<sup>7</sup> Cetamin® - Syntec, Brasil

<sup>8</sup> Dormire® - Cristália, Brasil

<sup>9</sup> Isoflurane® - Cristália, Brasil

<sup>10</sup> Colírio anestésico® - Allergan, Brasil

<sup>11</sup> M-9 - DF Vasconcellos, Brasil

<sup>12</sup> Mononylon 5-0 - Bioline, Brasil

<sup>13</sup> Kolplast ci ltda, São Paulo, Brasil

<sup>14</sup> Slit knife 15 degrees® - Alcon labs.

<sup>15</sup> Steel inox, São Paulo, Brasil

<sup>16</sup> Kolplast ci ltda, São Paulo, Brasil

<sup>17</sup> Vicryl 8-0® - Ethicon, Brasil

pontos, localizados nas posições correspondentes às 12, 6, 3 e 9 horas de um relógio. Ato contínuo, foram posicionados os demais, entre as suturas iniciais.

Utilizou-se substância viscoelástica<sup>18</sup>, retirada, por aspiração, imediatamente antes da confecção do último ponto de fixação do enxerto.

#### 4.6 Procedimentos pós-operatórios

Findados os tempos cirúrgicos, colocou-se colar do tipo Elizabethano.

Empregou-se colírio à base de tobramicina<sup>19</sup>, em instilações intercaladas de 6 horas, durante 10 dias consecutivos. Utilizou-se colírio à base de diclofenaco sódico<sup>20</sup>, a cada 6 horas, durante 15 dias. Empregou-se soro sanguíneo equino, a cada 6 horas, por 15 dias consecutivos, que fora obtido por venopunção jugular, acondicionado em frascos estéreis e mantido refrigerado à 4°C, por 72 horas máximas. Para se minimizarem riscos de rejeição aguda dos enxertos, empregou-se pomada oftálmica, à base de ciclosporina A à 0,2%<sup>21</sup>, a intervalos de 12 horas, por 10 dias consecutivos, segundo proposto por Plummer et al. (2008). Para analgesia, utilizou-se cloridrato de buprenorfina<sup>22</sup>, na dose de 0,01mg/kg, pela via subcutânea, a intervalos regulares de 12 horas, durante cinco dias consecutivos.

#### 4.7 Avaliação clínica

As avaliações foram realizadas diariamente. Parâmetros referentes ao blefaroespasma, à secreção ocular, à quemose e à hiperemia conjuntival foram considerados. Outros, relativos às condições corneais, como vascularização, edema, vascularização do enxerto e transparência do enxerto, igualmente o foram. Para o estudo estatístico, adotaram-se os escores: *Nihil* (ausente), + (discreto), ++ (moderado) ou +++ (severo).

---

<sup>18</sup> Metilcelulose 2% - Ophthalmos Ltda

<sup>19</sup> Tobramicina 0,3% solução oftálmica - Cristália, Brasil.

<sup>20</sup> Still 0,1%® - Allergan, Brasil

<sup>21</sup> Ciclosporina A 0,2% pomada oftálmica - Ophthalmos, Brasil

<sup>22</sup> Temgesic® - Schering-Plough, Brasil

#### **4.8 Colheita do material**

Findados os períodos de avaliação concebidos, os animais foram submetidos à eutanásia ativa, empregando-se quetamina e midazolam, pela via intra-muscular, nas doses de 40 mg/kg e de 1,0 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente, e propofol<sup>23</sup>, na dose de 10 mg/kg, pela via intra-venosa.

Realizou-se a enucleação subconjuntival, seguida da excisão e da hemissecção das córneas. Amostras destinadas à histologia foram acondicionadas em frascos contendo solução de formaldeído tamponado à 10%. Amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura, o foram em frascos contendo glutaraldeído tamponado à 3%.

#### **4.9 Microscopia especular de não contato**

A microscopia especular de não contato<sup>24</sup> foi realizada previamente ao ato cirúrgico e o seria imediatamente antes da colheita das córneas em cada grupo (3, 7, 14, 21, 30 e 60 dias). Todavia, condições corneais e do enxerto, quanto à transparência e ao relevo, não permitiram a sua consecução no pós-operatório.

#### **4.10 Histologia**

As amostras foram individualmente armazenadas em recipientes plásticos, e identificadas. Para o processamento, o material, incluído em parafina, passou por cortes semi-seriados, à espessura de 5µm. As peças foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) ou pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Posteriormente, foram avaliadas à microscopia de luz e os eventos relativos à reparação corneal, notadamente quanto ao edema, à vascularização, à infiltração de leucócitos polimorfonucleares e à de mononucleares foram avaliados e documentados em fotomicroscópio<sup>25</sup>.

---

<sup>23</sup> Profolen<sup>®</sup> - Blausiegel, Brasil

<sup>24</sup> Microscópio especular de não contato SP-3000P- TOPCON- Japão

<sup>25</sup> DM5000B<sup>®</sup> - Leica, Germany

#### **4.11 Microscopia eletrônica de varredura**

Após a fixação em glutaraldeído à 3%, por 48 horas, as amostras foram tratadas com tetróxido de ósmio e transferidas para álcool 70%, sendo desidratados em concentrações crescentes, até a de 100%. Procedeu-se à sua secagem em câmara de CO<sub>2</sub>, à temperatura ambiente de 37°C e à pressão de 1500 PSI, por 20 minutos. Os fragmentos foram metalizados com ouro paládio e montados, empregando-se fita adesiva, com a face endotelial exposta. As avaliações foram realizadas com acelerações de 15 a 20Kv, em aumentos de 350 a 5000 vezes, empregando-se microscópio eletrônico<sup>26</sup>.

#### **4.12 Estatística**

As médias relativas aos eventos blefaroespasma, secreção ocular, quemose, hiperemia conjuntival, edema corneal, vascularização corneal, edema do enxerto, opacidade do enxerto e vascularização do enxerto foram categorizadas e comparadas. Empregou-se análise de variância para medidas repetidas, com posterior avaliação ao teste Tukey, considerando-se o nível mínimo de significância  $p \leq 0,05$ . Utilizou-se programa próprio para tal<sup>27</sup> em todas as análises, respeitando-se o nível mínimo de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Avaliação Clínica**

Os achados clínicos revelaram blefaroespasma, que fora discreto, e em apenas um indivíduo, aos 7 dias de pós-operatório. Os graus moderado e severo não foram identificados (Tab. 1). A análise à estatística não revelou diferenças em qualquer dos momentos avaliados ( $p > 0,05$ ).

Secreção ocular, do tipo mucosa, foi verificada de forma moderada ou discreta, com maior frequência durante os primeiros 30 dias da avaliação, regredindo nos períodos subsequentes (Tab. 1). Os animais diferiram entre si, nos dias 1° e 14° ( $p < 0,05$ ), 14° e 30° ( $p < 0,05$ ) e quando comparados o 1°

---

<sup>26</sup> Microscópio Eletrônico JSM 5410.

<sup>27</sup> GraphPad Prism 4

( $p<0,01$ ), 3° ( $p<0,05$ ), 7° ( $p<0,01$ ), 21° ( $p<0,01$ ) e 30° ( $p<0,01$ ), com o 60° dia de avaliação.

**Tabela 1.** Parâmetros referentes aos eventos, blefaroespasma e secreção do 1° ao 60° dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, SP, 2013.

| Sinais Clínicos |                    |     |    |     |              |      |      |     |       |
|-----------------|--------------------|-----|----|-----|--------------|------|------|-----|-------|
| Dias            | Blefaroespasma (%) |     |    |     | Secreção (%) |      |      |     | Total |
|                 | Grau               |     |    |     | Grau         |      |      |     | (n)   |
|                 | <i>Nihil</i>       | +   | ++ | +++ | <i>Nihil</i> | +    | ++   | +++ |       |
| 1               | 100                |     |    |     | 16,6         | 22,2 | 55,6 | 5,6 | 18    |
| 3               | 100                |     |    |     | 27,8         | 27,8 | 44,4 |     | 18    |
| 7               | 93,3               | 6,7 |    |     | 20           | 46,7 | 33,3 |     | 15    |
| 14              | 100                |     |    |     | 27,3         | 63,7 | 9    |     | 12    |
| 21              | 100                |     |    |     | 12,5         | 75   | 12,5 |     | 9     |
| 30              | 100                |     |    |     | 20           | 40   | 20   | 20  | 6     |
| 60              | 100                |     |    |     | 100          |      |      |     | 3     |

Nihil (ausente), + (discreto), ++ (moderado), +++ (severo)

Graus severos de quemose foram observados exclusivamente no primeiro dia da avaliação, em três dos animais. Ao sétimo dia da avaliação, houve discreta quemose, que deixou de ser evidente a partir do 14° dia (Tab. 1). Observou-se diferença significativa, quando comparados o dia 1° ( $p<0,01$ ) com o 7°, 14°, 21°, 30° e 60° dias da avaliação. Adjunto, quando se compararam o 3° dia ( $p<0,01$ ) com o 14°, 21°, 30° e 60° dias.

Constatou-se hiperemia conjuntival de discreta a severa (Figs. 1B, 1C, 1D e 2A) nos primeiros momentos de avaliação, para diminuir nos períodos subsequentes, e não mais ser evidenciada a partir do 30° dia da avaliação (Tab. 1). Verificou-se diferença entre os dias 1° e 7° e entre os dias 1°, 3° e 7° , com os dias 14°, 21°, 30° e 60° ( $p<0,01$ ), respectivamente.



**Tabela 2.** Parâmetros referentes aos eventos, quemose e hiperemia conjuntival do 1º ao 60º dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, SP, 2013.

| Sinais Clínicos |              |      |      |      |                        |      |      |      |       |
|-----------------|--------------|------|------|------|------------------------|------|------|------|-------|
| Dias            | Quemose (%)  |      |      |      | Hiper. Conjuntival (%) |      |      |      | Total |
|                 | Grau         |      |      |      | Grau                   |      |      |      | (n)   |
|                 | <i>Nihil</i> | +    | ++   | +++  | <i>Nihil</i>           | +    | ++   | +++  |       |
| 1               | 33,3         | 22,2 | 27,8 | 16,7 | 27,8                   | 22,2 | 33,3 | 16,7 | 18    |
| 3               | 44,4         | 38,9 | 16,7 |      | 38,9                   | 33,3 | 27,8 |      | 18    |
| 7               | 60           | 40   |      |      | 46,7                   | 53,3 |      |      | 15    |
| 14              | 100          |      |      |      | 63,7                   | 36,3 |      |      | 12    |
| 21              | 100          |      |      |      | 75                     | 25   |      |      | 9     |
| 30              | 100          |      |      |      | 100                    |      |      |      | 6     |
| 60              | 100          |      |      |      | 100                    |      |      |      | 3     |

Nihil (ausente), + (discreto), ++ (moderado), +++ (severo)

Edema da córnea receptora foi observado a partir do primeiro dia. Verificou-se evolução para o grau severo até o 21º dia da avaliação, com tendência à diminuição nos períodos subsequentes. Aos 60º dia de pós-operatório, ele foi discreto (Tab. 2). Os animais diferiram estatisticamente entre si ao 1º ( $p<0,01$ ), 3º ( $p<0,01$ ), 7º ( $p<0,05$ ) e 14º ( $p<0,01$ ) dias, relativamente ao 21º dia da avaliação e entre o 30º e 60º dias, relativamente ao 21º ( $p<0,01$ ).

Vascularização corneal iniciou-se aos 7 dias de pós-operatório, a partir do limbo (Tab. 2 e Fig. 2B) em direção ao enxerto (Fig. 1E). Observaram-se graus de moderado a severo, até o 30º dia, a partir do qual houve tendência à sua diminuição. Houve diferença entre o 1º ( $p<0,01$ ) e o 3º ( $p<0,01$ ) dias, com o 14º, 21º, 30º e 60º dias; entre o 7º ( $p<0,01$ ) com o 14º, 21º e 30º dias; entre o 14º ( $p<0,05$ ) e o 60º ( $p<0,01$ ) dias, com o 21º e o 30º dias de avaliação.

**Tabela 3.** Parâmetros referentes aos eventos, edema e vascularização nas córneas receptoras, do 1º ao 60º dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, SP, 2013.

| Condições Corneais |              |      |      |      |                    |      |      |      |       |
|--------------------|--------------|------|------|------|--------------------|------|------|------|-------|
| Dias               | Edema (%)    |      |      |      | Vascularização (%) |      |      |      | Total |
|                    | Grau         |      |      |      | Grau               |      |      |      | (n)   |
|                    | <i>Nihil</i> | +    | ++   | +++  | <i>Nihil</i>       | +    | ++   | +++  |       |
| 1                  | 66,7         | 22,2 | 11,1 |      | 100                |      |      |      | 18    |
| 3                  | 50           | 44,4 | 5,6  |      | 100                |      |      |      | 18    |
| 7                  | 40           | 40   | 13,3 | 6,7  | 53,3               | 46,7 |      |      | 15    |
| 14                 | 18,2         | 45,4 | 27,3 | 9,1  | 18,2               | 36,3 | 45,5 |      | 12    |
| 21                 |              | 50   | 37,5 | 12,5 |                    | 25   | 62,5 | 12,5 | 9     |
| 30                 | 20           | 60   | 20   |      |                    | 20   | 60   | 20   | 6     |
| 60                 | 66,7         | 33,3 |      |      | 100                |      |      |      | 3     |

Nihil (ausente), + (discreto), ++ (moderado), +++ (severo)

Constatou-se edema do enxerto em graus variados, até o 30º dia de pós-operatório, a partir do qual houve diminuição da sua intensidade (Tab. 3, Figs. 1C e 1E). Ao se compararem o 1º, 3º, 7º e 21º dias com o 30º e o 60º dias ( $p < 0,01$ ), observou-se diferença significativa, assim como com o 14º dia com o 60º dia ( $p < 0,01$ ) e 30º ( $p < 0,05$ ) dia.

Verificou-se opacidade do enxerto em grau moderado (Fig. 1E), na maioria dos animais, em todos os momentos (Tab. 3). Em alguns, observou-se opacidade severa, dificultando ou impossibilitando a visibilização de detalhes da câmara anterior (Figs. 1A, 1D, 2D e 2F). No último momento da avaliação, encontrou-se opacidade moderada. Estatisticamente, não se encontrou qualquer diferença entre os momentos avaliados ( $p \geq 0,05$ ).

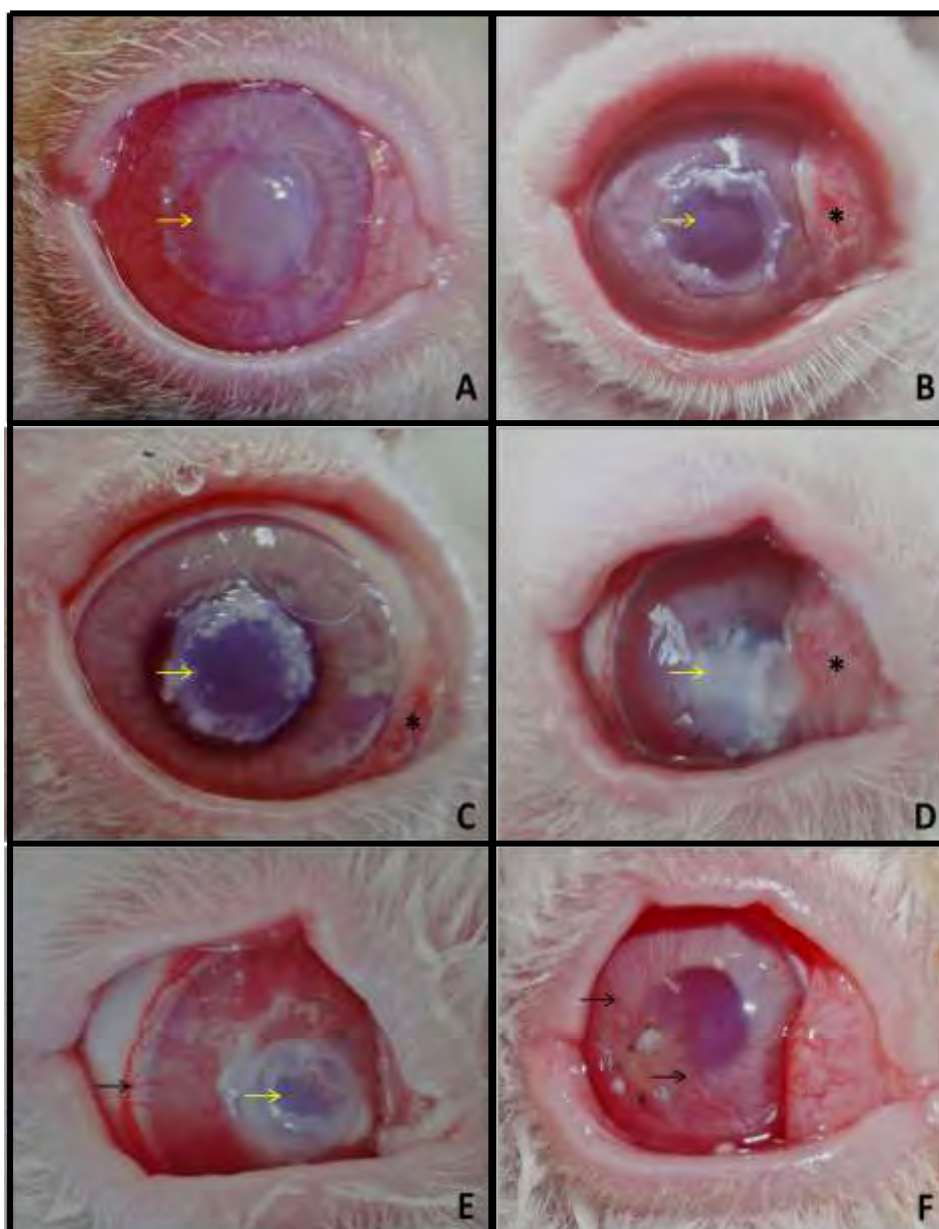
Observou-se vascularização do enxerto (Fig. 2C), à partir do 14º dia da avaliação (Tab. 3). O evento evoluiu de discreto a moderado até o final dos momentos da avaliação (Fig. 1F). Observou-se diferença significativa ao se compararem os dias 1º, 3º, 7º, 14º e 21º com os dias 30º e 60º ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 4.** Parâmetros referentes aos eventos, edema, opacidade e vascularização do enxerto, do 1º ao 60º dias da avaliação, na ceratoplastia penetrante, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, SP, 2013.

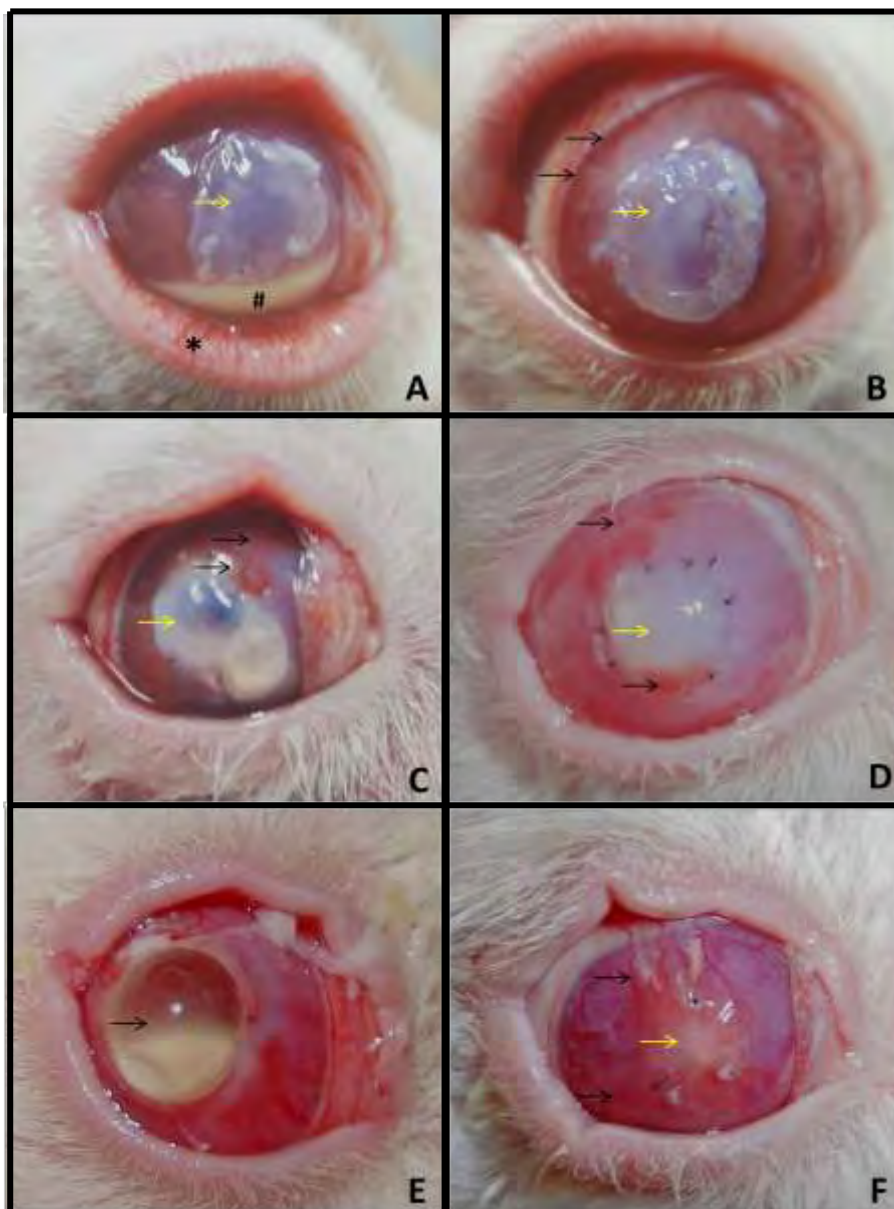
| Condições do Enxerto |              |      |      |      |               |      |      |      |                    |      |      |     |       |
|----------------------|--------------|------|------|------|---------------|------|------|------|--------------------|------|------|-----|-------|
| Dias                 | Edema (%)    |      |      |      | Opacidade (%) |      |      |      | Vascularização (%) |      |      |     | Total |
|                      | Grau         |      |      |      | Grau          |      |      |      | Grau               |      |      |     | (n)   |
|                      | <i>Nihil</i> | +    | ++   | +++  | <i>Nihil</i>  | +    | ++   | +++  | <i>Nihil</i>       | +    | ++   | +++ |       |
| 1                    | 5,6          | 38,9 | 44,4 | 11,1 |               | 33,3 | 50   | 16,7 | 100                |      |      |     | 18    |
| 3                    | 16,7         | 44,4 | 38,9 |      |               | 16,7 | 55,5 | 27,8 | 100                |      |      |     | 18    |
| 7                    | 6,7          | 53,3 | 40   |      |               | 20   | 66,7 | 13,3 | 100                |      |      |     | 15    |
| 14                   | 9,1          | 45,4 | 18,2 | 27,3 |               | 18,2 | 45,4 | 36,4 | 90,9               | 9,1  |      |     | 12    |
| 21                   |              | 62,5 | 25   | 12,5 |               | 12,5 | 62,5 | 25   | 87,5               | 12,5 |      |     | 9     |
| 30                   |              | 60   | 40   |      |               | 20   | 60   | 20   | 40                 | 40   | 20   |     | 6     |
| 60                   | 100          |      |      |      |               |      | 66,7 | 33,3 |                    | 66,7 | 33,3 |     | 3     |

Nihil (ausente), + (discreto), ++ (moderado), +++ (severo)

Complicações pós-operatórias foram identificadas. Houve um caso de perfuração corneal precedido por deiscência da sutura e perda do enxerto, com protrusão da lente e prolapso de vítreo ao 30º dia (Fig. 2E). Houve três casos de hipópio, aos 7º, 11º e 30º dias de pós-operatório (Fig. 2A), com resolução espontânea. Visibilizou-se hifema em um indivíduo, cuja resolução foi igualmente espontânea.



**Figura 1.** Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratoplastia penetrante. Em A, severa opacidade do enxerto corneal (seta amarela), ao 3º dia da avaliação. Em B, discreta opacidade do enxerto (seta amarela) e moderada hiperemia conjuntival (\*), ao 3º dia da avaliação. Em C, moderada opacidade do enxerto (seta amarela) e discreta hiperemia conjuntival ao 7º dia de pós-operatório. Em D, severa opacidade do enxerto (seta amarela), adjunto à discreta hiperemia conjuntival (\*), ao 14º dia de pós-operatório. Em E, moderada opacidade do enxerto (seta amarela), associada à vascularização corneal (seta preta), ao 21º dia de pós-operatório. Em F, moderada vascularização corneal (setas pretas) ao 30º dia de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2013.



**Figura 2.** Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratoplastia penetrante. Em A, moderada opacidade em enxerto (seta amarela), hipópio (#) e discreta hiperemia conjuntival (\*), ao 7º dia de pós-operatório. Em B, severa opacidade do enxerto (seta amarela), adjunto a discreta vascularização corneal (setas pretas), ao 7º dia de pós-operatório. Em C, severa vascularização corneal (setas pretas), invadindo a área do enxerto, que se apresenta com moderada opacidade (seta amarela) ao 14º dia de pós-operatório. Em D, severa opacidade do enxerto (seta amarela), associada à severa vascularização corneal (setas pretas), aos 30º dia de pós-operatório. Em E, protrusão de lente e de parte do vítreo (seta preta), decorrentes da perda do enxerto, ao 30º dia de avaliação. Em F, severa vascularização corneal (setas pretas), invadindo a região do enxerto, que se apresenta com severa opacidade (seta amarela), ao 60º dia de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2013.

## **5.2 Microscopia especular de não contato**

Como mencionado em “*caput*” anterior, em nenhum dos momentos do pós-operatório foi possível a realização dos exames, por estar a córnea irregular (com superfície em relevo ou em depressão), e com graus variados de edema ou de opacidade. No pré-operatório (basal), em que ela fora realizado, os achados não diferiram da normalidade, para a espécie.

## **5.3 Histologia**

### **Três dias de pós-operatório**

Verificaram-se edema acentuado da córnea receptora, bem como do enxerto corneal, e pouca organização estromal (Fig. 3A). Encontrou-se infiltrado celular composto por neutrófilos, tanto na córnea receptora como no enxerto corneal, em graus de discreto a moderado (Fig. 3A). No enxerto, não se encontraram membrana de Descemet e endotélio.

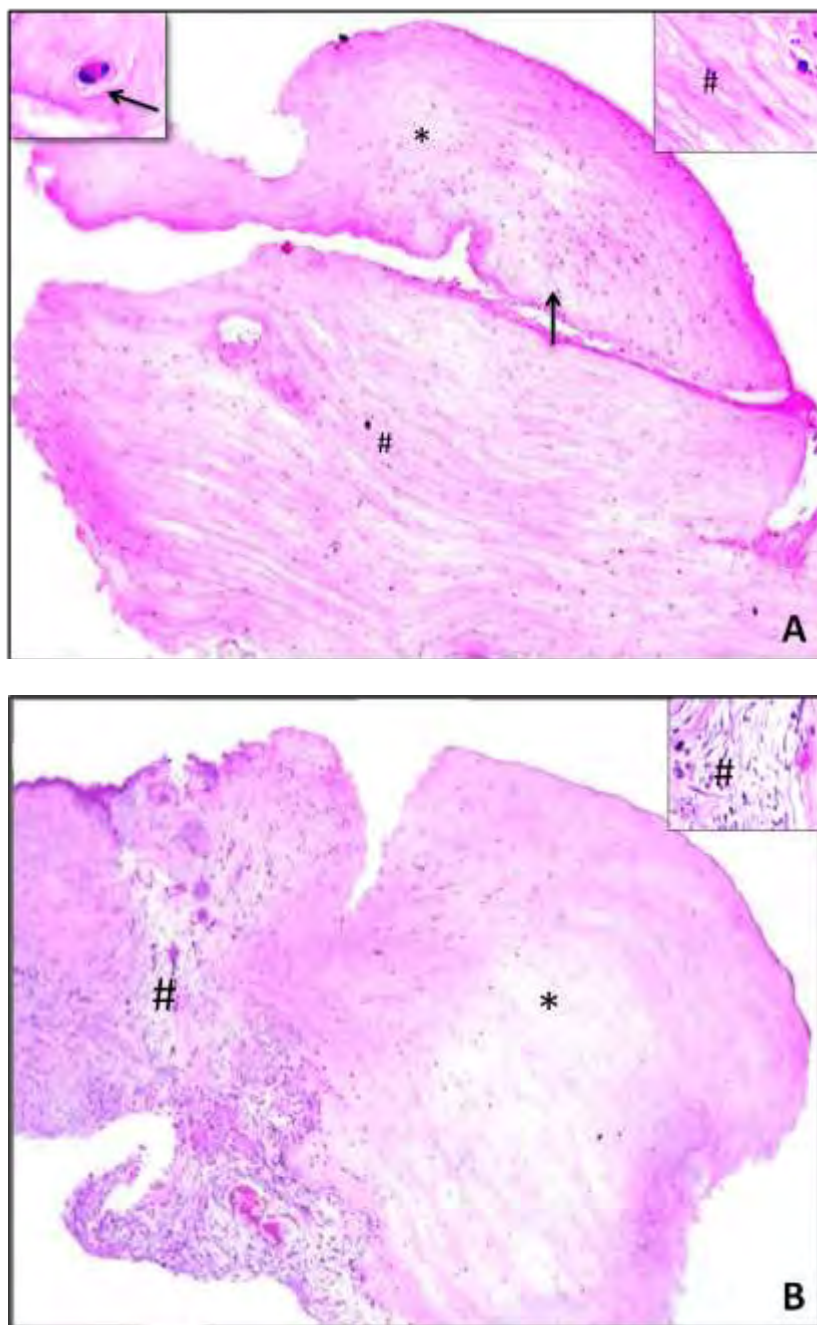
### **Sete dias de pós-operatório**

Edema da córnea receptora, bem como do enxerto corneal, mostraram-se severos. Moderada organização estromal deu-se na córnea receptora. No enxerto corneal houve discreta organização. Encontrou-se infiltrado de neutrófilos, tanto na córnea receptora como no enxerto corneal, em grau moderado. Vascularização, de discreta a moderada, ocorreu na córnea e no enxerto (Fig. 3B). Observaram-se membrana de Descemet e endotélio na córnea receptora, mas não no enxerto corneal.

### **Quatorze dias de pós-operatório**

Edema na córnea receptora e no enxerto corneal mostraram-se intensos. Houve moderada organização estromal na córnea receptora (Fig. 4A). No enxerto corneal, deu-se discreta organização estromal (Fig. 4A). Encontrou-se infiltração por neutrófilos (Fig. 4A) íntegros ou degenerados na córnea receptora e no enxerto corneal, em grau severo. Observou-se moderada vascularização corneal (Fig. 4A), e também no enxerto. Identificaram-se

membrana de Descemet e endotélio na córnea receptora, mas não no enxerto corneal (Fig. 4A).



**Figura 3.** Fotomicrografias de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, notar edema acentuado e discreta organização estromal na córnea receptora (#), assim como na córnea doadora (\*); infiltração neutrofílica na córnea doadora (\*) e, no detalhe (seta), ao 3º dia de pós-operatório (HE,40x). Em B, notar área de reorganização na borda da córnea receptora (#) e na da doadora (\*). No detalhe, observam-se fibroblastos, aos 7º dias de pós-operatório (HE,40x). Jaboticabal, SP, 2013.



### **Vinte e um dias de pós-operatório**

Verificou-se evolução para a epitelização do enxerto. Decorreram edema da córnea receptora, bem como do enxerto corneal, moderados. Encontrou-se organização estromal moderada na córnea receptora, bem como no enxerto corneal. Neutrófilos íntegros e em degeneração foram visibilizados na córnea receptora e no enxerto corneal, em grau moderado. Deu-se moderada vascularização corneal e no enxerto (Fig. 4B). Membrana de Descemet e endotélio foram observados na córnea receptora, mas não no enxerto corneal (Fig.4B).

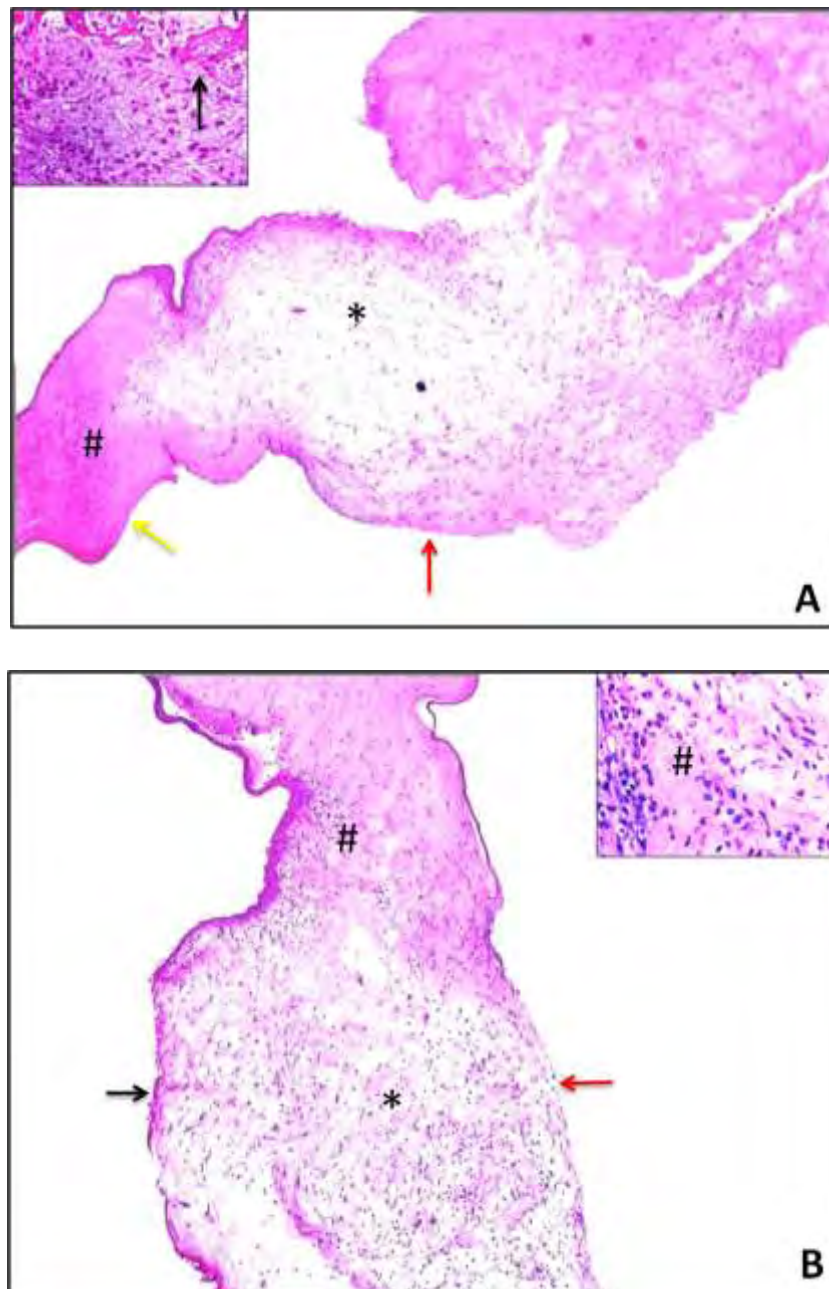
### **Trinta dias de pós-operatório**

Constatou-se epitelização sobre o enxerto e hiperplasia epitelial na córnea receptora. Edema da córnea receptora e do enxerto decorreram com intensidade moderada. Encontrou-se moderada organização estromal na córnea receptora, bem como no enxerto. Verificou-se infiltrado de neutrófilos íntegros e em degeneração, em grau moderado, na córnea receptora e no enxerto. Moderada a severa vascularização na córnea receptora, bem como no enxerto, foram visibilizadas (Fig. 5A). Membrana de Descemet e endotélio na córnea receptora foram visibilizados, mas não o foram no enxerto corneal (Fig. 5A).

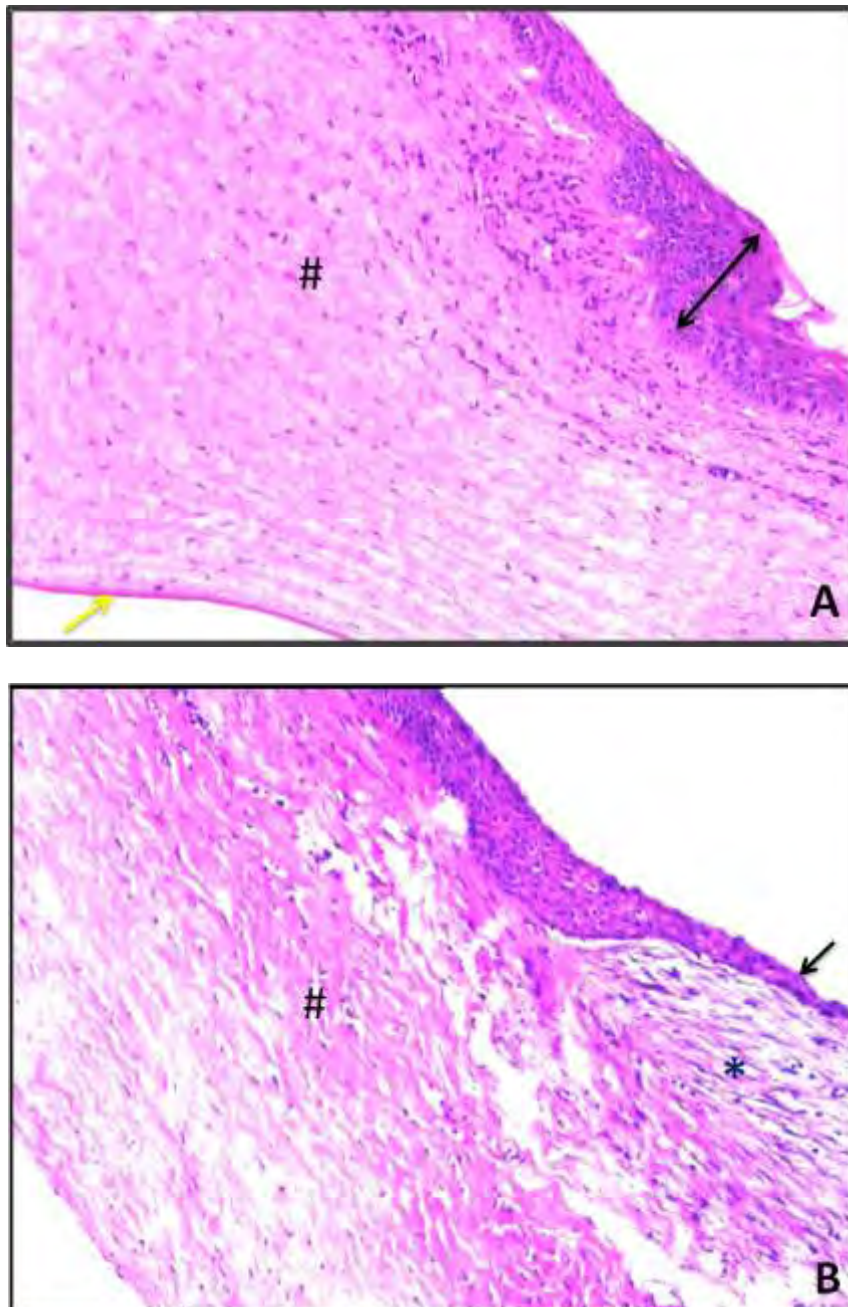
### **Sessenta dias de pós-operatório**

Observou-se epitelização sobre o enxerto. O edema da córnea receptora e do enxerto corneal mostrou-se moderado. Verificou-se organização estromal na córnea receptora, em grau moderado. Neutrófilos íntegros e em degeneração foram visibilizados em grau moderado, quer na córnea receptora, quer no enxerto corneal. Encontrou-se de moderada a severa vascularização na córnea receptora, bem como no enxerto (Fig. 5B). A similitude de outros períodos da avaliação, membrana de Descemet e endotélio foram visibilizados na córnea receptora, mas não no enxerto corneal.





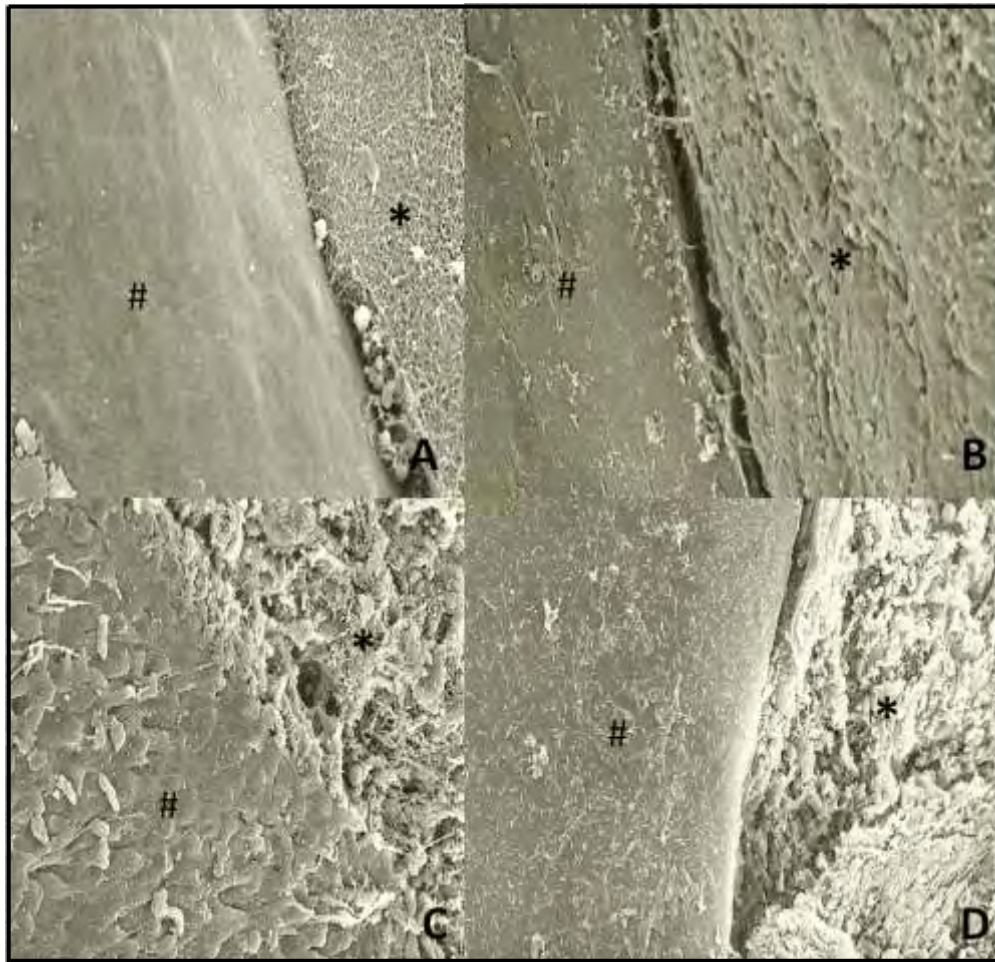
**Figura 4.** Fotomicrografias de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, notar organização na córnea doadora (\*), em contraste com a receptora (#), e evidenciar presença da membrana de Descemet e endotélio (seta amarela) na córnea receptora (#) e ausência (seta vermelha) na doadora (\*). No detalhe, observam-se infiltrado inflamatório e área de neovascularização (seta preta), aos 14º dias de pós-operatório (HE, 40x). Em B, notar processo de re-epitelização (seta preta) e ausência da membrana de Descemet e endotélio (seta vermelha) na córnea doadora (\*) e, no detalhe, moderado infiltrado inflamatório na borda da córnea receptora (#), aos 21 dias de pós-operatório (HE, 40x). Jaboticabal, SP, 2013.



**Figura 5.** Fotomicrografias de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório na ceratectomia penetrante. Em A, notar área de hiperplasia epitelial (seta dupla) na córnea receptora (#), junto a presença da membrana de Descemet e endotélio (seta amarela), aos 30 dias de pós-operatório (HE, 40x). Em B, notar avançado processo de re-epitelização (seta) na córnea doadora (\*), aos 60 dias de pós-operatório (HE, 100x). Jaboticabal, SP, 2013.

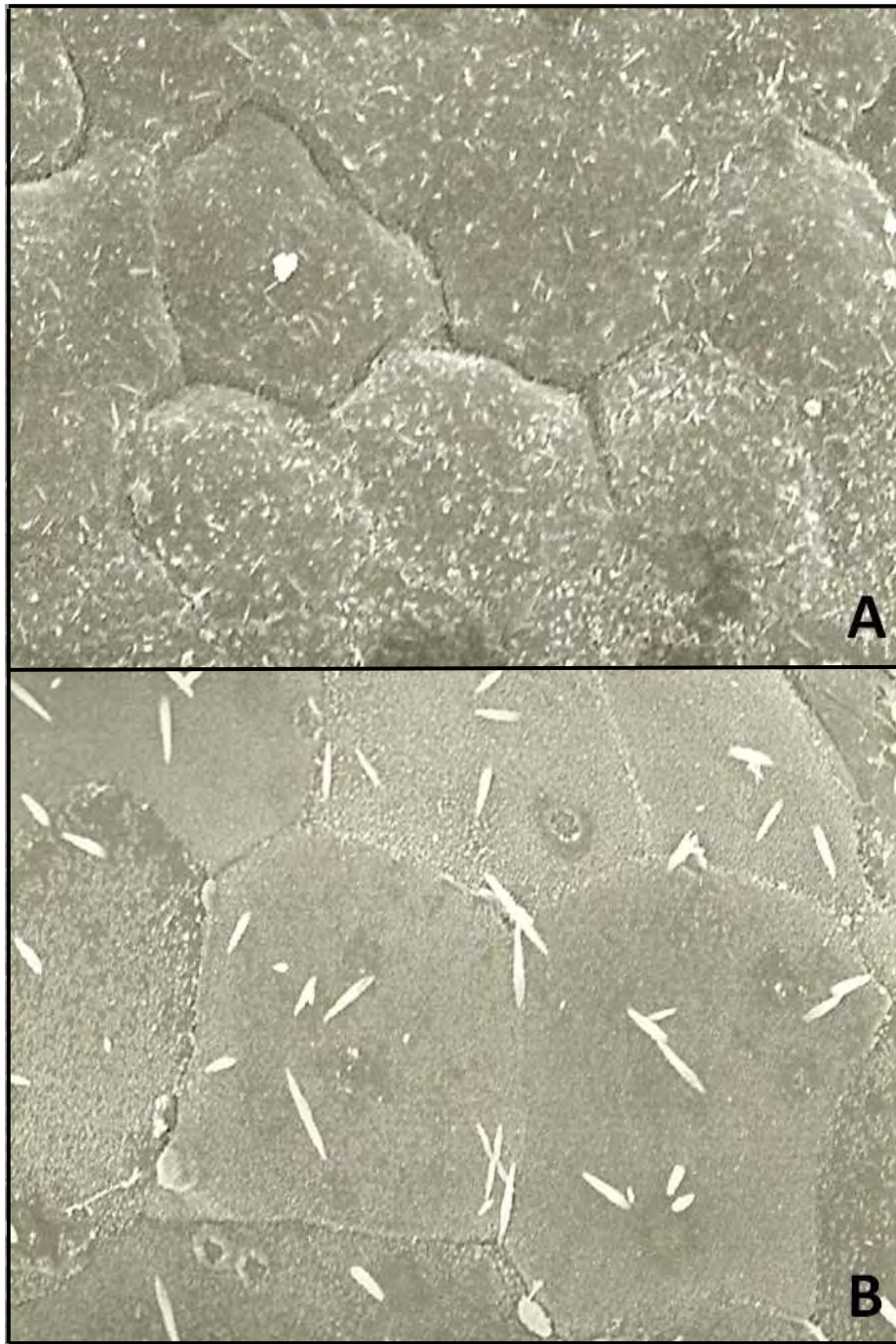
#### 5.4 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens revelaram, na transição da córnea doadora para a receptora, coaptação dos tecidos, que fora mais consistente com a evolução temporal. Observou-se nenhuma migração de células endoteliais para a córnea enxertada, em todos os momentos da avaliação (Fig. 6 e Fig. 7).



**Figura 6.** Eletronfotomicrografia de varredura de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, aos 3 dias de pós-operatório (1000X); Em B, aos 7 dias de pós-operatório (350X); Em C, aos 30 dias (350X) e em D, aos 60 dias de pós-operatório (350X). Observar ausência de endotélio na córnea doadora (\*), em relação à receptora (#), sem qualquer evidência de migração de células endoteliais. Jaboticabal, SP, 2013.





**Figura 7.** Eletronfotomicrografia de varredura de córnea de coelho da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, na ceratectomia penetrante. Em A, aos 7 dias de pós-operatório (2000X) e em B, aos 21 dias de pós-operatório (2000X). Observar a presença de células endoteliais na córnea receptora. Jaboticabal, SP, 2013.

## 6. DISCUSSÃO

A transparência corneal é imperativa para a boa acuidade visual. O endotélio e epitélio corneais deve estar íntegros para que desidratem o estroma, prevenindo o edema e a opacidade concomitante. Processos inflamatórios, trauma mecânico ou lesão específica pós cirurgia intraocular são condições factíveis para a perda de células endoteliais. Uma vez que a densidade das células endoteliais diminui a valores críticos, a descompensação corneal decorrerá. Em tais condições, a ceratoplastia penetrante poderá ser indicada (SCHWARTZKOPFF et al., 2010).

No presente estudo, estando a córnea em sua normalidade (basal), foi possível a realização da microscopia especular de não contato, com os valores não diferindo do normal. De acordo com Yee e colaboradores (1987), os parâmetros morfométricos normais em coelhos apontam para valores próximos a 3160 (células/mm<sup>2</sup>), área de 317-5 (mm<sup>2</sup>) e hexagonalidade de 71%. No pós-operatório, todavia, ela não foi possível em qualquer das córneas, em todos os momentos da avaliação. Decorreram superfície em relevo ou em depressão e graus variados de edema e de opacidade. As regiões do enxerto estavam desprovidas de endotélio, como fora constatado à histologia e à microscopia eletrônica de varredura.

Edema corneal e no enxerto foram visibilizados em grau mais intenso até o 21º dia da avaliação, regredindo nos períodos subsequentes, quer na avaliação clínica, quer à histologia. O edema, em tais circunstâncias, decorre da presença do humor aquoso e da sua difusão para as lamelas estromais, corroborando com a desorganização do estroma. A ausência do endotélio, como fora notificado, atuou de maneira decisória para a ocorrência do evento.

Relatos, em pacientes humanos, apontam para uma maior perda de células endoteliais, a partir do enxerto doador, na ceratoplastia penetrante, resultando em risco de descompensação corneal. Tem-se aumento na espessura da córnea, mesmo em enxertos inicialmente bem sucedidos, como o observado no presente estudo. Perda de células endoteliais em transplantes de córnea decorrem, principalmente, de lesões mecânicas associadas a procedimentos cirúrgicos ou por reações mediadas pelo sistema imune (JONUSCHEI et al., 2011).

Transplantes de córnea podem ser realizados utilizando-se enxertos frescos ou congelados, com função terapêutica ou tectônica. No presente estudo, optou-se por se utilizarem os congelados (BROOKS, 2005). Enxertos frescos, todavia, caracterizam-se por maximizar a preservação das células endoteliais, diminuindo a opacidade corneal no pós-operatório (WILSON E BOURNE, 1989). Eles são os preferidos, mas, na maioria dos casos, não estão momentaneamente disponíveis obrigando ao uso dos congelados, que oferecem riscos de alterações endoteliais e, de eliminação, por alterações do PH, da pressão osmótica, da concentração de solutos, e por formação de cristais de gelo (BROOKS, 2005). A ausência, no presente estudo, de endotélio nos enxertos doadores, acredita-se, deva ter decorrido da crioproteção, principalmente.

Vasos sanguíneos corneais foram evidenciados a partir do 7º dia da avaliação e, temporalmente, evoluíram. Eventos de mesma magnitude já haviam sido reportados (JAVADI et al., 2010). A partir do 14º dia de pós-operatório, foi possível a visibilização de vasos sanguíneos no enxerto, a exemplo do que houvera sido observado por Brooks et al. (2005), em equinos, quando o evento iniciou-se entre 5 e 10 dias dos transplantes. Sabe-se que a vascularização oferece suporte trófico aos transplantes de córnea e que eles não são considerados integrados até que ela se concretize (HENDRIX et al., 1995; WHITTAKER et al., 1997; ANDREW et al., 2000). Em contrapartida, ela própria, infecções e inflamação corneal podem contribuir para a perda do tecido transplantado (VOLKER-DIEBEN et al., 1982; WILSON E KAUFMAN, 1990; BOISJOLY et al., 1993; COSTER, 1997; VAIL et al., 1997; NIEDERKORN, 1999; PANDA et al., 2007). Vasos corneais interferem com o privilégio imunogênico da córnea (VAIL et al., 1997).

A localização e o tamanho dos transplantes podem induzir à sua rejeição. Enxertos mais próximos do limbo estão mais sujeitos à rejeição (KHODADOUST E SILVERSTEIN, 1969; VOLKER-DIEBEN et al., 1982; WILLIAMS et al., 1992; BOISJOLY et al., 1993; BROOKS, 2005). A vascularização corneal, quando intensa, fornece deposição de tecido fibroso, com consequências para a transparência da córnea (FINI E STRAMER, 2005).

Nos primeiros momentos da avaliação, houve casos de eliminação do enxerto. O enxerto fora notificado por Brooks e por colaboradores (2008), em

indivíduos com 5 a 7 dias de pós-operatório. Em transplantes de córneas alógenos, notificaram-se casos de rejeição ao cabo 15º dia de pós-operatório (SCHWARTZKOPFF et al., 2010).

Estudos, em indivíduos da espécie humana, mostraram rejeição ou de falha do enxerto decorridos 15 anos de pós-operatório, na ceratoplastia penetrante, de 23% e de 28%, respectivamente (PATEL et al., 2005). Trinta por cento de olhos de pacientes humanos que passaram por ceratoplastia penetrante apresentaram, pelo menos, um episódio de rejeição e de 5 a 7% foram perdidos. Índices de rejeição, em casos em que decorreu intensa vascularização, foram de 65%, mas puderam, em sua maioria, ser controlados com fármacos (PANDA et al., 2007).

Deu-se opacidade do enxerto em diferentes graus, à semelhança do observado por Schwartzkopff et al. (2010). A restauração da transparência corneal em ceratoplastias penetrantes é possível, se mantida a patência funcional da camada de células endoteliais. Estudos realizados por Schwartzkopff et al. (2010) mostraram que, em transplantes de córnea sem endotélio, a transparência deu-se em 6 semanas. No presente estudo, decorridas 8 semanas da avaliação, não se encontrou transparência corneal. Sabe-se que, em coelhos, em gatos e em ratos, células endoteliais podem se proliferar e migrar para cobrir o defeito (TUFT et al., 1986; GLOOR et al., 1986; LANDSHMAN et al., 1989; PETROLL et al., 1999). Não obstante, em seres humanos, em cães e em muitos outros mamíferos, a reparação se dá notadamente por hipertrofia das células endoteliais adjacentes à lesão (FRANZEN et al., 2010).

No presente estudo, a não migração das células endoteliais adjacentes do hospedeiro para o enxerto doador, admite-se, decorreu, entre outras causas possíveis, da presença de fibras colágenas irregulares do estroma da córnea doadora atuando como barreira física à migração celular. Adjunto, da criopreservação.

## **7. CONCLUSÕES**

Considerando-se a maneira como a pesquisa fora concebida e os resultados que dela foram obtidos, é possível afirmar que não houve migração de células endoteliais do leito corneal receptor para o doador. Estudos complementares, contemplando monitoramento temporal mais duradouro, contribuiriam para a melhor elucidação de eventos na ceratoplastia penetrante em coelhos.



## 8. REFERÊNCIAS

ANDREW, S. E.; BROOKS, D. E.; BIROS, D. J.; DENIS, H. M.; CUTLER, T. J.; GELATT, K. N. Posterior lamellar keratoplasty for treatment of deep stromal abscesses in nine horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, p. 99 -103, 2000.

ANWAR, M.; TEICHMANN, K. Deep Lamellar keratoplasty. Surgical techniques for anterior lamellar keratoplasty with and without baring of Descemet's membrane. **Cornea**, v. 21, p. 374 -383, 2002a.

ANWAR, M.; TEICHMANN, K. Big-bubble technique to bare Descemet's membrane in anterior lamellar keratoplasty. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 28, p. 398- 403, 2002b.

BOISJOLY, H. M.; TOURIGNY, R.; BAZIN, R: Risk factors of corneal graft failure. **Ophthalmology**, v. 100, p. 1728 -1735, 1993.

BROOKS, D. E. Penetrating keratoplasty, deep lamellar endothelial keratoplasty, and posterior lamellar keratoplasty in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, p. 37 - 49, 2005.

BROOKS, D. E.; PLUMMER, C. E.; KALLBERG, M. E.; BARRIE, K. P.; OLLIVIER, F. J.; HENDRIX, D. V. H.; BAKER, A.; SCOTTY, N. C.; UTTER, M. E.; BLACKWOOD, S. E.; NUNNERY, C. M.; BEN-SHLOMO, G.; GELATT, K. N. Corneal transplantation for inflammatory keratopathies in the horse: visual outcome in 206 cases (1993 - 2007). **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, p. 123 - 133, 2008.

CHAN, T.; PAYOR, S.; HOLDEN, B. A. Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachometer. **Investigative Ophthalmology and Visual Sciences**, v. 24, p. 1408 - 1410, 1983.

CHI, H. H.; KELMAN, C. D.: Effect of freezing on ocular tissues. I. Clinical and histological study of corneal endothelium. **American Journal of Ophthalmology**, v. 61, p. 630, 1966.

CLAERHOUT, I.; BEELE, H.; KESTELYN, P. Graft failure: I. Endothelial cell loss. **International Ophthalmology**, v. 28, p. 73 – 165, 2008.

COSTER, D. J: Evaluation of corneal transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 81, p. 618 - 619, 1997.

DONALD, T. H. T.; JOHN, K. G. D.; EDWARD, J. H.; SHIGERU, K. Ophthalmology 3. in: **Corneal transplantation**, v. 379, p. 1749 – 1755, 2012.

FINI, M. E.; STRAMER, B. M. How the cornea heals. Cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. **Cornea**, v. 24 Suppl. 1, p. S2–S11, 2005.

FRANZEN, A. A.; PIGATTO, J. A. T.; ABIB, F. C.; ALBUQUERQUE, L.; LAUS, J. L. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.4, p.222-226, 2010.

FUNNELL, C. L.; BALL, J.; NOBLE, B. A. Comparative cohort study of the outcome of deep lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty for keratoconus. **Eye**, v. 20, p. 527 - 532, 2006.

GLOOR, B.; GLOOR, M. L.; MERZ-HILL, M.; MARSHALL, J.; MESZAROS, J.; DAICKER, B. Wound healing of the corneal posterior surface in animal experiments. **Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde**, v. 188, p. 225-230, 1986.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28p.

GONG, N.; PLEYER, U.; RITTER, T.; KNOP, E.; CHEN, X. Corneal allograft endothelial cell replacement represents a reparative response to transplant injury. **Molecular Vision**, v. 15, p. 654-661, 2009.

HENDRIX, D. V.; BROOKS, D. E, Smith PJ, et al: Corneal stromal abscesses in the horse: a review of 24 cases. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, p. 440-447, 1995.

HONEGGER, H.: Quantitative untersuchungen iiber die hornhautendothel regeneration *in vivo*, **Albrecht von Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 165, p. 31, 1962.

ING, J. J.; ING, H.H.; NELSON, L. R.; HODGE, D. O.; BOURNE, W. M. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. **Ophthalmology**. v.105, p. 1855 -1865, 1998.

JAVADI, M. A.; FEIZI, S.; KANAVI, M. R. Cellular changes of donor corneal tissue after deep anterior lamellar keratoplasty versus penetrating keratoplasty in eyes with keratoconus: a confocal study. **Cornea**, v. 29, n. 8, p. 866-870, 2010.

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

KAISERMAN, I. The elusive big bubble: is this the future of deep anterior lamellar keratoplasty? **Expert Review of Ophthalmology**, v. 4, p. 1 - 3, 2009.

KANAI, A.: The regeneration of corneal endothelium. **Journal of Japanese Ophthalmological society**. V. 76, p. 1163, 1976.

KAUFMAN, H. E.; BEUERMAN, R. W.; STEINEMANN, T. L.; THOMPSON, H. W.; VARNELL, E. D. Optisol corneal storage medium. **Archives Ophthalmology**, v. 109, p. 864-868, 1991.

KHOUDAHOUST, A. A.; GREEN, K.: Physiologic function of regenerating endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 15, p. 96, 1976.

KHODADOUST, A. A.; SILVERSTEIN, A. M: Transplantation and rejection of individual layers of the cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 8, p. 180-195, 1969.

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

LINDSTROM, R. L. et al. Optisol corneal storage medium. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, p. 345-356, 1992.

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

MURAINÉ, M.; TOUBEAU, D.; GUEUDRY, J.; BRASSEUR, G. Impact of new lamellar techniques of keratoplasty on eye bank activity. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 245, p. 32- 40, 2007.

NIEDERKORN, J. Y: The immune privilege of corneal allografts. **Transplantation**, v. 67, p. 1503-1508, 1999.

NOBLE, B. A.; AGRAWAL, A.; COLLINS, C.; SALDANA, M.; BROGDEN, P. R.; ZUBERBUHLER, B. Deep anterior lamellar keratoplasty (DALK): visual outcome and complications for a heterogeneous group of corneal pathologies. **Cornea**, v. 26, p. 59 - 64, 2007.

PANDA, A.; VANATHI, M.; KUMAR, A.; *et al.* Corneal graft rejection. **Survey of Ophthalmology**, v. 52, p. 375–396, 2007.

PATEL, S. V.; HODGE, D. O.; BOURNE, W. M. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, p. 311–319, 2005.

PETROLL, I W. M.; JESTER, J. V.; BEAN, J.; CAVANAGH, H. D. Labeling of cycling corneal endothelial cells during healing with a monoclonal antibody to the Ki67 antigen (MIB-1). **Cornea**, v. 18, p. 98-108, 1999.

PIGATTO, J. A. T.; CERVA, C.; FREIRE, C. D.; ABIB, F. C.; BELLINI, L. P.; BARROS, P. S. M.; LAUS, J. L. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.9, p.427-430, 2008.

PLSKOVÁ, J.; KUFFOVA, L.; HOLAN, V.; FILIPEC, M.; FORRESTER, J. V. Evaluation of corneal graft rejection in a mouse model. **British Journal Ophthalmology**, v. 86, p. 108-13, 2002.

PLUMMER, C. E.; KALLBERG, M. E.; OLLIVIER, F. J.; BARRIE, K. P.; BROOKS, D. E. Deep lamellar endothelial keratoplasty in 10 horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, supl. 1, p. 35 - 43, 2008.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. IN: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, 3<sup>rd</sup> ed, 1999. cap.2, p. 31 – 150.

SCHWARTZKOPFF, J.; BREDOW, L.; MAHLENBREY, S.; BOEHRINGER, D.; REINHARD, T. Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. **Molecular Vision**, v. 16, p. 2368-2375, 2010.

SLATTER, D. Cornea e esclera. in: \_\_\_\_\_, **Fundamentos da oftalmologia Veterinária**, 3rd ed, cap. 91, p. 1368 - 1396, 2007.

STAINER, G. A.; BRIGHTBILL, F. S.; CALKINS, B. A comparison of corneal storage in moist chamber and McCarey-Kaufman medium in human keratoplasty. **Ophthalmology**, v.88, p.46-49, 1981.

STOCKER, F. W.: The Endothelium of the Cornea and Its Clinical Implications. **Publisher** , 2nd ed, cap. 111, p. 214, 1971.

TUFT, S. J.; WILLIAMS, K. A.; COSTER, D. J. Endothelial repair in the rat cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 27, p. 1199-204, 1986.

VAIL, A.; GORE, S. M.; BRADLEY, B. A.; et al: Conclusions of the corneal transplant follow up study. **British Journal Ophthalmology**, v. 81, p. 631-636, 1997.

VAN HORN, D. L.; HYNDIUK, R. A.; SEIDEMAN, S.; BUCO, P. J.; DE BRUIN, J.: Endothelial regeneration in cornea: a comparative study in rabbit and cat. **In Proceedings of Scanning Electron Microscopy Symposium**, 1976, p. 285.

VOLKER-DIEBEN, H. J.; KOK-VAN ALPHEN, C. C.; LANSBERGEN, Q.; et al: Different influences of corneal graft survival in 539 transplants. **Acta Ophthalmologica**, v. 60, p. 190-202, 1982.

WHITLEY, R. D.; GILGER, B. C. Diseases of the canine cornea and sclera. IN: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, 3rd ed., cap. 19, p. 635 – 673, 1999.

WILLIAMS, K. A.; RODER, D.; ESTERMAN, A.; et al: Factors predictive of corneal graft survival. **Ophthalmology**, v. 99, p. 403-414, 1992.

WILLIAMS, K. A.; LOWER, M.; BARTLETT, C.; KELLY, T. L.; COSTER, D. J. Risk factors for human corneal graft failure within the Australian corneal graft registry. **Transplantation**, v. 86, p. 1720–24, 2008.

WILSON, S. E.; BOURNE, W. M: Corneal preservation. **Survey Ophthalmology**, v. 33, p. 237-259, 1989.

WILSON, S. E.; KAUFMAN, H. E: Graft failure after penetrating keratoplasty. **Survey Ophthalmology**, v. 34, p. 325-356, 1990.

WHITTAKER, C. J. G.; SMITH, P. J.; BROOKS, D. E.; HENDRIX, D. V. H.; CHMIELEWSKI, N. T.; ANDREW, S. E. et al., Therapeutic penetrating keratoplasty for deep corneal stromal abscesses in eight horses. **Veterinary and Comparative Ophthalmology** , v. 7, n. 1, p. 19–28, 1997.

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