

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROPRIEDADES BIRREFRINGENTES E
ORGANIZAÇÃO MACROMOLECULAR DOS
COLÁGENOS FIBRILARES DO ESTROMA CORNEAL
DE CÃES**

Camila Pinho Balthazar da Silveira

Médica veterinária

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROPRIEDADES BIRREFRINGENTES E
ORGANIZAÇÃO MACROMOLECULAR DOS
COLÁGENOS FIBRILARES DO ESTROMA CORNEAL
DE CÃES**

Camila Pinho Balthazar da Silveira

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Coorientadora: Dra. Marcela Aldrovani

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de doutor em Cirurgia
Veterinária.**

2019

S587p Silveira, Camila Pinho Balthazar da
Propriedades Birrefringentes e organização macromolecular
dos colágenos fibrilares do estroma corneal de cães / Camila
Pinho Balthazar da Silveira. -- Jaboticabal, 2019
39 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: José Luiz Laus
Coorientadora: Marcela Aldrovani Rodrigues

1. cão. 2. córnea. 3. colágeno. 4. tensor de estrutura. 5.
microscopia de luz polarizada. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PROPRIEDADES BIRREFRINGENTES E ORGANIZAÇÃO MACROMOLECULAR DOS COLÁGENOS FIBRILARES DO ESTROMA CORNEAL DE CÃES

AUTORA: CAMILA PINHO BALTHAZAR DA SILVEIRA

ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ LAUS

COORDINADORA: MARCELA ALDROVANI RODRIGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



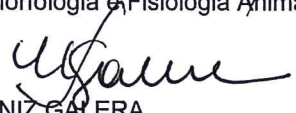
Profa. Dra. MARCELA ALDROVANI RODRIGUES
UNIFRAN / Franca/SP



Profa. Dra. CLÁUDIA VALÉRIA SEULLNER BRANDÃO
Depto. de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / FMVZ/Botucatu - Unesp



Profa. Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. PAULA DINIZ GALERA
Departamento de Medicina Veterinária-Universidade de Brasília / Brasília/DF



Pós-doutorando IVAN RICARDO MARTINEZ PADUA
Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP

Jaboticabal, 31 de janeiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAMILA PINHO BALTHAZAR DA SILVEIRA – nascida em 08 de agosto de 1984, na cidade de Salvador, Bahia, filha de Alice Pinho Balthazar da Silveira e Carlos Magno Balthazar da Silveira. Graduada em Medicina veterinária pela Universidade Federal da Bahia, em fevereiro de 2010. Residência em Clínica Cirúrgica e Cirurgia, pela Universidade Federal da Bahia no ano de 2010 – 2012. Em 2014, tornou-se mestre em Cirurgia Veterinária pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Campus de Jaboticabal, do qual, atualmente, é aluna regular do curso de Doutorado e atuante do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus. Atua em pesquisas nas áreas de oftalmologia, oncologia ocular e cirurgia geral.

Recomeço

*Quando a vida bater forte e sua alma sangrar,
quando esse mundo pesado lhe ferir, lhe esmagar,
é hora do recomeço, recomece a lutar.*

*Quando a estrada for longa e seu corpo fraquejar,
quando não houver caminho, nenhum lugar para chegar,
é hora do recomeço, recomece a caminhar.*

*Quando você cair e ninguém lhe aparar,
quando a força do que é ruim lhe derrubar,
é hora do recomeço, recomece a levantar.*

*Quando a falta de esperança lhe açoitar,
se tudo que for real for difícil suportar,
mais uma vez é hora de recomeçar, recomece a sonhar.*

É preciso de um final para poder recomeçar.

Como é preciso cair para poder se levantar.

Nem sempre engatar a ré significa voltar.

Remarque aquele encontro, reconquiste um amor, reúna quem lhe quer bem.

Reconforte um sofredor, reanime quem está triste, reaprenda na dor.

*Recomece, se esforce, lembre o que foi bom, reconstrua cada
sonho, redescubra algum dom, reaprenda quando errar, rebole quando dançar.*

*E se um dia lá na frente a vida der uma ré, recupere sua fé e
recomece novamente.*

Bráulio Bessa

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Agradeço aos membros da banca, por todo o carinho e atenção dedicados à leitura e às considerações feitas neste trabalho. A conclusão dessa fase é marcante na vida de qualquer pessoa, e vocês já fazem parte dessa minha história.

Ao meu queridíssimo professor José Luiz Laus, obrigada por ter aberto as portas do seu maravilhoso Serviço de Oftalmologia para que eu pudesse aprender!! Obrigada pela oportunidade, conversas, confiança, e ensinamentos que levarei por toda a vida!

Agradeço a Deus, que sempre me guiou e me deu forças para superar as dificuldades e seguir em frente. Em momentos de desespero, nunca me senti só, pois sempre tive a certeza de que o Senhor estaria comigo. Obrigada por me fortalecer! Obrigada por me mostrar os meus erros. Obrigada por mostrar que nem sempre os erros são dos outros, e que existem formas diferentes de ver as coisas. Obrigada por me ensinar a perdoar mais, julgar menos e aceitar as minhas limitações. Obrigada por me ensinar a recomeçar, sem medo de cair, de ser julgada, me dando força para seguir na sabedoria, na fé, na saúde e no amor! Obrigada por me mostrar o quão maravilhoso é seu universo, em especial os animais, com os quais eu tive e tenho o privilégio de trabalhar ao longo dessa trajetória. Obrigada por zelar pela minha família, pela minha mente e pelos meus amigos. **Obrigada, Pai! Obrigada, Pai! Obrigada, Pai!**

Agradeço a meus pais, Alice (em memória) e Carlos Magno, por todo apoio, incentivo, ensinamentos, determinação, dedicação e amor. Não haverá tempo, nem distância, que apague esse sentimento maravilhoso que sinto por vocês. Agradeço também a Margarida Balthazar, minha “mãedrasta”, por toda coragem, amor, zelo, carinho e paciência.

Aos meus amados irmãos, meus eternos companheiros, Analice, Rafael, Jéssica e Nathaly. Obrigada por todo apoio, pelas risadas fora de hora, por longas terapias de felicidade! Amo vocês!

Às minhas avós Gil (a super vovozinha!) e Lurdes (em memória). Amo muito vocês! Obrigada!

Ao meu amado marido Cláudio, você é minha fortaleza, meu chão, minha aurora, minha metade. Obrigada por todo apoio diário, pela cumplicidade, pelo zelo, pela dedicação e por me mostrar que com calma e paciência é possível alcançar os objetivos. Obrigada por cuidar tão bem de mim e de nossos filhos (Júlio e Paizinho), um verdadeiro “pão”! Te amo, te amo, te amo!

Ao meu filho Júlio... nossa, é algo inexplicável! Eu não tenho palavras para explicar o que é você na minha vida. Meu Deus! Que amor é esse! Incondicional! Que dá vontade de engolir, morder, apertar, beijar, amar, admirar, cheirar... e se você não está perto, tudo perde o sentido. Filho, você é a maravilha mais fantástica com que esse universo pôde me presentear! Eu amo, amo, amo você! Meu menino do cabelo dourado, do sorriso sincero, do cheirinho de Pibes! Você é meu artigo mais bem publicado! Obrigada, meu amor!

Ao meu filho Paizinho! Meu preto velho! Gato, você é o anjo que guarda nossa família. Sua vontade de viver me ensinou que não devemos desistir por tão pouco. Não importa o quão difícil esteja algo, devemos sempre lutar e seguir em frente! Obrigada por me mostrar que nunca devo desistir de nada, e que sempre há um novo recomeço, outra forma de ver o mundo, e que limitações não são sinais de incapacidade. Obrigada, filho preto! Eu te amo!

Aos meus tios, tias, primos, Carolina Lago, sogro e “mamazita” Patrícia por todo apoio e incentivo!

Aos professores João Moreira da Costa Neto, Arianne Pontes Oriá, Euler Penha, José Pinheiro, Paola Moraes, Andriago Barbosa de Nardi, Fabrício de Oliveira e Annelise Carla Camplesi, obrigada pelos ensinamentos, confiança e paciência!

À minha co-orientadora Marcela Aldrovani, obrigada por toda paciência e por muitas vezes segurar na minha mão para que eu não desistisse de continuar. Obrigada por me mostrar que sou forte, e que não podemos desistir! No final, vai dar certo! Obrigada por acalmar minha ansiedade de querer dar um passo além do que é possível... devemos fazer uma coisa de cada vez. Obrigada por permanecer sempre do meu lado, por me ensinar e por estar sempre disponível! Você me ensinou muitas coisas, e sou eternamente grata por todas elas.

Aos meus amigos da Unesp e do Serviço de Oftalmologia: Tiago Barbalho, Dunia, Edson (600), Carlos Pugliesi, Ana Panosso, Nathan Cruz, Fernanda Martinato, Thaiza Costa, Hebert Hecht, Alexandre Franchi de Barros Sobrinho, Roberta Renzo, Roberta Crivelaro, Daniela Moura, Ivan Martinez, Marcella Filézio, Ana Pascoli, Flor Claros, Gabriela Madruga, Thais Abreu, Fran, Karina Herencia Bueno, Karina Kamachi, Luciana Larceda, Gisele Valdetaro, Luciano Conceição e Fábio Marinho, vocês fortaleceram o meu aprendizado, mostraram que o trabalho em equipe é fundamental para o crescimento profissional e pessoal, e que juntos podemos tornar o nosso trabalho muito mais leve e divertido, sem perder o profissionalismo e a responsabilidade! Obrigada!

Aos meus amigos, Caroline Aoki, Mariana Rondelli, Flávia Campos, Claudênia, Josiane Panzini, Tiago Barbalho, Roberta Renzo, Isabela Garanhani, Thuanny, vocês sempre foram minha inspiração, obrigada por todo apoio e confiança, obrigada por sermos sempre irmãos!

Às minhas queridas amigas Kalina Simplício, e sua pequenina Maya, e Helena Brito e seu pequeno Heitor, vocês foram os meus anjos nesse doutorado! Vocês me deram suporte físico e mental, vocês foram as risadas mais gostosas em dias difíceis, vocês foram as parceiras mais incríveis que um amigo pode ter. Obrigada por entrarem na minha vida e da minha família, e com certeza nossa irmandade será sempre lembrada!

Aos meus grandes amigos Mônica Wittmaack, Guilherme Sembenelli, e às pequenas Laura e Bianca, foi maravilhoso conhecer vocês! Obrigada pela companhia, pelas noites de conversas e distração! Pelo incentivo e confiança!

Agradeço aos animais, que durante essa jornada foram muitos... entretanto, alguns marcaram profundamente os meus dias, assim como os de Júlio. Obrigada em especial às cadelas do projeto Vincristina (Sofia, Mel, Nina, Pandora, Neguinha, Pipoca, Tika, Princesa (1), Princesa (2) e Tieta), ao gato Apollo, aos shih tzus Otávio Augusto e Beethoven, ao Meliante (Beagle), ao Pato e à Alma, às éguas do experimento da Helena Brito (número 50, Angélica, Cris, Cabecinha, Mel, Quebrada, Dina, xuxa, Pampinha e Margi). Gostaria de agradecer também aos meus pacientes do serviço e aos animais do meu experimento! Vocês são anjos! Vocês me mostram todo dia o que é o mais importante!

SUMÁRIO

	Páginas
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. CAPÍTULO – Considerações gerais.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2. Revisão da literatura.....	3
1.2.1 Considerações sobre a córnea	3
1.2.2 Implicações do estroma na biomecânica e na transparência da córnea.....	4
1.2.3 Padrões supraorganizacionais das fibrilas e fibras colágenas do estroma corneal.....	7
1.2.4 Birrefringência como ferramenta para avaliação da supraorganização das fibras colágenas estromais.....	9
1.3 Referências.....	12
2. CAPÍTULO 2 – Artigo Científico	17
1. Introduction.....	17
2. Material and methods.....	19
2.1 Ethics.....	19
2.2 Animals.....	19
2.3 Tissue processing.....	20
2.4 Birefringence analyses.....	20
2.4.1. Theory	20
2.4.2. Equipament.....	21
2.4.3 Experimental setup.....	22
2.4.3.1. Qualitative studies from whole mount corneas.....	22
2.4.3.2. Studies using video image analysis and structure tensor..	23
2.4.3.3. Calculations of OPD and linear birefringence.....	24
2.4.4 Data analysis.....	24

3. Results	25
3.1. <i>Qualitative studies from whole mount preparations</i>	25
3.2. <i>Studies using video image analysis and structure tensor</i>	26
3.3. <i>Calculations of OPD and linear birefringence</i>	29
4. Discussion	31
5. Conclusion	35
6. Referências	36
7. Acknowledgments	39



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Propriedades birrefringentes e organização macromolecular dos colágenos fibrilares do estroma corneal de cães**", protocolo nº 17.823/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de dezembro de 2016.

Vigência do Projeto	15/01/2017 a 15/01/2019
Espécie / Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cão)
Nº de animais	20
Peso / Idade	-
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Cães que vierem a óbito em hospitais escolas (UNIFRAN, UNESP)

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

B_F: Birrefringência de forma

B_T: Birrefringência total

B_i: Birrefringência intrínseca

f: Função logarítmica

HSB: *hue-saturation-lightness*

Kg: Quilograma

Max: Máximo

Min: Mínimo

PIO: Pressão intra-ocular

PLP: Plano de luz polarizada

RO: Retardo óptico

W: *Watts*

OPD: *Optical path difference*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Schematic representation showing how a cornea was sectioned in five quadrants, called superior, inferior, central, temporal, and nasal20
- Figura 2.** Schematic diagram of the major parts of a quantitative polarized light microscope. This microscope is designed to observe birefringent structures, such as the cornea. It is equipped with UPLFLN objectives, an analyzer (placed in the optical pathway between the objective rear aperture and the observation tubes or camera port), a polarizer (positioned in the light path somewhere before the specimen), a rotating stage, a 100-watt halogen lamp, a 546-nm monochromatic light, a Sénarmont compensator, and a Bräce-Köhler compensator. The microscopic image contrast arises from the interaction of plane-polarized light with the birefringent sample to produce two individual wave components that are each polarized in mutually perpendicular planes.22
- Figure 3.** Images of interference colors (due to anomalous dispersion of birefringence) observed in the peripheral regions from corneas in whole mount preparations illuminated with polychromatic polarized light. The arrow heads point to areas of intertwined collagen fibers (a,c,d). The asterisks in the image (b) correspond to collagen fibers that extended from the cornea towards the limbus and the sclera. Bar = 200 micrometers25
- Figure 4.** Birefringent images of anterior, middle, and deep stromal collagen fibers oriented at 45 degrees to the plane of the polarized light. (a), superior cornea. (b), inferior cornea. (c), central cornea. (d), nasal cornea. (e), temporal cornea. Bar = 200 micrometers.....26
- Figure 5.** Birefringent images of anterior, middle, and deep stromal collagen fibers oriented at 90 degrees to the plane of the polarized light. (a), superior cornea. (b), inferior cornea. (c), central cornea. (d), nasal cornea. (e), temporal cornea. Bar = 50 micrometers.....27

LISTA DE TABELAS

Table 1. Statistical comparisons of the coherency coefficient calculated in different stromal sites from dog cornea's sections. Calculations were performed with the collagen fibers oriented at 90 degrees to the plane of the polarized light (PPL).....	28
Table 2. Optical path difference (OPD) values related to the birefringence brightnesses from collagen fibers in different quadrants and stromal sites from dog cornea's sections. Measurements of OPD values associated with total, form, and intrinsic birefringence were performed with the long axes of the collagen fibers oriented at 45 degrees to the plane of the monochromatic ($\lambda = 546 \text{ nm}$) polarized light.....	30
Table 3. Values of linear birefringence for dog cornea	31

PROPRIEDADES BIRREFRINGENTES E ORGANIZAÇÃO MACROMOLECULAR DOS COLÁGENOS FIBRILARES DO ESTROMA CORNEAL DE CÃES

RESUMO – Visando compreender como se comporta a organização das fibras colágenas do estroma corneal de cães por meio de propriedades birrefringentes, objetivou-se com a pesquisa mapear a supraorganização das fibras do estroma corneal de cães, de maneira setorizada e comparativa, nos diferentes sítios e fragmentos. Córneas ($n=22$) foram removidas de 11 cães submetidos a eutanásia por razões não relacionadas à pesquisa. Quatro córneas foram estudadas *in totum*, após confecção de montagens totais, e 18 foram incluídas em parafina e transversalmente seccionadas para 7 μm . Todo o material foi estudado sob microscópio de luz polarizada (Olympus BX-53 Pol, Tóquio, Japão) munido de luz policromática e monocromática de 546 nm, compensadores de Sénarmont e Brace-Köhler, e sistema para vídeo-análise de imagens. As fibras colágenas foram posicionadas a 45 e 90 graus do plano da luz polarizada (PLP) e avaliadas setorialmente, ou seja, nas regiões anterior, média e profunda dos estromas superior, inferior, central, nasal e temporal das córneas. A supraorganização das fibras colágenas foi estabelecida a partir dos valores da diferença do caminho óptico (OPD) quantificados pelo método de Sénarmont e Brace-Köhler. O tensor de estrutura, foi processado com auxílio do plugin Java “OrientationJ”. Diferenças com $P<0,05$ foram consideradas significativas. Não foram observadas diferenças em alinhamento das fibras colágenas entre as regiões superior, inferior e central da córnea ($P>0,05$). As fibras colágenas nos sítios anterior e médio dos fragmentos nasal e temporal das córneas foram menos alinhadas e mais onduladas do que as fibras colágenas dos demais fragmentos corneais ($P<0,05$). As fibras colágenas dos fragmentos centrais das córneas apresentaram valores altos de OPD, ou seja, foram mais compactadas, se comparadas com as fibras das outras regiões da córnea ($P<0,01$). Em contraste, as fibras do fragmento inferior foram menos compactadas (valores < OPD) do que nos outros fragmentos ($P<0,01$). As fibras colágenas estromais da córnea canina apresentam birrefringência de forma (B_F) positiva. A contribuição da B_F para a Birrefringência total (B_T) foi superior a 80%. Relativamente a birrefringência intrínseca (B_i), fibras colágenas nos fragmentos corneais central e inferior apresentaram, respectivamente, o menor e o maior valor. Em conclusão, a birrefringência total (forma e intrínseca) em cães é positiva em todos os fragmentos e profundidades da córnea, e a córnea canina apresenta dispersão anômala de birrefringência em sua periferia. Além disso, o padrão de ordenação das fibras colágenas não é constante em toda a córnea, sendo diferente entre os fragmentos estudados.

Palavras-chave: cão, córnea, colágeno, tensor de estrutura, microscopia de luz polarizada

BIREFRINGENT PROPERTIES AND MACROMOLECULAR ORGANIZATION OF THE FIBRILLAR COLLAGEN OF THE CANINE CORNEAL STROMA

ABSTRACT – In order to comprehend the behavior of the organization of the canine cornea stromal collagen fibers by birefringent properties, this research aimed to map the supraorganization of the canine corneal stroma fibers, sectorial and comparatively, in different sites and fragments. Corneas ($n = 22$) were removed from 11 dogs submitted to euthanasia for reasons not related to this research. Four corneas were fully studied, after the total montage confection, and eighteen of those were embedded in Histosec® and transversely sectioned to 7 μm . All material were studied under a polarized-light advanced microscope (Olympus BX-53 Pol, Tokyo, Japan) equipped with polychromatic and 546 nm monochromatic light, Sénarmont and Brace-Köhler compensators, and an image analysis system. The collagen fibers were positioned at 45 e 90 degrees to the polarized light plane (PPL) and evaluated by sector, that is, at the anterior, medium and deep stroma of the superior, inferior, central, nasal and temporal corneal fragments. The supraorganization of the collagen fibers was defined based on values of optical path difference (OPD) quantified by Sénarmont and Brace-Köhler method. The structure tensor, a 2×2 matrix that calculates the coherency coefficient of local pixels to inform about the orientation of the fibers in the X and Y microscopy images planes, was processed with a Java plugin named “OrientationJ”. Differences were considered significant when $P < 0.05$. No differences regarding the alignment of the collagen fibers among superior, inferior and central regions of the cornea ($P > 0.05$) were observed. Collagen fibers in the anterior and middle sites of the nasal and temporal corneal fragments were less aligned and more wavy than the collagen fibers from other corneal fragments ($P < 0.05$). The collagen fibers in the central fragments of the corneas presented high OPD values, that is, they were more compact, when compared to the fibers from other regions of the cornea ($P < 0.01$). In contrast, the fibers in the inferior fragments were less compact (values $< \text{OPD}$) than in the other fragments ($P < 0.01$). The stromal collagen fibers of canine cornea present positive B_F . The contribution of B_F to B_T was greater than 80%. Regarding B_I , collagen fibers in the central and inferior corneal fragments presented, respectively, the lowest and the greatest value. In conclusion, total (form and intrinsic) birefringence in dogs is positive in all corneal fragments and depths, and canine cornea presents anomalous dispersion of birefringence in its periphery. Also, the ordering pattern of the collagen fibers is not constant through all the cornea, being different among the fragments studied.

Keywords: dog, cornea, collagen, structure tensor, polarized light microscopy

1. CAPÍTULO – Considerações gerais

1.1 Introdução

A acuidade visual dos mamíferos depende, entre outros fatores, das características macro e microscópicas da córnea, estrutura em contato com o ambiente externo que, juntamente com a esclera, protege as estruturas oculares internas. Por se tratar de uma lente refrativa, a córnea saudável é transparente e possui peculiaridades quanto ao formato e propriedades biomecânicas. O poder refrativo da córnea tem relação com a adaptação do animal ao ambiente, resulta de processos evolutivos, e parece ser espécie-específico. Refração, transparência, formato/curvatura e biomecânica corneal emergem, em parte, do arranjo único e altamente supraorganizado das fibrilas e fibras colágenas que compõem as lamelas estromais.

O arranjo do estroma corneal é do tipo lamelar e parece ser altamente conservado entre os mamíferos. Há evidências, no entanto, de que a supraorganização, em termos de orientação, cristalinidade e estado de agregação, das fibras colágenas que formam as lamelas varia entre os animais, acompanhando diferenças interespecíes em acuidade visual. Tais evidências têm implicações diretas em oftalmologia veterinária, pois indicam que conhecimentos sobre a arquitetura colagênica da córnea humana, a qual tem sido exaustivamente estudada por diferentes autores, não devem ser totalmente extrapolados para córneas de animais, principalmente quando envolvem manejo, prognóstico ou diagnóstico de doenças cuja causa de base envolvem mudanças na microestrutura do estroma. Ademais, peculiaridades espécie-específicas quanto ao arranjo das fibras colágenas podem explicar porque algumas espécies são mais predispostas do que outras ao desenvolvimento de certas disfunções que resultam em opacidade e em dispersão elevada de luz na córnea.

Freqüentemente, a oftalmologia veterinária utiliza técnicas empregadas em oftalmologia médica para diagnosticar e tratar doenças corneais em cães. Nem

sempre, todavia, as respostas observadas na córnea do cão são as mesmas da córnea humana. Diferenças microestruturais entre a córnea canina e a humana podem responder por certas discrepâncias em resultados clínicos, quando à extrapolação de técnicas de uma espécie para outra. Conhecimentos sobre a supra-organização colagênica estromal da córnea canina podem direcionar abordagens ou o desenvolvimento de algoritmos de diagnóstico por imageamento que permitam melhor atender essa espécie.

Diferentes aspectos supraorganizacionais qualitativos e quantitativos das fibras colágenas na córnea do cão podem ser mapeados aferindo-se as frações intrínseca e de forma da birrefringência corneal, condição que desencadeia mudanças no estado de polarização da luz. A birrefringência pode ser acessada de córneas "in totum" ou de secções de tecido corneal, e quali-quantificada sob microscópio avançado de luz polarizada equipado com compensadores de fase (cristais com caminho óptico conhecido) e com "softwares" de análise de imagens a fim de se obterem informações sobre topografia, orientação, estado de agregação e cristalinidade de fibras colágenas.

Com a presente pesquisa, objetivou-se descrever padrões de supraorganização das fibras colágenas do estroma corneal canino, por meio de estudos quali-quantitativos da birrefringência corneal. Avaliações foram conduzidas de forma setorizada e comparativa, visando-se o mapeamento de sítios estromais distintos (anterior, médio e profundo) em diferentes fragmentos (superior, inferior, central, nasal e temporal) da córnea.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Considerações sobre a córnea

A córnea é uma estrutura refrativa, transparente, avascular e deturgescente, em contato com o ambiente externo, que corresponde ao sexto anterior da túnica fibrosa ocular (Holland et al., 2015). Ela está presente em todos os tipos de olhos de vertebrados, com exceção das enguias (Holland et al., 2015). Possui formato arredondado, é convexa na superfície anterior e côncava na superfície posterior (Maurice, 1957; Meek; Knupp, 2015). As principais funções da córnea são convergir os raios luminosos que adentram o olho e proteger as estruturas oculares internas, uma vez que, adjunto à esclera, ela atua como barreira de proteção contra agentes traumáticos e infecciosos (QAZI et al., 2010). Os tecidos corneais são nutridos pelo filme lacrimal, pelas glândulas tarsais, pelas conjuntivas pálpebras e pelas arcadas vasculares do limbo corneoescleral, que correspondem aos ramos da artéria ciliar anterior (Holland et al., 2015).

Os tecidos corneais originam-se do ectoderma superficial embrionário e continuam a crescer e a aplainar após o nascimento. Em seres humanos, a córnea atinge medidas adultas (aproximadamente 11,5 mm em diâmetro) após o primeiro ano pós-natal (Holland et al., 2015). Em cães, as medidas da córnea adulta variam dependendo da raça, da idade e do sexo (Montiani-Ferreira et al., 2003). Em felinos, o diâmetro corneal aumenta com a idade, atingindo medidas adultas a partir da trigésima semana de vida (Moodie et al., 2001).

As espessuras totais da córnea humana adulta são de 0,52 mm no centro e de 0,65 mm na periferia. O quadrante central da córnea possui contorno esférico com raio de curvatura externo de aproximadamente 7,8 mm, enquanto que a córnea periférica é radialmente assimétrica (Holland et al., 2015). Em cães e em gatos, as espessuras da córnea central adulta são de 0,55 mm (Montiani-Ferreira et al., 2003)

e de 0,56 mm (Moodie et al., 2001), respectivamente. Em felinos adultos, a curvatura média da córnea é de 38,9 dioptrias, enquanto que nos cães ela varia entre 40 e 45 dioptrias (Gaiddon et al., 1991).

A córnea humana responde por aproximadamente 80% do poder refrativo do olho, com cerca de 42 dioptrias e índice de refração de 1,376 (Waring III, 1984; Klyce; Beuerman, 1988). Comparativamente aos humanos, os índices de refração corneal dos animais domésticos são de mesma ordem, com variações sutis (1,333 a 1,338). Relativamente à dioptria, os valores diferem significativamente entre os animais (Coile; O'keefe, 1988).

A córnea da maioria dos animais é formada por quatro camadas: o epitélio, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (Samuelson, 1999). Em seres humanos, observam-se ainda a camada de Bowman e a de Dua (DUA et al., 2013). O epitélio e o endotélio são responsáveis pela manutenção da transparência corneal, funcionando como barreiras seletivas à entrada de fluídos no estroma (Qazi et al., 2010; Hassell; Birk, 2010). O estroma é um tecido conjuntivo com características únicas e cujo arranjo altamente organizado de seus componentes favorece a curvatura e a biomecânica corneal e reduz a dispersão da luz, o que confere transparência à córnea, além de lhe prover importantes propriedades anisotrópicas e polarizantes que representam, na atualidade, a base diagnóstica de muitos métodos não invasivos de imageamento (Hassel; Birk, 2010).

1.2.2 Implicações do estroma na biomecânica e na transparência da córnea

O estroma representa cerca de 90% da espessura corneal nos vertebrados (Michelacci, 2003). Ele é formado de matriz extracelular contendo fibrilas heterotípicas de colágeno fibrilar do tipo I associado com colágeno tipo V, colágenos tipos III, XII, XIII e XIV, fibrilas elásticas, ceratócitos (fibroblastos), proteoglicanos, glicoproteínas

não-colagênicas, sais inorgânicos e água (Birk et al., 1988; Michelacci, 2003; Massoudi et al., 2016; Qazi et al., 2015; Meek; Knupp, 2015; Lewis et al., 2016).

O colágeno fibrilar do tipo I corresponde à principal macromolécula extracelular do estroma corneal. Ele tem forma de bastão, com peso molecular de 300 kDa, e é composto por três cadeias polipeptídicas denominadas alfa, que formam uma tripla fita helicoidal (Van Der Rest; Garrone, 1991). A estrutura primária do colágeno tipo I contém uma sequência repetitiva de aminoácidos do tipo Gly-X-Y, na qual X frequentemente é prolina e Y é glicina (Van Der Rest; Garrone, 1991), além de uma quantidade expressiva de hidroxiprolina, um aminoácido modificado ausente em todas as demais proteínas de origem animal (Reddy et al., 2002). Os resíduos de prolina possuem estrutura em anel, estabilizam a molécula de colágeno e, juntamente com as ligações cruzadas, conferem às fibrilas colágenas uma capacidade de resistência à tensão maior do que aquela proporcionada por um fio de aço de mesma espessura transversal (Nelson; Cox, 2002).

Fibras de colágeno tipo I, juntamente com a rede de elastina, conferem força e elasticidade variáveis ao tecido corneal. Tanto a força quanto a elasticidade dependem de fatores como a espessura corneal, a pressão intraocular e o comprimento axial do bulbo ocular, bem como da presença de erro refrativo, de oftalmopatias (e.g., glaucoma) ou de doenças sistêmicas (Garcia-Porta et al., 2014). Ademais, dependem da ação das pálpebras e dos músculos extraoculares durante a movimentação ocular normal e da movimentação da musculatura ciliar na acomodação visual, por se tratarem de forças fisiológicas de deformação que impactam a córnea. Deformações clínicas (e.g., aferição da pressão intraocular por tonometria) ou patológicas (e.g., cirurgias ou traumas, doenças) podem também repercutir na trama colagênica corneal, resultando em aberrações ópticas e distorção da visão (Ambekar et al., 2011). Quaisquer mudanças no formato ou na curvatura corneal resultam em aberrações ópticas e, por conseguinte, em modificações no foco da imagem na retina, ensejando perda da acuidade visual (Hayes et al., 2007; Winkler et al., 2015).

Alterações na microestrutura corneal, notadamente as decorrentes de mudanças na maquinaria de síntese e nos mecanismos extracelulares de montagem das fibrilas e fibras colágenas estromais, modificam as propriedades macroscópicas da córnea (Boote et al., 2005; Boote et al., 2016). Em seres humanos, por exemplo, colágenos com cristalinidade “anormal”, como os encontrados na córnea com ceratocone, comprometem a rigidez e a viscoelasticidade da córnea (Ambekar et al., 2011; Mercatelli et al., 2016).

Outrossim, mudanças na microestrutura estromal comprometem as propriedades ópticas e refrativas da córnea. Com base nas propriedades físicas da luz, foi proposto que a transparência corneal é uma função da homogeneidade dos índices refrativos de todos os constituintes da córnea, em especial do estroma (Hassell; Birk, 2010). A trajetória da luz no estroma corneal depende da transparência corneal e vice-versa, sendo que a absorção e a dispersão mínimas de fótons são condições necessárias para ambas (Misson, 2012). Qualquer alteração no estado ordenado de agregação, na orientação espacial e na espessura das fibras colágenas interfere na transparência corneal e, conseqüentemente, no caminho óptico da luz. Os fótons de luz, ao atingirem a superfície da córnea saudável, interagem diretamente com a microestrutura estromal gerando ondas eletromagnéticas que permeiam as fibrilas colágenas, produzindo ondas secundárias que se anulam e geram uma só direção de propagação da luz, evitando dispersão de fótons (Hassell; Birk, 2010; Meek; Knupp, 2016). Nas opacificações corneais de diferentes etiologias, a dispersão de fótons é elevada (Meek; Knupp, 2016).

Alterações na síntese de proteoglicanos também modificam a qualidade do colágeno estromal corneal, uma vez que as cadeias glicânicas dos proteoglicanos estão intimamente associadas com as fibrilas colágenas, influenciando o remodelamento, a cicatrização, a biomecânica e as propriedades ópticas do tecido (Quantock et al., 2015). A distrofia macular corneal humana é um exemplo de alteração em proteoglicanos que afeta o colágeno. Trata-se de uma doença hereditária que altera o espaçamento intermolecular das fibras colágenas e está caracterizada por opacificação corneal progressiva secundária a uma mutação na via

de sulfatação enzimática dos keratan sulfatos (Hassell et al., 1980; Quantock et al., 2015).

1.2.3 Padrões supraorganizacionais das fibrilas e fibras colágenas do estroma corneal

Colágenos fibrilares possuem “requerimentos estruturais” tecido-específicos e, por meio de fenômenos espontâneos de auto-reconhecimento e de automontagem intra e intermoleculares, geram tecidos ou estruturas supra-organizadas, com diferentes atributos macroscópicos e funcionais (Hay, 1981). Na córnea, o processo de automontagem das fibrilas estromais de colágeno tipo I origina fibras mistas com espaçamento regular e diâmetro uniformemente reduzido (± 31 nm, ou seja, menor que o comprimento de onda da luz), comparativamente às fibras presentes em outras estruturas do corpo (Michellaci, 2003; Doughty; Bergmanson, 2004). As fibras colágenas estromais se reúnem para formar lamelas (Boote et al., 2005; Park et al., 2015), cujas orientações nos planos da córnea variam entre as classes de vertebrados (Hayes et al., 2007; Winkler et al., 2015). Embora as lamelas estejam dispostas em todas as possíveis orientações no plano da córnea, elas exibem orientações preferenciais que diferem entre os quadrantes central, periférico e limbal corneoescleral (Boote et al., 2005, Ottani et al., 2002; Nguyen; Boyce, 2011).

As córneas dos mamíferos possuem padrão estrutural diferente dos descritos para córneas de outros vertebrados. Winkler et al. (2015) mostraram que nos mamíferos os feixes de fibras colágenas são dinâmicos e podem se orientar em direções variáveis dentro de um mesmo plano corneal. Ademais, os feixes e fibras colágenas possuem ramificações e anastomoses cruzando os planos lamelares. A densidade das ramificações varia em função da profundidade do estroma e diverge entre as espécies. Evidências sugerem que a função das ramificações lamelares é estabilizar o formato da córnea, o que é crucial para a função refrativa (Winkler et al., 2015).

Não obstante o arranjo lamelar corneal seja bem conservado entre os mamíferos, a supra-organização colagênica estromal, em termos de orientação, cristalinidade e estado de agregação de fibras, parece variar entre as espécies (Hanlon et al., 2015), contribuindo para diferenças espécie-específicas em acuidade visual (Hayes et al., 2007; Winkler et al., 2015). A córnea humana, por exemplo, apresenta padrão ortogonal de orientação fibrilar, com direções preferenciais nos sentidos superior-inferior e nasal-temporal (Hayes et al., 2007). Entretanto, fibras colágenas nas córneas de saguis, cavalos e bovinos têm padrão vertical de orientação no sentido superior-inferior. Córneas de porcos, camundongos e coelhos apresentam fibras dispostas em padrão circunferencial de orientação. Estudos prévios apontam que a semelhança entre todas as espécies é a presença do annulus circunferencial limbal (também chamado de circum-corneal annulus) (Hayes et al., 2007), que corresponde a uma rede de fibras colágenas circunferencialmente organizadas na periferia corneal, interligada a uma rede de fibras elásticas que correm paralelamente a ela, auxiliando na manutenção da curvatura e conferindo estabilidade biomecânica à córnea (Kamma–Lorger et al., 2010). Relativamente à córnea do cão, desconhecem-se detalhes sobre os padrões de orientação e supraorganização das fibras colágenas estromais.

A cada dia emergem novas evidências de que os padrões supra-organizacionais das fibras colágenas da córnea humana não podem ser totalmente extrapolados para córneas de outras espécies de vertebrados (Hayes et al., 2007; Winkler et al., 2015); isso tem implicações diretas na abordagem clínica e diagnóstica de doenças corneais em pacientes veterinários. A oftalmologia veterinária, frequentemente, adapta técnicas empregadas em oftalmologia médica para tratar doenças corneais em animais, principalmente cães e gatos. Nem sempre, todavia, os resultados alcançados na veterinária são os mesmos descritos na medicina. Os conhecimentos limitados sobre a microestrutura corneal de cães poderia ser um fator contribuinte para diferenças em resultados clínicos e em prognósticos, quando da transposição de algumas técnicas usadas em seres humanos para cães. Conhecimento espécie-específico sobre a supraorganização colagênica estromal da córnea poderiam direcionar adaptações metodológicas que permitam melhor atender os diferentes pacientes veterinários.

Conhecimentos sobre a supraorganização do colágeno estromal corneal podem, também, auxiliarem na compreensão dos processos evolutivos do olho, permitindo estabelecer uma relação entre a filogenia da córnea, enquanto lente refrativa em contato com o ambiente, e o habitat das espécies (Winkler et al., 2015). Quando a luz incide sobre a superfície curva da córnea, o ângulo de refração gerado é proporcional à diferença dos índices refrativos dos constituintes corneais. A córnea possui índice de refração muito próximo ao da água, de modo que seu formato torna-se irrelevante no ambiente aquático. Em contrapartida, no ambiente terrestre, há diferença marcante entre os índices refrativos da estrutura e do ambiente; assim, para assegurar um poder refrativo efetivo, a funcionalidade da córnea dos animais terrestres depende da curvatura e de outras propriedades relacionadas com a organização da rede colagênica (Winkler et al., 2015).

1.2.4 Birrefringência como ferramenta para avaliação da supra-organização das fibras colágenas estromais

Na atualidade, a interação do colágeno com a luz polarizada e com as ondas eletromagnéticas constitui a base biofísica para a interpretação de muitos métodos de diagnóstico por imageamento (Boote et al., 2016; Mercatelli et al., 2016). Fibras colágenas do estroma corneal podem ser estudadas empregando-se fundamentos de anisotropias ópticas, uma vez que elas são altamente birrefringentes (Maurice 1957; Aldrovani; Vidal, 2007; Gotzinger et al., 2007; Park et al., 2015).

A birrefringência é uma condição que desencadeia mudanças no estado de polarização da luz (Aldrovani et al., 2007; Aldrovani; Vidal, 2007; Vidal; Mello, 2009). As fibras de colágeno apresentam dois tipos de birrefringência: a de forma (B_F) e a intrínseca (B_I), que somadas compõem a birrefringência total (B_T). A birrefringência de forma contribui com até 2/3 e a birrefringência intrínseca com até 1/3 para a birrefringência total da córnea humana (Misson, 2012).

A B_F depende da geometria e da interação das moléculas de colágeno com o comprimento de onda de um fóton, bem como da orientação, do grau de organização

e do empacotamento molecular das fibras colágenas (Ribeiro et al., 2013; Vidal; Mello, 2010). Ela é uma condição óptica não linear que ocorre em corpos mistos (formados por mais de um tipo de molécula) com periodicidade no arranjo ordenado de seus constituintes. Sumariamente, a B_F emerge da montagem uniforme e paralela entre as cadeias helicais em forma de bastão que formam as fibras de colágeno, que por sua vez estão inseridas em uma matriz extracelular homogênea com diferentes índices de refração. Ela é, portanto, o produto de simetrias e assimetrias do colágeno em nível supramolecular e depende de índices de refração (Misson, 2012).

A B_I é a anisotropia resultante do alinhamento assimétrico de ligações químicas, íons ou moléculas dentro de um meio de transmissão. No caso do colágeno, ela depende de polarizabilidade e resulta das interações do campo eletromagnético da luz com os elétrons das moléculas (Vidal; Mello, 2009).

Quando a luz polarizada permeia a córnea, os componentes ortogonais do vetor elétrico 'E' exibem dois índices de refração, que causam propagação de luz em diferentes velocidades e direções (Aldrovani et al., 2007; Vidal; Mello, 2010). A mudança de fase dos componentes do vetor elétrico, um em relação ao outro, é representada pela equação:

$$\delta = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) L \Delta n$$

na qual δ é a diferença de fase entre as propagações ortogonais polarizadas, λ é o comprimento de onda da luz, L é a espessura da amostra e Δn é a diferença nos índices de refração entre os dois eixos ópticos da amostra. $L\Delta n$ corresponde ao retardo óptico, também chamado de diferença do caminho óptico (OPD) da amostra (Aldrovani et al., 2007). Sob microscopia de luz polarizada, o OPD corneal é detectado como um brilho, cujas avaliações qualitativa e quantitativa informam sobre morfologia, topografia, orientação e empacotamento das fibras de colágeno (Aldrovani et al., 2007; Aldrovani; Vidal, 2007; Vidal; Mello, 2010; Ribeiro et al., 2013).

Estudos descrevendo a supraorganização ou o arranjo microestrutural das fibras de colágeno nos tecidos oculares ajudam a entender as propriedades ópticas e

biomecânicas dos elementos que compõem o olho (Meek; Boote, 2003). Nos últimos anos, vários estudos sobre a microestrutura da córnea foram realizados em diferentes espécies, mamíferos ou não (Winkler et al., 2015; Kington; Huang, 2002). A luz polarizada permite descrições detalhadas da microestrutura da córnea, uma vez que sua interação com os tecidos anisotrópicos resulta em propriedades físicas, notadamente a birrefringência, cujos padrões estão relacionados ao nível de organização macromolecular das fibras colágenas dentro do estroma. Uma das ferramentas mais utilizadas para avaliar as fibras colágenas da córnea é a microscopia quantitativa de luz polarizada, na qual dados sobre orientação, estado de agregação e cristalinidade ou polarizabilidade do estroma já foram revelados, notadamente na córnea humana (Hayes et al., 2007).

1.3. Referências

Ambekar R, Toussaint KC;Johnson AW (2011)The effect of keratoconus on the structural, mechanical and optical proprieties of cornea. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials** 4:223-236.

Aldrovani M, Guaraldo AMA, Vidal BC (2007) Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. **Vision Research** 473: 229–3237

Aldrovani M, Vidal BC (2007). Application of principles of optical anisotropies and image analysis to the investigation of molecular packing, cristallinity, spatial organization and three-dimensional topography in collagen fibers from porcine cornea. **Progress in Biopolymer Research** (ed. Sanchez PC), Nova Sci Publ Inc, New York, p.225-42.

Birk E, Fitch JM, Basbiari JP, Linsenmayer TF (1988) Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. **Journal of Cell Biology** 106: 999-1008.

Boote C, Dennis S, Huang Y, Quantock AJ, Meek KM (2005) Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties. **Journal of Structural Biology** 149:1-6.

Boote C, Palko JR, Mohammadvali A, Elsheikh A. Komáromy AM, Pan X, Liu J (2016) Changes in posterior scleral collagen microstructure in canine eyes with an ADAMTS10 mutation. **Molecular Vision** 22: 503-517.

Coile DC, O'keefe LP (1988) Schematic eyes for domestic animals. **Ophthalmic & Physiological Optics** 8: 215-220.

Doughty MJ, Bergamnson JPG (2004) Resolution and reproductibility of measures of the diameter of small collagen fibrils by transmission electron microscopy-application to the rabbit corneal stroma. **Micron** 36:331-343.

Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J (2010) Human Corneal Anatomy Redefined A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). **Ophthalmology** 120:1778-1785.

Gaiddon J, Rosolen SG, Steru L, Cook CS, Peiffer RJR (1991) Use of biometry and keratometry for determining optimal power for intraocular lens implants in dogs. **American Journal of veterinary Research** 52: 781-783.

Garcia-Porta N, Fernandes P, Queiros A, Salgado-Borges JPA, Rafita-Mato, M, González-Méijome, JM (2014) Corneal biomechanical properties in different ocular conditions and new measurement techniques. **ISRN Ophthalmology** 4: 724546.

Götzinger E, Pircher M, Dejaco-Ruhswurm I, Kaminski S, Skorpik C, Hitzenberger CK (2007) Imaging of birefringent properties of keratoconus corneas by polarization-sensitive optical coherence tomography. **Investigative Ophthalmology and Visual Sciences** 48: 3551-3558.

Hanlon SD, Behzad ARS, Akai LY, Burns AR (2015) Corneal stroma microfibrils. **Experimental Eye Research** 132:198-207.

Hassell JR, Newsome DA, Krachmer JH, Rodrigues MM (1980) Macular Corneal Dystrophy: Failure To Synthesize A Mature Keratan Sulfate Proteoglycan. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America** 77:3705-3709.

Hassell JR, Birk DN (2010) The molecular basis of corneal transparency. **Experimental Eye Research** 91:326-335.

Hay ED. Extracellular matrix (1981). **Journal of Cell Biology** 91:205-223.

Hayes S, Boote C, Lewis J, Sheppard J, Abahussin M, Quantock AJ, Purslow C, Votrubá M, Meek KM (2007) Comparative Study of Fibrillar Collagen Arrangement in the Corneas of Primates and Other Mammals. **The Anatomical Record** 290: 1542–1550.

Holland EJ, Mannis M, Barry Lee W (2015): **Doenças da Superfície Ocular**. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier. 317p.

Kamma-Lorger CS, Boote C, Hayes S, Moger J, Burghammer M, Knupp C, Quantock AJ, Sorensen T, Di Cola E, White N, Young RD, Meek KM (2010) Collagen and mature elastic fibre organization as a function of depth in the human cornea and limbus. **Journal of Structural Biology** 169:424–430 R.W.

Knighton RW, Huang X (2002) Linear Birefringence of the Central Human Cornea. **Investigative Ophthalmology Visual Science** 43:82-86.

Klyce SD, Beuerman RW (1988). Structure and function of the cornea. In.: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, Waltman SR. **The Cornea**. 1.ed. New York: Churchill Livingstone. p. 3.

Lewis PN, White TL, Young RD, Bell JS, Winlove CP, Meek KM (2016) Three-dimensional arrangement of elastic fibers in the human corneal Stroma. **Experimental Eye Research** 146:43-53.

Massoudi D, Malecaze F, Galiacy SD (2016) Collagens and proteoglycans of the cornea: importance in transparency and visual disorders. **Cell and Tissue Research** 363:337-49.

Maurice DM (1957) The structure and transparency of the cornea. **The Journal of Physiology** 136:263- 286.

Meek KM, Knupp C (2015) Corneal structure and transparency. **Progress in Retinal and Eye Research** 49:1-16.

K.M. Meek KM, Boote C (2003) The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma. **Progress in Retinal and Eye Research**, 28:369-392.

Mercatelli R, Ratto F, Rossi F, Tatini F, Menabuoni L, Malandrini A, Nicoletti R, Pini R, Pavone FS, Cicchi R (2016) Three-dimensional mapping of the orientation of collagen corneal lamellae in healthy and keratoconic human corneas using SHG microscopy. **Journal of Biophotonics** 10: 1-9.

Michelacci YM (2003) Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36: 1037-1046.

Misson GP **Birefringent Properties of the Human Cornea *in vivo*: Towards a New Model of Corneal Structure**. 2012. 310f. Tese (Doutorado em Filosofia) -The University of Warwick, 2012.

Montiani-Ferreira F, Petersen-Jones S, Cassotis N, Ramsey DT, Gearhart P, Cardoso F (2003) Early postnatal development of central corneal thickness in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, 6: 19-22.

Moodie KL, Hashizume N, Houston DL, Hoopes, PJ, Demidenko E, Trembly BS, Davidson MG (2001) Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. **Veterinary Ophthalmology** 4: 267–272.

Nelson DL, Cox MM. Carboidratos e glicoconjugados e aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: LEHNINGER – **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Savier, 2002, p.94-240.

Nguyen TD, Boyce BL (2011) An inverse finite element method for determining the anisotropic properties of the cornea. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, 10: 323–337.

Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M (2002) Hierarchical structures in fibrillar collagens. **Micron** 33: 587–596.

Park CY, Lee JK, Chuck, RS (2015) Second Harmonic Generation Imaging Analysis of Collagen Arrangement in Human Cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 56: 5622–5629.

Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK (2010) Corneal transparency: Genesis, maintenance and dysfunction. **Brain Research Bulletin**, 8:198–210.

Quantock AJ, Winkler M, Parfitt GJ, Young RD, Brown DJ, Boote C, Jester JV (2015) From nano to macro: Studying the hierarchical structure of the corneal extracellular matrix. **Experimental Eye Research** 133: 81-99.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka S (2002) Glycation induced matrix stability in the rabbit Achilles tendon. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 399:174-180.

Ribeiro JF, Anjos EHM, Mello MLS, Vidal BC (2013) Skin Collagen Fiber Molecular Order: A Pattern of Distributional Fiber Orientation as Assessed by Optical Anisotropy and Image Analysis. **PLoS ONE** 8:e54724.

Samuelson DA. Ophthalmic Anatomy. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p.31-150.

Van Der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. **FASEB Journal** 5: 2814-2823.

Vidal, BC, Mello MLS (2009) Structural organization of collagen fibers in chordae tendineae as assessed by optical anisotropic properties and Fast Fourier transform. **Journal of Structural Biology** 167:166–175.

Vidal BC, Mello MLS (2010) Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochemica** 112:53-61.

Waring III GO. Corneal structure and pathophysiology. In: LEIBOWITZ, H. **Corneal disorders: clinical diagnosis and management**. Philadelphia, 1.ed, 1984; p.3-25.

Winkler M, Shoa G, Tran ST, Xie Y, Thomasy S, Raghunathan VK, Murphy C, Brown DJ, Jester JVA (2015) Comparative study of vertebrate corneal structure: the evolution of a refractive lens. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 56:2764-2772.

2. CAPÍTULO – Artigo científico¹

Imaging and measurements of birefringent properties related to supraorganization of stromal collagen fibers in dog corneas

CAMILA P. BALTHAZAR DA SILVEIRA^{1,*}, MARCELA ALDROVANI², IVAN R. M. PÁDUA¹, ALEXANDRE A. F DE BARROS SOBRINHO¹, THAIS G.M. ABREU¹, ROBERTA M. CRIVELARO³, AND JOSÉ LUIZ LAUS¹

¹Ophthalmology Unit, Department of Clinics and Veterinary Surgery, São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, Brazil

²University of Franca (UNIFRAN), Franca, SP, Brazil

³Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaina, Rio Grande do Sul, Brazil

*balthazardasilveira.c@gmail.com

Abstract: This study aimed to compare different regions of the canine cornea considering the supraorganization of the stromal collagen fibers. All the material was studied under a polarized light microscope equipped with polychromatic light and 546 nm monochromatic light, Sénarmont and Brace-Köhler compensators, and an image analysis system. The collagen fibers were positioned at 45 and 90 degrees to the plane of the polarized light (PPL) and evaluated sectorially. Total, form and intrinsic birefringences were defined based on optical path difference (OPD) values measured in corneal tissue sections embedded in solutions with different refractive indexes. Microscopy images were processed and examined using the structure tensor. The main findings of the study were: collagen fibers in the anterior and middle sites of the nasal and temporal corneal fragments were less aligned and wavier than the collagen fibers in the other corneal fragments ($P < 0.05$). The OPD values revealed that collagen fibers in the central and inferior fragments of the canine cornea are, respectively, more and less compact, when compared to the fibers in other corneal fragments ($P < 0.01$). Collagen fibers in central and inferior corneal quarters presented, respectively, greater and lower OPD values regarding intrinsic birefringence. In conclusion, total (form and intrinsic) birefringence in dogs is positive in all corneal fragments and depths, and canine cornea presents anomalous dispersion of birefringence in its periphery. Also, the ordering pattern of the collagen fibers is not constant through all the cornea, being different among the fragments studied.

© 2018 Optical Society of America under the terms of the [OSA Open Access Publishing Agreement](#)

1. Introduction

Cornea is the first refractive lens of the eye, and about 90% of the corneal thickness of the vertebrates is made of conjunctive fibrous tissue containing type 1 collagen fibrils in its

¹ Esse capítulo está de acordo com as normas da revista Optics Express
Disponível em: <https://www.osapublishing.org/submit/style/osa-styleguide.cfm>

stroma [1-4]. In the corneal stroma, collagen fibrils form bundles, and they group to form the lamellae [5]. The hierarchical and supraorganized arrangement of its stroma collagen fibrils makes it a resistant, resilient [4, 6], convex-shaped, refractive and transparent structure [3,7]; that is, the way collagen fibrils interact and arrange themselves provide optical and biomechanical characteristics to the cornea [8].

As cornea compounds present as a liquid crystal, its macroscopic and functional properties depend on the orientation, orderliness and aggregation state of the compounds of the stroma [9 – 13]. Collagen fibrils of the corneal stroma may be studied by optic anisotropies foundations, since they are highly birefringent [5, 14, 15].

Since corneal birefringence was discovered, the investigation of the preferential orientation of corneal stroma collagen fibers in different species has been studied [8, 16-18]. The corneas of mammals structural standard is different from that of other vertebrates [18]. Although the lamellar arrangement of the corneal stroma is well conserved in mammals, the stromal collagenic supraorganization seems to vary among species (6), contributing to species-specific differences regarding visual acuity [17, 18].

Nowadays, the birefringence of human cornea is the most studied [15, 16, 19, 20]. The different methodologies employed in the investigation of human corneal stroma supraorganization have contributed to a better understanding of this microstructure's biological behavior in case of physiological and pathological manifestations [13,17, 20-23].

Veterinary medicine frequently uses techniques employed in human ophthalmology to diagnose and treat corneal diseases in dogs [24-26], though the results obtained are not always the same. Microstructural differences between human and canine corneas may explain certain divergences between clinical results when techniques are extrapolated from one species to the other [25, 26].

Different qualitative and quantitative supraorganizational aspects of the canine cornea collagen fibers may be mapped by measuring the corneal birefringence, condition that unleashes changes in the state of light polarization [9, 16, 18, 19, 27]. The birefringence may be measured in corneas *in totum* or in sections of the corneal tissue and quail-quantified by advanced polarized light microscope equipped with phase compensators (crystals with known optical path) and with image analysis softwares, in order to provide information about topography, orientation, aggregation state, and cristallinity of collagen fibers [10,12, 14, 16, 19, 28, 29].

In veterinary medicine, few are the studies which provide information about the organizational standard of domestic animals corneal collagen fibers with clinical, prognostic or diagnostic purpose for the species. Some researches seek for studies in animal cornea as experimental model to increase the understanding of the corneal microstructure focusing on providing relevant information for humans [30, 31].

Due to the lack of comprehension of the organizational standard of the collagen fibers of the healthy canine cornea, the present research aimed to describe supraorganizational standards of the canine corneal stroma collagen fibers by quali-quantitative studies of the corneal birefringence. Sectorial and comparative evaluations were carried out in order to map the different stromal sites (anterior, middle and deep) and fragments (superior, inferior, central, nasal and temporal) of the cornea.

2. Material and Methods

2.1. Ethics

The experimental protocols of this study were approved by the Ethics Committee on Animal Use (Protocol No. 178223/16) of State University Sao Paulo (FCAV-UNESP), Jaboticabal/SP.

2.2. Animals

Right and left eyes (n=22) were removed from 11 adult dogs, both genders, aged between 1 and 10 years, weighing 7 to 30 kg (average $\pm$ 22,7 kg), mixed breeds, submitted to humanized euthanasia for reasons not related to this research, after written consent of the owners. The time interval between dogs' euthanasia and eye removal did not exceed 2 hours.

Eye removal was made by veterinary ophthalmologists who previously examined the cornea for presence of alterations. All corneas were transparent, with no signs of pigment, edema, scars, vascularization, and ulcerations. On removal, a scleral suture was added to mark the superior globe position.

2.3. Tissue processing

After eye removal, approximately 0.3 mL of humor was drawn from the vitreous chamber with a syringe, and replaced by an equal volume of 10% buffered formalin (Synth, São Paulo, Brazil). In the sequence, the dog eyes were immersed in 10% buffered formalin for 48 hours [9, 14], and then the corneas were carefully excised within the scleral rim.

The excised corneas were washed in water and sectioned in five fragments identified as superior, inferior, central, nasal, and temporal (Fig. 1). The central cornea was delimited with help of a biopsy punch (Miltex, Plainsboro, NJ, USA), measuring 5 mm in diameter.

Fragments obtained of four corneas were stored at 70% ethanol in a refrigerator with constant temperature of 9°C, until they were used as whole mount preparations [9]. The remaining samples were washed in water, dehydrated in increasing concentrations of ethanol (Synth, São Paulo, Brazil), processed for embedding in Histosec® without dimethyl sulfoxide (Merck, Darmstadt, Germany) at a 56–58°C melting point, and transversely sectioned to 7 µm thickness using a paraffin microtome [12].

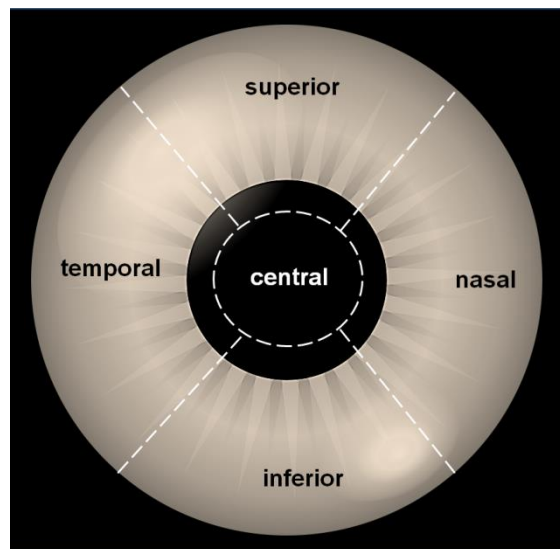


Fig. 1. Schematic representation showing how a cornea was sectioned in five fragments, called superior, inferior, central, temporal, and nasal.

2.4. Birefringence analyses

2.4.1. Theory. Corneal birefringence is a condition that leads to changes in the polarization of light. If polarized light passes through the cornea, the orthogonal components of the electric

vector E display two refractive indexes which lead to light propagation at different speeds and directions [9, 10]. The components of the electric vector experience a phase shift relative to one another, which is represented by the equation:

$$\delta = \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right) L \Delta n$$

where δ is the phase difference between propagating orthogonal polarizations, λ is the light wavelength, L is the thickness of the sample, and Δn is the difference in the refractive indexes between the two optical axes of the sample. The quantity $L\Delta n$ is known as the OPD and represents the difference between the two optical path lengths [9].

The OPD is visualized under a polarized light microscope as a brightness, whose qualitative and quantitative evaluation informs on the supraorganization of the collagen fibers [9, 10, 12, 14].

2.4.2. Equipment. All analyses were performed using a polarized light microscope (Olympus BX-53 Pol, Tokyo, Japan) equipped with UPLFLN 20/0.75 objective, rotating stage, a 100-watt halogen lamp to provide polychromatic white light, a narrow band pass interference filter (Edmund Industrial Optics, Barrington, NJ, USA) to provide 546-nm monochromatic light, a Sénarmont compensator consisting of a 1/4 wave retardation plate, and a Bräce-Köhler compensator consisting of a 1/10 wave retardation plate (Fig. 2).

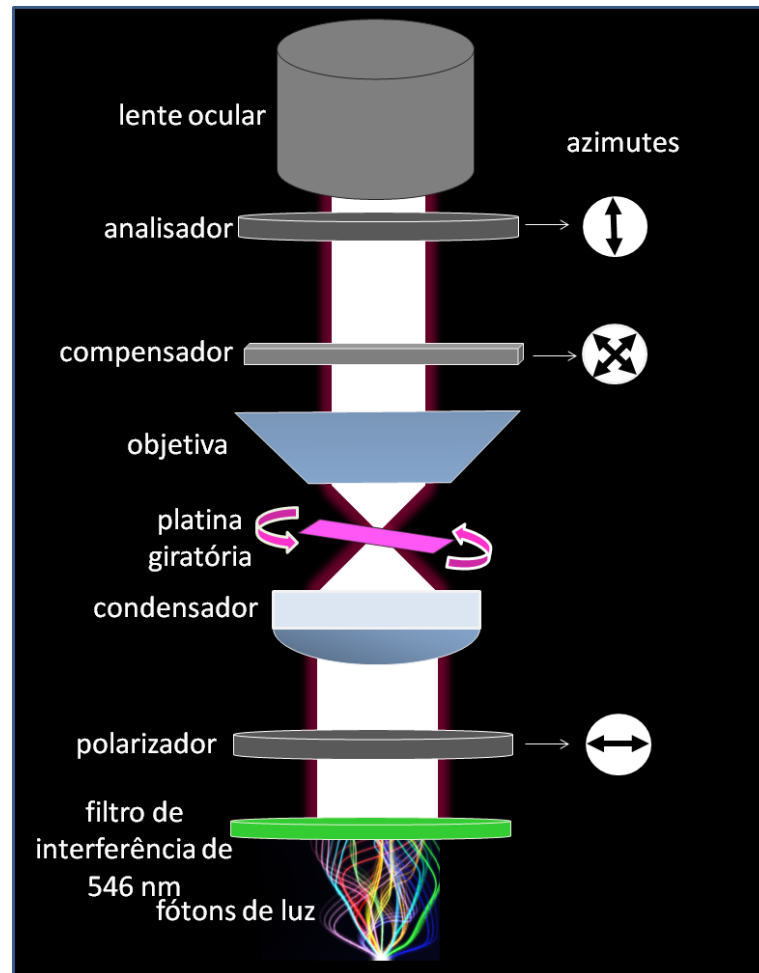


Fig. 2. Schematic diagram of the major parts of a quantitative polarized light microscope. This microscope is designed to observe birefringent structures, such as the cornea. It is equipped with UPLFLN objectives, an analyzer (placed in the optical pathway between the objective rear aperture and the observation tubes or camera port), a polarizer (positioned in the light path somewhere before the specimen), a rotating stage, a 100-watt halogen lamp, a 546-nm monochromatic light, a Sénarmont compensator, and a Bräce-Köhler compensator. The microscopic image contrast arises from the interaction of plane-polarized light with the birefringent sample to produce two individual wave components that are each polarized in mutually perpendicular planes.

2.4.3. Experimental setup. Qualitative and quantitative aspects of the corneal birefringence were evaluated using three different procedures:

2.4.3.1. Qualitative studies from whole mount corneas. Cornea's fragments identified as superior, inferior, central, nasal, and temporal were removed of the 70% ethanol and washed in distilled water. In the sequence, they were mounted in water on slides (i.e., whole mount preparations) and evaluated under polarized light microscopy. No staining was done. Corneal whole mount preparations were illuminated with polychromatic polarized light to study interference colors due to birefringence anomalous dispersion.

2.4.3.2. Studies using video image analysis and structure tensor. Slides containing unstained sections (7 μm) of superior, inferior, central, nasal, and temporal corneas were mounted in water with the coverslip. This procedure was performed to reduce the refractive index mismatch, which could leads to considerable alterations of OPD in biological tissues [28]. To studies on morphology and topography, the long axis of the stromal collagen fibers were oriented at 45 degrees and, later, at 90 degrees relative to the plane of the polarized light (PPL). Data were collected for collagen fibers into the anterior, middle, and posterior stromas in the different corneal fragments studied.

With the help of a high resolution video camera (Olympus), images of fibers oriented at 90 degrees to the PPL were transmitted to a computer and captured using the ImageJ software (<http://images.nih.gov/ij/> National Institutes of Health, Bethesda, MD, US). The OrientationJ (<http://bigwww.epfl.ch/demo/orientation/>), which is an ImageJ plug-in based on structure tensor, was used to calculate the coherency coefficient, an alignment metric that informs about the waviness characteristics of the collagen fibers [32].

The tensor structure (J) is a 2x2 matrix of partial derivatives along the x and y directions, containing information about the orientation of each pixel within an image [33-35]. It is mathematically expressed as:

$$J = \begin{bmatrix} \langle f_x, f_x \rangle \omega & \langle f_x, f_y \rangle \omega \\ \langle f_x, f_y \rangle \omega & \langle f_y, f_y \rangle \omega \end{bmatrix}$$

where ω is the Gaussian filter that delimits the interest area (5x5, with 0 mean and standard deviation equal to 1 pixel length in this study), and f_x and f_y are the partial derivatives of the image $f(x, y)$, along the principal directions x and y , respectively. In the case of image of birefringent fibers converted to binary, that is to a gray-scale image, $f(x, y) = 0$ and $f(x, y) = 255$ pixels.

Based on the structure tensor, the OrientationJ calculated the coherency coefficient (ImageJ > Plugins > OrientationJ > Measure) for every pixel of the image [36] by means of the equation:

$$C = \frac{\alpha_{max} - \alpha_{min}}{\alpha_{max} + \alpha_{min}}$$

$$= \frac{\sqrt{(\langle f_y, f_y \rangle \omega - \langle f_x, f_x \rangle \omega)^2 + 4 \langle f_x, f_y \rangle \omega}}{\langle f_x, f_x \rangle \omega + \langle f_y, f_y \rangle \omega}$$

where α_{max} is the largest and α_{min} is the smallest eigenvalue, respectively. A coherency coefficient close to 1 indicates a strongly parallelism/alignment of local fibers (low waviness), whereas a coherency coefficient close to zero denotes a low parallelism (high waviness) of fibers [34; 36].

2.4.3.3. Calculations of OPD and linear birefringence. OPD values were quantified in corneal tissue sections after immersion in water (refractive index of 1.333) or in pure glycerin (refractive index of 1.471), for 1 hour [9; 37]. Anterior, middle, and deep stromal collagen fibers in the superior, inferior, central, nasal, and temporal corneas were examined. All measurements of OPD were made on the polarized light microscope, with the long axis of the collagen fiber oriented at 45 degrees to the PPL, using Sénarmont (for water-immersed tissues) and Bräcke-Köhler (for pure glycerol-immersed tissues) compensators [9, 14]. The function of the compensators is to introduce known phases difference between the ordinary and extraordinary rays that pass through the birefringent cornea and thus to generate destructive interferences that are observed as dark field measurable at angles in the eyepiece of the microscope.

The angles of the phase difference (δ) read by the compensators were converted to OPD, in nanometers, by means of the formulas:

$$Sernarmont \lambda/4 = \delta \times 3.03$$

$$Bräcke-Köhler \lambda/10 = 47.20\sin(2\emptyset)$$

where 47.20 is the retardation of the compensator, $\emptyset$ is 45 degrees – δ , where 45 is the orientation of the cornea long axis relative to the PPL [9].

The OPD values obtained for samples immersed in pure glycerin inform about the B_I of the collagen fibers. The values of OPD quantified from samples immersed in water report on total birefringence (B_T) which is the sum of B_I and B_F . In this work, the B_F was estimated by subtracting B_I from B_T [37].

The linear birefringence was calculated by dividing the B_I as function of the sample thicknesses (7 μm) [38].

2.4.4. Data analysis

All data were tested for statistical normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons were made using the one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey post

hoc test. Differences with $p < 0.05$ were considered significant, with 95% confidence interval (95%CI). All calculations and comparisons were performed using the Minitab 12™ (Minitab, State College, San Diego, CA, USA) and the MedCalc (version 9.3.6.0, MedCalc, Mariakerke, Belgium) softwares.

3. Results

3.1. Qualitative studies from whole mount preparations

Variable birefringence interference colors were observed in the periphery (Fig. 3 a-d), but not in the center, of the cornea illuminated with polychromatic polarized light. Some collagen fibers in the cornea's periphery presented a high degree of branching and intertwining in different spatial planes. Throughout the corneal periphery, it was possible to observe populations of fibers that transversely extended from the cornea towards the limbus and the sclera (Fig. 3b).

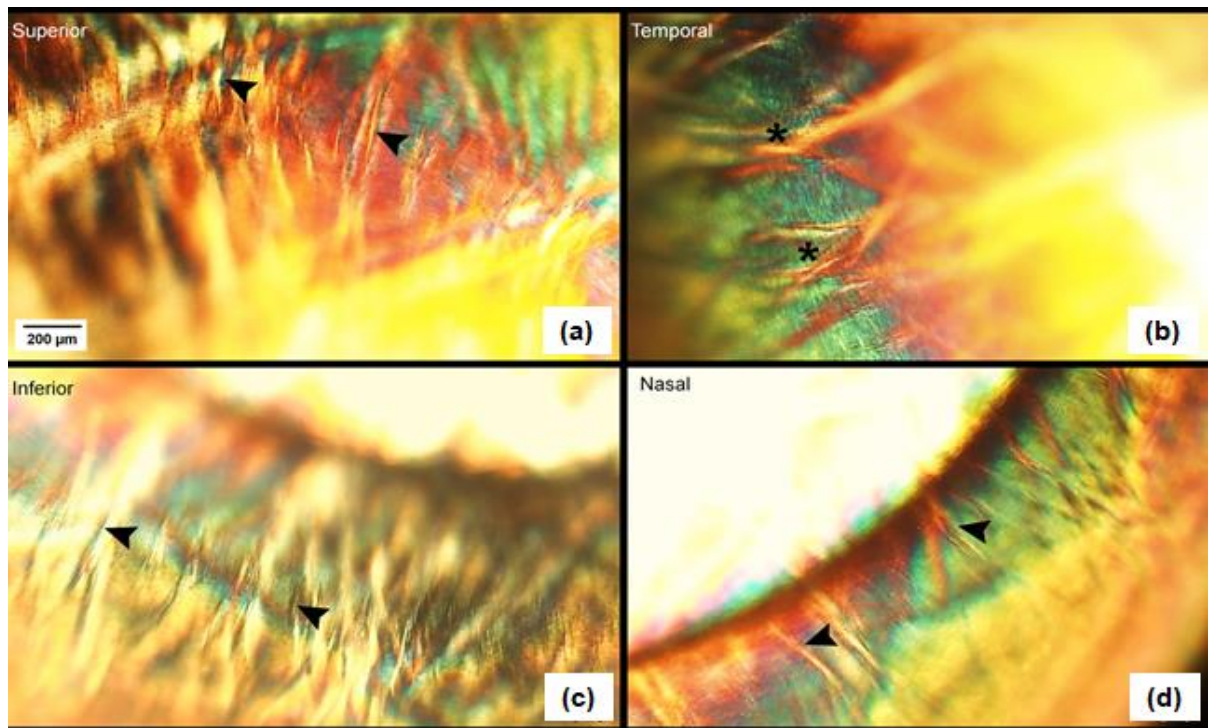


Fig. 3. Images of interference colors (due to anomalous dispersion of birefringence) observed in the peripheral regions from corneas in whole mount preparations illuminated with polychromatic polarized light. The arrow heads point to areas of intertwined collagen fibers (a, c, d). The asterisks in the image (b) correspond to collagen fibers that extended from the cornea towards the limbus and the sclera. Bar = 200 micrometers.

3.2. Studies using video image analysis and structure tensor

Cornea's sections, illuminated with monochromatic ($\lambda = 546 \text{ nm}$) polarized light, presented inhomogeneous brightnesses, whose intensities varied depending on the positioning of the cornea long axis in relation to the PPL, and consequently of the different angles formed between the stromal collagen fibers and the PPL (Fig. 4 and 5). Stromal collagen fibers in the temporal cornea showed greater variation and irregularity in brightness intensity (Fig. 4e) when visually compared to collagen fibers in other cornea's fragments. In all corneal fragments studied, the birefringence was never completely extinguished by rotating the microscope stage and changing the angle formed between the fiber long axis and the PPL from 45 degrees to 90 degrees (parallel to the PPL). Maximum and minimum birefringence brightnesses have always been observed in collagen fibers orientated at 45 (Fig. 4) and 90 degrees (Fig. 5), respectively, to the PPL.

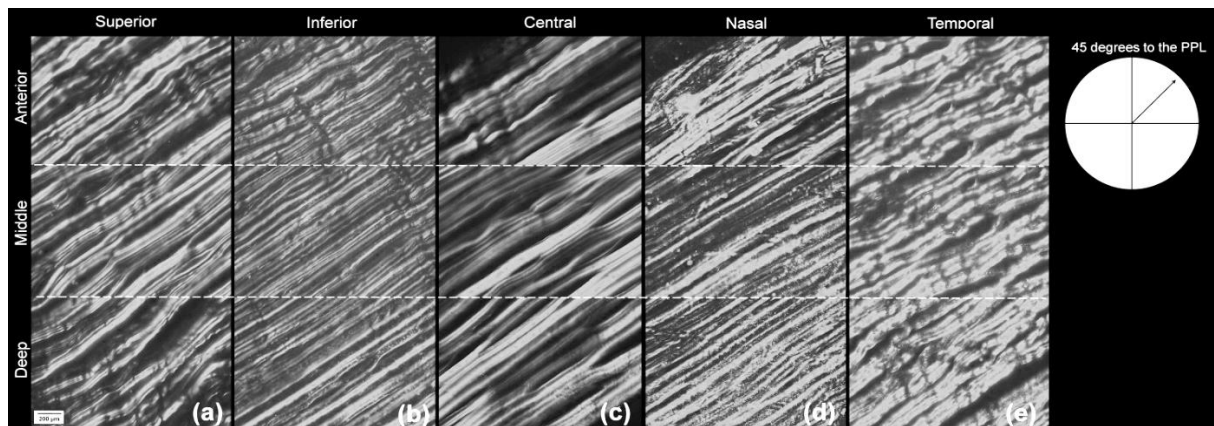


Fig.4. Birefringent images of anterior, middle, and deep stromal collagen fibers oriented at 45 degrees to the plane of the polarized light. (a), superior cornea. (b), inferior cornea. (c), central cornea. (d), nasal cornea. (e), temporal cornea. Bar = 200 micrometers.

The stromal collagen fibers showed ripples (waviness), characterized by irregular alternation of light (birefringent) and dark (non-birefringent) areas (Fig. 5). At 90 degrees to the PPL, collagen fibers in the temporal and nasal fragments of the dog cornea (Fig. 5d and e) were wavier and clearly had more intertwining than the fibers in other regions.

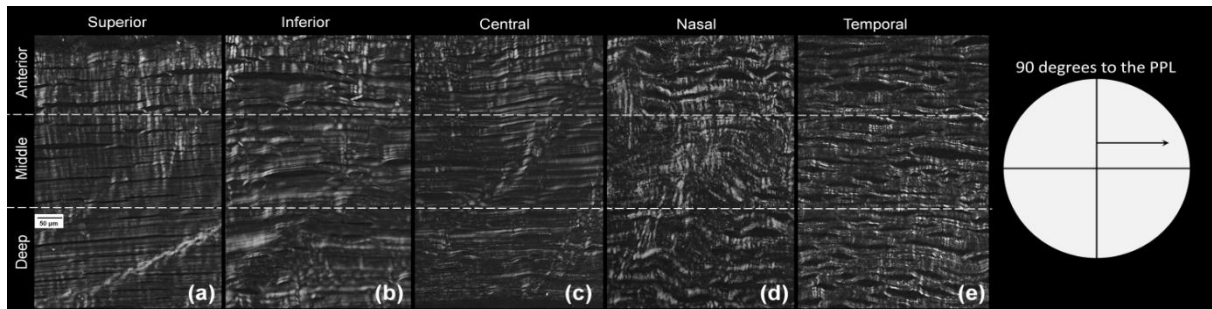


Fig. 5. Birefringent images of anterior, middle, and deep stromal collagen fibers oriented at 90 degrees to the plane of the polarized light. (a), superior cornea. (b), inferior cornea. (c), central cornea. (d), nasal cornea. (e), temporal cornea. Bar = 50 micrometers.

Statistical comparisons of coherency coefficient calculated for birefringent collagen fibers in different fragments and stromal sites from the dog cornea's sections are shown in Table 1. Collagen fibers in the anterior, middle, and deep stromas of superior and inferior corneas were less wave ($p < 0.05$) than collagen fibers in the anterior, middle, and deep stromas of other cornea's fragments, except for central anterior that was similar to these regions.

TABLE 1. Statistical comparisons of the coherency coefficient calculated in different stromal sites from dog cornea's sections. Calculations were performed with the collagen fibers oriented at 90 degrees to the plane of the polarized light (PPL)

Corneal fragments	Anterior stroma				Middle stroma				Deep stroma			
	Mean	± SD	Range		Mean	± SD	Range		Mean	± SD	Range	
			Min	Max			Min	Max			Min	Max
Superior	0.32 ^a	0.11	0.17	0.42	0.63 ^a	0.11	0.55	0.75	0.54 ^a	0.13	0.32	0.65
Inferior	0.36 ^a	0.07	0.26	0.43	0.49 ^b	0.09	0.36	0.58	0.59 ^a	0.04	0.57	0.67
Central	0.29 ^a	0.11	0.17	0.44	0.38 ^c	0.09	0.26	0.46	0.29 ^b	0.10	0.18	0.42
Nasal	0.06 ^b	0.03	0.008	0.08	0.10 ^d	0.08	0.03	0.22	0.10 ^c	0.07	0.04	0.22
Temporal	0.21 ^c	0.05	0.19	0.29	0.30 ^e	0.02	0.28	0.34	0.17 ^c	0.05	0.10	0.21

Max, maximum value; Min, minimum value; ± SD, ± standard deviation.

Different letters in the same column indicate the statistical differences between the cornea's regions compared in this study.

Differences were significant when $p < 0.05$ (ANOVA with Tukey post hoc test).

200 measurements were performed from each site (anterior, middle, and deep) of the different corneal regions (superior, inferior, central, nasal, and temporal) studied.

3.3. Calculations of OPD and linear birefringence

Collagen fibers in the anterior, middle, and deep stromas of the central cornea presented high values of OPD associated with B_T compared to stromal collagen fibers in other fragments of the dog cornea (Table 2). Within each cornea's fragments (superior, inferior, central, nasal, and temporal), no differences in B_T of anterior, middle, and deep collagen fibers were observed ($p > 0.05$).

The OPD values varied according to the refractive indexes of the solutions used for immersion of the samples (water, refractive index = 1.333, pure glycerin, refractive index = 1.471), indicating that the stromal collagen fibers of the dog cornea have positive B_F . The contribution of B_F to corneal B_T was greater than 80% (ranging from 81.44% in the deep stroma of the inferior cornea to 88.65% in the middle stroma of the central cornea) (Table 2).

Collagen fibers in the inferior and central corneas, when compared to the fibers in other corneal fragments, had, respectively, higher and lower B_I values. In all corneal fragments studied, the B_I values for anterior stromal collagen fibers were lower than the B_I values for middle and deep stromal collagen fibers (Table 2).

The values of linear birefringence calculated for the dog cornea are presented in the Table 3 and were lower for collagen fibers in the anterior stroma, in comparison with middle and deep stromas.

TABLE 2. Optical path difference (OPD) values related to the birefringence brightnesses from collagen fibers in different fragments and stromal sites from dog cornea's sections. Measurements of OPD values associated with total, form, and intrinsic birefringence were performed with the long axes of the collagen fibers oriented at 45 degrees to the plane of the monochromatic ($\lambda = 546$ nm) polarized light

Corneal fragments	Anterior stroma					Middle stroma					Deep stroma				
	B _T		B _F		B _I	B _T		B _F		B _I	B _T		B _F		B _I
	Mean ± SD	Mean	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	Mean	%	Mean ± SD	%	Mean ± SD	Mean	%	Mean ± SD	%
Superior	20.02±7.81 ^a	17.29	86.37	2.73±0.18 ^{a,A}	13.63	21.64± 8.62 ^a	18.66	86.23	2.98±0.21 ^{a,B}	13.77	21.50±8.08 ^a	18.54	86.38	2.96±0.28 ^{a,B}	13.62
Inferior	16.73±7.80 ^b	13.91	83.15	2.82±0.11 ^{b,A}	16.85	17.48± 8.39 ^b	14.42	82.50	3.06±0.17 ^{b,B}	17.50	16.83±5.90 ^b	13.70	81.44	3.13±0.12 ^{b,B}	18.59
Central	22.59±4.10 ^c	19.95	88.32	2.64±0.23 ^{c,A}	11.68	25.37± 4.44 ^c	22.49	88.65	2.88±0.22 ^{c,B}	11.35	24.53±3.13 ^c	21.58	87.98	2.95±0.15 ^{c,B}	12.02
Nasal	20.27±8.69 ^a	17.49	86.29	2.78±0.18 ^{a,A}	13.71	21.44±11.77 ^a	18.47	86.15	2.97±0.29 ^{a,B}	13.85	20.68±9.71 ^a	17.65	85.35	3.03±0.25 ^{d,B}	14.65
Temporal	19.24±6.23 ^a	16.45	83.55	2.79±0.14 ^{a,A}	14.50	21.28± 7.79 ^a	18.31	86.05	2.97±0.21 ^{a,B}	13.95	20.02±5.87 ^a	16.93	84.57	3.09±0.09 ^{d,B}	15.43

B_F, form birefringence; B_I, intrinsic birefringence; B_T, total birefringence; ± SD, ± standard deviation.

Different lowercase letters in the same column represent the statistical differences between mean values obtained for the cornea's regions (superior, inferior, central, nasal, and temporal) studied.

Different uppercase letters in the same line represent the statistical differences between the mean values of B_I obtained for the different stromal sites (anterior, middle, and deep) within each corneal region.

Differences were significant when $p < 0.05$ (ANOVA, with Tukey post hoc test).

Within each region of the cornea, no differences in B_T were observed between the anterior, middle and deep stromas ($p > 0.05$).

B_F was calculated as B_T – B_I, so SD cannot be presented.

TABLE 3. Values of linear birefringence for dog cornea

Corneal fragments	Anterior stroma	Middle stroma	Deep stroma
Superior	0.0038	0.0042	0.0042
Inferior	0.0040	0.0043	0.0044
Central	0.0037	0.0041	0.0042
Nasal	0.0039	0.0042	0.0043
Temporal	0.0039	0.0042	0.0044

4. Discussion

In this study, polarized light microscopy has been employed in order to evaluate the collagen fibers of the canine cornea, since knowledge regarding this issue is rare. In order to gather as much information as possible, studies have been carried out with the use of *in totum* preparations of corneal tissue and histological cuts; also, both qualitative and quantitative evaluations have been conducted [13].

Studies describing the supraorganization or the microstructural arrangement of the collagen fibers in ocular tissues help understanding the optical and biomechanical properties of the elements that compose the eye [39]. During the last years, several studies regarding the microstructure of the cornea have been carried out in different species, mammals or not [17, 18]. The polarized light allows detailed descriptions of the corneal microstructure, since its interaction with the anisotropic tissues results in physical properties, notably the birefringence, whose standards are related to the macromolecular organization level of the collagen fibers inside stroma. One of the tools widely used to evaluate corneal collagen fibers is the quantitative polarized light microscopy, by which data regarding orientation, aggregation state and cristallinity or polarizability of the stroma have been revealed, remarkably in human cornea [16].

A strong point of this study is that evaluations were conducted sectorially, that is, in different corneal sites and regions. As it is widely accepted that the supraorganization of collagen fibers, in the corneas of mammals, varies through central and peripheral regions [40], we have concentrated the analysis on the central and paracentral regions of the cornea, that is, inside and around visual axis, in order to provide new information for the literature. Hence, the central corneal fragment, in the histological cuts, comprehends the visual axis and the extension of the pupillary region, and the other fragments comprehend the areas near the pupillary region.

The evaluation of the *in totum* samples illuminated with polychromatic light was an exception, since that examination was carried out from the center to the peripheries of the corneal tissue.

The *in totum* evaluations revealed standards of interference colors in the peripheries of the cornea, that is, regions of transition between limbus and sclera [12, 41, 42]. The interference colors result from the anomalous dispersion of birefringence, a non-linear optical effect which is intimately associated with variations of the thickness (not the diameter) and of the orientation of collagen lamellae/fibers and bundles in relation to the crossed polarizers. The colors of the total spectrum visually represent OPDs of various nm, and the tonalities are a function of the orientation of tissular elements which form the birefringent structure [42].

Based on the interpretation of the interference colors, it is possible to state that the peripheral regions of canine cornea, in its different fragments, are heterogeneous in spatial orientation and in collagen fibers thickness, including with intertwinements between fibers in different spatial planes. In contrast, the absence of interference colors in non-peripheral (central/paracentral) regions of the cornea indicates presence of fibers with uniform spatial periodicity and thickness [43, 44]. These findings are similar to those previously reported for human cornea, in which the existence of variations in the orientation of corneal peripheral collagen fibers, including with intertwinements between corneal and scleral fibers, are well-known [40, 44 -46]. Besides, they converge with the observations of Newton e Meek (1998), according to whom human cornea collagen fibers change their direction once they reach the most peripheral regions of the cornea, merging with the fibers from the limbal/scleral region. The density of the branchings and intertwinements between fibers in the cornea-limbus-sclera area varies among species [18] and could not be quantified with the methodology employed in this study. There are evidences that the presence of these branchings and intertwinements gives support to the tensional forces and to the corneal curvature [17, 18, 43, 44], which is crucial for the refractive function [17, 18, 21, 43].

In the histological sections, evaluations were carried out with monochromatic light and image video analysis or phase compensators. When monochromatic light is used, given the conditions for the occurrence of birefringence, informations about the organization of the collagen fibers around the ordinary and extraordinary axis are gathered [9, 47]. Generally, the brighter is the birefringence of a sample, the greater is the number of electronic vibrations and intermolecular crosslinks among the collagen fibers in the mentioned tissue [9]. This knowledge

is important since crosslinks play a role in alignment, stability and molecular packing of the fibers, which are determinant supraorganizational conditions for the biomechanical properties of a structure [10, 12].

Regarding the fibers alignment, qualitative birefringence studies showed waviness standards (alternance between birefringent and non-birefringent bands) in all corneal fragments and sites studied. The wavinesses, better seen with fibers oriented at 90 degrees to the PPL, are called crimps, and were previously reported in humans, mice and swine's corneas [9, 14, 48]. Morphologically, the crimps represent changes in the collagen microfibrillar arrangement, which, in corneal stroma, seems to also form an helicoidal arrangement similar to what has been described in fibrils of other conjunctive tissues [49, 50], which is not surprising, since collagen molecule is a propeller, and, according to the structural chirality principles, "chiral molecules form chiral bodies" [9]. Functionally, the crimps are associated with collagen fibers flexibility, in terms of capacity of absorbing and transmitting physiological charge/forces applied to the structure [48-52]. Liu et al. (2014), in a study of constitutive model of the corneal microstructure, showed that the wavy aspect of collagen fibrils in rest position is a morphological requirement for the non-linear mechanical behavior of the cornea. Interestingly, some studies point out that the majority of the corneal deformations due to intraocular pressure increase occur at the periphery, while central and paracentral regions remain without significant changes [52, 53]. In this study with canine cornea, we have also noticed that wavinesses are prevalent outside corneal central/pupillary region in the temporal fragment, which may be related to the transmission of forces from the extraocular musculature.

Still with the purpose of evaluating the alignment of the fibers, image analysis by structure tensor was used in this study. It consists in matrixes which represent partial derivatives, widely used in image processing. OrientationJ evaluates, among other parameters, the local coherency of the fibers, that is, the degree of parallelism of the fibrillar arrangement that emerges from every pixel of the image which is converted to binary. Canine cornea sections presented fibers alignment variation depending on the fragment or site under study. Nasal and temporal fragments exhibited coherency values that suggest lower fiber parallelism in all stromal sites, while superior and inferior fragments presented more aligned fibers in middle and deep stromae and less aligned fibers in anterior stroma. That converges with previous studies regarding human cornea, according to which corneal collagen fibers are partially organized, being the anterior stroma less organized and more isotropic [32].

Although qualitative analysis of birefringence have revealed that canine cornea presents fibrillary collagenic arrangements which are similar to those described in corneas of other species, quantitative OPD studies have revealed some canine cornea particularities in terms of ordered aggregation state (B_T and B_F) and fibers crystallinity (B_I). In terms of B_I and linear birefringence, the results were very similar to those regarding human cornea, in which previous studies showed lower OPD values in the central cornea [16, 54].

In the cornea of dog, OPD values associated with B_T and B_F did not differ among the stromal sites (anterior, middle and deep) of a same corneal fragment, which suggests that molecular ordering of stromal fibers around the extraordinary axis is constant through the stromal regions. This finding diverges from what has been described in cats, for example, in which B_T seems greater in anterior stroma than in the posterior one [55]. On the other hand, B_I differed among the stromal sites, being lower in the anterior stroma of all fragments under study and diverging from linear birefringence values of the human cornea, which indicate isotropic standards of fiber distribution, with lower electron polarizability [54, 56].

The polarizability of a molecule is intimately related with the capacity of forming dipoles. In the presence of a magnetic field, the relative position of positive and negative ions change slightly, which induce dipole moments [57, 58]. Therefore, it is considered that B_I OPD values are proportional to the density of electronic surface [59]. In crystallinity state, the molecules are near each other and their intermolecular forces are more amplified, which makes them denser, more bonded and resistant to external action – that is, more ordered –, a characteristic observed in the values found in middle and deep stroma [57, 58, 60]. Study carried out by Freund et al. (1995) reported that the middle and deep stromae of the corneas of rabbits and humans presented themselves more hydrated, and its collagen fibrils were denser than the ones in the respective anterior stromae. In a study with cats, B_I values in the central region were greater in the anterior stroma than in the posterior one, revealing greater fibers packing density in the anterior segment of the stroma [55].

This study's findings regarding birefringence are, in a general way, close to the ones described by Boote et al. (2003), which revealed greater fiber ordering in the central region of the human cornea. In functional and biomechanical terms, this greater fiber ordering in the central cornea, which is, in most species, less thick in comparison to the other corneal fragments, may contribute to the containment of tensional forces and the maintenance of the curvature [60].

5. Conclusion

The results obtained in this study revealed that total - form and intrinsic - birefringence in dogs is positive in all corneal fragments and depths, and also that canine cornea presents anomalous dispersion of birefringence in its periphery. The morphological and quantitative analysis of the birefringence revealed that the ordering pattern of the collagen fibers is not constant through all the cornea, being different among the fragments studied.

6.Reference

1. D. Massoudi, F. Malecaze, and S.D. Galiacy, "Collagens and proteoglycans of the cornea: importance in transparency and visual disorders," *Cell Tissue Res* **363**(2), 337-349 (2016)
2. Y. Qazi, G. Wong, B. Monson, J. Stringham and B.K. Ambati, "Corneal transparency: Genesis, maintenance and dysfunction," *Brain Res Bull* **81**(2-3),198–210(2010)
3. K.M. Meek, C. Knupp, "Corneal structure and transparency," *Prog Retin Eye Res* **49**,1-16(2015)
4. P.N. Lewis, T.L. White, R.D. Young, J.S. Bell, C.P. Winlove and K.M. Meek, "Three-dimensional arrangement of elastic fibers in the human corneal Stroma," *Exp Eye Res* **146**, 43-53(2016)
5. C.Y. Park, J.K. Lee and R.S. Chuck , "Second Harmonic Generation Imaging Analysis of Collagen Arrangement in Human Cornea," *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**(9), 5622–5629(2015)
6. S.D. Hanlon, A.R.S. Behzad, L.Y. Akai, and A.R. Burns, "Corneal stroma microfibrils," *Exp Eye Res* **132**, 198-207(2015).
7. D.M. Maurice, "The structure and transparency of the cornea," *J.Physiol.***136**, 263- 286(1957).
8. C. Boote, S. Dennis, Y. Huang, A.J. Quantock and K.M. Meek, "Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties," *J Struct Biol* **149**(1),1-6(2005)
9. M. Aldrovani, A.M.A. Guaraldo, and B.C. Vidal, "Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice," *Vision Res* **47**(26), 3 229–3237(2007)
10. B.C. Vidal and M.L.S. Mello, "Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization," *Acta Histochem* **112**(1),53-61(2010)
11. S.L. Jacques, "Corrigendum: Optical properties of biological tissues: a review," *Phys Med Biol*, **58**, 5007–5008(2013).
J.F. Ribeiro, E.H.J. Anjos, M.L.S. Mello, and B.C. Vidal, "Skin Collagen Fiber Molecular Order: A Pattern of Distributional Fiber Orientation as Assessed by Optical Anisotropy and Image Analysis," *PLoS ONE* **8**(1), e54724 (2013)
12. A.J. Quantock, M. Winkler, G.J. Parfitt, R.D. Young, D.J. Brown, C. Boote, and J.V. Jester, (2015)" From nano to macro: Studying the hierarchical structure of the corneal extracellular matrix," *Exp Eye Res* **133**, 81-99(2015).
13. M. Aldrovani, and B.C. Vidal, "Application of principles of optical anisotropies and image analysis to the investigation of molecular packing, cristallinity, spatial organization and three-dimensional topography in collagen fibers from porcine cornea," in *Progress in Biopolymer Research*, ed. (Sanchez PC, 2007), pp.225-42.
14. E. Götzinger, M. Pircher,I. Dejaco-Ruhswurm, S. Kaminski, C. Skorpik, and C.K. Hitzenberger, "Imaging of birefringent properties of keratoconus corneas by polarization-sensitive optical coherence tomography," *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(8), 3551-3558(2007)
15. J.W. Jaronski, and H.T. Kasprzak, "Linear birefringence measurements of the in vitro human cornea," *Ophthalmic Physiol Opt* **23**(4), 361-369(2003).
16. S. Hayes, C. Boote, J. Lewis, J. Sheppard, M. Abahussin, A.J. Quantock, C. Purslow, M. Votruba, and K.M. Meek, " Comparative Study of Fibrillar Collagen Arrangement in the Corneas of Primates and Other Mammals," *Anat Rec* **290**(12),1542–1550(2007).
17. M. Winkler, G. Shoa, S.T. Tran, Y. Xie, S. Thomasy, V.K. Raghunathan, C. Murphy, D.J. Brown, and J.V.A Jester, "Comparative study of vertebrate corneal structure: the evolution of a refractive lens," *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**, 2764-2772(2015) .

18. R.W. Knighton, and X. Huang, "Linear Birefringence of the Central Human Cornea," *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43** (1),82-86(2002).
19. R. Mastropasqua, M. Nubile, N. Salgari, M. Lanzini, R. Calienno, P. A. Mattel, A. Sborgia, and L. Agnifill, "Interference figures of polimetric interferometry analysis of the human corneal stroma," *Plos one* **12**(6), e0178397(2017).
20. S. Hayes, C. Boote, S.J Tuft, A.J. Quantock, and K.M. Meek, "A study of corneal thickness, shape and collagen organisation in keratoconus using videokeratography and X-ray scattering techniques," *Exp Eye Res* **84**(3), 423e434(2007).
21. R. Ambekar, K.C. Toussaint, and A.W. Johnson, "The effect of keratoconus on the structural, mechanical and optical proprieties of cornea," *Mech Behav Biomed Mater.* **4**(3), 223-236(2011).
22. R. Mercatelli, F. Ratto, F. Rossi, F. Tatini, L. Menabuoni, A. Malandrini, R. Nicoletti, R. Pini, F.S. Pavone, and R. Cicchi, "Three-dimensional mapping of the orientation of collagen corneal lamellae in healthy and keratoconic human corneas using SHG microscopy," *J Biophotonics* **10**, 1-9(2016).
23. B.C. Martins, D.E. Brooks, C.E Plummer, D.A Salmuelsen, B.G. Mangan, and J.L. Laus, "Light microscopic evaluation and scanning electron microscopic analysis of horse eyes following deep anterior lamellar keratectomy," *Vet Ophthalmol* **16**(1), 42-51,(2013).
24. S.A. Pot, N.S. Gallhofer, I.W. Reinhardt, F. Hafezi, and B. M. Spiess, "Treatment of bullous keratopathy with corneal collagen cross-linking in two dogs," *Vet Ophthalmol*, **18**(2), 168–173(2015).
25. F. Famose, "Evaluation of accelerated corneal collagen cross-linking for the treatment of bullous keratopathy in eight dogs (10 eyes)," *Vet Ophthalmol* **19**(3), 250–255(2016).
26. B. Yang, N. J. Jan, A.V. Brazile, K. L. Lathorop, and I.A. Sigal, "Polarized light microscopy for 3 D mapping of collagen fiber architecture in ocular tissues," *J Biophotonics* **11**, e201700356(2018).
27. D.F. Teixeira Da Silva, B.C. Vidal, D.M. Zezell, T.M.T. Zorn, S.C. Núñez, and M.S. Ribeiro, "Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy," *J Biomed Opt*, **11**(2), 0240021-0240025(2006).
28. B.C. Vidal, and M. L.S. Mello, "Structural organization of collagen fibers in chordae tendineae as assessed by optical anisotropic properties and Fast Fourier transform," *J Struct Biol* **167**(2), 166–175(2009).
29. C. Boote, J.R. Palko, A. Mohammadvali, A. Elsheikh, A.M. Komáromy, X. Pan, and J. Liu, "Changes in posterior scleral collagen microstructure in canine eyes with an ADAMTS10 mutation," *Mol Vis* **22**, 503-517(2016)
30. J.R. Palko, S. Iwabe, X. Pan, G. Agarwal, A.M. Komáromy, and J. Liu, "Biomechanical Properties and Correlation With Collagen Solubility Profile in the Posterior Sclera of Canine Eyes With an ADAMTS10 Mutation," *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 2685–2695(2013)
31. F. J. Ávila, and J.M. Bueno, "Analysis and quantification of collagen organization with the structure tensor in second harmonic microscopy images of ocular tissues," *Applied Optics* **54** (33), 9848 - 9854(2015).
32. J. Bigun, T. Bigun, and K. Nilsson, "Recognition by Symmetry Derivatives and the Generalized Structure Tensor". *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* **26**(12), 1590 -1605, (2004).
33. R. Rezakhanliha, A. Agianniotis, J.T.C. Schrauwen, A. Griffa, D. Sage, C.V.C. Bouten, F.N. Van De Vosse, M. Unser, and N. Stergiopoulos, "Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy," *Biomech Model Mechanobiol.* **11**(3-4), 461–473(2012).

34. Z. Püspöki, M. Storath, D. Sage, and M. Unser, “Transforms and Operators for Directional Bioimage Analysis: A Survey,” *Adv Anat Embryol Cel* **219**, (2016).
35. E. Fonck, G.G. Feigl, J. Fasel, D. Sage, and M. Unser, D.A. Ru“Fenacht, and N. Stergiopulos, “Effect of Aging on Elastin Functionality in Human Cerebral Arteries,” *Stroke* **40**(7), 2552-2556(2009)
36. B.C. Vidal, E.H.M. Dos Anjos, and M.L.S. Mello, “Optical anisotropy reveals molecular order in a mouse enthesis,” *Cell Tissue Res* **362**(1),177-185(2015)
37. D.F. Teixeira Silva, A.S.L. Gomes, B.C. Vidal, and M.S. Ribeiro, “Birefringence and Second Harmonic Generation on Tendon Collagen Following Red Linearly Polarized Laser Irradiation,” *Ann Biomed Eng.***41**(4),752-62(2013)
38. N.J Jan, J.L. Grimm, H. Tran, K.L. Lathrop, G. Wollstein, R.A. Bilonick, H. Ishikawa, G. Schuman, and I.A. Sigal, “ Polarization microscopy for characterizing fiber orientation of ocular tissues,” *Biomed Opt Express* **6**(12),4705-4718(2015).
39. K.M. Meek, and C. Boote, “The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma,” *Prog Retin Eye Res*,**28**(5), 369-392(2009)
40. B.C. Vidal, “Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy,” *Micron* **34** (8),423–432(2003)
41. M. Shribak, “Polychromatic polarization microscope: bringing colors to a color less world,” *Scientific Reports* **5**, 17340(2015).
42. N.J. Fullwood, “Collagen Fibril and Corneal Curvature,” *Structure*, **12** (2),169–174 (2004)
43. C.Boote, C.S. Kamma-Lorger, S. Hayes,J. Harris, M. Burghammer, J. Hiller, N.J. Terrill, and K.M. Meek, “Quantification of collagen organization in the peripheral human cornea at micron-scale resolution,” *Biophys J.* **101**(1),33-42(2011)
44. R.H. Newton, and K.M. Meek, “The Integration of the Corneal and Limbal Fibrils in the Human Eye,” *Biophys J*, **75**(5), 1998 2508 –2512(1998)
45. W. Radner, M. Zehetmayer, R. Aufreiter, and R. Mallinger, “Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea,” *Cornea*, **17**(5), 537-543(1998).
46. J. Rieppo, J. Hallikainen, J.S. Jurvelin, I. Kiviranta, H.J. Helminen, and M.M. Hyttinen, “Practical considerations in the use of polarized light microscopy in the analysis of the collagen network in articular cartilage,” *Microsc Res Tech.* **71**(4), 279-87(2008).
47. X. Liu, L. Wang, J. Jing, W. Yao, W. Wei, J. Fan, S. Joshi, S. Li, and Y. Fan, “A Mechanical Model of the Cornea Considering the Crimping Morphology of Collagen Fibrils,” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **55**(4), 2739–2746 (2014)
48. V. Ottani, M. Raspanti, and A. Ruggeri, “Collagen structure and functional implications,” *Micron*, **32**(3), 251-260(2001).
49. V. Ottani, D. Martini, and M. Franchi, “Hierarchical structures in fibrillar collagens,” *Micron*, **33**(7-8), 587-596(2002)
50. F. H. Silver, J.W. Freeman, and G.P. Seehra, “Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties,” *J Biomech*, **36**(10), 1529-53(2003).
51. J. S. Bell, S. Hayes, C. Whitford, J. Sanchez-Weatherby, O. Shebanova, C. Vergari, C.P. Winlove, N. Terrill, T. Sorensen, A. Elsheikh, and K.M. Meek, “The hierarchical response of human corneal collagen to load,” *Acta Biomater*, **65**, 216–225(2018)
52. B.L. Boyce, J.M. Grazier, R.E. Jones, and T.D. Nguyen, “Full-field deformation of bovine cornea under constrained inflation conditions,” *Biomaterials*, **29**(28),3896-3904(2008)
53. J.M. Bueno, and J. Jaronski, “Spatially resolved polarization properties for in vitro corneas,” *Ophthal. Physiol. Opt.* **21**(5),384-392(2001)
54. D. Post, and J. Gurland, “Birefringence of the cat cornea,” *Exp. Eye res.* **5**(4), 286-295. (1966)

55. W.T. Cope, M. L. Wolbarsht, and B.S. Yamanashi, "The corneal polarization cross," *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, **68**(8), 1139(1978)
56. A.C. Jayasuriya, J.I. Scheinbeim, V. Lubkin, G. Bennett, and P. Kramer, "Piezoelectric and mechanical properties in bovine cornea," *J Biomed Mater Res A*. **66**(2),260-265(2003).
57. J. W. Regini, G.F. Elliott, and A.S. Hodson, "The ordering of corneal collagen fibrils with increasing ionic strength," *J Mol Biol*. **336**(1), 179-186(2004).
58. B.C Vidal, and H.F Carvalho, "Aggregational State and Molecular Order of Tendons as a Function of Age,"*Matrix*, **10**(1),48-57 (1990)
59. C. Boote, R.H. Newton, H. Puri, and K.M. Meek," Collagen fibrils appear more closely packed in prepupillary cornea: optical and biomechanical implications," *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(7), 2941- 2948(2003)
60. D. E. Freund, L.R. McCally, R.A. Farrell, S.M. Cnstol, N.L. UHernautX, and H.F. Edelhauser, " Studies on both rabbit and bovine cornea have shown that the posterior stroma is more hydrated and has a greater capacity to swell than the anterior stroma," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36**,1508-1523(2010).

7. Acknowledgments

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), São Paulo Research Foundation (FAPESP), National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), and Department of Clinic and Veterinary Surgery, College of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University (Jaboticabal campus, UNESP). We would also like to acknowledge the assistance provided by Fausto A. Marinho-Neto, during this research.