

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DO ENDOTÉLIO
CORNEAL DE GATOS (*Felis catus* - LINNAEUS, 1758) DE
DIFERENTES IDADES À MICROSCOPIA ESPECULAR.**

Angela Aguiar Franzen

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Agosto de 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DO ENDOTÉLIO
CORNEAL DE GATOS (*Felis catus* - LINNAEUS, 1758) DE
DIFERENTES IDADES À MICROSCOPIA ESPECULAR.**

Angela Aguiar Franzen

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Co-orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Agosto de 2008

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANGELA AGUIAR FRANZEN – nascida em 18 de dezembro de 1974, em Vacaria, Rio Grande do Sul, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, em janeiro de 2000. É aluna do programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal desde março de 2006. Participa do Serviço de Oftalmologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

À minha mãe Eni,
Ao meu pai Danilo,
À minha irmã Daniela e
Ao meu marido Michel,
pela paciência e
imprescindível colaboração,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Laus, pela prestimosa acolhida em seu excelente Serviço de Oftalmologia Veterinária, pelo exemplo e orientação.

Ao Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto, por me apresentar à oftalmologia veterinária, pela orientação e estímulo constantes.

Ao Prof. Dr. Fernando Cesar Abib, pela generosa acolhida em seu serviço e dedicação à conclusão deste trabalho.

À DIAGLASER, pelo excelente acolhimento em seu serviço e pela oportunidade de aprender mais sobre microscopia especular.

A todos os meus amigos e colegas da UNESP – Jaboticabal, pela amizade, ensinamento, paciência e carinho.

Aos meus amigos Marlos Gonçalves e Roberta Zander, por terem me recebido tão bem em seu lar.

As minhas queridas amigas: Ana Letícia, Bianca e Gláucia, por fazerem de sua casa, a minha.

As minhas amigas e colegas do Serviço de Oftalmologia da UFRGS, pela ajuda e compreensão, em especial a Luciane Albuquerque por estar sempre disposta a colaborar e aprender comigo.

Ao meu cunhado Wilton e à minha irmã Daniela, que tiveram especial participação na realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

A todas as pessoas que confiaram em mim e me apoiaram em mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VIII
SUMMARY	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Endotélio Corneal	3
2.2 Métodos de Avaliação Endotelial	7
2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	7
2.2.2 Microscopia com corantes vitais	8
2.2.3 Microscopia confocal.....	9
2.2.4 Microscopia especular.....	xix
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Aspectos Éticos	18
3.2 Animais.....	18
3.2.1 Enucleação e preservação dos bulbos oculares.....	19
3.2.2 Microscopia especular.....	xxix
3.2.3 Análise à estatística	22
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imagem fotográfica ilustrando o acondicionamento dos bulbos oculares em câmara úmida.....	19
Figura 2. Imagem fotográfica de microscópio especular de contato, Bioptics LSM - 2100C , com o bulbo ocular fixado em suporte adaptado, e posicionamento da objetiva na região central da córnea.....	20
Figura 3. Cópia xerográfica de laudo emitido pelo programa Bambi Plus 2000, em microscopia especular.....	21
Figura 4. Fotomicrografia especular do endotélio da córnea do olho esquerdo de um gato com 24 meses de idade. Em A e B notam-se células poligonais com padrão regular e bordas celulares nítidas.....	23
Figura 5: Representação gráfica das médias dos valores de densidade celular endotelial nos grupos 1 (idades entre 1 e 3 meses): 6493 células/mm ² , 2 (idades entre 5 e 12 meses) : 4082 células/mm ² e 3 (idades entre 24 e 4 meses): 2873 células/mm ²	24
Figura 6: Fotomicrografia especular do endotélio corneal normal de gato, com dois meses de idade . Nota-se endotélio íntegro , com padrão regular de células poligonais , predomínio da forma hexagonal e densidade celular de 6579 células/mm ² , área celular média é de 152 µm ² , pleomorfismo de 52,3% e polimegatismo de 0,32.....	24
Figura 7. Fotomicrografia especular do endotélio corneal normal de gato, com seis meses de idade. Nota-se endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais, predomínio da forma hexagonal e densidade celular endotelial de 5100 células/mm ² . Área celular média é de 196 µm ² , pleomorfismo de 50% e polimegatismo de 0,32.....	25
Figura 8. Fotomicrografia especular do endotélio corneal normal de gato, com Seis meses de idade. Nota-se endotélio íntegro apresentando um padrão regular de células poligonais, com predomínio da forma hexagonal e densidade celular endotelial de 2500 células/mm ² . Área celular média é de 399 µm ² , o pleomorfismo de 62,4% e o polimegatismo de 0,27.....	25

Figura 9: Representação gráfica dos valores médios de pleomorfismo dos grupos 1 (idades entre 2 e 3 meses): 52%, 2 (idades entre 5 e 12 meses): 49% e 3 (idades entre 24 e 40 meses): 66%.....	26
Figura 10. Representação gráfica do pleomorfismo endotelial, expresso em %, em gatos de diferentes faixas etárias, expressas em meses.....	27
Figura 11: Representação gráfica dos valores médios de polimegatismo nos grupos 1 (idades entre 2 e 3 meses): 0,12, 2(idades entre 5 e 12 meses): 0,12 e 3 (idades entre 24 e 40 meses): 0,11.....	28
Figura 12: Variação dos valores do polimegatismo , representado pelo coeficiente de variação, em gatos de diferentes faixas etárias, expressa em meses.....	28
Figura 13: Representação gráfica dos dados de área celular média dos grupos 1 (idades entre 2 e 3 meses): 154 μm^2 , 2 (idades entre 5 e 12 meses): 245 μm^2 e 3 (idades entre 24 e 40 meses): 348 μm^2	29
Figura 14. Variação dos valores da área celular média, expressos em μm^2 , em gatos de diferentes faixas etárias, expressas em meses.....	29

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DO ENDOTÉLIO CORNEAL DE GATOS (*Felis catus* - LINNAEUS, 1758) DE DIFERENTES IDADES À MICROSCOPIA ESPECULAR

RESUMO - O endotélio corneal é essencial para a manutenção da transparência da córnea, é necessário um número mínimo de células endoteliais para a manutenção desta transparência. As alterações morfológicas e morfométricas do endotélio da córnea de gatos decorrentes do avanço da idade não estão ainda compreendidas e elucidadas. Objetivou-se estudar os parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea de gatos de diferentes idades, utilizando-se a microscopia especular. Avaliaram-se a densidade celular, a área celular média, o pleomorfismo e o polimegatismo. Empregaram-se 18 animais da espécie felina (*Felis catus* - LINNAEUS, 1758), machos ou fêmeas, subdivididos em três grupos com 6 animais cada, designados por: G1 (animais com idade entre 1 a 3 meses); G2 (animais com idade entre 5 a 12 meses) e G3 (animais com idades entre 24 a 40 meses). A microscopia especular de contato revelou que com o avanço da idade a densidade celular endotelial diminuiu, a área celular média e o pleomorfismo aumentaram e o polimegatismo apresentou valores constantes nos 3 grupos estudados.

Palavras chave: córnea, endotélio, gatos, microscopia especular.

**MORPHOLOGY AND MORPHOMETRY IN THE CORNEAL ENDOTHELIUM OF CATS
(*Felis catus* - LINNAEUS, 1758) IN DIFFERENT AGES BY SPECULAR
MICROSCOPY**

SUMMARY - The corneal endothelium is essential to maintain the corneal transparency. Morphological and morphometric changes in the feline corneal endothelium as a function of age are little known. The purpose of this study was investigating the effect of age on endothelial morphology and morphometry in cats. The corneal endothelium was studied through contact specular microscopy. The exam presented data as cell density, average cell area, polymegathism and pleomorphism. A total of 16 cats were evaluated in this study. The subjects were divided in three groups with six cats (*Felis catus* - LINNAEUS, 1758): G1 (cats with 1 to 3 months old); G2 (cats with 5 to 12 months old); G3 (cats with 24 to 40 months old). The specular microscopy revealed decrease of cell density with age. The cell area increase and pleomorphism increase as function of age. The polymegathism showed constants values on the three groups.

Keywords: cornea, endothelium, cats, specular microscopy.

1. INTRODUÇÃO

A córnea é uma estrutura indispensável ao funcionamento do bulbo do olho, na medida em que possibilita a conservação da percepção visual. Das camadas que compõem a córnea, o endotélio contribui sobremaneira para a manutenção de sua transparência e espessura (TUFT & COSTER, 1990). O endotélio pode sofrer alterações decorrentes do envelhecimento, de agentes químicos e físicos e de procedimentos cirúrgicos, principalmente os relacionados ao segmento anterior do bulbo do olho (WARING et al., 1980).

A cicatrização corneal tem sido amplamente estudada por sua importância no que tange a procedimentos intra-oculares e às lesões endoteliais decorrentes destes (TREFFERS, 1982; MATSUDA et al., 1985). Em casos de comprometimento endotelial severo, ocorre edema acentuado com perda da transparência da córnea, algumas vezes, irreversível. Quando há perda celular com diminuição da densidade endotelial, as células sobreviventes preenchem as áreas aviltadas, aumentando em tamanho e perdendo sua regularidade (WARING et al., 1980; YEE et al., 1987; TUFF & COSTER, 1990).

Várias técnicas podem ser utilizadas com o objetivo de se avaliar o endotélio. Incluem-se os métodos de investigação clínica e os estudos *in vitro*. Das técnicas preconizadas, a microscopia especular tem sido a mais utilizada (COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; ANDREW et al., 2001; PIGATTO et al., 2006; McCAREY et al., 2008).

Parâmetros endoteliais são estudados, valendo-se da microscopia especular, em diversas espécies animais, incluindo a humana, a canina, a leporina, e a suína (GWIN et al., 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB, 2000; ABIB & BARRETO, 2001; ANDREW et al., 2001; VICENTI, 2004; PIGATTO et al., 2005). Além disso, esta técnica possibilita avaliações pré e pós-operatórias da remoção da catarata (LEAMING, 1996; DÍAZ-VALE

et al., 1998; ABIB, 2000). A precisa quantificação da densidade endotelial, previamente aos procedimentos cirúrgicos, minimiza os riscos dos procedimentos (ABIB, 2000).

Objetivou-se nesta pesquisa a avaliação de parâmetros morfológicos e morfométricos do endotélio da córnea, em gatos de diferentes idades, através da microscopia especular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Endotélio Corneal

As células do endotélio da córnea são provenientes da crista neural e, nos estágios iniciais da embriogênese, proliferam e formam uma monocamada composta por polígonos irregulares. No estágio seguinte, a irregularidade celular é reduzida e as células adotam um tamanho uniforme e simétrico. Logo que a camada celular endotelial se completa, junções intercelulares começam a se formar (TUFT & COSTER, 1990; DOUGHTY et al., 1997). O endotélio corneal é uma camada única de células poligonais, hexagonais, em sua maioria, que reveste posteriormente a córnea (DOUGHTY, 1989; COLLIN & COLLIN, 1998).

Em seres humanos, existem entre 400 e 500 mil células, com densidade celular média de 3500 e 4000 células/mm², nos recém-nascidos, e de 2500 células/mm², em adultos (SVEDBERGH & BILL, 1972).

Com o avanço da idade, a densidade celular reduz progressivamente. Em seres humanos, ocorre um rápido declínio no primeiro ano de vida, devido ao aumento do diâmetro da córnea. Nos anos posteriores, a diminuição da celularidade passa a ser mais lenta e linear. Estima-se que, entre os 20 e 80 anos, ocorra uma diminuição anual média na densidade celular endotelial de 0,52% (TUFT & COSTER, 1990). Em contrapartida, a área celular média e a variação do tamanho das células aumentam (LAULE et al., 1978).

Alterações na densidade e forma celulares, decorrentes do envelhecimento, têm sido observadas em seres humanos e em outros animais, incluindo macacos, ratos,

cães e coelhos (SVEDBERGH & BILL, 1972; McCAREY, 1977; GWIN et al., 1982; MacCALUM et al., 1983; RODRIGUES et al., 2006).

Uma célula endotelial humana normal mede 5 μm de espessura e 18 a 20 μm de largura. Seu núcleo tem cerca de 7 μm de diâmetro, sendo achatado e oval (SVEDBERGH & BILL, 1972). Uma célula endotelial canina mede, aproximadamente, de 15 a 20 μm de diâmetro (STAPLETON & PEIFFER, 1979).

A membrana celular endotelial posterior apresenta variado número de microvilosidades que se projetam entre 0,5 e 0,6 μm em direção à câmara anterior (DOUGHTY, 1989). Existem, em algumas células, oligocílios que se projetam 2 a 7 μm para o citoplasma posterior (GALLAGER, 1980). Nas superfícies internas das membranas laterais e posteriores, encontram-se vesículas pinocíticas formadas pela invaginação da membrana celular. Estas vesículas destacam-se da membrana, atravessam o citoplasma e liberam o seu conteúdo no espaço entre as células endoteliais. Sua formação é temperatura dependente, e está relacionada com o transporte ativo de água e metabólitos (TUFT & COSTER, 1990).

As células endoteliais estão separadas, lateralmente, por uma abertura, de aproximadamente, 30 μm que é reduzida para 3 μm no local da junção *gap*, em direção à câmara anterior. As junções *tight* unem as células no terço apical. Quando as células são vistas da superfície posterior, há um padrão hexagonal com uma dobra marginal fina, mas histologicamente se observa que há extensas e irregulares interdigitações entre as células (TUFT & COSTER, 1990).

A membrana celular de cada célula está em contato direto com a membrana de Descemet e, devido aos tipos de complexos juncionais presentes, as células endoteliais são facilmente deslocadas por lesões mecânicas (WARING, 1980).

O citoplasma das células endoteliais é rico em organelas, sugerindo transporte ativo e síntese de proteínas. Apresenta grande número de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso e um complexo de Golgi bem desenvolvido. Pigmentos são ocasionalmente vistos no citoplasma das células endoteliais (TUFT & COSTER, 1990).

Uma banda circunferencial de filamentos localizados na junção apical pode facilitar a movimentação celular para cobrir defeitos endoteliais e há, ainda, uma

camada de glicoproteínas extracelular (TUFT & COSTER, 1990).

A manutenção da transparência da córnea depende de um número mínimo de células endoteliais (MISHIMA, 1982). A ausência de contínuas junções do tipo *tight* entre as células endoteliais permite livre passagem do humor aquoso para o estroma. Quando o acesso é aumentado e maior contingente de aquoso adentra ao estroma, este poderá tornar-se opacificado (TUFT & COSTER, 1990).

A função endotelial, como bomba fluídica, é prevenir a excessiva passagem de fluidos e solutos e de promover o transporte ativo para remoção de fluidos e captação de nutrientes (MISHIMA, 1982).

O transporte de fluidos pelo endotélio depende do metabolismo aeróbico que pode ser reversivelmente inibido pelo resfriamento da córnea. Mitocôndrias fornecem a energia para funcionamento do sistema, produzindo o ATP através do metabolismo da glicose. O oxigênio requerido é difundido para as células endoteliais, vindo da câmara anterior, e, em sua maioria, do filme lacrimal (TUFT & COSTER, 1990).

A permeabilidade endotelial está relacionada com o peso molecular de cada substância; assim, os solutos passam por difusão simples, através dos espaços teciduais. A passagem reflete a patência dos complexos juncionais desta camada celular, considerando-se que as junções *gap* são as principais barreiras contra a permeabilidade dos solutos (MISHIMA, 1982).

O bicarbonato necessário para o funcionamento da bomba endotelial provém do lado estromal do endotélio, por fluxo destes íons para o humor aquoso. Este movimento é o substrato para a bomba endotelial, entretanto, sabe-se que o sódio e o potássio podem influenciar o transporte de fluidos. O número de sítios iônicos da bomba endotelial pode variar em determinadas situações, como em algumas distrofias corneais (TUFT & COSTER, 1990).

A regeneração endotelial é espécie-dependente. Existem estudos em seres humanos, gatos, cães, suínos, coelhos e ratos que comprovam a assertiva (VAN HORN et al., 1977; RAO et al., 1978; BEFANIS et al., 1981; ILMONEN et al., 1984; OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA et al., 1985; LANDSHMAN et al., 1988; LING et al., 1988; BROGDON et al., 1989; HUANG et al., 1989; PETROLL et al., 2001).

Em ratos e coelhos, a reparação endotelial envolve, inicialmente, migração e alongamento celulares e divisão celular nas margens da lesão (VAN HORN et al., 1977; OLSEN & DAVANGER, 1984; MATSUDA et al., 1985).

Em suínos, a condição cursa de maneira semelhante. As células endoteliais, nas margens da lesão, perdem o formato hexagonal, variando de tamanho e se arranjam irregularmente para cobrir a lesão. Ainda, pode ocorrer mitose celular concomitante (ILMONEN et al., 1984).

Em cães, as células endoteliais mostram extensiva formação de pseudópodes nas margens da lesão. A reendotelização ocorre por divisão mitótica, aumento e migração das células remanescentes (BEFANIS et al., 1981).

Em gatos, a divisão mitótica é limitada e a reparação endotelial ocorre por hipertrofia e migração celulares (VAN HORN et al., 1977; LING et al., 1988; LANDSHMAN et al., 1988; HUANG et al., 1989; BROGDON et al., 1989; PETROLL et al., 2001). VAN HORN et al. (1977) observaram que a reparação celular, em felinos, é mais lenta que em leporinos, nos quais a divisão mitótica é bastante acentuada. As células endoteliais dos felinos, cuja capacidade de movimentação é grande, sofrem mudanças morfológicas mesmo em regiões distantes da lesão inicial. Por serem tais características estreitamente similares ao que ocorre em seres humanos, os gatos têm se constituído em bons modelos para estudos de respostas a lesões endoteliais (LING et al., 1988; LANDSHMAN et al., 1988; HUANG et al., 1989; BROGDON et al., 1989; PETROLL et al., 2001).

Em seres humanos, durante a primeira fase da reparação tecidual, ocorrem mudanças acentuadas na morfologia endotelial. As células que circundam a lesão sofrem alargamento e alongamento para cobrir o defeito. A densidade celular diminui em toda a córnea, sugerindo que a reparação ocorre por mobilização das células remanescentes, sem proliferação significativa (LAING et al., 1979; LANDSHMAN et al., 1988; HUANG et al., 1989).

TREFFERS (1982) realizou um estudo em córneas humanas *in vitro* e *in vivo* e demonstrou, por auto-radiografia de timidina, que o endotélio corneal era capaz de proliferar-se como parte da resposta à injúria, em ambos os casos. O autor demonstrou,

ainda, que a migração inicia-se imediatamente à ocorrência da lesão e que a proliferação o faz decorridas 24 a 48 horas, cessando assim que a ferida é recoberta (72 a 96 horas). Os resultados permitiram ao autor admitir ter havido síntese de DNA e, portanto, mitose nas células endoteliais.

A capacidade de divisão mitótica das células do endotélio corneal de seres humanos é limitada em jovens e praticamente inexistente em adultos (LAING et al., 1975; LANDSHMAN et al., 1988; HUANG et al., 1989).

2.2 Métodos de Avaliação Endotelial

2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura tem sido amplamente utilizada para se avaliar e comparar a ultra-estrutura endotelial de vertebrados e os efeitos de medicamentos e procedimentos cirúrgicos no endotélio da córnea (VOGELWEID et al., 1986; MEDIN, 1992; DOUGHTY et al., 1997; DOUGHTY, 1998; COLLIN & COLLIN, 1998; PIGATTO et al., 2005; PIGATTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006). A técnica possibilita, ainda, avaliarem-se a morfologia e as bordas celulares, além do padrão do mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989).

Durante as etapas de preparação do material podem ser gerados artefatos, notadamente quanto à morfologia celular. VIRTANEN et al. (1984) reportaram que o glutaraldeído em concentrações de 1,25% e 2,5% é o melhor fixador para preparações endoteliais.

A avaliação da densidade celular pela microscopia eletrônica de varredura é bastante limitada, dadas as diminuições nas dimensões da córnea, que ocorrem como resultado do preparo do tecido. A média de retração celular endotelial é de 29,7%

(SCHUTTEN & VAN HORN, 1980).

2.2.2 Microscopia com Corantes Vitais

As técnicas histológicas comuns obrigam a excisão da córnea e sua incubação em soluções de coloração direta ou indireta. A imagem resultante das células endoteliais dependerá da seletividade topográfica do método de coloração utilizado. Os corantes mais utilizados são o vermelho de alizarina, o nitrato de prata, a hematoxilina e o azul de tripano (SPERLING, 1977; DOUGHTY, 1989). O azul de tripano pode ser usado para realçar as bordas celulares, quando viáveis. Ele é muito utilizado, em combinação com o vermelho de alizarina, para avaliação do núcleo e das bordas celulares do endotélio (SPERLING 1977; TAYLOR & HUNT, 1981).

Métodos histológicos são utilizados para se avaliarem a viabilidade, os graus de danos à superfície celular e a morfologia endoteliais (SPERLING, 1977; DOUGHTY, 1989; RUIZ et al., 1991). As técnicas, combinadas com a morfometria, podem fornecer dados importantes em casos de córneas edematosas, cuja análise não é factível à microscopia especular (GEROSKI & EDELHAUSER, 1989). Estes métodos oferecem variações quanto aos níveis de hidratação, induzindo a riscos de distorção das células endoteliais. O endotélio pode, ainda, estar distorcido pela ação da pressão sobre a córnea, durante a montagem para captura da imagem (DOUGHTY, 1989). A área celular endotelial média diminui em torno de 30%, quando comparada com a área *in situ* avaliada à microscopia especular (GEROSKI & EDELHAUSER, 1989).

Não obstante as limitações, a microscopia de luz com corantes vitais é um método simples, rápido e prático (TAYLOR & HUNT, 1981). Avaliações toxicológicas e quanto à estocagem em bancos de olhos têm sido realizadas valendo-se dessa técnica (MANNIS et al., 1998; DOUGHTY, 1989; MEANS et al., 1995; WERNER et al., 1998).

2.2.3 Microscopia Confocal

Na microscopia confocal, os raios de iluminação e de observação são focados no mesmo plano da córnea e duas fendas são inseridas nos planos de imagem de cada raio (KLAIS et al., 2003). Este arranjo óptico é chamado confocal porque delimita a luz do plano de foco e reduz a contribuição de luz fora do foco (CAVANAGH et al; 2000; KLAIS et al., 2003). Mudando-se a posição do plano focal, é possível a obtenção de imagens de diferentes profundidades, permitindo examinar todos os componentes celulares da córnea, camada por camada, de maneira tridimensional não invasiva (HARA et al., 2003).

O microscópio confocal tem a capacidade de promover cortes ópticos seriados que permitem obter imagens de diferentes profundidades em uma mesma amostra. Dessa forma, eliminam-se procedimentos de secção e processamento das amostras (JAVALOY et al., 2005).

Um gel refrativo é utilizado para promover contato entre a objetiva e a superfície da córnea, agindo como um amortecedor que previne danos ao epitélio ou aplanção da córnea (KLAIS et al., 2003). O gel de acoplamento reduz a dispersão da luz no epitélio corneal, permitindo a sua observação mesmo em córneas afetadas por distúrbios epiteliais (HARA et al., 2003).

A microscopia confocal possibilita a visualização de tecidos vivos com alta resolução. Observações obtidas são rapidamente enviadas a um sofisticado sistema de análise quantitativa de imagens, úteis para a determinação da densidade celular endotelial, do pleomorfismo e do polimegatismo, tanto em córneas normais como nas edematosas, sem diferenças significativas, sob o ponto de vista estatístico, comparativamente à microscopia especular (KLAIS et al., 2003; JALBERT et al., 2003; KITZMANN et al., 2005).

A microscopia confocal diverge da especular, quanto a avaliação de todas as camadas da córnea, quanto a dados de espessura corneal; densidade de nervos corneais e luz dispersada pela córnea. Ela possibilita a avaliação do endotélio em

córneas edematosas, e da densidade de ceratócitos (HARA et al., 2003; KITZMANN et al., 2005).

2.2.4 Microscopia Especular

Os primeiros relatos do emprego da microscopia especular para avaliação endotelial datam do início do século XX, quando Vogt, em 1920, apresentou o método de avaliação do mosaico endotelial por reflexão especular usando a biomicroscopia em lâmpada de fenda (YEE et al., 1987; A. A. O., 1997). MAURICE, em 1968, proporcionou avanço ao observar *in vivo*, com magnificação de 400 vezes, as células do endotélio da córnea. LAING et al. (1975) modificaram o microscópio especular desenvolvido por Maurice, permitindo registro fotográfico dos exames.

A microscopia especular é uma técnica não invasiva que permite avaliação *in vivo* da estrutura e função do endotélio corneal (STAPLETON & PEIFFER, 1979; ABIB, 2000; SANCHIS-GIMENO et al., 2003; McCAREY et al., 2008).

O microscópio especular é um aparelho para observação do endotélio corneal em grande aumento. Sabendo-se que a distribuição das células endoteliais na córnea é praticamente uniforme e, mediante seu estudo em uma área de dimensões determinadas, pode-se conhecer o número, a forma e o tamanho dessas células (LAING et al., 1979).

Para realização do exame, um feixe de luz é projetado até o endotélio da córnea e uma grande quantidade desta luz é transmitida para o humor aquoso. Entretanto, uma pequena fração é refletida da interface celular aquoso-endotélio de maneira especular, tanto que o ângulo de reflexão do observador é igual ao ângulo de incidência (LAING et al., 1979; PEIFFER et al., 1981; ABIB, 2000; McCAREY et al., 2008).

A área da superfície do reflexo especular é dependente da curvatura da superfície refletida. Uma restrição adicional na área do reflexo da luz é causada pela proximidade de duas superfícies concêntricas. A superfície epitelial é altamente

reflectiva por causa da grande diferença quanto ao índice refrativo entre o ar e o filme lacrimal (McCAREY et al., 2008).

Se a objetiva do microscópio está focada na superfície posterior da córnea, a luz refletida forma uma imagem do endotélio corneal, que é coletada e magnificada pelas objetivas. A imagem pode ser vista diretamente e fotografada, permitindo exame *in vivo*, relativamente à quantificação e análise morfológica das células endoteliais da córnea (LAING et al., 1979; PEIFFER et al., 1981; ABIB, 2000).

O microscópio especular tem uma lente objetiva de imersão e um profundo cone em contato com a superfície da córnea. Este tipo de microscópio elimina o reflexo forte da luz da superfície da córnea, facilitando a fotografia das células endoteliais (MISHIMA, 1982).

Com a evolução dos meios semiológicos oculares, surgiu o microscópio especular de grande ampliação que, posteriormente, passou a utilizar a análise computadorizada para os dados endoteliais (ABIB, 2000).

Conforme a maneira de captar a imagem, os microscópios especulares podem ser de contato ou de não-contato (LAING et al., 1979).

A microscopia especular de contato requer a presença de contato físico entre a córnea e a lente objetiva. Ao deslizar a objetiva do microscópio especular sobre a superfície da córnea, obtém-se a imagem do mosaico endotelial. Pode-se cobrir toda a superfície corneal, permitindo, portanto, a avaliação de toda a superfície endotelial (ABIB, 2000). Com esse equipamento, visualizam-se entre 700 a 800 células, por área (McCAREY et al., 2008).

O uso do microscópio especular de contato, contudo, oferece risco de desepitelização da córnea que é inversamente proporcional à experiência do operador do equipamento. O exame requer cooperação do paciente, sendo necessário que ele se mantenha imóvel e sem piscar pelo tempo necessário à obtenção da imagem desejada. Para pesquisa científica, esse equipamento oferece maior versatilidade e objetividade (ABIB, 2000).

A microscopia especular de não-contato não requer contato da córnea com a objetiva do aparelho. O aparelho de não-contato não proporciona visibilização de toda a

área endotelial, mas de áreas específicas, central em alguns equipamentos e central e paracentral nos mais modernos (ABIB, 2000; SANCHIS-GIMENO et al., 2003).

O equipamento capta a imagem do mosaico endotelial, de forma automatizada e estática, em menor magnificação e com boa qualidade (ABIB, 2000). Com ele, visibilizam-se, aproximadamente, de 150 a 170 células por área avaliada (McCAREY et al., 2008). Devem ser contadas, no mínimo, 75 células para cada área avaliada (DOUGHTY et al, 2000).

A microscopia especular de não-contato é mais confortável ao paciente. Em animais, a anestesia pode ser necessária (ABIB, 2000). Irregularidades do filme lacrimal pré-corneal ou da superfície corneal podem distorcer a imagem endotelial e interferir na interpretação das condições endoteliais (MISHIMA, 1982).

Quanto ao modo de análise dos dados, os microscópios especulares podem ser não-automatizados, semi-automatizados ou automatizados. O primeiro não oferece recursos para a análise, que fica a cargo do operador, que compara os dados com uma grade pré-determinada, relativamente a padrões de densidade endotelial, pleomorfismo e polimegatismo. O segundo oferece recursos para a análise endotelial, porém necessita de interação do operador. No modo automatizado, são oferecidos recursos para as análises sem interação do operador (ABIB, 2000).

Como existem muitos modelos de microscópio especular, cada qual capturando imagens com diferentes magnificações e calibração, torna-se importante que um mesmo equipamento seja empregado, diminuindo intercorrências de magnificação e interpretação de imagens (McCAREY et al., 2008).

Como o microscópio especular capta feixes luminosos que refletem da córnea, alguns dispersos, outros com reflexão especular, para apresentação da imagem no monitor do equipamento, torna-se difícil a obtenção de uma boa imagem endotelial na presença de edema e opacidade de córnea (ABIB, 2000).

A avaliação do endotélio corneano baseia-se na estimativa da densidade endotelial, no estudo do tamanho e da forma das suas células, na presença de estruturas depositadas na superfície endotelial e na análise das alterações dismórficas do endotélio ou da membrana de Descemet (McCAREY et al., 2008).

Os parâmetros endoteliais avaliados podem ser divididos em morfológicos e morfométricos. A morfologia inclui qualquer avaliação da anatomia, histologia e citologia de um organismo ou célula. Na avaliação endotelial, através da microscopia especular, a morfologia celular é avaliada em termos qualitativos, relativamente à medidas de área e forma celulares, ou seja, polimegatismo e pleomorfismo (A. A. O., 1987; ABIB, 2000; McCAREY et al., 2008).

A quantificação da variação no formato celular é chamada de pleomorfismo ou polimorfismo e pode ser determinado pelo cálculo do percentual de células hexagonais (A. A. O., 1997; ABIB, 2000). Mishima (1982) concluiu que, na espécie humana, o pleomorfismo aumenta com a idade.

O coeficiente de variação na área celular descrito é denominado de polimegatismo. Ele é determinado pela divisão do desvio padrão da área celular pela média da área celular em micrômetros (AAO, 1987; ABIB, 2000; McCAREY et al., 2008). Aumentos no polimegatismo sugerem diminuição na avaliação, com exatidão, da área celular média (McCAREY et al., 2008).

A morfometria inclui avaliação da densidade celular endotelial e da área celular média (DOUGHTY, 1989). A densidade endotelial é avaliada por estimativa do quantitativo de células, em 1 mm². Entretanto, um número mínimo de células deve ser analisado, na área selecionada, que seja representativo do padrão celular (McCAREY et al., 2008). Muitos estudos mostram similaridade entre a densidade celular nas regiões periférica e central da córnea (LAING et al, 1979; MISHIMA, 1982; AAO, 1997; ABIB 2000; McCAREY et al., 2008). A probabilidade de se encontrar densidade menor do que 2000 células por milímetro quadrado é maior nas pessoas com mais de 70 anos (ABIB & BARRETO, 2001).

A área celular média é dada em micrômetros quadrados. Ela começou a ser utilizada como parâmetro de análise endotelial na década de 70, quando ficou estabelecido que o endotélio de primatas e humanos têm um número limitado de células e, quando a densidade endotelial diminui, células remanescentes aumentam em área para manter a contigüidade da camada endotelial (DOUGHTY, 1989).

Parâmetros endoteliais foram estudados em várias espécies, incluindo-se humanos (RAO et al., 1978; KHODADOUST et al., 1984; CHENG et al., 1985; BERGMANSON, 1992; JACKSON et al., 1995; PILAI et al., 2000; MÓDIS et al., 2002; AMANN et al., 2003; SANCHIS-GIMENO et al., 2003; FARIAS et al., 2007; MATHYS et al., 2007), suínos (NEUBAUER et al., 1984; EGDELING et al., 2000; VICENTI, 2004), coelhos (HULL & GREEN, 1980; LESTER et al., 1981; EDELHAUSER et al., 1981; NEUBAUER et al., 1984; SHERRARD, 1984; MATSUDA et al., 1985; GEROSKI & EDELHAUSER, 1989; MORITA, 1995; ALP et al., 2000), cães (BEFANIS et al., 1981; GWIN et al., 1982; RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2006), eqüinos (ANDREW et al., 2001), lhamas e alpacas (ANDREW et al., 2002) e gatos (PEIFFER et al., 1981).

Em coelhos, estudos em microscopia especular avaliaram a morfologia e morfometria do endotélio da córnea. GEROSKI & EDELHAUSER (1989) realizaram um estudo com microscopia especular e reportaram área celular média de $284 \pm 4.1 \mu\text{m}^2$ e pleomorfismo de $62,3 \pm 2.1\%$. MORITA (1995) avaliou densidade celular endotelial em grupos de leporinos com diferentes idades; o estudo mostrou densidade celular média entre 3009 e 3224 células/mm², em animais com 6 meses de idade e, entre 2695 e 2852 células/mm², naqueles com idades entre 12 a 15 meses. NEUBAUER et al. (1984) estudaram a viabilidade endotelial de córneas de leporinos, armazenadas em diferentes meios de preservação.

VICENTI (2004) estudou o endotélio da córnea de suínos jovens à microscopia especular e observou padrão regular de células poligonais, com predomínio da forma hexagonal. Reportou, ainda, pleomorfismo moderado e densidade endotelial elevada, além de maior densidade e menor área celular média na região central da córnea. O endotélio de suínos foi utilizado como modelo para avaliação de meios de preservação de córneas (NEUBAUER et al., 1984), bem como quanto à penetração e toxicidade de fármacos intra-oculares (EGDELING et al., 2000).

ANDREW et al. (2001), ao estudarem o endotélio corneal de eqüinos, encontraram densidade celular endotelial média de 3155 ± 765 células por milímetro quadrado. Observaram, ainda, decréscimo da densidade com avanço da idade. Não

detectaram, contudo, qualquer correlação entre a densidade celular endotelial e a espessura da córnea.

Estudos foram realizados comparando-se a morfologia e a reparação endotelial entre leporinos, felinos, caninos, primatas e humanos (VAN HORN et al., 1977; JACKSON et al., 1995; COLLIN & COLLIN 1998). Os resultados mostraram que o perímetro e diâmetro celular médio foram significativamente maiores nos gatos que nos coelhos e em humanos, com pequena diferença entre o homem e os coelhos. As células endoteliais de primatas, por sua vez, foram menores do que as das outras três espécies estudadas. O polimegatismo humano foi significativamente maior do que nas outras espécies. A maior diferença entre as espécies, relacionou-se à distribuição e às características morfométricas das células gigantes e em todas, o menor trauma resultou na formação de células aumentadas 48 horas após a lesão.

Existem estudos, realizados em gatos, estabelecendo o padrão morfológico na espécie, sem distinção entre faixas etárias (PEIFFER et al., 1981; MacCALLUM et al., 1983; JACKSON et al., 1995). PEIFFER et al. (1981) reportaram que, em cães, as células endoteliais formam um mosaico hexagonal de 15 a 25 μm de diâmetro e que a densidade celular endotelial é de 2668 células/ mm^2 . Não houve, contudo, relação entre a densidade celular e espessura corneal. Estudos adjuntos relacionaram-se à capacidade regenerativa do endotélio (VAN HORN et al., 1977; LANDSHMAN et al., 1988; LING et al., 1988; BROGDON et al., 1989; HUANG et al., 1989).

Em cães adultos, o endotélio normal é constituído por células de, aproximadamente, 15 a 20 μm de diâmetro, arranjadas em padrão linear. A densidade celular é de, aproximadamente, 2800 células por milímetro quadrado (BEFANIS et al., 1981).

GWIN et al. (1982) avaliaram o endotélio de cães em diferentes faixas etárias e reportaram que os animais com menos de um ano apresentam 2600 células por milímetro quadrado, sendo, em sua maioria, de formato hexagonal e tamanho uniforme. Cães com idade entre um e nove anos apresentaram diminuição na densidade endotelial, variando de 2300 a 2500 células por milímetro quadrado, sendo as células de formato hexagonal e tamanho uniforme, com raro pleomorfismo. A densidade

endotelial, diminuiu em cães com idade acima de dez anos, variando de 1900 a 2100 células por mm^2 . Nesses, houve pleomorfismo definido das células, entretanto a córnea permanece transparente, sugerindo haver patência da função endotelial. A densidade endotelial foi, ainda, avaliada nas regiões central e periférica da córnea e não ocorreu diferença significativa entre as duas regiões. Outrossim, não houve diferença significativa entre os olhos direito e esquerdo.

Dentre os principais fatores que influenciam na densidade e morfologia endoteliais incluem-se a idade, procedimentos cirúrgicos intra-oculares, aplicação de fármacos intra-oculares, doenças sistêmicas, uveíte e glaucoma (GWIN et al., 1982; CHENG et al., 1985; OHGURO et al., 1991; MEDIN, 1992; DOUGHTY et al., 2000; ABIB, 2000; EDELHAUSER, 2000; PILLAI et al., 2000; RODRIGUES et al., 2006; MATHYS et al., 2007; McCAREY et al., 2008)

DOUGHTY et al. (2000) avaliaram córneas saudáveis de indivíduos da espécie humana em diferentes faixas etárias: 4 a 6 anos, 20 a 25 anos, 32 a 41 anos e 68 a 83 anos. As médias de densidade celular estimadas foram, respectivamente, 4124, 3457, 3360 e 3113 células por mm^2 (RAO et al., 1978; LAULE et al., 1978; BLACKWELL et al., 1977).

No glaucoma, deve-se avaliar o endotélio para afastar a possibilidade de doença endotelial primária ou secundária. Em crises de glaucoma agudo, pode ocorrer perda endotelial. Cirurgias, nesses casos, podem, também, induzir à perdas endoteliais (ABIB, 2000).

Na uveíte, os leucócitos presentes no humor aquoso podem migrar para entre ou abaixo das células endoteliais, levando à perda celular. Podem, ainda, levar à edema corneal (TUFT & COSTER, 1990; PILLAI et al., 2000).

A determinação da densidade endotelial, previamente a procedimentos cirúrgicos intra-oculares, torna-se útil para se conhecerem os riscos cirúrgicos (ABIB, 2000).

No *diabetes mellitus*, utiliza-se a microscopia especular para avaliação do risco cirúrgico, tanto para a facectomia como para cirurgias vitreoretinianas. Ressalta-se a necessidade de conhecimento prévio quanto a doenças endoteliais associadas (ABIB, 2000).

As indicações para a microscopia especular são, principalmente, bancos de córneas, avaliação pré e pós-operatória, avaliação de doenças corneais e estados inflamatórios do segmento anterior (A. A. O., 1997). Emprega-se a microscopia também para se avaliarem efeitos da idade e toxicidade de drogas (WARING et al., 1980).

Em bancos de olhos, a fotografia endotelial tem sido valiosa na avaliação de córneas para transplante, possibilitando o uso de tecidos mais velhos com densidade celular suficiente e eliminando tecidos doadores com anormalidades corneais não suspeitas (WARING et al., 1980; A. A. O., 1997).

FARIAS et al. (2007) utilizaram a microscopia especular para avaliação de córneas de doadores, armazenadas. Os autores concluíram que córneas de indivíduos mais jovens mantêm-se melhores preservadas. Relativamente ao mesmo estudo, concluiu-se, ainda, que decorridas seis horas do óbito, perdas endoteliais são mais factíveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

A pesquisa foi realizada atendendo as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO), relativamente ao emprego experimental de animais em pesquisas oftálmicas. Outrossim, para sua implementação, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, sob o número de protocolo 10331-07.

3.2 Animais

Empregaram-se 36 bulbos oculares, de 18 animais da espécie felina (*Felis catus*, LINNAEUS, 1758), machos ou fêmeas, sem raça definida, de diferentes idades, que vieram a óbito no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por enfermidades que não comprometiam a integridade do aparelho oftálmico.

Realizou-se exame oftálmico de todos os animais, imediatamente ao óbito, a fim de se selecionarem somente bulbos oculares hígidos. O exame oftálmico consistiu na

avaliação da transparência da córnea com lâmpada de fenda¹ e da integridade epitelial corneal com a prova da fluoresceína², além das demais medidas rotineiras.

Os animais foram subdivididos em 3 grupos com 6 animais cada, considerando as idades, designados por G1, G2 e G3, onde:

G 1: entre 1 e 3 meses;

G 2: entre 5 e 12 meses;

G 3: entre 24 e 40 meses.

3.2.1 Enucleação e Preservação dos Bulbos Oculares

Imediatamente ao óbito, realizou-se enucleação subconjuntival e acondicionamento dos bulbos oculares em câmara úmida (Figura 1). Os frascos foram acondicionados em embalagem térmica e mantidos refrigerados até o exame de microscopia especular.



Figura 1. Imagem fotográfica ilustrando o acondicionamento dos bulbos oculares em câmara úmida.

¹ Portable Slit Lamp Heine HSI 150.

² Fluoresceína strips, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

3.2.2 Microscopia Especular

Estudaram-se os bulbos oculares decorridas até seis horas *post-mortem*. Os exames em microscopia especular foram realizados na Clínica de Olhos Dr. Fernando Cesar Abib, em Curitiba - PR. Após serem removidos da câmara úmida, os bulbos oculares foram fixados em um suporte adaptado ao microscópio especular de contato Bioptics LSM-2100C e lubrificados com solução fisiológica. A seguir, posicionou-se a lente objetiva do microscópio sobre a região central da superfície corneal para o registro fotográfico digital do endotélio (Figura 2). De cada amostra, foram capturadas três imagens nítidas. De cada imagem, foram analisadas, pelo menos, 100 células endoteliais. Para as análises morfológica e morfométrica, utilizou-se o programa *Bambi Plus 2000* (Figura 3). O programa forneceu os dados de densidade endotelial, área celular média, polimegatismo e pleomorfismo.



Figura 2. Imagem fotográfica de microscópio especular de contato Bioptics LSM-2100C, com o bulbo ocular fixado em suporte adaptado e posicionamento da objetiva na região central da córnea.

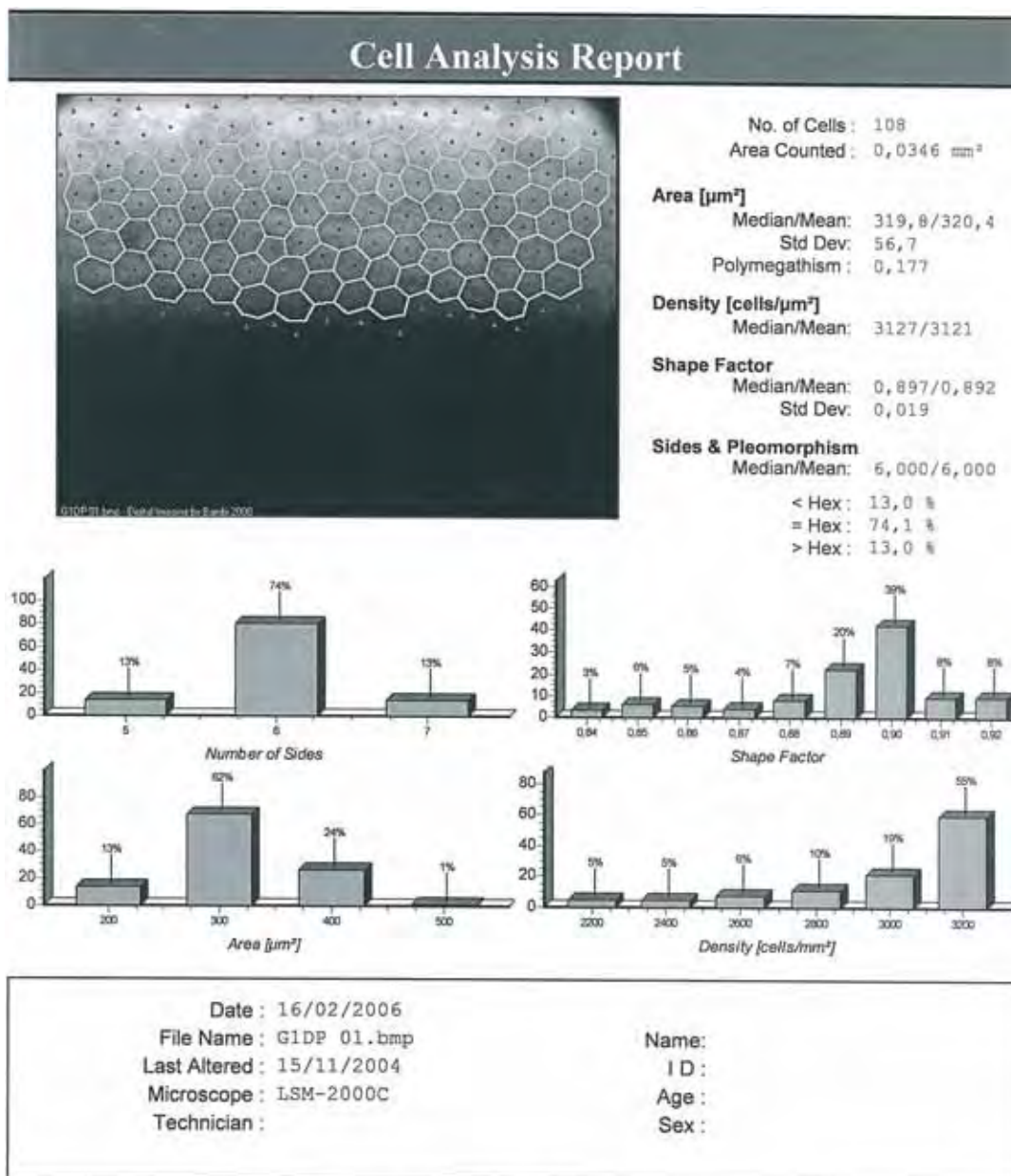


Figura 3. Cópia xerográfica de laudo emitido pelo programa *Bambi Plus 2000*, em microscopia especular.

3.2.3 Análise à Estatística

Os dados obtidos foram comparados entre os três grupos estudados, empregando-se testes de Anova e Tukey. Compararam-se, também, os dados dos bulbos oculares direito e esquerdo de cada grupo pelo Test t. Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

A microscopia especular possibilitou constatar regularidade do padrão de distribuição das células endoteliais, em todas as imagens avaliadas. Observaram-se células poligonais, com bordas nítidas (Figura 4).

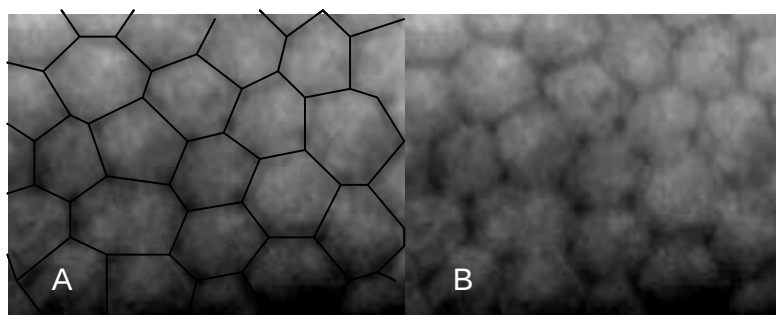


Figura 4: Fotomicrografia especular do endotélio da córnea do olho esquerdo de um gato com 24 meses de idade. Em A e B notam-se células poligonais com padrão regular e bordas celulares nítidas.

A densidade celular endotelial média nos animais do grupo 1 variou entre 5533 e 7355 células/mm². Nos animais do grupo 2, os valores variaram entre 3378 e 5159 células/mm². Nos animais do grupo 3, variaram entre 2493 e 3367 células/mm² (Tabelas 1, 2 e 3).

A morfometria computadorizada mostrou densidade celular média no grupo 1 de 6493 células/mm²; no grupo 2 de 4082 células/mm² e no grupo 3 de 2873 células/mm² (Figura 5) .

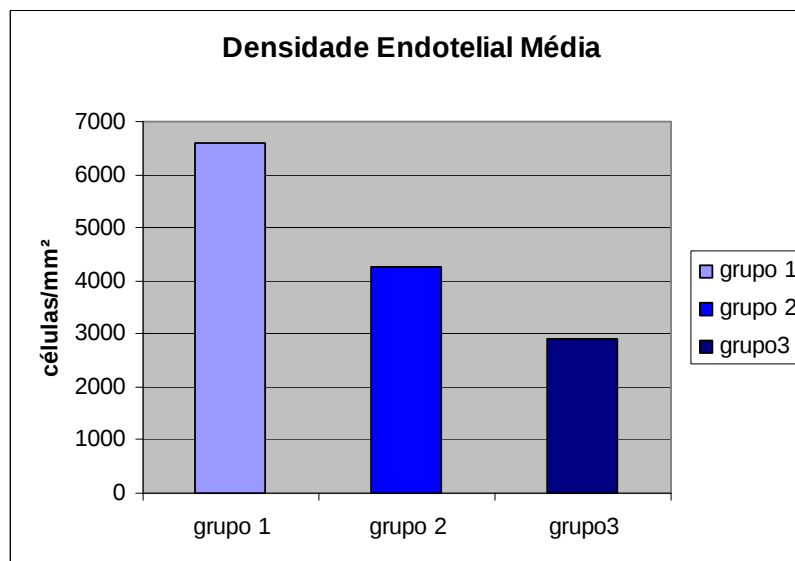


Figura 5: Representação gráfica das médias dos valores de densidade celular endotelial nos grupos 1 (idades entre 1 e 3 meses): 6493 células/mm², 2 (idades entre 5 e 12 meses): 4082 células/mm² e 3 (idades entre 24 e 40 meses): 2873 células/mm².

Observou-se diminuição na densidade endotelial com o aumento da idade em todos os grupos. Entretanto, não houve diferença significativa entre os bulbos oculares direito e esquerdo de cada grupo (Figuras 6, 7 e 8).

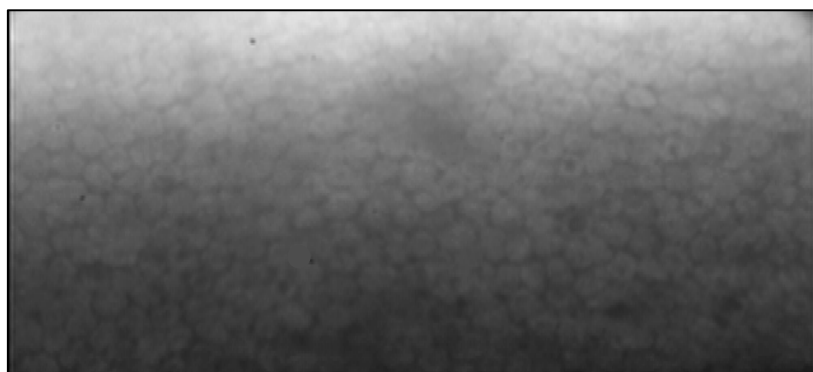


Figura 6: Fotomicrografia especular do endotélio corneal normal de gato, com dois meses de idade. Nota-se endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais, predomínio da forma hexagonal e densidade celular de 6579 células/mm². Área celular média de 152 μ m², pleomorfismo de 52,3% e polimegatismo de 0,32.

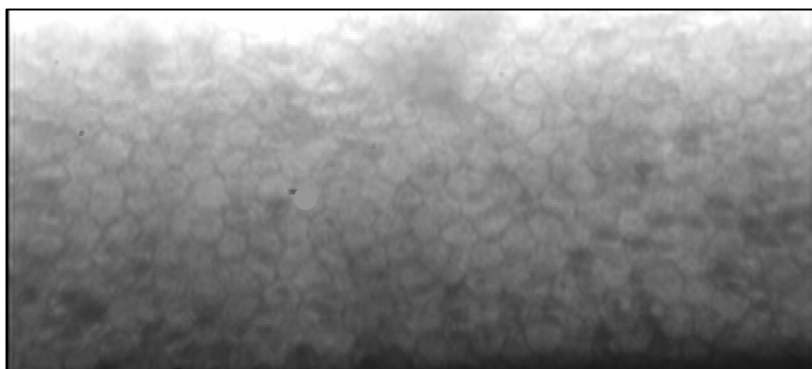


Figura 7. Fotomicrografia especular do endotélio corneal normal de gato, com seis meses de idade. Nota-se endotélio íntegro, com padrão regular de células poligonais, predomínio da forma hexagonal e densidade celular endotelial de 5100 células/mm². Área celular média é de 196 μm^2 , pleomorfismo de 50% e polimegatismo de 0,32.

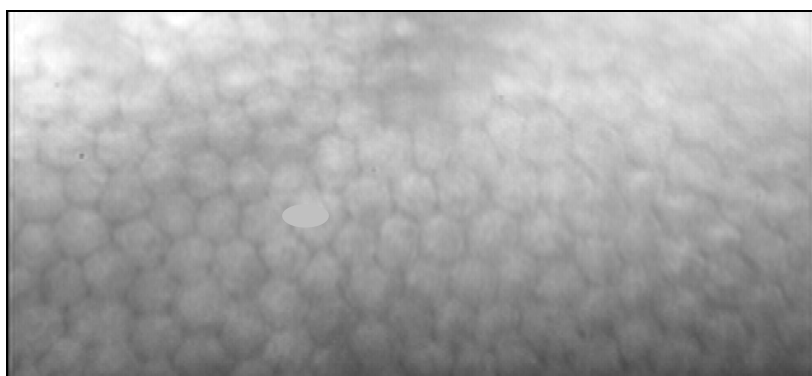


Figura 8. Fotomicrografia especular do endotélio corneal normal de gato, com seis meses de idade. Nota-se endotélio íntegro apresentando um padrão regular de células poligonais, com predomínio da forma hexagonal e densidade celular endotelial de 2500 células/mm². Área celular média é de 399 μm^2 , o pleomorfismo de 62,4% e o polimegatismo de 0,27.

Relativamente ao pleomorfismo, os animais do grupo 1 exibiram valores que variaram entre 46 e 57%. Nos animais do grupo 2, eles variaram entre 39 e 60%. Nos do grupo 3, variaram entre 48 e 74% (Tabelas 1, 2 e 3). O pleomorfismo no grupo 1 foi de 52%; no grupo 2 foi 49% e no grupo 3 foi 66% (Figura 9).

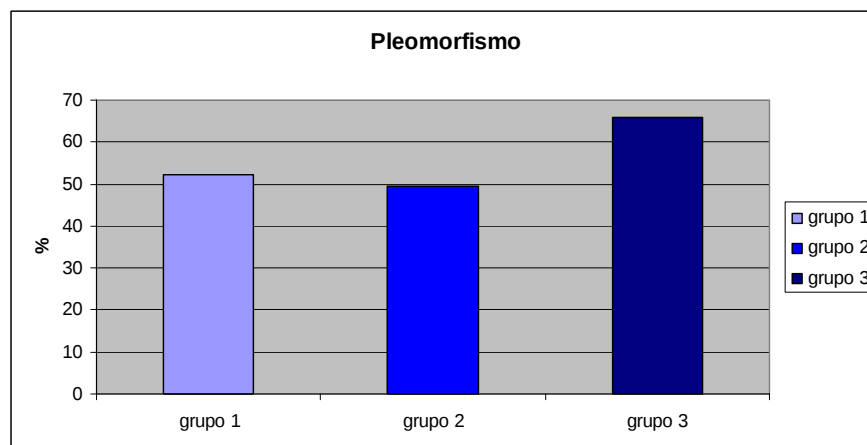


Figura 9: Representação gráfica dos valores médios de pleomorfismo dos grupos 1 (idades entre 2 e 3 meses): 52%, 2 (idades entre 5 e 12 meses): 49% e 3 (idades entre 24 e 40 meses): 66%.

A análise estatística dos dados referentes ao pleomorfismo, evidenciou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos 2 e 3 e entre os grupos 1 e 3. Entretanto, não o fez entre os grupos 1 e 2. Não houve diferença significativa entre os bulbos oculares direito e esquerdo. Com o avanço da idade, o pleomorfismo aumentou linearmente (Figura 10).

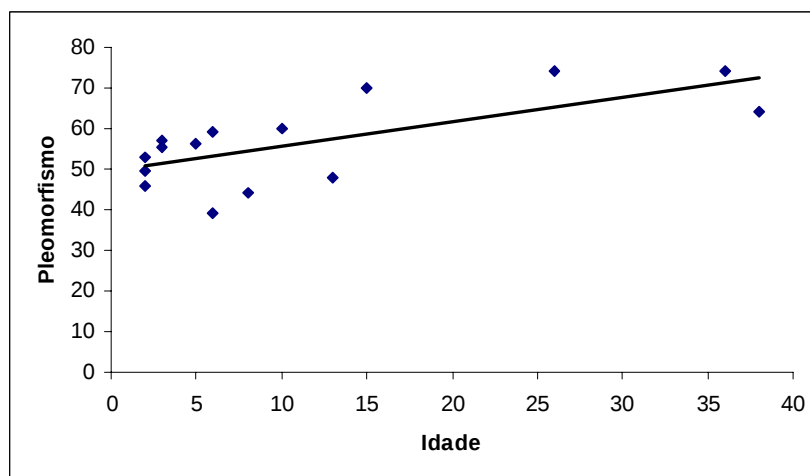


Figura 10. Representação gráfica do pleomorfismo, expresso em %, em gatos de diferentes faixas etárias, expressas em meses.

Quanto ao polimegatismo, os animais do grupo 1 exibiram valores que variaram entre 0,10 e 0,13. Nos animais do grupo 2, os valores encontrados variaram entre 0,12 e 0,18, e no grupo 3, entre 0,10 e 0,12 (Tabelas 1, 2 e 3). Os valores de polimegatismo foram, no grupo 1: 0,12, no grupo 2: 0,12 e no grupo 3: 0,11. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os três grupos e entre os bulbos oculares direito e esquerdo. Os valores foram constantes em todos os olhos examinados (Figuras 11 e 12).

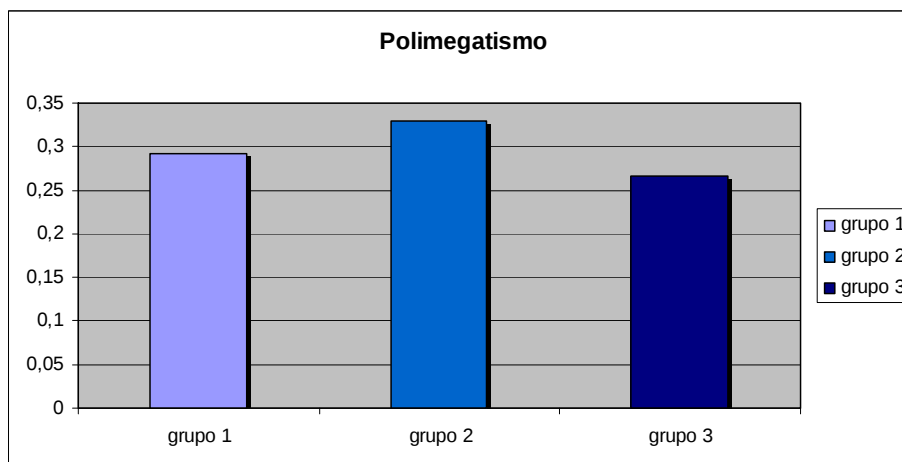


Figura 11: Representação gráfica dos valores médios de polimegatismo nos grupos 1 (idades entre 2 e 3 meses): 0,12, 2 (idades entre 5 e 12 meses): 0,12 e 3 (idades entre 24 e 40 meses): 0,11.

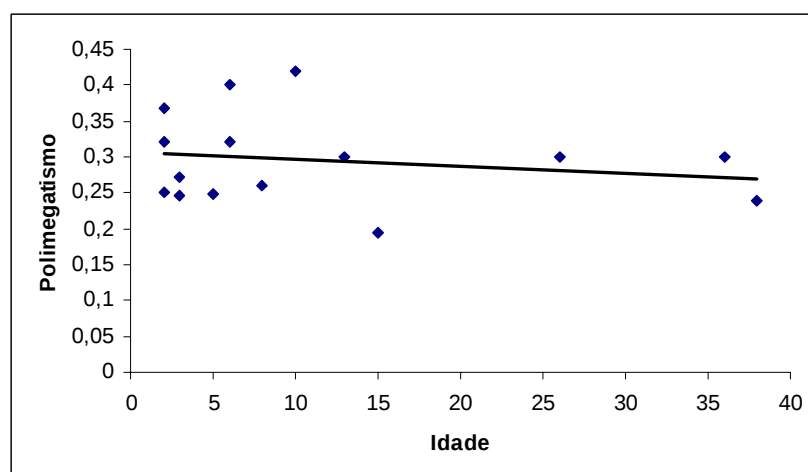


Figura 12: Variação dos valores do polimegatismo, representado pelo coeficiente de variação, em gatos de diferentes faixas etárias, expressa em meses.

Em relação à área celular, os animais do grupo 1 exibiram valores que variaram entre 136 e 182 μm^2 . Nos animais do grupo 2, eles variaram entre 194 e 296 μm^2 . Nos animais do grupo 3 variaram entre 297 e 401 μm^2 (Tabelas 1, 2 e 3). A área celular média no grupo 1 foi de 154 μm^2 , no grupo 2 de 245 μm^2 e no grupo 3 de 348 μm^2 . Observou-se aumento na área celular média, em todos os grupos, com o avanço da

idade. Os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à área celular média. Não houve diferença significativa entre os bulbos oculares direito e esquerdo (Figuras 13 e 14).

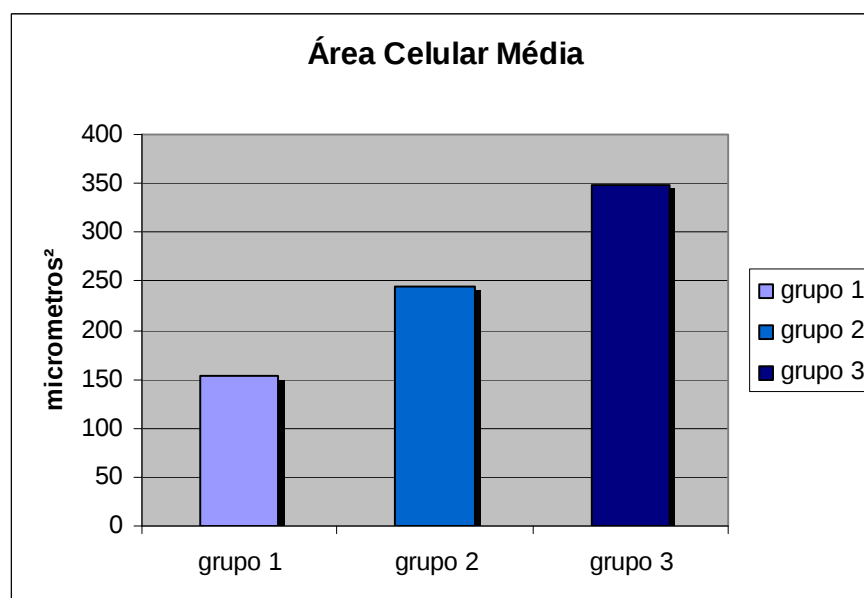


Figura 13: Representação gráfica dos dados de área celular média dos grupos 1 (idades entre 2 e 3 meses): $154\mu\text{m}^2$, 2 (idades entre 5 e 12 meses): $245\mu\text{m}^2$ e 3 (idades entre 24 e 40 meses): $348\mu\text{m}^2$.

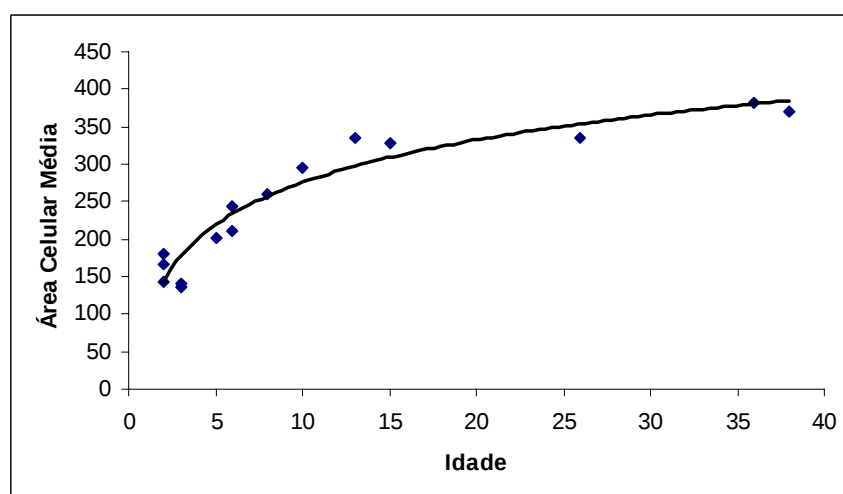


Figura 14. Variação dos valores da área celular média, expressos em μm^2 , em gatos de diferentes faixas etárias, expressas em meses.

Tabela 1. Valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão de idade (meses), densidade endotelial (células/mm²), área celular média (μm²), pleomorfismo (%) e polimegatismo, em gatos (*Felis catus*) do grupo 1 (1 e 3 meses), avaliados à microscopia especular.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade	2	3	2,4	0,55
Densidade endotelial	5533	7355	6493	771
Área celular média	136	182	154	19
Pleomorfismo	46	57	52	4,5
Polimegatismo	0,10	0,13	0,12	0,05

Tabela 2. Valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão da idade (meses), densidade endotelial (células/mm²), área celular média (μm²), pleomorfismo (%) e polimegatismo, em gatos (*Felis catus*) do grupo 2 (5 e 12 meses), avaliados à microscopia especular.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade	5	12	8,5	2
Densidade endotelial	3378	5159	4082	627,6
Área celular média	194	296	245	35,6
Pleomorfismo	39	60	49	5,7
Polimegatismo	0,12	0,18	0,12	0,07

Tabela 3. Valores máximos, mínimos, médios e desvio padrão da idade (meses), densidade endotelial (células/mm²), área celular média (μm²), pleomorfismo (%) e polimegatismo, em gatos (*Felis catus*) do grupo 3 (24 e 40 meses), avaliados à microscopia especular.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade	24	40	32	2
Densidade endotelial	2493	3367	2873	319,3
Área celular média	297	401	348	37,9
Pleomorfismo	48	74	66	10,8
Polimegatismo	0,10	0,12	0,11	0,05

5. DISCUSSÃO

Entre os fatores responsáveis pela manutenção da espessura e transparência da córnea, encontra-se a integridade morfo-funcional das células do endotélio (MISHIMA, 1982; TUFT & COSTER, 1990). Nas espécies já estudadas, ocorre decréscimo da densidade endotelial e outras modificações decorrentes do avanço da idade, de procedimentos cirúrgicos intra-oculares, da aplicação de fármacos intra-oculares, de doenças sistêmicas, de traumas oculares, de glaucoma e de inflamação inespecífica (GWIN et al., 1982; CHENG et al., 1985; OHGURO et al., 1981; MEDIN, 1992; DOUGHTY et al., 2000; ABIB, 2000; EDELHAUSER, 2000; PILLAI et al., 2000; RODRIGUES et al., 2006; MATHYS et al., 2007; MACCAREY et al., 2008). O limiar entre 400 a 700 células/mm² geralmente é necessário para manter a deturgescência da córnea (ABIB, 2000).

Referências detalhando os parâmetros endoteliais à microscopia especular, além das dos seres humanos, limitam-se a alguns animais domésticos e silvestres, como suínos (VICENTI, 2004), coelhos (EDELHAUSER et al., 1981), cães (GWIN et al., 1982), eqüinos (ANDREW et al., 2001), lhamas e alpacas (ANDREW et al., 2002) e gatos (PEIFFER et al., 1981). A maioria dos estudos, todavia, não se reporta a parâmetros endoteliais e sua relação com a idade. GWIN et al. (1982) avaliaram os parâmetros endoteliais em função da idade, em cães, e MORITA (1995), da mesma maneira, em coelhos.

Embora gatos domésticos sejam empregados em pesquisas, no âmbito da oftalmologia, relativamente ao endotélio da córnea inexistem estudos quanto a parâmetros morfológicos e morfométricos, em diferentes idades, à microscopia especular. Frente a tal assertiva, admitiu-se realizar estudo comparativo, entre diferentes idades, de felinos domésticos, quanto à celularidade endotelial, à microscopia

especular de contato. Utilizaram-se grupos de diferentes idades e avaliaram-se as repercussões da idade sobre parâmetros morfométricos e morfológicos.

Dado que se utilizaram animais que vieram à óbito, evitaram-se sacrifícios para a pesquisa. Bulbos oculares foram descartados frente à presença de opacidades na córnea, porquanto para a avaliação do endotélio à microscopia especular, é imprescindível que a córnea esteja transparente. Opacidades ensejam dispersão do raio luminoso incidente, prejudicando a reflexão especular e, conseqüentemente a qualidade da imagem do mosaico endotelial (ABIB, 2000). Considerando-se a necessidade de uma superfície ocular íntegra, a córnea transparente e que se tivesse conhecimento preciso da idade dos animais, examinaram-se mais de cem felinos para que se obtivesse um número mínimo de seis animais por grupo.

O acondicionamento dos bulbos oculares em câmara úmida permitiu a preservação da integridade endotelial ao momento do exame. Nenhum dos bulbos foram descartados por intercorrências quanto à descontinuidade da camada endotelial. Empregou-se método utilizado com ênfase por ANDREW et al. (2001), por VICENTI (2004) e por PIGATTO et al. (2006).

VICENTI (2004) sugeriu que córneas colhidas com até 6 horas *post-mortem* permitem ser estudadas. ANDREW et al. (2001) e PIGATTO et al. (2006), da mesma forma, realizaram estudos com metodologias semelhantes, avaliando, respectivamente, equinos e cães.

Entre os métodos utilizados para a avaliação do endotélio da córnea encontram-se a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia com corantes vitais, a microscopia confocal e a microscopia especular.

Com o advento do microscópio especular a análise *in vivo* e o registro fotográfico das células endoteliais passaram a ser factíveis, à quantificação da celularidade endotelial, evitando que a retração celular, decorrente da preparação de córneas para estudo *in vitro* seja observada. Não obstante a simplicidade operacional do microscópio especular, os exames foram realizados por uma só pessoa (A.A.O., 1997; ABIB, 2000; McCAREY et al., 2008). Tal permitiu a captura de imagens nítidas e sua futura interpretação.

Apesar das inúmeras vantagens, a microscopia especular imprime limitações (A.A.O., 1997; ABIB, 2000). Destaca-se a dificuldade na obtenção de imagens em áreas endoteliais que passaram por trauma ou edemaciadas. No presente estudo, o acondicionamento dos bulbos oculares em câmaras úmidas e a realização dos exames em até 6 horas após a enucleação, evitou tal complicação.

A microscopia especular mostrou-se factível para o estudo e documentação das condições do endotélio da córnea de olhos normais de felinos, em diferentes faixas etárias. Permitiu, ainda, a quantificação dos dados.

No presente estudo, somente células da região central da córnea foram analisadas. Como, em indivíduos com córnea hígida, a distribuição celular é uniforme entre as regiões central e periférica, o estudo da área central apenas é confiável para se estimar a celularidade e se definir a morfologia do contingente celular do endotélio (MORITA, 1980; McCAREY, 2008). Em avaliações endoteliais após procedimentos cirúrgicos intra-oculares, além da região central, áreas periféricas devem ser examinadas, pois nestas situações as perdas endoteliais ocorrem de forma heterogênea (PIGATTO, 2005).

Parâmetros endoteliais foram analisados empregando-se o maior número de células em cada imagem, sendo o mínimo de 100 contadas por imagem. Avaliaram-se três imagens da região central de cada bulbo ocular. LAING et al (1979) recomendaram que o quantitativo de células analisadas em cada imagem seja superior a 50, com o objetivo de se diminuir erros. Já McCAREY et al. (2008) reportaram que, avaliando-se 78 células por imagem, o erro pode chegar à 0,1% e, avaliando-se 147 células por imagem, ele cai para 0,03%, relativamente à densidade celular.

Entre os principais parâmetros endoteliais mensuráveis, encontram-se a contagem celular e a variação de tamanho e forma de suas células (ABIB, 2000). No presente estudo, optou-se pela análise da densidade celular endotelial, área celular média, pleomorfismo e polimegatismo.

O endotélio da córnea de felinos caracterizou-se por uma monocamada de células poligonais uniformes em tamanho e forma. O padrão regular de células poligonais, observado à microscopia especular, com predomínio da forma hexagonal,

foi similar ao descrito em outros estudos em humanos, ratos, suínos, coelhos, cães e gatos (LAING et al, 1975; STAPLETON & PEIFFER, 1979; PEIFFER et al., 1981; YEE et al., 1987; MORITA, 1995).

Mediante os resultados do presente estudo, utilizando a microscopia especular de contato, pode-se verificar que os valores da densidade celular endotelial variaram entre 7355 e 2493 células/mm². Observou-se diminuição da densidade endotelial com o avanço da idade.

PEIFFER et al. (1981) avaliaram a morfologia e a densidade do endotélio da córnea de gatos entre um e três anos, à microscopia especular. Eles encontraram padrão de células hexagonais, com densidade celular endotelial média de 2668 células/mm², semelhante ao visto no presente estudo, em idades de 24 a 40 meses. Nesses, a densidade endotelial média foi de 2873 células/mm². Reitera-se que, à similitude do homem, outras espécies exibem decréscimo gradativo da densidade endotelial desde o nascimento até a morte (LAULE et al., 1978; PEIFFER et al., 1981; GWIN et al., 1982; DOUGHTY et al., 2000; ANDREW et al., 2001).

Estudos avaliando as alterações das células do endotélio da córnea ao longo da vida de seres humanos demonstraram que a densidade celular endotelial reduz progressivamente. Estima-se que entre os 20 e 80 anos ocorra uma diminuição média de 0,52%, ao ano, na densidade celular endotelial (LAULE et al., 1978; TUFT & COSTER, 1990).

DOUGHTY et al. (2000) estudaram a densidade celular endotelial em quatro grupos de seres humanos de diferentes faixas etárias e observaram que, no grupo com idade entre 4 e 6 anos, a densidade celular era de 4124 células/mm². Naquele entre 20 a 25 anos, o resultado foi 3457 células/mm². Já no grupo com idades entre 32 e 41 anos, obtiveram 3360 células/mm² e no último grupo, com idades entre 68 e 83 anos, a densidade celular foi 3113 células/mm².

Em cães com menos de 1 ano, a densidade é, em média, de 2600 células/mm²; em animais com idade entre 1 e 9 anos ela é de 2300 a 2500 células/mm² e naqueles com idade superior a 10 anos, de 1900 e 2100 células/mm² (GWIN et al., 1982).

Andrew et al. (2001) realizaram um estudo em endotélio da córnea de eqüinos, à microscopia especular, e observaram densidade celular endotelial média de 3155 ± 765 células/mm². Observaram, à similitude do reportado em outras espécies, decréscimo da densidade com o avanço da idade. A área celular média encontrada neste estudo variou entre 136 e 401µm², e aumentou com a idade. A área celular média é obtida pela fórmula: $ACM = 10^6 / \text{densidade celular endotelial}$. Trata-se, portanto, de parâmetro inversamente proporcional à densidade endotelial (ABIB, 2000).

Estudos em felinos, em sua maioria, o são sobre a regeneração do endotélio. As células endoteliais, nos gatos, têm grande capacidade de movimentação celular, resultando em mudanças na morfologia, mesmo nas regiões mais distantes da área inicial da lesão (LAING et al., 1979; LANDSHMANN et al., 1988; HUANG et al., 1989; BROGDON et al., 1989; PETROLL et al., 2001).

O pleomorfismo exprime a variação do formato hexagonal das células endoteliais e pode ser determinado pela percentagem de células hexagonais de cada imagem (ABIB, 2000). Estudos prévios demonstraram que o endotélio corneal é uma monocamada constituída, em sua maioria por células hexagonais, mas que podem apresentar quatro, cinco, sete ou até oito lados (DOUGHTY, 1989). No presente estudo o pleomorfismo variou entre 39 e 74%, apresentando aumento com o avanço da idade.

Existem poucos estudos sobre o pleomorfismo. Relativamente ao aumento com o avanço da idade, eles são a maioria (LAULE et al., 1978; GWIN et al., 1982). O aumento, admite-se, ocorre em função da baixa atividade mitótica e regeneração do endotélio, principalmente por migração e hipertrofia celular, levando à alteração da forma (LANDSHMANN et al., 1988; HUANG et al., 1989; BROGDON et al., 1989; PETROLL et al., 2001).

Neste estudo, houve aumento linear do pleomorfismo com a idade, com diferença significativa entre os grupos 2 e 3 e entre os grupos 1 e 3. Não houve, entretanto, diferença significativa entre os grupos 1 e 2. Hipoteticamente, o evento decorre da pequena diferença entre as idades nos grupos 1 e 2.

Alguns estudos têm sugerido que a morfologia do endotélio pode refletir a sua patência (RAO et al., 1984; YEE et al., 1987). Acredita-se que a não uniformidade

(polimegatismo) e o arranjo irregular não hexagonal (pleomorfismo) expressem algum comprometimento estrutural ou funcional (YEE et al., 1987). Adaptações ambientais, estruturais e metabólicas de vertebrados inferiores evidenciam a correlação entre a sua morfologia e função (YEE et al., 1987).

A área celular média aumentou em paralelo à diminuição da densidade celular, suscitando aumento do pleomorfismo e polimegatismo com o avançar da idade (LAING et al., 1975; RAO et al., 1982). No presente estudo, o polimegatismo foi constante em todos os grupos e não houve diferença significativa entre eles. GWIN et al (1982) reportaram não haver significativa diferença, quanto ao polimegatismo em função da idade.

No presente estudo não se observaram diferenças quanto aos parâmetros endoteliais estudados entre os bulbos oculares direito e esquerdo. As informações da literatura asseguram a inexistência de diferenças, relativamente aos parâmetros endoteliais obtidos entre um olho e o seu adelfo (BLACKWELL et al., 1977; PEIFFER et al., 1981; GWIN et al., 1982; ANDREW et al., 2001).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a pesquisa, na forma como fora ela concebida, permitem admitir que:

1. O endotélio da córnea de gatos normais é composto por padrão regular de células poligonais, com predomínio da forma hexagonal;
2. O endotélio da córnea de gatos sofre alterações decorrentes da idade;
3. A densidade celular endotelial diminui com o avanço da idade;
4. A área celular média aumentou com o avanço da idade;
5. O pleomorfismo aumenta linearmente com o avanço da idade;
6. O polimegatismo foi constante nos três grupos estudados;
7. Em olhos normais de felinos, mensurações realizadas em um dos olhos permitem extrapolar, com segurança, resultados para o olho adelfo.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY. Corneal endothelial photography, Three year revision. **Ophthalmology**, v.104, n. 8, p.1360-1365, 1997.

ABIB, F. C. **Microscopia especular de córnea: Manual e atlas**. Rio de Janeiro: Rio Med Livros, 2000. 140p.

ABIB, F. C.; BARRETO JR, J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 27, p.1574-1578, 2001.

ALP, B. N. et al. The effect of povidone iodine on the corneal endothelium. **Cornea**, v.19, n. 4, p. 546-550, 2000.

AMANN, J. et al. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. **American Journal of Ophthalmology**, v.135, n. 5, p. 584-590, 2003.

ANDREW, S. E. et al. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 479-482, 2001.

ANDREW, S. E.; WILLIS, A. M.; ANDERSON, D. E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 3, p. 326-329, 2002.

BEFANIS, P. J.; PEIFFER, R. L.; BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 4, p. 590-595, 1981.

BERGMANSON, J. P. G. Histopathological analysis of corneal endothelial polymegathism. **Cornea**, v. 11, n. 2, p. 133-142, 1992.

BLACKWELL, W. L.; GRAVENSTEIN, N.; KAUFMAN, H. E. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. **American Journal of Ophthalmology**, v.84, n.4, p.473-476, 1977.

BROGDON, J. D. et al. Effect of epidermal growth factor on healing of corneal endothelial cells in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.8, p.1237-1238, 1989.

CAVANAGH, H. D. et al. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy. **Cornea**, v.19, n.5, p.712-722, 2000.

CHENG, H. et al. Precision of cell density estimates and endothelial cell loss with age. **Archives of Ophthalmology**, v.103, p.1478-1482, 1985.

COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v.81, n.6, p.245-254, 1998.

DÍAZ-VALE, D. et al. Endothelial damage with cataract surgery techniques. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.24, p.951-955, 1998.

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

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

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

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

EDELHAUSER, H. F. et al. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v.99, p.1281-1287, 1981.

EDELHAUSER, H. F. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. **Cornea**, v.13, n.3, p.263-273, 2000.

EGGELING, P. et al. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.26, p.1403-1408, 2000.

FARIAS, R. J. M. et al. Avaliação de córneas doadoras em lâmpada de fenda e microscopia especular durante o período de armazenamento. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.70, n.1, 2007.

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

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

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

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

HUANG, P. T.; NELSON, L. R.; BOURNE, W. M. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 30, n.8, p.1794-1801, 1989.

ILMONEN, M. et al. Initial healing of the posterior corneal surface following perforating trauma in guinea pig: a scanning electron microscope study. **Acta Ophthalmologica**, v. 62, p.787-795, 1984.

JACKSON, A. J.; GARDINER, T.; ARCHER, D. B. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. **Ophthalmology Physiology Optometry**, v.15, n.4, p.305-310, 1995.

JALBERT, I. et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. **British Journal of Ophthalmology**, v.87, n.2, p.225-237, 2003.

JAVALOY, J. et al. Microscopía confocal de la córnea en la cirugía fotorrefractiva. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v.80, n.9, 2005.

KHODADOUST, A. A.; HIRST, L. W. Diurnal variation in corneal endothelial morphology. **Ophthalmology**, v.91, n.10, p.1125-1128, 1984.

KITZMANN, A. S. et al. Comparison of corneal endothelial cell images from a noncontact specular microscope and a scanning confocal microscope. **Cornea**, v.24, n.8, p.980-984, 2005.

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

LAING, R. A.; SANDSTROM, M. M.; LEIBOWITZ, H. L. Monitoring for continuing endothelial cell loss with cataract extraction and intraocular lens implantation. **Archives of Ophthalmology**, v.93, n.2, p.143-145, 1975.

LAING, R. A. et al. Clinical specular microscopy. **Archives of Ophthalmology**, v. 97, p. 1714-1719, 1979.

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

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

LEAMING, D. V. Practice styles and preferences of American society of cataract and refractive surgery members- 1994 survey. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.21, p.378-385, 1996.

LING, T.; VANNAS, A.; HOLDEN, B. A. Long-term changes in corneal endothelial morphology following wounding in the cat. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.29, n.9, p.1407-1412, 1988.

MacCALLUM, D. K. et al. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.24, n.2, p.247-250, 1983.

MANNIS, M. J.; SWEET, E. H.; LEWIS, R. A. The fluorouracil on the corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v.106, n.6, p.816-823, 1998.

MATHYS, K. C.; COHEN, K. L.; ARMSTRONG, B. D. Determining factors for corneal endothelial cell loss by using bimanual microincision phacoemulsification and power modulation. **Cornea**, v.26, n.9, p.1049-1055, 2007.

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

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

McCAREY, B. E. In vitro specular microscope perfusion of M-K- and moist chamber-stored human corneas. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.16, n.8, p.743-751, 1977.

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

MEANS, T. L. et al. Viability of human corneal endothelium following optisol-GS storage. **Archives of Ophthalmology**, v.113, p.805-809, 1995.

MEDIN, W. A method for registration of toxic drug effects on corneal endothelium. **Acta Ophthalmologica**, v.70, p.101-107, 1992.

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

MÓDIS, L.; LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and noncontact specular microscopy. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.28, p.1763-1769, 2002.

MORITA, H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v.57, n.2, p.273-277, 1995.

NEUBAUER, L. et al. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. **Archives of Ophthalmology**, v.102, p.921-922, 1984.

OHGURO, N.; MATSUDA, M.; KINOSHITA, S. The effects of denatured sodium hyaluronate on the corneal endothelium in cats. **American Journal of Ophthalmology**, v.112, n.4, p.424-430, 1991.

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

PEIFFER, R. L.; DEVANZO, R. J.; COHEN, K. L. Specular microscopic observations of clinically normal feline corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.5, p.854-855, 1981.

PETROLL, W. M. et al. Organization of junctional proteins in proliferating cat corneal endothelium during wound healing. **Cornea**, v.20, n.1, p.73-80, 2001.

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

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

PILLAI, C. T. et al. Evaluation of corneal endothelium and keratic precipitates by specular microscopy in anterior uveitis. **Brazilian Journal Ophthalmology**, v.84, p.1367-1371, 2000.

RAO, M. N. et al. Morphological appearance of the healing corneal endothelium. **Archives of Ophthalmology**, v.96, p.2027-2031, 1978.

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

RUIZ, J. M.; MEDRANO, M.; ALIÓ, J. L. An improved method of vital staining of the corneal endothelium. **Ophthalmic Research**, v.23, p.23-27, 1991.

SANCHIS-GIMENO, J. A. et al. Human corneal thickness using a noncontact specular microscope. **Europe Journal of Anatomy**, v.7, n.3, p.117-120, 2003.

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

SHERRARD, E. S. Interpretation of some specular microscopical images of insulted corneal endothelium by scanning electron microscopy. **Experience Eye Research**, v.39, p.685-699, 1984.

SPERLING, S. Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypan blue. **Acta Ophthalmologica**, v.55, p.573-580, 1977.

STAPLETON, S.; PEIFFER, R. L. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.12, p.1803-1804, 1979.

SVEDBERGH, B.; BILL, A. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**, v.50, p.321-335, 1972.

TAYLOR, M. J.; HUNT, C. J. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v.65, p.815-819, 1981.

TREFFERS, W. F. Human corneal endothelial wound repair. **Ophthalmology**, v.89, n.6, p.605-613, 1982.

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

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

VICENTI, F. M. **Morfologia e morfometria do endotélio corneano de suínos (*Sus scrofa domesticus*, LINNAEUS, 1758) à microscopia especular**. Jaboticabal, março 2004, 61 p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

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

VOGELWEID, C. M. et al. Scanning electron microscopy of bovine corneas irradiated with sun lamps and challenge exposed with *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.2, p.378-384, 1986.

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

WERNER, L. P. et al. Toxicity of xylocaine to rabbit corneal endothelium. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.24, p.1371-1376, 1998.

YEE, R. W.; EDELHAUSER, H.; STERN, M. E. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. **Experience Eye Research**, v.44, n.715, p.703-714, 1987.