

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

**AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DO TRANSPLANTE LAMELAR
POSTERIOR SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEANO DE SUÍNOS UTILIZANDO
A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. ESTUDO *IN VITRO***

Luciane de Albuquerque

PORTO ALEGRE
2014

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

**AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DO TRANSPLANTE LAMELAR
POSTERIOR SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEANO DE SUÍNOS UTILIZANDO
A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. ESTUDO *IN VITRO***

Autor: Luciane de Albuquerque

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

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE
2014

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho aos meus amados pais,
à minha querida irmã, à minha linda afilhada e
aos meus anjos caninos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço com imenso amor às pessoas mais importantes na minha vida que são os meus pais **José** e **Osvaldina**, minha irmã **Quel** e minha afilhada **Mariah**. Sem o amor, o incentivo e o apoio de vocês nada teria acontecido.

Agradeço com muito carinho aos meus amigos de quatro patas: **Coquinho, Piti, Xuxa, Luli, Quel, Lelo, Lica, Kinho, Lola, Cristal, Lilo e Lolo**. Foi o meu amor por vocês que fez essa história começar.

Agradeço ao meu namorado, amigo e companheiro **Marcos**, que mesmo estando há uma distância tão grande conseguiu se fazer presente em cada etapa desse trabalho.

Minha imensa gratidão ao meu orientador prof. **Pigatto**. Muito obrigada por todos os ensinamentos que me foram proporcionados e por toda paciência que foi tida com as minhas falhas ao longo desses quase 10 anos de convivência. Agradeço também pela oportunidade que me foi dada em participar de um projeto tão enriquecedor. Tenho muito orgulho de ter tido a sua orientação e também a sua amizade que contribuiu muito para o meu crescimento profissional e também pessoal.

Muito obrigada a toda família Visentini, em especial aos amigos **Paulo Rogério** e Dona **Irene**. A acolhida, a amizade e o carinho de vocês foi fundamental para a realização desse projeto.

Agradeço à equipe do Serviço de Oftalmologia Veterinária da UFRGS, em especial as pessoas me que ajudaram no dia-a-dia da minha pós-graduação: **Carol, Kad, Rafa e Cel**.

Agradeço ao prof. **André Caríssimi** pelo apoio e pela torcida para realização desse projeto.

Muito obrigada aos membros da banca: prof. **José Luiz Laus**, prof. **Sérgio Kwitko** e prof. **Carlos Afonso de Castro Becker** pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Agradeço ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudo para realização desse projeto.

Por fim, agradeço a **Deus** pela vida que me foi proporcionada!

CIP - Catalogação na Publicação

ALBUQUERQUE, LUCIANE

AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DO TRANSPLANTE LAMELAR
POSTERIOR SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEANO DE SUÍNOS UTILIZANDO A MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA.

ESTUDO IN VITRO / LUCIANE ALBUQUERQUE. -- 2014.

72 f.

Orientador: JOÃO ANTONIO TADEU PIGATTO.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS,
2014.

1. OFTALMOLOGIA VETERINÁRIA. 2. TRANSPLANTE DE CORNEA. 3. ENDOTÉLIO . 4.
CIRURGIA OFTÁLMICA. I.

PIGATTO, JOÃO ANTONIO TADEU, orient. II. Título.

Luciane de Albuquerque

**AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DO TRANSPLANTE LAMELAR
POSTERIOR SOBRE O ENDOTÉLIO CORNEANO DE SUÍNOS UTILIZANDO
A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. ESTUDO *IN VITRO***

Aprovado em 25 de abril de 2014

Aprovado por

Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto
Orientador e presidente da comissão

Prof. Dr. José Luiz Laus
Membro da comissão

Prof. Dr. Sérgio Kwitko
Membro da comissão

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

RESUMO

O transplante endotelial tem sido cada vez mais utilizado como uma alternativa ao transplante penetrante no tratamento das desordens do endotélio da córnea. No entanto, ao consultar a literatura não foram encontradas referências identificando em qual momento da cirurgia de transplante lamelar posterior ocorre maior dano às células endoteliais do botão doador. Objetivou-se avaliar e comparar as repercussões de duas etapas do transplante lamelar posterior sobre o endotélio da córnea de suínos utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Utilizaram-se 30 bulbos oculares de 20 suínos, mestiços (1/2 Large White 1/2 Landrace), machos, com seis meses de idades e com peso médio de 100 kg. Foram designados dois grupos experimentais. No G1 constituído por 10 bulbos oculares, foi avaliado o dano ao endotélio da córnea após a confecção do botão doador. No G2, formado por 20 bulbos oculares, foi avaliado o dano ao endotélio da córnea após a inserção do botão doador no leito receptor utilizando introdutor de Busin. Perdas celulares ocorreram e variaram de acordo com o grupo estudado. A perda endotelial média do G1 foi 8,41% e no G2 17,31%. As diferenças foram estatisticamente significativas entre os grupos estudados. No presente estudo e nas condições experimentais realizadas foi possível concluir que a inserção do botão doador induziu maiores danos ao endotélio corneano de suínos, comparativamente à sua criação.

Palavras-chave: endotélio da córnea, transplante endotelial, ceratoplastia, DSEK, Busin

ABSTRACT

Endothelial keratoplasty has been adopted as an alternative to penetrating keratoplasty in the treatment of corneal endothelial disorders. However, references identifying at what time of posterior lamellar transplant surgery occurs greater damage to the endothelial cells of the donor button were not found, when consulting the literature. The aim of this study was to assess and compare the effects of two stages of posterior lamellar keratoplasty on the corneal endothelium of swine using scanning electron microscopy. A total of 30 eyes were evaluated in this study. The eyes were divided in two groups of ten each eye: G1 (evaluated after delamination and preparation of the donor button) and G2 (evaluated after delamination and preparation and insertion of the donor button using Busin glide). Cell loss occurred and varied according to the study group. The average endothelial cell loss was 8.41% in G1 and 17.31% in G2. The differences were statistically significant between the groups studied. Scanning electron microscopy demonstrated damage in either group. The average endothelial cell loss was 8.41% in G1 and 17.31% in G2. The differences were statistically significant between the groups studied. It was concluded in the present study and also in the experimental conditions that the insertion of the donor button has induced greater damage to the corneal endothelium of swine compared to its creation.

Key-words: *Corneal endothelium, endothelial transplant, keratoplasty, DSEK, Busin*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suíno utilizada para avaliação do dano endotelial após a confecção do botão doador no grupo 1. Aumento original de 37 X; Barra = 1mm. As setas demonstram áreas de perda celular que totalizaram a média de 8,41% no grupo 50
- Figura 2 - Eletromicrografia de varredura do endotélio corneano de suíno obtida após a confecção do botão doador. Observa-se área com perda celular demarcada. Aumento original 1300 X; Barra = 10 μm 51
- Figura 3 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo 1. Região endotelial sem perda celular. Aumento original de 1300 X; Barra = 10 μm 51
- Figura 4 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suíno utilizada para avaliação do dano endotelial após a confecção e inserção do botão doador no grupo 2. Aumento original de 37 X; Barra = 1mm 52
- Figura 5 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suínos do G1. Observa-se área com perda celular demarcada Aumento original de 1300 vezes; Barra = 1mm 52
- Figura 6 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo 2 evidenciando áreas de desnudamento celular. Aumento original de 1300 X; Barra = 100 μm 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios percentuais das perdas de células endoteliais das córneas de suínos submetidas a duas etapas do DSEK	49
Tabela 2 - Valores médios percentuais das perdas de células endoteliais das córneas de suínos submetidas a duas etapas do DSEK	50

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - Representação gráfica do dano endotelial encontrado na córnea de suíno do grupo 1 e do grupo 2 no procedimento cirúrgico de DSEK. Valor mínimo, médio e máximo expressos em percentual	49
---	----

ABREVIATURAS

‰: por cento

&: e

µm: micrômetros

µ: micron

et al.: e outros

G: grupo

Kg: Kilograma

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

min: minuto

mm: milímetros

p: probabilidade

prof.: professor

DLEK: *Deep lamellar endothelial keratoplasty*

DSEK: *Descemet stripping endothelial keratoplasty*

DSAEK: *Descemet stripping automated endothelial keratoplasty*

DMEK: *Descemet membrane endothelial keratoplasty*

DMAEK: *Descemet membrane automated endothelial keratoplasty*

FLEK: *Femtosecond laser-assisted corneal endothelial keratoplasty*

PK: *Penetrating keratoplasty*

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

v: volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Anatomofisiologia de córnea.....	15
2.2 Cicatrização da córnea	17
2.3 Endotélio da córnea.....	19
2.4 Métodos de avaliação da córnea	21
2.4.1 Microscopia confocal	22
2.4.2 Paquimetria ultrassônica	23
2.4.3. Microscopia especular	24
2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura	26
2.4.5 Corantes vitais	31
2.5 Transplante de córnea	32
2.5.1 A evolução do transplante de córnea	33
3 ARTIGO	43
3.1 Comparação da perda celular endotelial após a realização de duas etapas distintas do procedimento de DSEK em bulbos oculares de suínos. Estudo in vitro	43
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Material e métodos.....	45
Resultados	48
Discussão e conclusão.....	53
Referências.....	59
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	63

1 Introdução

Para a manutenção da transparência da córnea, é fundamental que a mesma se mantenha em constante estado de deturgescência (ABIB, 2000; ABIB; BARRETO, 2001). As duas camadas da córnea responsáveis por esse estado são: O epitélio e o endotélio (POWER; NEVES, 2005). O epitélio atua como barreira, impedindo que os líquidos do meio externo adentrem a córnea (SAMUELSON, 1999; SLATTER, 2005). O endotélio possui dois mecanismos distintos de manutenção da desidratação: o de barreira que bloqueia a entrada do humor aquoso para o interior da córnea e o de bomba que remove os solutos do interior da córnea carreando em conjunto líquidos (JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005; SAMUELSON, 1999; SLATTER, 2005).

Para que o endotélio realize a manutenção da transparência corneana, é necessário a existência de uma densidade celular mínima, que nos animais não deve ser inferior a 800 células/mm² (SLATTER, 2005). Na medicina veterinária, as causas mais comuns de dano endotelial são as cirurgias intraoculares, os traumas e as distrofias endoteliais (SLATTER, 2005). Na maioria das espécies, o endotélio da córnea possui capacidade de regeneração limitada ou ausente. Estudos demonstraram que nos humanos, a proliferação endotelial ocorre apenas durante o período de formação uterina (BOURNE et al., 1994; HOLLINGSWORTH et al., 2001; MURPHY et al., 1984). Na ausência da mitose, quando ocorre perda endotelial, a reparação é realizada por intermédio de hipertrofia e migração das células adjacentes a área acometida (LAING et al., 1975; MATSUDA et al., 1985). Em situações em que o endotélio da córnea é severamente danificado, a sua funcionalidade fica comprometida e o humor aquoso adentra as camadas da córnea levando à perda da sua transparência (ABIB, 2000; ABIB; BARRETO, 2001; JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; GALERA et al., 2009).

O transplante de córnea é a opção de tratamento nos casos de falência endotelial. Ele se diferencia em transplante penetrante, lamelar anterior ou lamelar posterior (NITA et al., 2012; TAN et al., 2012; YOUNG et al., 2012). A escolha pela técnica a ser empregada dependerá principalmente da camada da córnea acometida. Porém, fatores como treinamento técnico, habilidade cirúrgica e instrumentais disponíveis também podem influenciar na seleção do procedimento (NITA et al., 2012).

O transplante de córnea posterior tem como finalidade substituir apenas o endotélio. Essa técnica cirúrgica tem como principais vantagens a manutenção das camadas anteriores da córnea intactas, ausências de suturas e a realização do procedimento transoperatório com o bulbo do olho fechado, fatores esses que repercutem em uma recuperação visual precoce (MELLES et al., 1999; TERRY, 2003; PRICE & PRICE, 2006; YOUNG, et al., 2012). A perda de células endoteliais, durante a realização do procedimento cirúrgico é a principal preocupação na ceratoplastia endotelial (DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011).

Embora existam inúmeros estudos avaliando a eficácia do transplante de córnea lamelar posterior em humanos, ao se consultar a literatura, não foram encontradas pesquisas referentes às repercussões das diferentes fases do procedimento de DSEK sobre o endotélio da córnea de suínos. Objetivou-se avaliar e comparar as repercussões de duas etapas distintas do transplante lamelar posterior sobre o endotélio da córnea de suínos.

2 Revisão de literatura

2.1 Anatomofisiologia da córnea

A córnea, em conjunto com a esclera, compõe a túnica fibrosa do bulbo do olho sendo também denominada de túnica externa (SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009). Essas estruturas compreendem a porção mais externa e resistente do bulbo ocular, conferindo a manutenção da sua forma e proteção (SAMUELSON, 1999; POWER; NEVES, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009). A córnea hígida é lisa, esférica e transparente (ANDRADE et al., 1999; POWER; NEVES, 2005; SLATTER 2005; GALERA et al., 2009). Sua transparência se deve ao fato de possuir as fibras de colágeno do estroma organizadas de forma paralela e regular, além de ser avascular, não pigmentada, inervada por fibras amielínicas e manter-se em estado constante de deturgescência (SAMUELSON, 1999; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009). Sua principal função é exercer a refração dos raios luminosos para formação da visão, e também atuar como barreira entre o meio externo e as estruturas intraoculares (POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; GALERA et al., 2009).

No que diz respeito à sua composição, na maioria dos animais, a córnea possui cinco camadas (SAMUELSON, 1999; JOYCE, 2003; SLATTER, 2005). O filme lacrimal pré-corneano, embora não seja visível ao corte histológico, é considerado a camada externa que recobre a córnea e a conjuntiva possuindo uma espessura média de 7µm. Ele é constituído por três camadas distintas: a porção lipídica externa, a aquosa intermediária e a mucosa interna (STADES et al., 1999; SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009). As funções do filme lacrimal pré-corneano compreendem o fornecimento primário de oxigênio para a córnea, o suprimento de proteínas antimicrobianas, a lubrificação da superfície ocular e a remoção de debris e de células esfoliativas através da drenagem da lágrima (STADES et al., 1999; SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009).

O epitélio corneano possui padrão simples, do tipo pavimentoso estratificado, não queratinizado, escamoso e não secretor (POWER; NEVES, 2005; GALERA et al., 2009; PIPPI; GONÇALVES, 2009). Ele é formado, normalmente, por cinco a sete camadas de células poliédricas ancoradas sobre uma membrana basal, a qual promove a adesão do epitélio ao estroma adjacente. Essa membrana é composta por colágenos dos

tipos IV, VI e VII, por hialuronato de sódio e por fibronectinas (SAMUELSON, 1999; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005).

Em humanos e em espécies de animais como os cetáceos, as aves e os primatas, com exceção dos lêmures, se diferenciam dos demais por possuírem abaixo da membrana basal a camada de Bowman (POWER; NEVES, 2005; SAMUELSON, 2011). Essa camada é acelular e secretada pelo epitélio anterior. Possui de 10 a 15 μm de espessura e é formada basicamente por fibrilas de colágeno que se dispõem aleatoriamente sendo considerada uma a porção superficial do estroma (POWER; NEVES, 2005).

O estroma compreende aproximadamente 90% da espessura corneana e é constituído por ceratócitos, fibrócitos, feixes de fibras de colágeno e substância fundamental, além de linfócitos, polimorfonucleares e macrófagos (POWER; NEVES, 2005). As fibras de colágeno se dispõem de forma precisamente paralela. Essa disposição contribui para a manutenção da transparência da córnea e diferencia o estroma do colágeno existente no tecido cicatricial e na esclerótica (POWER; NEVES, 2005; SAMUELSON, 1999; SLATTER, 2005).

Posterior ao estroma, encontra-se a membrana de Descemet, que é considerada a membrana basal do endotélio (POWER; NEVES, 2005; SAMUELSON, 2011). Ela é uma estrutura elástica, formada por fibras delgadas de colágeno, e é continuamente depositada pelo endotélio. Suas fibras são pouco resistentes e, em casos de descemetocele, essa camada fica facilmente protuída (SAMUELSON, 1999; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009).

A camada mais interna da córnea é o endotélio. Ele fica em contato direto com o humor aquoso, atuando como barreira para a entrada de líquidos no interior da córnea (ABIB, 2000; JOYCE, 2003). O endotélio é constituído por uma monocamada de células poligonais, sendo que na maioria das espécies essas células possuem formato predominantemente hexagonal (PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al. 2005b; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; FRANZEN et al., 2009; GALERA et al., 2009). Essa camada é a maior responsável pela manutenção do estado de deturgescência da córnea, fator fundamental para proporcionar a transparência corneana (ABIB, 2000; ABIB; BARRETO, 2001; JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; GALERA et al., 2009).

Por ser uma estrutura avascular, a córnea recebe a maior parte do oxigênio necessário para sua manutenção por intermédio do filme lacrimal pré-corneano. Os capilares provenientes do limbo e da conjuntiva também atuam na manutenção da sua oxigenação (MILLER, 2001; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005). A nutrição da córnea ocorre devido ao contato com o humor aquoso, do qual ela recebe oxigênio, aminoácidos, glicose e demais nutrientes. O metabolismo da glicose é a principal fonte de energia (MILLER, 2001; SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009).

A inervação da córnea tem origem no nervo trigêmeo, que se ramifica e origina os ramos sensitivos não mielinizados dos nervos ciliar curto e longo. Essa inervação se estende a partir da esclera em direção ao estroma anterior, alcançando o seu epitélio (MILLER, 2001; GARCIA et al, 2009). Os receptores de sensibilidade corneana estão situados no estroma e na camada basal do epitélio; e as suas terminações nervosas situam-se na superfície epitelial (SLATTER, 2005; GARCIA et al, 2009).

2.2 Cicatrização da córnea

A reparação da córnea varia de acordo com a profundidade da lesão (MILLER, 2001; SLATTER, 2005). Em úlceras superficiais, o processo de cicatrização é basicamente desempenhado pelas células epiteliais adjacentes à área lesionada e se inicia nas primeiras horas após a lesão (ANDRADE, 1999; SLATTER 2005). O epitélio da córnea possui um equilíbrio constante entre as células perdidas e as renovadas por intermédio da sua capacidade de auto regeneração (SLATTER, 2005). Em situações de injúria, as células epiteliais perdem as suas aderências hemidesmossômicas e migram em direção à área ulcerada. Em conjunto, ocorre secreção de fibrina, fibrinogênio e fibronectina seguido pela mitose das células basais do epitélio. (MILLER, 2001; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; GALERA et al., 2009) O deslizamento e a mitose das células epiteliais são mediados pelo sistema nervoso simpático, além dos hormônios, dos fatores de crescimento e dos mensageiros bioquímicos (GALERA et al., 2009).

Nas lesões epiteliais em que a membrana basal epitelial permanecer intacta, ela servirá como ponto de ancoragem entre as células epiteliais mitóticas e o estroma

subjacente (KERN, 1990; GALERA et al., 2009). Quando ocorre perda da membrana basal, ela deverá ser restabelecida. Esse mecanismo se inicia aproximadamente uma semana após a lesão inicial e dura cerca de seis a oito semanas até a sua conclusão (KERN, 1994; GALERA et al., 2009).

A restauração do estroma corneano é mais complexa; envolve produção e distribuição de colágeno, alterações na síntese de proteoglicanos e remodelação gradual de toda a sua estrutura (POWER; NEVES, 2005). A lesão inicialmente é recoberta por um tampão de fibrina. Em poucas horas, polimorfonucleares chegam até a região danificada e realizam atividade proteolítica e remoção de debris celulares. A secreção de colágeno inicia cerca de 24 horas após ocorrer a lesão, através da migração dos ceratócitos adjacentes à borda da úlcera. O colágeno depositado sofrerá remodelação, no entanto, não irá recuperar a sua organização fibrilar inicial (NASISSE, 1985; KERN, 1994; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; GALERA et al., 2009).

A membrana de Descemet, é uma estrutura elástica e, quando ela rompe, suas bordas se retraem e se enrolam (SLATTER 2005). Na tentativa de selamento da ferida, ocorre a formação de um coágulo de fibrina (POWER; NEVES, 2005; SLATTER 2005; GALERA et al., 2009). Em poucas horas, as células endoteliais sofrem um processo de tumefação para realizar o tamponamento da lesão. Células epiteliais conjuntivais migram até a ferida e, posteriormente, assumem o padrão de células epiteliais corneanas (SLATTER, 2005; GALERA et al., 2009). Esse processo demanda longo tempo, envolve reações inflamatórias, neovascularização e resulta em cicatriz (KERN, 1994; ANDRADE, 1999; GALERA et al., 2005; SLATTER, 2005).

O endotélio possui capacidade limitada de regeneração na maioria das espécies e a sua reposição ocorre pelo aumento no tamanho das células endoteliais adjacentes à área lesionada (ABIB, 2000). O envelhecimento diminui o potencial de recuperação endotelial (GALERA et al., 2005; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005). O endotélio é o responsável pela manutenção da desidratação da córnea, fator fundamental para a sua transparência. Quando a perda das células ultrapassa a capacidade de compensação pelas células remanescentes, tem-se como resultado o edema de córnea que compromete a sua transparência, podendo ocasionar a diminuição, ou perda completa da visão (ABIB, 2000; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005).

2.3 Endotélio da córnea

O endotélio corneano é vital para manutenção da transparência da córnea (ABIB, 2000; JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005). Ele constitui a última camada da córnea e forma uma barreira entre as estruturas internas do bulbo do olho e as demais camadas da córnea, sendo fundamental no bloqueio da entrada do humor aquoso para o estroma (JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005). É uma camada unicelular, cujo as células possuem aproximadamente 5 μm de espessura e 20 μm de diâmetro (ABIB, 2000; JOYCE, 2003). As células possuem formato poligonal e estudos realizados em diversas espécies de animais demonstraram que a maioria delas possui formato hexagonal (ABIB, 2000; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO, et al 2005b; FRANZEN et al., 2009)

A célula endotelial possui núcleo grande, achatado e ovalado. Em seu citoplasma encontram-se várias organelas relacionadas ao transporte ativo e síntese proteica como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, sendo considerada uma célula com metabolismo altamente ativo (ABIB,2000; JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005). Elas possuem bordos irregulares e se unem umas às outras por intermédio da *zonula ocludens* e dos complexos juncionais que são diferenciados em *tight* ou *gap* (ABIB, 2000; JOYCE, 2003). Essas interconexões são tortuosos prolongamentos da membrana lateral das células endoteliais que aumentam a superfície de contato entre elas e podem estar associadas à função de bomba ativa endotelial (POWER; NEVES, 2005). As conexões do tipo *tight* atuam na barreira entre o estroma e o humor aquoso. Essas ligações são dependentes de cálcio e fundamentais para manutenção da função de barreira endotelial (ABIB, 2000). As *gap* contribuem para comunicação intercelular (OJEDA et. al, 2001, POWER; NEVES, 2005).

Microscopicamente, observa-se uma grande quantidade de microvilosidades na face posterior do endotélio. A face anterior do endotélio está em contato direto com a membrana de Descemet por intermédio de hemidesmossomos, não havendo complexos juncionais. Isto explica o fato das células endoteliais serem facilmente deslocadas por traumas mecânicos ou durante cirurgias intraoculares (TUFT & COSTER, 1990).

Além das microvilosidades, em algumas espécies, como na humana, nos primatas, nos suínos e nos leporinos já foi descrita a presença de cílios na face posterior do endotélio. Embora a sua função não esteja bem elucidada, acredita-se que os cílios

atuem como quimiorreceptores, osmorreguladores ou detectores de pressão (COLLIN; COLLIN 1998).

As funções de bomba e de barreira do endotélio são responsáveis por manter a transparência da córnea, regulando a hidratação do estroma (JOYCE, 2003). A barreira endotelial regula a circulação de água e de substâncias a partir do humor aquoso para o interior estromal. Ela ocorre pela presença das interdigitações e dos complexos juncionais, também chamados de junções *gap*, localizados no espaço intercelular (ABIB, 2000; JOYCE, 2003). Esses complexos mantêm as células endoteliais unidas e impedem a permeabilidade de solutos para o espaço intracelular. Apesar disso, existe uma passagem constante de humor aquoso, transporte de glicose, de aminoácidos e de outros nutrientes essenciais através dos espaços intercelulares para o estroma. Esse conteúdo é equilibrado pela atividade de bomba endotelial (MISHIMA, 1982; TUFT; COSTER 1990; ABIB, 2000).

Além da função barreira, o endotélio atua como uma bomba endotelial de sódio e íons bicarbonato. Essa atividade mantém o equilíbrio dinâmico da córnea através do transporte ativo de íons forçando a saída de água da córnea e contrariando a tendência do estroma em absorvê-la (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985a; TUFT; COSTER 1990).

A passagem constante do humor aquoso leva ao acúmulo de líquido no estroma. A saída de fluido da córnea depende do metabolismo aeróbico realizado pelas bombas endoteliais, principalmente por intermédio do transporte ativo de íons de bicarbonato, sódio e potássio. A energia utilizada na forma de ATP é produzida a partir da glicose pelas mitocôndrias, através do ciclo de Krebs e da via das pentoses-fosfato. O oxigênio requerido pelas células endoteliais é difundido primariamente através da câmara anterior. O movimento de fluido através do endotélio acontece de forma passiva e segue o fluxo dos íons que são ativamente transportados pela membrana posterior das células (MISHIMA, 1982; YEE et al., 1985a; JOYCE, 2003; SLATTER, 2005).

Para que o endotélio ajude a manter a transparência da córnea por intermédio das suas funções de barreira e de bomba, a densidade celular deve permanecer acima de 500 células/mm² (JOYCE, 2003; POWER; NEVES, 2005; SLATTER, 2005; JOYCE 2012). Estudos apontam que nos humanos a proliferação endotelial ocorre apenas durante o período de formação uterina (BOURNE et al., 1997; MURPHY et al., 1984;

HOLLINGSWORTH et al., 2001). O recém-nascido humano possui uma densidade endotelial média de 3.500 a 4.000 cel/mm², sendo que esse número vai sofrendo um decréscimo constante ao ponto que aos 20 anos de idade, a contagem celular é de aproximadamente 1.400 a 2.500 cel/mm² (ABIB, 2000). A partir desse período, essa queda na densidade endotelial diminui, atingindo uma estabilidade de aproximadamente 0,3% a 0,6% de decréscimo ao ano (YEE et al, 1985b; TUFT; COSTER, 1990; ABIB, 2000; JOYCE, 2012).

Além do decréscimo fisiológico, a diminuição na contagem endotelial é influenciada por fatores como agentes químicos, traumas cirúrgicos e principalmente por alterações endoteliais primárias, por exemplo, distrofias endoteliais e afecções oculares decorrentes de diabetes mellitus, uveítes, contusões ou perfuração ocular (LEIBOWITZ; LAING, 1994; ABIB; MOREIRA, 2001; JOYCE, 2003; JOYCE, 2012).

A resposta endotelial à perda celular envolve hipertrofia e difusão celular das células remanescentes. Como resultado observa-se o aumento no tamanho e alteração no formato celular (LAING et al., 1974; MATSUDA et al., 1985). Contudo, a hipertrofia celular não é idêntica para todas as células resultando em um endotélio com células de diferentes tamanhos e formatos (MATSUDA et al., 1985).

2.4 Métodos de avaliação da córnea

Diferentes métodos semiológicos podem ser utilizados para avaliação do endotélio na rotina clínica da oftalmologia e também nas pesquisas dessa área. As principais possibilidades consistem na lâmpada de fenda, no paquímetro ultra-sônico, no microscópio especular de contato e/ou de não contato e no microscópio confocal (ABIB, 2000).

Na pesquisa, os métodos de avaliação do endotélio da córnea disponíveis para sua análise *ex vivo* compreendem a microscopia confocal, a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia especular, e os corantes vitais, em especial o azul tripan e o vermelho de alizarina (KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003; TERVO; MOILANEN, 2003; KAUFMAN et al., 2004).

A seguir, será apresentada uma revisão com os principais métodos de análise do

endotélio da córnea *in vivo* e *ex vivo* utilizados no âmbito da pesquisa oftalmológica.

2.4.1 Microscopia confocal

A grande vantagem da microscopia confocal é a possibilidade de avaliação de todas as camadas da córnea de maneira não invasiva tanto *in vivo* quanto *ex vivo* (KLAIS; BÜHREN; KOHNEN, 2003; TERVO; MOILANEN, 2003; KAUFMAN et al., 2004). Características microscópicas das estruturas celulares da córnea podem ser avaliadas com elevada nitidez e resolução utilizando esse exame. A análise e abordagem completa da córnea, além da sua espessura é determinada minimamente permitindo observação de alterações histológicas, cicatriciais e também avaliação de toda sua inervação (TERVO; MOILANEN, 2003; HARA et al., 2003; KAUFMAN et al., 2004; JONUSCHEIT; DOUGHTY; RAMAESH, 2011).

Ao se comparar os métodos normalmente utilizados para avaliação endotelial, como a microscopia especular, os corantes vitais e a microscopia eletrônica de varredura, em relação a microscopia confocal, essa apresenta algumas vantagens. A microscopia especular, que é considerada um dos métodos mais tradicionais para avaliação endotelial, se torna difícil e até mesmo impossível de ser realizada nos casos com edema de córnea avançado. A microscopia eletrônica de varredura e os corantes vitais só são possíveis de serem utilizados em estudos *ex vivo*. Enquanto que, a microscopia confocal permite o exame do endotélio da córnea tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, mesmo em casos de edema corneano moderado (CHIOU et al., 2006).

Esse método semiológico possui a particularidade de permitir o acompanhamento do comportamento endotelial pós-transplante de córnea, sendo que o uso clínico da microscopia confocal em córneas transplantadas data de 1990 (CHIOU et al., 2006).

Bourne (2001) utilizou tanto a microscopia especular quanto a microscopia confocal na avaliação de 500 córneas após a realização do transplante penetrante. Em 2007, Szaflik e colaboradores novamente utilizaram o microscópio confocal para descrever a ultraestrutura de 32 córneas quatro dias após a ceratoplastia penetrante, sendo que, nesse estudo, em apenas uma córnea, os autores não conseguiram realizar a

análise das camadas posteriores ao estroma. A razão para isso foi o edema intenso dessa córnea.

Sendo assim, a principal vantagem da microscopia confocal inclui a possibilidade de avaliação endotelial detalhada, mesmo em córneas que perderam a transparência, como por exemplo, nas situações de acometimento por distrofias ou antes e após realização de transplante (HARA et al., 2003; JONUSCHEIT.; DOUGHTY; RAMAESH, 2011).

Recentemente a microscopia confocal foi utilizada para avaliar o endotélio de 40 córneas após o transplante *in vivo*. Nesse estudo, Jonuscheit e colaboradores (2010) avaliaram 20 córneas onde havia sido realizado ceratoplastia lamelar anterior profunda (DALKS) e 20 córneas submetidas ao transplante penetrante (PK) no intuito de comparar a avaliação automatizada em relação a avaliação manual.

2.4.2 Paquimetria ultra-sônica

A paquimetria ultra-sônica avalia a espessura corneana, e indica indiretamente a função da bomba endotelial que é responsável pela manutenção da córnea em constante regime de desidratação (GILGER et al., 1993; REALINI; LOVELACE, 2001).

A mensuração da espessura corneana por intermédio do paquímetro ultrassônico é uma metodologia de suma valia para monitoramento da função e da integridade das células endoteliais. O paquímetro ultra-sônico consiste em um aparelho, que faz contato com a córnea por intermédio de um menisco de água deionizada, sem toca-la diretamente. O tempo requerido para a energia ultra-sônica atravessar a córnea é registrado e a espessura corneana é calculada (GILGER et al., 1993).

Em vista disso, em 2008 Ranzani e colaboradores publicaram um estudo que teve por finalidade comparar os valores da espessura corneana central de 13 felinos obtidos pelo paquímetro ultra-sônico em relação aos obtidos pelo microscópio especular de não contato. Nesse estudo, os autores chegaram à conclusão que os dois métodos são válidos na medicina veterinária, porém sugerem que os valores da microscopia especular sofrem interferência pela ausência do filme lacrimal pré-corneano em virtude da falta de movimentação palpebral.

O mesmo modelo de estudo já havia sido realizado por Brandão e colaboradores em 2006. Nessa investigação, a espessura corneana central foi determinada em 22 olhos de 11 ovinos, inicialmente com microscópio especular de não-contato seguido pelo paquímetro ultra-sônico. Os autores chegaram à conclusão que ambos os instrumentos são confiáveis.

Em humanos, Kubaloglu e colaboradores (2012), realizaram estudo semelhante. Os autores utilizaram paquímetro ultrassônico de forma satisfatória para determinar a espessura corneana central, além do microscópio especular de não contato para avaliar a densidade endotelial e a área celular média, nos quatro primeiros anos após o transplante lamelar profundo anterior e a ceratoplastia penetrante em pacientes com ceratocone.

Flynn e colaboradores (2010) realizaram um trabalho experimental avaliando a eficácia do paquímetro ultra-sônico como método semiológico no diagnóstico de rejeição do transplante de córnea em camundongos. No estudo, a transparência do enxerto foi graduada e a espessura corneana determinada pela paquimetria o que comprovou que o aumento na opacidade corneana era acompanhado da elevação nos valores da paquimetria. Mostrou-se, dessa maneira que a aferição da paquimetria pode auxiliar no diagnóstico de rejeição no transplante de córnea.

2.4.3 Microscopia especular

Um método de avaliação que pode ser utilizado para análise endotelial tanto *in vivo* quanto *ex vivo* é a microscopia especular (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979). Idealizado por Dr. David Maurice na década de 60, o microscópio especular tem sido considerado um dos métodos mais fidedignos para avaliação da morfologia e morfometria endotelial tanto na rotina clínica quanto nas pesquisas (ABIB, 2000; LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; PIGATTO et al., 2006).

Os microscópios especulares se diferenciam basicamente em dois modelos: de contato ou de não contato com a córnea (ABIB, 2000; PHILIPS et al., 2005). No microscópio especular de contato, é necessário o contato físico entre a córnea e a lente objetiva do microscópio especular, ele tem como grande vantagem a realização da applanção da córnea no momento do exame, o que permite o fornecimento de uma área

maior a ser analisada. Já o microscópio de não contato é mais prático, porém, a manutenção da curvatura da córnea resulta na obtenção de uma menor área endotelial para análise (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; ABIB, 2000; PHILIPS et al., 2005).

Em relação ao método de análise dos dados obtidos pela microscopia especular, podemos diferenciá-los em automatizados, semiautomatizados ou não automatizados. No método automatizado a análise endotelial é realizada 100% por meio de *software* sem a necessidade de interação com o operador. O método semiautomatizado, oferece recursos para avaliação endotelial, porém necessita de interação com o profissional que opera o microscópio. Já no método não automatizado, não existem recursos para análise endotelial. O operador fica responsável pela análise dos padrões endoteliais (ABIB, 2000).

O princípio básico da microscopia especular baseia-se na incidência de um feixe luminoso sobre a córnea e na sua reflexão. Uma porção desse feixe luminoso que incide sobre o endotélio é refletido de forma especular e capturado pelo microscópio que irá fornecer uma imagem ampliada do endotélio corneano permitindo a avaliação da sua morfologia e da sua morfometria (ABIB, 2000; PHILIPS et al., 2005)

Tem como uma das grandes vantagens a sua praticidade e o fato de ser uma técnica semiológica não invasiva. Na rotina clínica, algumas das indicações para a sua realização incluem diagnóstico de distrofias endoteliais, acompanhamento da evolução de afecções oculares, controle da segurança no uso de fármacos oculares, exames pré e pós-operatório de cirurgias intraoculares, seleção de córneas doadoras para transplante, entre outros (ABIB, 2000; FARIAS et al., 2007; OLIVEIRA; MOTTA; MUCCIOLI, 2009; PÉREZ-RICO et al., 2009).

Na pesquisa, a microscopia especular tem sido amplamente empregada para determinar o padrão endotelial de diferentes espécies, verificar a segurança de procedimentos cirúrgicos e de fármacos utilizados principalmente em cirurgias intraoculares (LAING; SANDSTROM; LEIBOWITZ, 1979; ABIB, 2000; PIGATTO et al, 2006; PRICE; PRICE, 2008).

Franzen e colaboradores (2010) valeram-se da microscopia especular para determinar alterações endoteliais em decorrência do envelhecimento de felinos

domésticos. Estudos semelhantes já haviam sido realizados em demais espécies como suínos (TAMAYO-ARANGO et al., 2009), coelhos (SAILSTAD; PEIFFER, 1981), cães (GWIN et al., 1982; RODRIGUES 2006; PIGATTO et al., 2006), equinos (ANDREW et al., 2001), lhamas, alpacas (ANDREW et al., 2002) e gatos (PEIFFER et al., 1981).

No transplante de córnea, além de ser considerado um exame preliminar fundamental para seleção das córneas doadoras, a microscopia especular é o método semiológico padrão para acompanhamento da recuperação pós cirúrgica (PRICE; PRICE, 2008; ACAR et al., 2011; KHOR et al., 2013). As córneas transplantadas podem sofrer um decréscimo de até 50% no valor da sua densidade endotelial ao longo de 5 anos após o procedimento cirúrgico. Por esse motivo, a microscopia especular é incontestavelmente importante como meio de avaliação da densidade endotelial e seleção das córneas doadoras (BOURNE, 1994).

Nesse sentido, durante o período de setembro de 2002 a fevereiro de 2003, o Banco de Olhos de Sorocaba utilizou a microscopia especular para analisar 203 córneas doadoras durante o seu período de armazenamento. A contagem de celular foi realizada previamente ao preparo do botão doador com o bulbo do olho ainda íntegro e classificada em excelente, boa, razoável e ruim de acordo com a densidade endotelial. A intenção dos pesquisadores foi relacionar fatores como idade do doador, tempo do óbito à preservação, causa do óbito e número de células endoteliais no 1º dia de avaliação com a perda endotelial ao longo do armazenamento. A microscopia especular foi de extrema valia pois demonstrou que das 86 córneas que falharam, 30 (66,3%) apresentavam contagem endotelial inferior a 2.500 células/mm² no primeiro dia de avaliação. O mesmo ocorreu no estudo publicado por Wilhelmus e colaboradores (1995), onde constataram por intermédio da microscopia especular que as 60 córneas que apresentaram falência primária possuíam uma densidade endotelial média de 2.685 cel/mm².

Price e Price, em 2007, publicaram um estudo de acompanhamento pós-transplante da técnica de DSEK, na qual o método de análise foi a microscopia especular. Nesse estudo foram acompanhados 263 olhos de 216 pacientes submetidos a técnica de DSEK ao longo de dois anos. A intenção foi registrar a perda endotelial no decorrer desse período.

Em estudo semelhante, Acar e colaboradores (2011) também obtiveram resultados satisfatórios ao utilizar o microscópio especular para avaliação da perda endotelial. Os autores analisaram pacientes que haviam sido submetidos ao transplante de córnea penetrante e tiveram que ser submetidos a cirurgia intraocular para remoção da catarata tanto por intermédio da facoemulsificação quanto realizando a extração manual da lente. Da mesma forma, esse método semiológico foi utilizado em um estudo realizado por Khor e colaboradores (2013) na seleção pré operatória e no acompanhamento pós cirúrgico de pacientes que seriam submetidos a técnica cirúrgica de DSAEK.

2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Ao contrário dos métodos anteriormente citados, a microscopia eletrônica de varredura é possível de ser utilizada unicamente para estudos *ex vivo*. Essa metodologia é amplamente empregada com o intuito de estabelecer a morfologia e morfometria endotelial de diferentes espécies (PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; RODRIGUES et al., 2006; TAMAYO-ARANGO et al., 2009). Por intermédio da microscopia eletrônica de varredura já foi possível estabelecer o padrão endotelial de diferentes animais como jacarés do pantanal, coelhos, pinguins, avestruzes, cães e roedores (SVEDBERGH & BILL, 1972; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; PIGATTO et al., 2009).

Em vista disso, um trabalho foi o realizado por Pigatto e colaboradores em 2005 valendo-se da microscopia eletrônica de varredura para examinar a superfície posterior do endotélio da córnea de coelhos. No ano de 2009, o mesmo autor, avaliou o endotélio da córnea de avestruz também por intermédio do microscópio eletrônico de varredura. Nesse trabalho, utilizando o microscópio eletrônico de varredura, foi possível concluir que o endotélio corneano do avestruz é constituído de células poligonais uniformes em tamanho e forma, com poucas interdigitações nas bordas celulares além da presença de microvilosidades na superfície celular (PIGATTO et al., 2009).

Em outro momento, numa avaliação também realizada em coelhos, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para analisar alterações do endotélio corneano após aplicação de mitomicina C na esclera onde esse modo de avaliação

serviu para evidenciar alterações na forma e no tamanho das células endoteliais (SILVA; GREGÓRIO, 2009).

A microscopia eletrônica de varredura já havia sido a forma eleita por Collins e Collins em 1998 para estudar a superfície posterior do endotélio da córnea de vertebrados, onde concluíram que a forma das células endoteliais corneanas nas classes avaliadas é um conjunto de células hexagonais e pentagonais com bordas irregulares e interdigitações.

A vantagem da microscopia eletrônica de varredura em relação à microscopia especular é que permite a avaliação da ultraestrutura celular (DOUGHTY, 1998). Além disso, possibilita a determinação da área celular média, densidade celular, pleomorfismo e polimegatismo (SVEDBERGH; BILL, 1972; PIGATTO et al., 2004).

O microscópio eletrônico de varredura utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite a obtenção de uma maior resolução das imagens obtidas. Esse aparelho fornece rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é rotineira em estudos na área da biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina, medicina veterinária e geologia, sendo que a principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (WATT, 1997).

Visando analisar a segurança de novas técnicas cirúrgicas, a microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada para avaliar as características endoteliais resultantes de diferentes procedimentos cirúrgicos como no estudo realizado por Aboalchamat e colaboradores (1999), no qual a microscopia eletrônica de varredura foi a ferramenta de avaliação as características morfológicas endoteliais após o transplante de células *in vitro*.

O uso da microscopia eletrônica de varredura na avaliação do transplante de córnea data desde 1972, quando Dr. Polak publicou o uso da microscopia eletrônica de varredura para estudo da rejeição epitelial e endotelial da córnea transplantada em

coelhos. Nesse trabalho, a rejeição epitelial foi caracterizada por ruptura e colapso de sua estrutura normal em uma área de 60 a 80 nm de largura. A microscopia permitiu visibilizar áreas de desnudamentos celular, presença de linfócitos, múltiplas vilosidades e pseudopodes foram avistados no endotélio rejeitado. Nos enxertos totalmente opacos, a microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o endotélio foi substituído por células achatadas de vários tamanhos e formas dispostas em várias camadas formando uma membrana.

A microscopia eletrônica de varredura também foi utilizada para comparar as alterações ultra estruturais ocorridas no endotélio da córnea de ratos armazenadas em duas diferentes temperaturas, 0° e 4° C durante 1, 2 e 7 dias. Nesse estudo, realizado por Yamasaki e Inoué em 2001, os autores concluíram que independente do tempo de armazenamento as córneas preservadas a 0° C apresentaram menor irregularidade em relação as preservadas a 4°C.

A magnificação proporcionada por esse método avaliação faz com que ele seja escolhido por muitos pesquisadores para suas análises. Terry e colaboradores (2006) analisaram as diferenças no leito receptor após a realização de duas técnicas distintas de transplante de córnea, a DSEK e a DLEK. O objetivo do estudo foi avaliar a existência de correlação entre o deslocamento do botão doador e a técnica realizada para preparo do leito receptor a fim de elaborarem novas estratégias cirúrgicas de prevenção dessa complicação. Para tanto, foram avaliadas a face estromal posterior da córnea de 10 bulbos oculares de cadáveres que haviam sido submetidos ao procedimento de DLEK em um olho e ao de DSEK no olho adelfo. A microscopia eletrônica de varredura, nesse trabalho, permitiu a obtenção de imagens com magnificação de 50 X permitindo que os autores concluíssem que a interface estromal nos procedimentos de DSEK eram mais lisas, em relação a superfície do estroma na DLEK. A partir desses resultados, os autores modificaram a sua técnica de DSEK passando a criar um leito receptor com uma superfície de contato mais irregular o que resultou em uma queda para apenas 4% de deslocamento nos 100 procedimentos de DSEK subsequentes.

A microscopia eletrônica de varredura também foi utilizada em uma pesquisa em bulbos oculares de suínos, no qual o objetivo foi avaliar o corte estromal resultante da utilização do microceratótomo pendular em diferentes frequências, oscilações e profundidade de corte. Nesse estudo, a utilização da microscopia eletrônica de varredura

como metodologia de análise possibilitou de forma plenamente satisfatória que fosse avaliada a aresta de corte utilizando um aumento de 100X. A superfície de corte foi estudada por intermédio de uma magnificação de 10X. Já a regularidade da superfície estromal foi possível de ser avaliada realizando micrografias com magnificação de 50X (HEICHEL et al., 2013). Em outro estudo, também relacionado ao transplante de córnea utilizando bulbos dos oculares de suínos, Kwang e Kim (2009) já haviam optado pela utilização da microscopia eletrônica de varredura para analisar as repercussões endoteliais ocasionadas na cirurgia de DSAEK utilizando diferentes técnicas para inserção do botão endotelial.

2.4.5. Corantes vitais

Os corantes vitais constituem uma excelente alternativa para o estudo do endotélio da córnea *ex vivo*. Essa metodologia não é recente, pois já no ano de 1976, Spence e Peiman relataram a utilização dos corantes vermelho de alizarina e azul de tripan para a análise do padrão endotelial corneano. Pouco depois, em 1981 Taylor e Hunt também publicaram seu trabalho utilizando os corantes vermelho de alizarina e azul de tripan para avaliação das células do endotélio de coelhos.

A associação dos corantes vermelho de alizarina com o azul de tripan é justificada pelo fato de que o vermelho de alizarina é um corante intercelular com capacidade de identificar e delinear o limite celular tanto de células íntegras quanto danificadas. Além disso, o vermelho de alizarina se adere e colore de forma satisfatória a membrana de Descemet nos locais onde o endotélio da córnea foi lesionado (TAYLOR; HUNT, 1981; IGNÁCIO et al., 2005; SAAD et al., 2008). Já o corante azul de tripano tem a propriedade de impregnar o núcleo das células endoteliais danificadas ou mortas nas quais a parede celular foi rompida (TAYLOR; HUNT, 1981).

O azul de tripan tem sido utilizado em concentrações que variam entre 0,001 % e 0,5%, com diferentes períodos exposição. Enquanto que as concentrações do vermelho de alizarina relatadas variam de 0,2% a 1 % também com diferentes tempo de exposição (SAAD et al., 2008; PARK et al., 2012).

A busca pela metodologia ideal na coloração endotelial incentivou Park e colabores (2012) a publicaram um estudo no qual descreveram o passo a passo da utilização dos corantes azul de tripan e vermelho de alizarina. Os autores utilizaram

córneas de cabras para avaliar o resultado de diferentes tempos de contato e de diluições distintas dos corantes vermelho de alizarina e azul de tripan no endotélio da córnea.

Nesse estudo de Park, foram testados quatro protocolos de coloração endotelial. No primeiro grupo o objetivo dos autores foi determinar a concentração ideal do corante azul de tripan. Para isso as córneas foram coradas com quatro concentrações distintas de azul de tripan, sendo elas: 0,4%, 0,2 %, 0,1 % e 0,05 % associado ao vermelho de alizarina 1%. No segundo grupo, o intuito foi testar o vermelho de alizarina em duas diferentes diluições (1% e 0,5%) em conjunto com o azul de tripan a 0,2%. No terceiro grupo a finalidade foi certificar que o azul de tripan realmente corava células danificadas. Para isso, previamente a coloração com o azul de tripano 0,2% e vermelho de alizarina 0,5% o endotélio foi danificado pelo contato com solução de peróxido de hidrogênio a 3%. O quarto grupo foi composto por córneas humanas submetidas a coloração com o azul de tripan a 0,2% e a 0,4%. Como resultado, o primeiro grupo não apresentou coloração pelo azul de tripan em nenhuma concentração. A concentração de 0,5% de alizarina delineou de forma mais nítida as margens celulares no segundo grupo. Já no grupo três, o azul de tripan corou de forma satisfatória as células danificadas pelo peróxido de hidrogênio e por fim, no quarto grupo a concentração de 0,4% de azul de tripano identificou o núcleo celular de forma mais nítida do que a concentração de 0,2%.

A toxicidade de fármacos também pode ser analisada por intermédio dos corantes vitais. A metodologia de avaliação endotelial utilizando o vermelho de alizarina e o azul de tripan foi a forma eleita em outro estudo experimental onde o mesmo autor avaliou a toxicidade da injeção intracameral do bevacizumabe no endotélio da córnea de coelhos (PARK et al., 2008).

Devido a ser um método pouco oneroso e bastante prático, inúmeros pesquisadores optaram pela utilização do vermelho de alizarina associado ou não ao azul de tripan para avaliação dos danos endoteliais após realização do transplante de córnea (IDE et al., 2007; WASILEWSKI et al., 2010; WAITE; DAVIDSON; TARAVELLA, 2013).

A diminuição da densidade endotelial durante o período de armazenamento da córnea é uma preocupação constante. Assim como a microscopia especular e os demais métodos, os corantes vitais também constituem em um bom método de avaliação

(MEANS et al., 1995). Bruinsma e colaboradores (2013), optaram pelo uso do azul de tripan 0,4% como um dos métodos para avaliação do polimegatismo, do pleomorfismo e da perda endotelial em córneas doadoras armazenadas no Banco de Olhos em Rotterdam.

Venzano e colaboradores (2010) valeram-se do vermelho de alizarina associado ao azul de tripan na avaliação da perda endotelial após a separação da membrana de Descemet utilizando uma bolha de ar. Nesse trabalho, os corantes permitiram que os autores avaliassem a morfologia, a morte das células endoteliais e a densidade celular utilizando uma magnificação de 100 vezes.

Ainda no âmbito do transplante de córnea, em um estudo realizado em córneas de coelhos, os autores optaram por usar apenas o vermelho de alizarina para avaliar a porcentagem de perda endotelial induzida no momento da separação da membrana de Descemet e também pela inversão do botão corneoescleral na câmara anterior artificial. O dano endotelial foi avaliado por intermédio de fotografias digitais tiradas no microscópio óptico após impregnar o endotélio com vermelho de alizarina. Os locais danificados foram identificados pela coloração avermelhada mais intensa (WASILEWSKI et al., 2010).

Em outro estudo recente, publicado em 2013, os corantes vitais também foram o método de avaliação escolhido por Waite e colaboradores, para analisar o dano as células endoteliais no botão doador da córnea após utilização do microceratótomo, comparando um microceratótomo dupla passagem com microceratótomo padrão de uma única passagem.

2.5 Transplante de córnea

O transplante de córnea é a principal alternativa para a recuperação da transparência corneana. Esse procedimento cirúrgico possui variações em relação a sua realização diferenciando-se em transplante penetrante, lamelar anterior ou lamelar posterior, cada um possuindo as suas indicações vantagens e desvantagens (NITA et al., 2012; TAN et al., 2012; YOUNG et al., 2012).

A técnica de transplante de córnea penetrante foi descrita pela primeira em 1824 por Reisinger, contudo, a melhora da acuidade visual só foi reportada cerca de 80 anos após por Eduard Zirm em 1905 (TAN et al., 2012, YOUNG et al., 2012). Nesse

período, a dificuldade em relação a sua realização consistia no curto tempo de sobrevivência do tecido doador devido a falência endotelial o que foi amenizado em meados de 1950 com a introdução dos corticosteroides (DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011; TAN et al., 2012, YOUNG et al., 2012). Vários estudos firmam a ideia de que as falhas ocorridas nos enxertos do transplante penetrante podem estar ligadas a um episódio agudo de rejeição endotelial ou a descompensação endotelial tardia (INOUE et al., 2001; TAN et al., 2012; YOUNG et al., 2012).

Os transplantes lamelares anteriores surgiram com uma alternativa para evitar as complicações referentes a rejeição endotelial. Tecnicamente, eles são mais difíceis de serem realizados em relação ao penetrante, pois exigem maior habilidade cirúrgica e instrumentos especializados, porém melhores resultados pós operatórios são alcançados (NITA et al., 2012). O transplante de córnea seletivo tem como grande vantagem a manutenção das camadas saudáveis da córnea, o que resulta na recuperação da acuidade visual precoce e diminuição das complicações pós cirúrgicas (CULBERSTON, 2003; TAN et al., 2012; YOUNG et al., 2012).

Quando inicialmente realizado, em meados de 1950, a ceratoplastia lamelar anterior, trouxe como grande vantagem diminuir o risco de rejeição do botão doador ao manter intacto o endotélio do receptor (OLAFSDOTTIR, 2011; YOUNG et al., 2012). Tem como principais indicações o tratamento de ceratocone, distrofias epiteliais, subepiteliais ou ainda que acometem a membrana de Bowman, distrofia estromal sem envolvimento da membrana de Descemet, opacidade e cicatrizes anteriores secundárias a inflamação e queimaduras, entre outras (NITA et al., 2012; YOUNG et al., 2012).

No período em que foi proposto, o transplante lamelar anterior apresentou como principal limitação a separação das camadas da córnea manualmente de forma regular, sem criar interface entre o botão doador e o leito receptor (NITA et al., 2012; YOUNG et al., 2012). Devido a essa dificuldade, que acarretava em resultados pouco satisfatórios, o transplante lamelar anterior deixou de ser visto como uma boa opção, sendo novamente substituído pelo transplante penetrante (YOUNG et al., 2012).

Contudo, devido à pequena sobrevivência do transplante penetrante e ao alto risco de rejeição endotelial, a ideia de realização do transplante lamelar anterior nunca foi esquecida, o que incentivou a adaptação de instrumentais cirúrgicos, desenvolvimentos de melhores microscópios cirúrgicos, idealização de microceratótomos e lasers de

precisão para dissecação da córnea (NITA et al., 2012; TAN et al., 2012, YOUNG et al., 2012). Essas inovações fizeram com que a ceratoplastia lamelar anterior obtivesse melhores resultados e fosse considerada a técnica de eleição nas afecções corneanas que acometem apenas as camadas anteriores da córnea (YOUNG et al., 2012).

Atualmente, a escolha pelo transplante penetrante ocorre em casos específicos que incluem pacientes acometidos por ceratocone com membrana de Descemet com cicatriz, ceratopatia bolhosa secundária a pseudofacia ou afacia, afecções que cursam com opacidade de todas as camadas da córnea, cicatrizes estromais, pacientes portadores de catarata madura com distrofia de Fuchs, entre outros (NITA et al., 2012).

Realizando a comparação entre o transplante lamelar anterior e o transplante penetrante, o lamelar anterior tem a seu favor o fato de não acarretar complicações transoperatórias intraoculares como a hemorragia expulsiva e a sinéquia. O fato do procedimento cirúrgico ser realizado com o bulbo do olho íntegro, gera menor perda de células endoteliais, além disso, não requer suturas na córnea a longo prazo o que diminui as chances de ocorrências de astigmatismo grave e, portanto, seus resultados são mais previsíveis. Contudo, essa técnica pode apresentar como intercorrência a perfuração da membrana Descemet transoperatória e o risco de rejeição subepitelial e/ou estromal, além de ser um procedimento mais demorado e que requer maiores habilidades cirúrgicas (ARDJOMAND et al., 2007; NITA et al., 2012).

A ceratoplastia lamelar posterior consiste na substituição do estroma posterior e da membrana de Descemet em conjunto com o endotélio (NITA et al., 2012). Ela tem como intuito a substituição das camadas internas da córnea nos casos de perda da transparência em virtude da falência endotelial, mantendo íntegras as porções saudáveis da córnea (MELLES et al., 1999; YOUNG et al., 2012).

O transplante lamelar posterior, também denominado de ceratoplastia lamelar posterior ou transplante endotelial, possui variações em relação a sua técnica de realização. Contudo, independente da técnica realizada, o objetivo é um só: a substituição das camadas internas da córnea doente. A ceratoplastia posterior se difere em: *Deep lamellar endothelial keratoplasty* (DLEK), *Descemet stripping endothelial keratoplasty* (DSEK), *Descemet stripping automated endothelial keratoplasty* (DSAEK), *Descemet membrane endothelial keratoplasty* (DMEK), *Descemet membrane automated endothelial keratoplasty* (DMAEK) e na *Femtosecond laser-*

assisted corneal endothelial keratoplasty (FLEK).

As vantagens da ceratoplastia lamelar posterior em relação a ceratoplastia penetrante são: menor risco de rejeição, manter a integridade estrutural da córnea, gerar pequenas alterações na superfície da córnea, menor astigmatismo induzido, ausência de suturas na superfície da córnea, cirurgia ser realizada com bulbo ocular fechado, recuperação visual mais rápida, córnea tectonicamente mais forte e a possibilidade de utilizar doador de córnea com alterações nas camadas anteriores da córnea (MELLES et al., 1999; PRICE; PRICE, 2006; TERRY, 2003; YOUNG et al., 2012). A perda de células endoteliais é uma das preocupações mais importantes na ceratoplastia endotelial (DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011).

A DLEK pode ser considerada o primeiro grande avanço no transplante posterior ao ser a primeira técnica no qual o segmento posterior foi transplantado através de uma pequena incisão de córnea. DSEK e DSAEK são duas técnicas inovadoras seguidas pela DMEK, DMAEK e recentemente pela FLEK (NITA et al., 2012).

O texto a seguir tem como finalidade apresentar uma revisão bibliográfica demonstrando a cronologia do transplante de córnea posterior.

3.5.1. A evolução do transplante de córnea

Atualmente, o transplante endotelial torna possível a substituição apenas da porção doente da córnea através de uma pequena incisão de córnea, mantendo intacto o tecido saudável (YOUNG et al., 2012). Porém, nem sempre a ceratoplastia lamelar posterior apresentou todas essas vantagens (NITA et al., 2012; TERRY, 2003; YOUNG et al., 2012).

O primeiro transplante lamelar posterior foi apresentado por Tillett em 1954 com resultados desanimadores que não encorajaram a sua realização pelos demais cirurgiões (DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011). Em 1960, Barraquer propôs uma inovação no transplante posterior ao sugerir o acesso ao segmento posterior da córnea utilizando a técnica do flap corneano (CULBERTSON, 2003; YOUNG et al., 2012). Essa técnica foi apresentada pela primeira vez por Barraquer no Primeiro Congresso Mundial da Córnea

em Washington em 1964 (CULBERTSON, 2003).

As vantagens do procedimento proposto por Barraquer em relação a ceratoplastia penetrante incluíam principalmente a menor indução ao astigmatismo e o retorno visual precoce. Contudo, esse procedimento apresentava algumas possíveis complicações, como úlcera de córnea e a presença de interface entre o *flap* e o botão doador (CULBERTSON, 2003).

A grande evolução ocorreu quando Barraquer inventou o microceratótomo que possibilitou a realização de um corte uniforme na córnea. Inicialmente o equipamento foi utilizado para confecção do *flap* no receptor, enquanto que o doador permanecia sendo delaminado manualmente (CULBERTSON, 2003; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011). O uso do microceratótomo proporcionou uma superfície de corte mais lisa melhorando a adesão entre o estroma posterior do *flap* e o botão doador. (CULBERTSON, 2003).

A técnica de Barraquer passou por aprimoramentos, sempre buscando o aperfeiçoamento e a melhoria na acuidade visual dos pacientes. Em 1998, Jones e Culbertson, desconheciam o trabalho apresentado anteriormente por Barraquer, e apresentaram o procedimento aperfeiçoado utilizando um microceratótomo em olhos de cadáveres nomeando a técnica de Ceratoplastia Endotelial Lamelar (ELK) (BUSIN et al., 2000; CULBERTSON, 2003; YOUNG et al., 2012).

Os procedimentos foram realizados pela primeira vez em três pacientes humanos em São Domingos, República Dominicana por Culbertson e Batalha, dos quais, dois transplantes foram bem sucedidos e em um transplante houve uma falha primária do enxerto (CULBERTSON, 2003).

A busca por melhorias prosseguiu, até o momento em que Busin apresentou significativas mudanças na técnica apresentada pelo Barraquer e a nomeou de endoceratoplastia. As principais diferenças do procedimento proposto por Busin foram o uso da câmara artificial, que permitiu a utilização do microceratótomo para confecção do *flap* no botão doador e a diminuição na quantidade de pontos ou até mesmo ausência de sutura no botão doador (BUSIN; ARFA; SEBASTIANI, 2000; CULBERTSON, 2003; YOUNG et al., 2012). A mecanização na confecção do botão doador proporcionou uma superfície de contato mais regular entre o tecido transplantado e a

córnea receptora, ocasionando uma melhor aderência do botão doador e redução da necessidade de sutura (BUSIN et al., 2008).

Foi no ano de 2001 que Azar apresentou o seu aprimoramento para o transplante de córnea posterior (AZAR et al., 2001; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011; YOUNG et al., 2012). A principal mudança na técnica de Azar consistia na possibilidade de utilização da lente de contato terapêutica para assegurar a aderência do *flap* de córnea (AZAR et al., 2001).

Apesar de todos méritos alcançados pelos pesquisadores na época, o transplante posterior continuava apresentando alguns problemas como a necessidade de suturas na superfície da córnea. As complicações relatadas pela realização desse procedimento incluíam alta taxa de falha primária do enxerto, crescimento epitelial na superfície da córnea, *melting* e astigmatismo irregular (BUSIN; ARFA; SEBASTIANI, 2000; AZAR et al., 2001; TERRY, 2003).

A verdadeira evolução no transplante de córnea profundo ocorreu no ano de 1993 quando o Ko publicou o acesso corneoescleral bem sucedido em bulbos oculares de coelhos (KO et al., 1993). O procedimento consistia na inserção do botão doador de 9mm de diâmetro dobrado ao meio por intermédio de uma incisão de apenas 5mm. O leito receptor era preparado, utilizando um trépano e o botão estabilizado injetando-se uma bolha de ar (NITA et al., 2012). Essa pequena incisão de córnea proporciona a estabilidade da topografia corneana, além de uma melhor refração e retorno da acuidade visual precoce em relação a ceratoplastia penetrante (TERRY, 2003). A mesma técnica despertou interesse da oftalmologia mundial quando em 1998 Melles apresentou o transplante posterior utilizando um acesso de apenas 8mm corneoescleral em bulbos dos olhos de cadáveres humanos (BUSIN; ARFA; SEBASTIANI, 2000; CULBERSTON, 2003; YOUNG et al., 2012).

A proposta de Melles consistia no preparo do botão doador injetando-se ar na câmara anterior, seguido por uma incisão de córnea periférica de 4mm de diâmetro com profundidade de 50% da espessura corneana. Utilizando espátulas específicas para esse fim, separava-se o segmento anterior da córnea do posterior em toda sua extensão. Após removia-se o botão corneoescleral que era posicionado com o endotélio voltado para cima sobre um *punch* e trepanado em um diâmetro de 6 mm. Ato contínuo, era realizado a separação do seguimento posterior da córnea e o mesmo era posicionado sobre

viscoelástico com o endotélio voltado para baixo (MELLES et al., 1999a; MELLES et al., 1999b).

A grande evolução ocorria em relação ao leito receptor onde era realizada uma incisão de 8mm de diâmetro com 50% de espessura na região limbar. Utilizando a mesma espátula do botão doador delaminava-se todo o segmento posterior da córnea. A seguir, um trépano de 6 mm era introduzido para realizar o corte do segmento a ser removido. Quando necessário, finalizava-se o corte do segmento a ser substituído com tesouras delicadas (MELLES et al., 1999a; MELLES et al., 1999b).

O tecido doente era então removido e o doador introduzido com auxílio de uma colher produzida especialmente para esse fim. Estabilizava-se o botão doador por intermédio da pressão exercida por esse mesmo instrumental e o procedimento era finalizado realizando sutura com aproximadamente 4 pontos interrompidos na incisão de 8 mm (MELLES et al., 1999a; MELLES et al., 1999b).

Posteriormente, o mesmo autor realizou a adequação dessa técnica com o aumento do diâmetro do botão doador de 6mm para 7 ou 7,5mm, além da estabilização utilizando uma bolha de ar e do aumento da profundidade na dissecação para 80% da espessura corneana ao invés de 50% (MELLES et al., 1999a).

Nos anos de 2000 e 2001, Terry e Ousley apresentaram a técnica de transplante endotelial sem sutura intitulada de Ceratoplastia Lamelar Endotelial Profunda (DLEK) primeiramente por intermédio de um estudo em bulbos oculares de cadáveres e após numa série de pacientes humanos nos Estados Unidos da América (TERRY; OUSLEY, 2001; TERRY; OUSLEY, 2003; CULBERSTON, 2003; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011). A técnica proposta por Dr Terry é bem similar a proposta por Dr. Melles com singelas modificações (TERRY; OUSLEY, 2003).

A real diferença consistia no uso de um trépano específico para corte da porção da córnea que seria substituída. Após a delaminação das camadas posteriores da córnea, introduzia-se o instrumental formado por duas alças circulares, sendo a externa serrilhada e a interna de 7mm de diâmetro cortante. A alça interna era introduzida entre as lamelas da córnea dissecada e por intermédio da pressão exercida em direção a câmara anterior realizava-se a trepanação do segmento a ser substituído. Quando necessário, tesouras delicadas eram utilizadas para completar o corte (TERRY;

OUSLEY, 2001; TERRY; OUSLEY, 2003).

Embora avanços nos procedimentos cirúrgicos ocorressem, as irregularidades intercorrentes da separação do estroma na córnea receptora continuavam preocupando e sendo considerada a principal intercorrência problema do transplante posterior. Em face disso, Melles em 2002 apresentou a técnica de Desnudamento da Membrana de Descemet (DMEK) (MELLES; LANDER; RIETVELD, 2002; MELLES; WIJD; NIEUWENDAAL, 2004; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011). A finalidade da DMEK é transplantar apenas a membrana de Descemet e o endotélio sem nenhuma porção do estroma posterior (MELLES; LANDER; RIETVELD, 2002; PRICE et al., 2009).

Para confecção do enxerto doador, o botão corneoescleral é imerso em um bloco contendo solução salina balanceada com o endotélio voltado para cima e a membrana de Descemet e o endotélio são separados delicadamente. Em decorrência das propriedades elásticas da membrana e da falta de suporte estromal, o enxerto adquire uma conformação de rolo com o endotélio posicionado externamente, o que dificulta a sua manipulação. Para facilitar a visualização da face endotelial, Melles optou pela utilização do corante vital azul de tripan. Em seguida, o rolo, contendo as duas camadas, é introduzido em um injetor (MELLES; LANDER; RIETVELD, 2002).

No leito receptor, a membrana de Descemet e o endotélio da córnea são removidos utilizando o instrumental denominado de Sinsky invertido. Para tal, realiza-se movimento circular semelhante ao efetuado na cirurgia de catarata no momento da capsulorrexe. O segmento destacado é retirado através de uma pequena incisão de córnea de 5mm. O resultado é a obtenção de uma superfície estromal regular para adesão do botão doador (MELLES; LANDER; RIETVELD, 2002, MELLES; WIJDH; NIEUWENDAAL, 2004; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011). Para finalizar, o rolo, contendo a membrana de Descemet e o endotélio, é introduzido na câmara anterior com auxílio de um injetor e estabilizado utilizando uma bolha de ar (MELLES; LANDER; RIETVELD, 2002; MELLES; WIJDH; NIEUWENDAAL, 2004).

Foi no ano de 2005 que Price popularizou técnica de remoção manual do segmento posterior da córnea e a renomeou de DSEK “*Descemet stripping endothelial keratoplasty*” (PRICE; PRICE, 2005; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011; YOUNG et al., 2012). No ano seguinte, em 2006, Melles propôs uma mudança na DSEK

apresentando a “*Descemet stripping automated endothelial keratoplasty*” (DSAEK).

A diferença entre a DSEK e a DSAEK ocorre na confecção do enxerto apenas. Em relação ao leito receptor, as duas técnicas são inovadoras e propõem a sua preparação de forma menos traumática em relação à DLEK, pois utiliza a decapagem ao invés da trepanação (PRICE; PRICE, 2005). A remoção do segmento posterior da córnea dessa forma é mais fácil e mais rápida, além disso, contribui para uma interface estroma posterior mais regular, o que melhora bastante a refração corneana (MAU, 2009; PRICE et al., 2009; PRICE et al., 2010).

Na DSAEK, ao invés de ser realizada a separação manual do botão doador, opta-se pela utilização de um microceratótomo (GOROVOY, 2006; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011; YOUNG et al., 2012). Essa mudança evita as irregularidades estromais oriundas da delaminação manual, melhorando a interface e trazendo como benefício a diminuição no tempo de recuperação pós-cirúrgica e o aumento na qualidade visual (GOROVOY, 2006; PRICE; PRICE, 2013).

A DSAEK consiste na montagem do botão doador em uma câmara artificial onde o segmento anterior é removido utilizando um microceratótomo. Após o botão corneoescleral, que contém o segmento posterior, é posicionado com o lado endotelial voltado para cima em um bloco de corte e trepanado (GOROVOY, 2006).

Como vantagem, a preparação automatizada do enxerto na DSAEK é mais rápida, mais precisa e repetível. Em ambas as técnicas, o botão doador inclui estroma residual, membrana de Descemet e endotélio, porém, na DSAEK, a superfície de contato é mais regular. Já na DSEK, diferenças na espessura do botão doador pode ocorrer, contudo, essas alterações não afetam significativamente na acuidade visual (MAU, 2009).

A espessura recomendada para o botão doador varia em média de 120-128 μ m. O diâmetro trepanado usualmente utilizado fica em torno de 7,5mm sendo inserido na câmara anterior através de uma incisão de aproximadamente 5 mm (PRICE; PRICE, 2005; GOROVOY, 2006; NITA et al., 2012). O botão é estabilizado, utilizando uma bolha de ar e o paciente é recomendado a ficar deitado durante o período de 1 hora para evitar o deslocamento do enxerto (PRICE; PRICE, 2005; GORORVOY, 2006).

Os métodos de inserção do botão doador são muitos, entre eles podemos mencionar o uso de um fórceps na técnica “taco”, a utilização de injetores específicos como o Busin, EndoGlide ou TAN endoGlide e por fim as técnicas de arrasto em que podem ser utilizados fios de suturas, pinças ou agulhas (BAHAR et al.,2009; HWANG; KIM, 2009; KHOR, MEHTA; TAN, 2011). Esses procedimentos se diferenciam em técnicas que introduzem ou em técnicas que puxam o botão doador para o interior da câmara anterior (DANESHGAR; ZIAGHARID, 2011).

Uma das manobras mais populares é a “Técnica do Taco” onde o disco doador é dobrado assimetricamente na porção de 60/40 e inserido utilizando uma pinça especial que pressiona apenas as extremidades do tecido minimizando a zona de compressão dano endotelial. A proporção de 60/40 garante melhor desdobraimento do botão ao ser inserido no leito receptor (TERRY; OUSLEY, 2005). Durante a inserção do botão doador nessa técnica é preciso a utilização de pinças que traumatizem o mínimo possível do endotélio. Para tanto, fórceps específicos como o de Goosey ou de Charlie foram desenvolvidos. Esses instrumentais fazem contato apenas com a porção final do disco doador causando menor trauma ao endotélio doador (DANESHGAR; ZIAGHARID, 2011).

Em 2009 Balachandran e colaboradores descreveram a técnica de inserção do enxerto doador utilizando uma agulha de 30 gauge. Nessa manobra, após a confecção de um túnel escleral de 5mm cria-se uma curvatura no terço distal da agulha e dobra-se o disco doador em 50:50.

No ano de 2008, Busin e colaboradores apresentaram um instrumental específico denominado de guia de Busin desenhado especialmente a modo de proporcionar o deslizamento do botão endotelial para o interior da câmara anterior causando o mínimo trauma endotelial. No introdutor de Busin o botão doador é delicadamente posicionado com o endotélio voltado para cima com auxílio de uma pinça colibri. Após o posicionamento, o instrumental é girado 180° e posicionado na incisão de córnea. Em seguida realiza-se uma incisão de 3.2mm em linha reta através da qual é inserida uma pinça de controle distal que irá puxar o botão endotelial para o posicionamento no leito receptor.

Outra opção são os injetores descartáveis endoGlide e o modelo mais moderno Tan EndoGlide. O dispositivo endoGlide é constituído por três componentes: a cápsula,

o introdutor e a base de preparação e foi desenvolvido pelo professor Donald Tan com o intuito de diminuir os danos endoteliais ocasionados pelos demais métodos (KHOR; MEHTA; TAN, 2011).

Os últimos avanços relacionados à ceratoplastia lamelar posterior dizem respeito ao uso do aparelho femtosegundo que realiza a separação das lamelas da córnea utilizando o laser. O laser de femtosegundo provoca a ablação do estroma posterior de maneira regular e suave. Ele permite uma incisão precisa, horizontal e lamelar da córnea do doador, produzindo um botão doador de 200 μ de espessura mais fino na porção central e mais espesso na periferia. A maior vantagem é a boa viabilidade das células endoteliais (CHENG et al., 2009a; CHENG et al., 2009b; SEITZ et al., 2003).

Foi em 2003 que Seitz propôs o uso do aparelho para dissecação das lamelas da córnea em um estudo *in vitro* (SEITZ et al., 2003; DANESHGAR; ZIAGHARIB, 2011). Nesse estudo, foram avaliados 8 bulbos oculares de suínos e 10 córneas de humanos que não poderiam ser utilizadas para o transplante de córnea. Utilizando aparelho de laser FEMTEC (Perfect Vision, Heidelberg, Alemanha), foi realizada a delaminação posterior criando flapes entre 6 e 7mm de diâmetro para análise do corte. Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram a viabilidade de criação do *flap*, a sua configuração, a regularidade da superfície de corte e a lesão térmica originada pelo laser (SEITZ et al., 2003).

Nesse estudo, Seitz e colaboradores (2003) concluíram que a tecnologia do femtosegundo poderia ser uma boa opção para abordagem do segmento posterior no transplante da córnea, porém sugeriram que mais estudos deveriam ser realizados para confirmação de seu uso. Desde, então, vários estudos estão sendo realizados visando à certificação da utilização do laser femtosegundo com segurança no transplante endotelial (CHENG et al., 2008; CHENG et al., 2009a; CHENG et al., 2009b).

3 ARTIGO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista Journal of Cataract and

Refractive Surgery (ISSN 0886-3350) e será traduzido para o inglês no momento da sua submissão.

4.1 Comparação da perda celular endotelial após a realização de duas etapas distintas do procedimento de DSEK em bulbos oculares de suínos

Comparison of endothelial cell loss after performing two different steps of the DSEK in eyes of swine

Albuquerque Luciane de¹, Pigatto João AT¹

Abstract

Purpose: Assess and compare the effects of two stages of posterior lamellar keratoplasty on the corneal endothelium of swine using scanning electron microscopy

Setting: Hospital de Clínicas Veterinárias do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Design: Experimental Study

Methods: A total of 20 eyes were evaluated in this study. The eyes were divided in two groups of ten each eye: G1 (evaluated after delamination and preparation of the donor button) and G2 (evaluated after creation and insertion of the donor button using Busin glide).

Conclusion: The results obtained demonstrated that insertion of the donor button causes more endothelial damage than confection.

¹ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 90540-00. Porto Alegre, RS, Brasil.

Introdução

A córnea transparente é fundamental na formação da visão. Para que o endotélio corneano garanta a transparência corneana por intermédio das suas funções de bomba e de barreira, é necessário que se mantenha uma densidade celular mínima.^{1,2}

Na maioria das espécies, a atividade mitótica do endotélio da córnea é mínima ou inexistente, portanto, quando ocorre diminuição na densidade endotelial, as células remanescentes iniciam um processo de migração e de hipertrofia na tentativa de ocupar o espaço das células perdidas.^{3,4} Porém quando a perda endotelial é grande, o transplante lamelar posterior tornasse a alternativa para recuperação da transparência corneana. Esse procedimento cirúrgico visa a substituição apenas das camadas internas da córnea, mantendo íntegras as camadas anteriores saudáveis.⁵⁻⁹

O transplante endotelial tem como vantagem a manutenção estrutural da córnea, ausência de suturas na superfície da córnea, recuperação visual precoce, menor astigmatismo induzido, manutenção da inervação da córnea e redução nas chances de rejeição do enxerto transplantado.^{5,6, 8, 9}

Inicialmente o transplante endotelial era realizado por intermédio de um *flap* corneano. Essa técnica foi aperfeiçoada ao longo dos anos por vários cirurgiões^{5,6}. O grande avanço ocorreu em 1998 quando Melles e colaboradores apresentaram por meio de um estudo experimental, a abordagem ao segmento posterior da córnea através de uma micro incisão escleral não necessitando a realização de suturas na superfície ocular. O autor denominou essa técnica de ceratoplastia lamelar posterior⁶. No ano de 2001, Terry e Ousley relataram resultados positivos em uma série de pacientes humano e renominaram a técnica de ceratoplastia endotelial lamelar profunda.⁹⁻¹¹ A partir dessa época, vários cirurgiões contribuíram para o aperfeiçoamento do transplante endotelial desenvolvendo novas abordagens, instrumentais e equipamentos.⁶⁻¹²

A técnica de DSEK tem como finalidade a substituição das camadas posteriores da córnea doentes que incluem o endotélio, a membrana de Descemet e o estroma posterior por um segmento composto pelas mesmas camadas saudáveis.⁵⁻¹¹

Este procedimento exige treinamento, habilidade em microcirurgia, curva de aprendizado e instrumentos específicos. Além disso, o sucesso da técnica está diretamente relacionado ao perfeito posicionamento do enxerto e à minimização do

trauma endotelial transoperatório.^{5,6,9,10} A inserção e o correto posicionamento do tecido doador representam uma etapa de difícil execução na ceratectomia lamelar posterior.¹² Com o intuito de facilitar esse passo cirúrgico, injetores específicos como o de Busin foram desenvolvidos.¹²⁻¹⁴

Objetivou-se avaliar e comparar as repercussões de duas etapas distintas do procedimento cirúrgico de DSEK sobre as células do endotélio da córnea em bulbos oculares de suínos.

Materiais e Métodos

A pesquisa foi conduzida conforme as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e recebeu aprovação da Comissão de Ética de Pesquisa Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS para sua realização.

Foram utilizados 30 bulbos oculares de 15 suínos com seis meses de idade, machos, mestiços (¹/₂Large White ¹/₂ Landrace), com peso médio de 100 Kg, selecionados no abatedouro Avisui Alimentos, Santa Maria, RS, Brasil.

Os animais foram abatidos em matadouro frigorífico, com Serviço de Inspeção Federal, de acordo com os preceitos técnicos e humanitários vigentes na legislação específica. Após o abate e antes da escalda, os olhos direito e esquerdo de cada animal foram enucleados e mantidos em câmara úmida. Imediatamente após a enucleação, foram avaliados com corante de fluoresceína¹, biomicroscopia com lâmpada de fenda² e microscopia especular³ para garantir que apenas bulbos dos olhos hígidos fizessem parte do estudo.

Para a avaliação das repercussões da técnica de DSEK sobre o endotélio da córnea e aferição das perdas celulares foram designados dois grupos. No grupo 1, o endotélio da córnea foi avaliado após a criação do botão doador. No grupo 2, o endotélio corneano foi analisado após a confecção e inserção do botão doador no leito receptor._____

¹ Prova da Fluoresceína strips, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, BR.

² Portable Slit lamp Kowa S115, Kowa Company, Ltd, Yanagihara-cho, JP.

³ Celmax, Medical Service, São Paulo, BR.

Na primeira fase do trabalho foram utilizados 10 bulbos oculares que serviram para criação do botão doador.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob magnificação com microsocópio cirúrgico⁴ e sempre por um mesmo cirurgião. Para o ato cirúrgico, o bulbo ocular foi fixado em um suporte de isopor utilizando alfinetes presos a conjuntiva remanescente. Em seguida, utilizando um bisturi cirúrgico trifacetado de safira⁵ realizou-se incisão de córnea de 5mm de largura com profundidade de 360 μ . Através dessa incisão foi inserido um escarificador de córnea⁶ com o qual se realizou a delaminação do segmento posterior da córnea em toda sua extensão com o intuito de separar a porção posterior corneana para formação do botão doador.

Ao término da delaminação, o bulbo ocular foi envolvido por uma gaze e utilizando uma lâmina de bisturi n.23⁷ realizou-se a demarcação do anel corneoescleral a uma distância de 3mm da margem do limbo. Em seguida, utilizando uma tesoura delicada confeccionou-se um anel corneoescleral. Ato contínuo, o botão corneoescleral foi posicionado com o endotélio voltado para cima em um bloco de Barron⁸ imerso em solução salina balanceada⁹ para sua trepanação utilizando o trépano de Barron de 7,5mm. Com auxílio de uma pinça colibri, a porção central do segmento posterior do botão doador foi separada da anterior e armazenada em tampão de glutaraldeído mais cacodilato de sódio a 2,5% , 0,1M e pH 7,4, durante oito horas, à temperatura de 4°C.

Na segunda fase do trabalho foram utilizados o total de 20 bulbos oculares, nos quais 10 serviram para confecção do botão doador e 10 bulbos formaram o leito receptor para a inserção do botão doador. O botão doador foi obtido realizando o mesmo protocolo de preparo da primeira etapa do projeto.

Para realização da segunda etapa do estudo, utilizou-se uma pinça Colibri para posicionar delicadamente a lamela doadora com o endotélio voltado para cima no

⁴ M 900 - com microfocalização, DF Vasconselos, Valença, BR.

⁵ Clear Degree Sapphire Knife, Accutome, Malvern, USA.

⁶ Escarificador de cornea, Medical Vision, Fortaleza, BR.

⁷ Lâminas de bisturi em aço descartável, Starmed artigos médicos e hospitalares LTDA, Curitiba, BR.

⁸ Trépano a vácuo de Barron, Katena Products INC, Denville, USA.

⁹ Solução Salina Balanceada, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, BR.

instrumental Busin¹⁰. Em seguida, o introdutor foi girado em 180° e posicionado na abertura da incisão corneana do bulbo ocular utilizado como leito receptor. Uma segunda incisão de córnea de 2.75mm¹¹ foi realizada na direção de 180° da primeira e com auxílio da pinça de controle distal o tecido doador foi introduzido no leito receptor. Após, injetou-se uma bolha de ar na câmara anterior com intuito de estabilizar o botão endotelial. As incisões de córnea foram suturadas ponto simples interrompido com fio mononailon 9-0. A seguir removeu-se o botão corneoescleral do bulbo do olho seguindo os mesmos passos realizados na córnea do G1.

A exemplo da primeira etapa do projeto, o botão doador foi removido e fixado em solução de glutaraldeído mais tampão cacodilato de sódio 2,5%, 0,1M e pH 7,4, durante oito horas, à temperatura de 4°C.

O processamento e a análise das amostras foram realizados junto ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS e ao Centro de Nanociência e Nanotecnologia (CNANNO) da UFRGS. As amostras, foram lavadas novamente em solução tampão cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações ascendentes de álcool etílico (30, 50, 70, 85, 90 e 100%), sendo 15 minutos para cada concentração, e três vezes na concentração de 100% de acetona P.A. Ato contínuo, as amostras foram secas no secador de ponto crítico utilizando dióxido de carbono líquido e fixadas em porta-espécime com fita condutiva de cola de carbono. Em seguida, as mesmas foram metalizadas com uma camada de ouro e paládio de 35nm de espessura, em íon *sputter coater* durante dois minutos.

De todas as amostras foi obtida uma eletromicrografia no aumento de 37 vezes valendo-se do microscópio eletrônico de varredura¹² operado com 15 Kv. Ocasionalmente obtiveram-se imagens com aumentos maiores de algumas regiões do endotélio. As imagens foram gravadas em arquivo digital.

O estudo morfométrico foi realizado empregando-se o software *Image Tool*¹³. Calculou-se de cada eletromicrografia o percentual de perdas celulares circundando as

¹⁰ Busin, Moria Inc, Doylestown, USA.

¹¹ Clear Cut™, Alcon Laboratories, Texas, USA.

¹² EVO 50, Zeis international, Berlin, Germany.

¹³ UTHSCSA IMAGE Tool 3.0, Department of Dental Diagnostic Science at The

University of Texas Health Science Center, Texas, USA.

áreas com ausência de células endoteliais. A medida foi expressa em μm^2 e após convertida para mm^2 . Dessa maneira obteve-se o percentual de dano endotelial.

As comparações das médias das perdas celulares após as duas etapas do transplante endotelial foram realizadas pelo teste de Wilcoxon, com nível de significância de 0,05. Os dados foram analisados no programa SPSS 20.0 e o alfa adotado foi de 5%.

Resultados

A microscopia especular permitiu a observação de um endotélio da córnea de suínos com padrão regular, sendo formado por células poligonais, na maioria hexagonais. Em relação ao bulbo do olho direito, a densidade endotelial média de 3.345 células/ mm^2 . No que diz respeito ao pleomorfismo celular, 51% das células possuíam 6 lados. A média da paquimetria obtida foi de 790, 45 μm .

No bulbo ocular esquerdo, a morfometria computadorizada apresentou a densidade endotelial média de 3.337 células/ mm^2 . Em relação ao pleomorfismo celular, 50% das células possuíam 6 lados. A média da paquimetria obtida foi de 792, 15 μm .

Foi possível realizar o preparo e a inserção do botão doador em todos os bulbos oculares selecionados. O tempo transoperatório médio despendido para a realização dos procedimentos cirúrgicos necessários ao grupo 1 foi de 13.4 ± 1.06 min. O tempo operatório médio despendido para a realização dos procedimentos cirúrgicos necessários ao grupo 2 foi 17.5 ± 2.1 min respectivamente. Não foram observadas intercorrências durante a realização dos procedimentos operatórios.

A microscopia eletrônica de varredura revelou perda de células endoteliais nas duas etapas do procedimento cirúrgico de DSEK (Tabela 1) (Gráfico 1). A média da perda endotelial obtida após a confecção manual do botão doador foi de 8,41%. Já a perda endotelial média calculada após a introdução do botão endotelial no leito receptor foi de 17,31%. Quando foram comparadas as médias das perdas celulares relativamente aos grupos 1 e 2, observou-se que essas foram maiores nas córneas advindas de olhos do G2. Essas diferenças foram estatisticamente significativas ($p = 0,002$) (Tabela 2).

Tabela 1 - Valores médios percentuais das perdas de células endoteliais das córneas de suínos submetidas a duas etapas do DSEK.

G1	%	G2	%
1	8,08	1	17,2
2	9,16	2	16,92
3	9,10	3	17,17
4	8,65	4	17,8
5	7,74	5	16,7
6	9,02	6	18,13
7	8,97	7	17,82
8	7,23	8	18,33
9	8,23	9	16,3
10	8,01	10	18,22

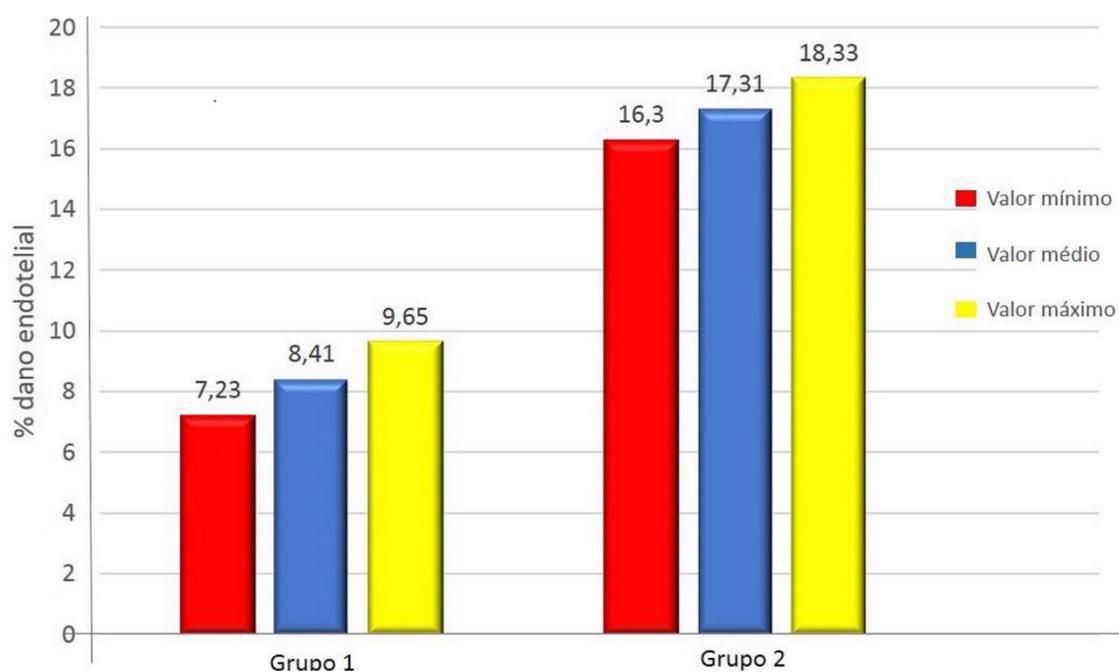


Gráfico 1 - Representação gráfica do dano endotelial encontrado na córnea de suíno do grupo 1 e do grupo 2 no procedimento cirúrgico de DSEK. Valor mínimo, médio e máximo expressos em percentual.

Tabela 2 - Valores médios percentuais das perdas de células endoteliais das córneas de suínos submetidas a duas etapas do DSEK.

	n	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor
Grupo 1	10	8,41	1,02	8,47	7,23	9,65	p =
Grupo 2	10	17,31	1,19	17,45	16,30	18,33	0,002

Nas eletromicrografias do grupo 1, (Figuras 1, 2 e 3) foram evidenciadas perdas celulares médias de 8,41%.

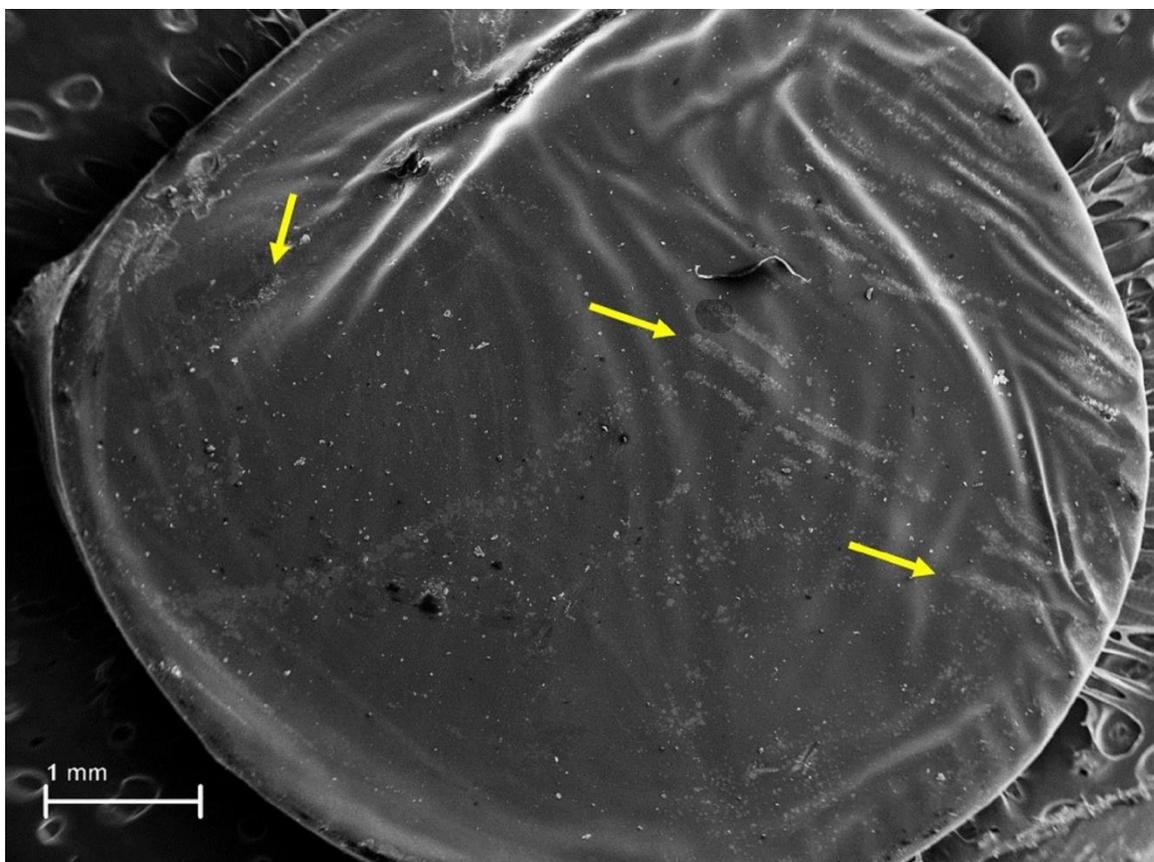


Figura 1 - Eletromicrografia de varredura do endotélio corneano de suíno obtida após a confecção do botão doador. Observam-se áreas com perda celular (setas). Aumento original 37 X; Barra = 1 mm.

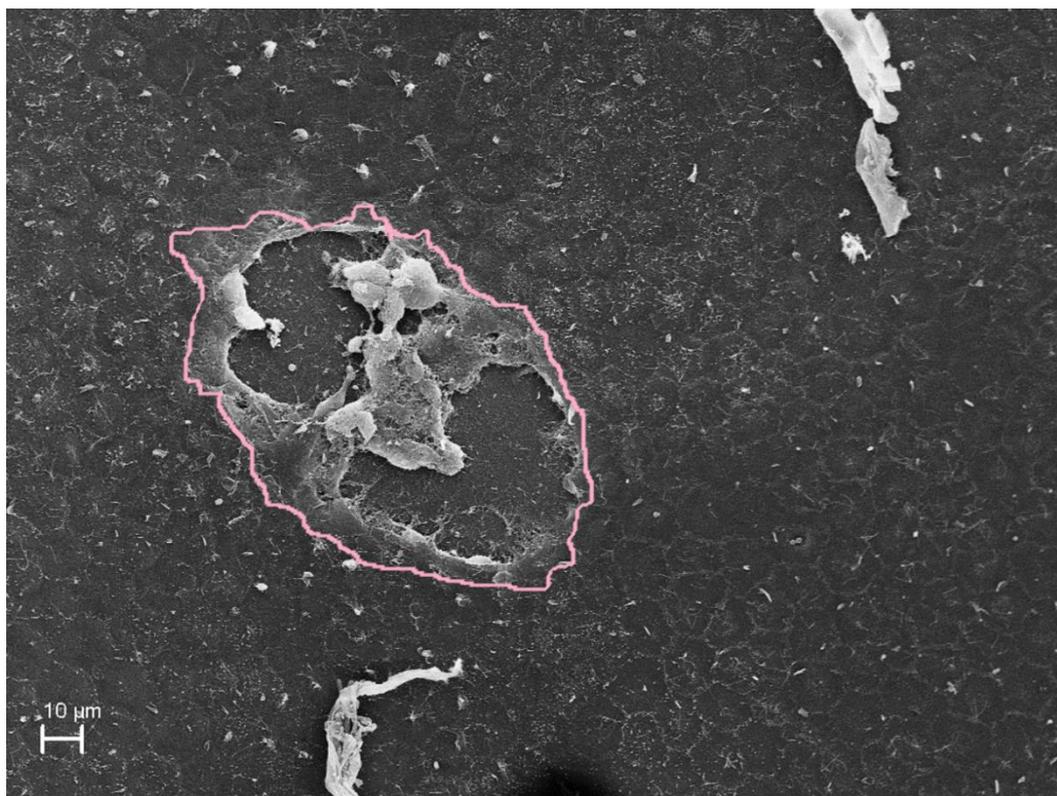


Figura 2 - Eletromicrografia de varredura do endotélio corneano de suíno obtida após a confecção do botão doador. Observa-se área com perda celular demarcada. Aumento original 1300 X; Barra = 10 μ m.

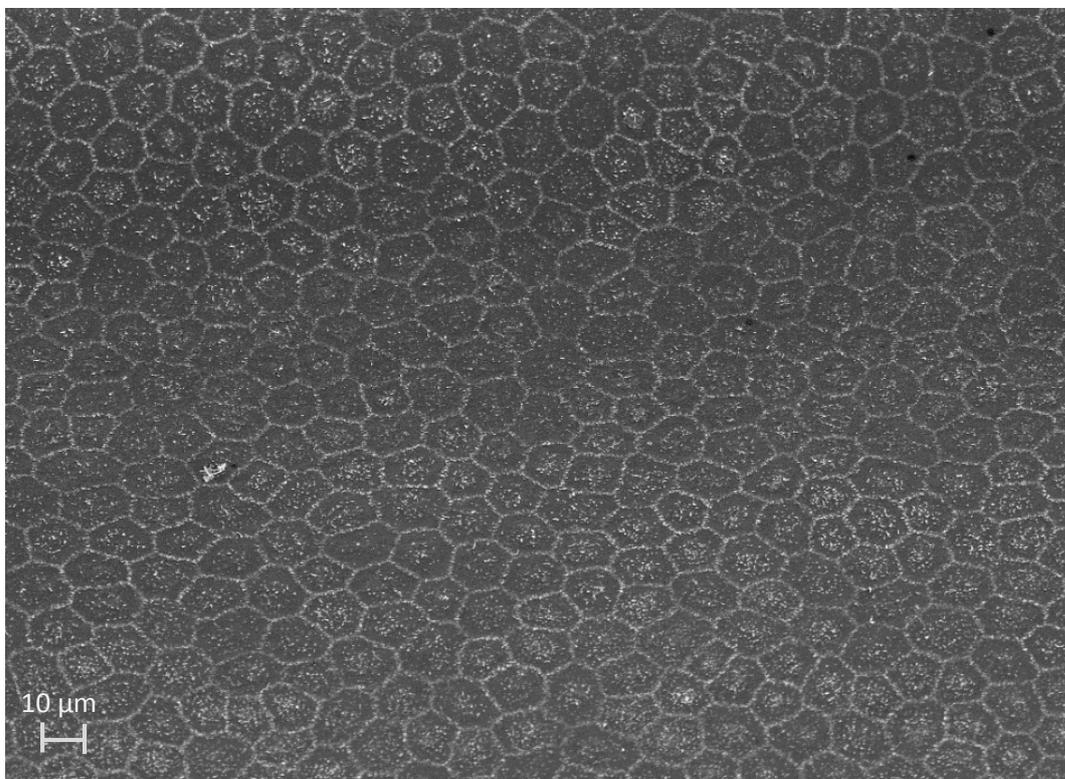


Figura 3 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo 1. Região endotelial sem perda celular. Aumento original de 1300 X; Barra = 10 μ m.

As eletromicrografias obtidas do grupo 2, (Figuras 4, 5 e 6) evidenciaram uma média de dano nas células endoteliais de 17,31%.

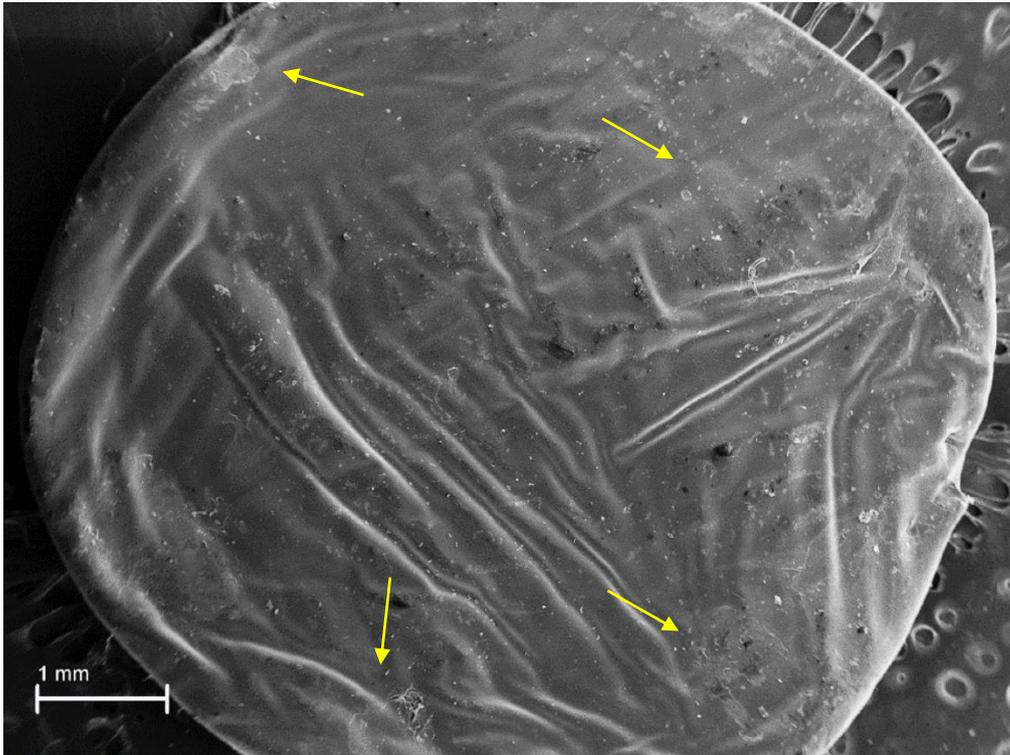


Figura 4 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suíno utilizada para avaliação do dano endotelial após a confecção e inserção do botão doador no grupo 2. Aumento original de 37 X; Barra = 1mm.

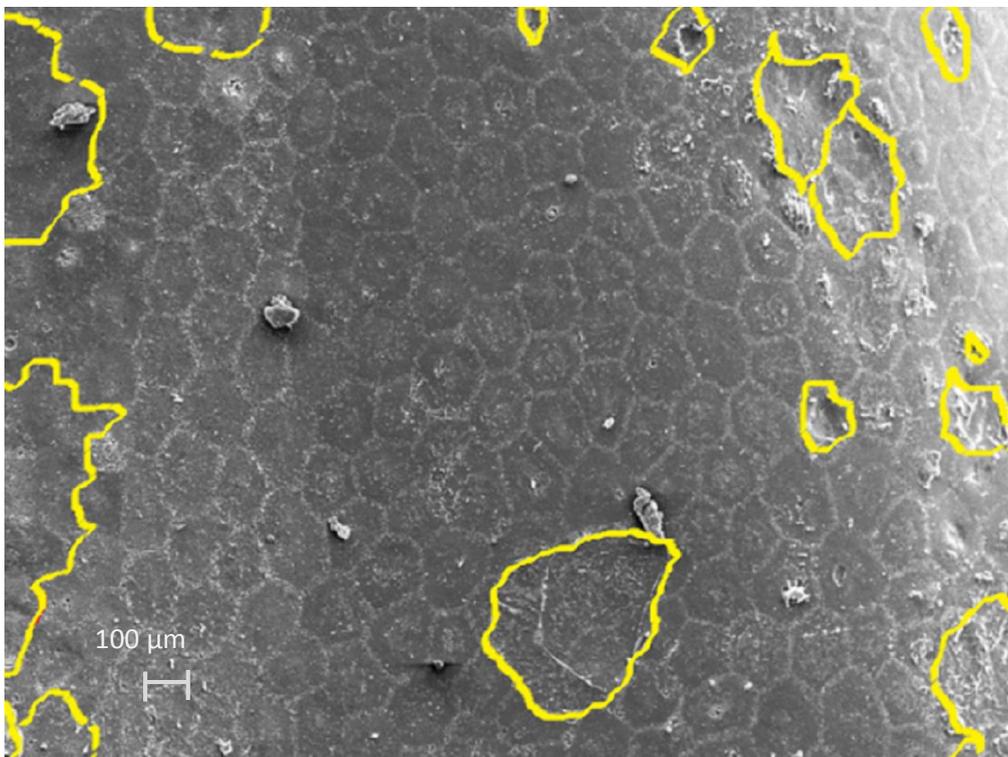


Figura 5 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suínos do G1. Observa-se área com perda celular demarcada Aumento original de 1300 vezes; Barra = 1mm

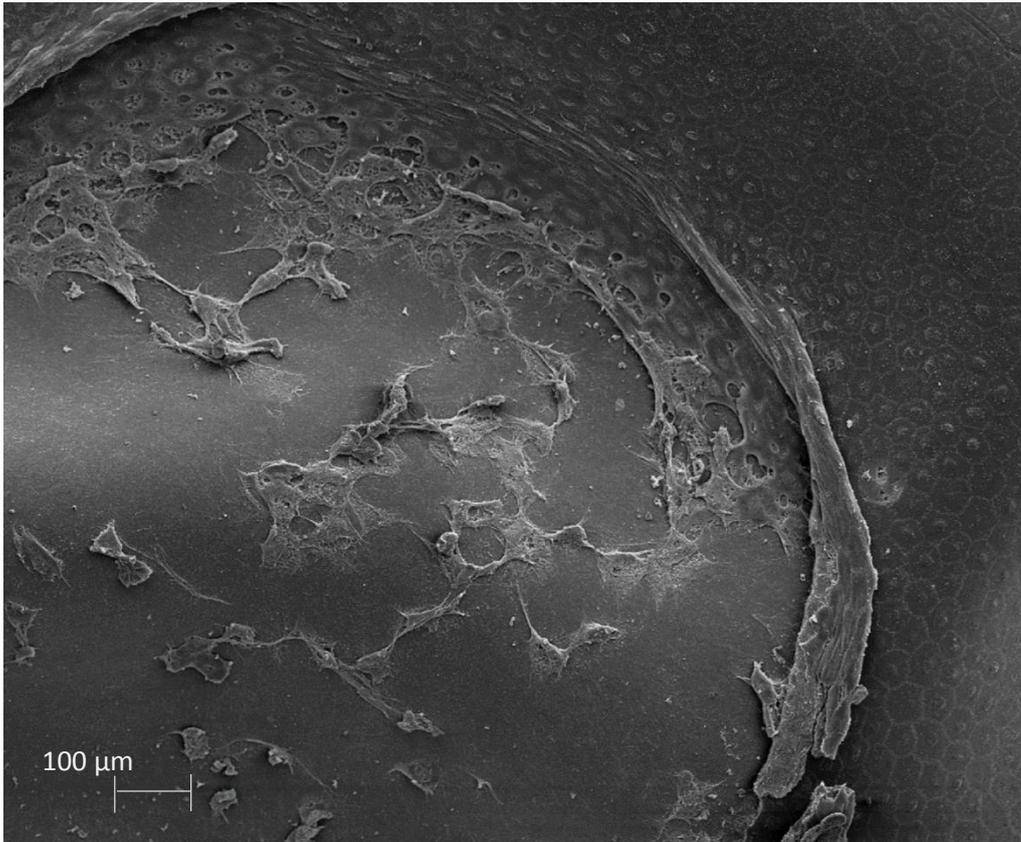


Figura 6 - Eletromicrografia eletrônica de varredura do endotélio da córnea de suíno do grupo 2 evidenciando áreas de desnudamento celular. Aumento original de 1300 X; Barra = 100 μm .

Discussão e conclusão

Os suínos tem sido amplamente empregados como modelo experimental no transplante córnea. Autores defendem que as semelhanças estruturais e comportamentais do endotélio da córnea de suínos possibilite que os resultados obtidos nessa espécie sejam transpostos em grande parte para humanos. Essas semelhanças fazem com que o suíno seja aceito como modelo experimental nos trabalhos científicos a respeito do transplante de córnea.¹⁴⁻¹⁸ Hwang & Kim (2009)¹⁹ apontaram que um fator negativo, diz respeito as córneas dos suínos serem levemente mais espessas do que as dos humanos, porém na sua pesquisa, considerou que essa diferença não interferiu nos resultados obtidos. Bulbos oculares de suínos também foram utilizados por Heichel¹⁷ e colaboradores no ano de 2011 para determinação da superfície de corte oferecida pelo aparelho *Femtosecond*. Os autores atentaram para o fato de que a córnea dessa espécie

mimetiza satisfatoriamente a córnea dos humanos, contudo, existem diferenças ultraestruturais como a camada de Bowman que torna a córnea de humanos mais rígida. Em virtude da córnea de suínos ser mais maleável, ela evidencia melhor as marcações dos cortes. O mesmo autor, em parceria com colaboradores em 2014¹⁸, utilizou novamente os suínos como modelo experimental quando objetivou avaliar a utilização de microceratótomo pendular em diferentes parâmetros de corte estromais. O respaldo da literatura, somado a critérios éticos da não necessidade de eutanásia dos animais especificamente para esse estudo, em conjunto com a facilidade de obtenção dos bulbos oculares, fez com que os suínos fossem o modelo experimental escolhido para realização desse trabalho.

A microscopia eletrônica de varredura é rotineiramente empregada para o estabelecimento da morfologia e da morfometria do endotélio da córnea de diferentes espécies.²⁰⁻²³ Muitos pesquisadores optaram pela sua utilização na análise da segurança de novas técnicas cirúrgicas no âmbito da oftalmologia.^{18,20-25} Aboalchamat e colaboradores²⁴ (1999), valeram-se da microscopia eletrônica de varredura em aumentos de 25X, 80X, 100X e 1000X ao estudarem as características morfológicas do endotélio da córnea de humanos após o transplante de células imortalizadas sobre a membrana de Descemt. Já em 1972, Dr. Polak²⁵ publicou o seu uso para análise da rejeição epitelial e endotelial da córnea transplantada em coelhos. Heichel e colaboradores¹⁸ (2013), utilizaram a microscopia eletrônica de varredura na córnea de suínos com ampliações de 14X, 40X e 200X para estudar as irregularidades ocasionadas no estroma corneano após a utilização de três mecanismos distintos de delaminação na cirurgia de DSAEK.

Hwang e Kim¹⁹ (2009) também optaram pela microscopia eletrônica de varredura para avaliação do dano endotelial na DSAEK após a utilização de três formas distintas de inserção do botão doador em bulbos oculares de suínos. A exemplo dos demais estudos, Hwang e Kim, utilizaram aumentos variados que incluíram ampliações de 25X, 35X, 150X, 1000X e 2000 X.

A ampliação e a possibilidade de avaliação ultraestrutural proporcionada por esse método fez com que a microscopia eletrônica de varredura fosse a metodologia de análise empregada no presente estudo.

Nesta pesquisa, assim como nos demais trabalhos, diferentes aumentos foram

utilizados para avaliação das amostras. O aumento de 37 X permitiu a visualização dos botões endoteliais na sua totalidade. Essa magnificação proporcionou a identificação das áreas danificadas e desprovidas de células endoteliais. Nas regiões onde observaram-se áreas com irregularidades no padrão endotelial, foram realizadas eletromicrografias com aumentos maiores, o que permitiu a confirmação da existência de perda endotelial. Nas regiões sem lesão, imagens com maiores aumentos proporcionaram a observação detalhada do mosaico endotelial.

A diminuição na atividade das células do endotélio ocasiona a perda da transparência da córnea comprometendo a visão. O transplante lamelar posterior é considerado o tratamento cirúrgico de eleição nos casos de falência endotelial^{6, 7, 8}. A DSEK tem como finalidade a substituição de um segmento da córnea doente contendo o estroma posterior, a membrana de Descemet e o endotélio pela mesma porção saudável de forma eficaz.^{7,8,10} A sua diferença em relação a DSAEK consiste que na DSEK a delaminação do estroma é realizada de forma manual⁶. A preparação do tecido doador na DSEK requer do cirurgião grande habilidade em microcirurgia além da utilização de instrumentais específicos.^{26,27} O preparo manual do botão doador acarreta maior tempo cirúrgico em relação a técnica automatizada.²⁸ Outra preocupação no procedimento não automatizado consiste no risco de perfuração do botão doador durante a delaminação manual do estroma.²⁹ Porém, devido ao alto custo para a obtenção do microceratótomo, a DSEK acaba sendo a opção de muitos cirurgiões, assim como ocorreu no trabalho publicado por Rice e colaboradores no ano de 2011.³⁰ Nesse artigo, os autores consideraram positivos os resultados obtidos após a realização da técnica de DSEK em 23 bulbos oculares de 20 pacientes durante os anos de 2006 e 2007 onde constataram a melhora visual em 81% dos pacientes.

No estudo apresentado, optou-se pela realização do procedimento de DSEK pela não disponibilidade do aparelho de microceratótomo. A perfuração ocular não ocorreu em nenhum dos 10 olhos delaminados. O tempo médio de preparo do botão doador incluindo a delaminação estromal, confecção do botão corneoescleral, trepanação central, separação do segmento posterior e posicionamento no introdutor de Busin foi de 13.5 minutos. Em decorrência dos valores de dano endotelial encontrado, acredita-se que esse tempo não tenha acarretado na perda celular.

Para diminuir o tempo transoperatório, existe a possibilidade do tecido doador

ser entregue já pronto ao cirurgião pelo Banco de Olhos. Estudos realizados por diferentes autores, demonstraram que o preparo do enxerto por um profissional não cirurgião, porém experiente, e o armazenamento por até 48 horas antes do uso não repercute em danos às células do endotélio.²⁸ Em estudo semelhante, Price e colaboradores (2008)³¹ realizaram a comparação entre os enxertos preparados por um banco de olhos e os enxertos preparados pelo cirurgião, como conclusão os autores não encontraram diferença em relação a perda das células endoteliais e aos resultados de acuidade visual. Porém, como o presente trabalho tem o objetivo de avaliar os danos ao endotélio nas diferentes etapas de manipulação do botão endotelial, foi imprescindível que todos os estágios do procedimento fossem realizados pelo mesmo cirurgião.

Entre as complicações do transplante lamelar posterior, deve ser mencionado o deslocamento do botão doador. Autores apontam uma taxa de aproximadamente 7% de deslocamento do enxerto quando o procedimento é realizado por um cirurgião experiente.³² Geralmente essa intercorrência ocorre em até duas semanas após a realização do procedimento cirúrgico, sendo que a principal causa apontada é a presença de fluido como o viscoelástico na interface de contato entre o leito receptor e o botão doador. O risco de rejeição do botão doador também requer atenção dos cirurgiões.²¹ No ano de 2007, Allan e colaboradores³³ apontaram que a rejeição no transplante posterior é menor quando comparado ao transplante penetrante. Porém, os pesquisadores alertam para o uso prolongado dos corticoesteróides nos pacientes que realizaram transplante lamelar endotelial. No entanto, como o presente estudo foi realizado utilizando bulbos oculares enucleados, essas duas variáveis não foram avaliadas.

O dano endotelial é considerado o melhor parâmetro para avaliação do sucesso cirúrgico no transplante posterior.¹⁹ A sobrevivência das células endoteliais pode ser comprometida em todas as etapas do procedimento cirúrgico, incluindo, desde a coleta do bulbo ocular, o preparo do botão doador, a inserção do mesmo no leito receptor e a condução pós-operatória.²⁰ Nessa pesquisa, comparou-se a perda das células endoteliais em dois momentos distintos do transplante lamelar posterior realizando a técnica de DSEK.

O primeiro momento de avaliação foi imediatamente após a confecção do botão doador e o segundo após a inserção do enxerto na câmara anterior utilizando o

introdutor de Busin. A média da perda endotelial obtida após a confecção manual do botão doador foi de 8,41%. Já a perda endotelial média calculada após a introdução do botão endotelial no leito receptor foi de 17,31%. Esses valores se assemelham aos encontrados em um estudo onde foi avaliado o dano endotelial após a utilização de três métodos distintos para inserção do botão doador também em bulbos oculares de suínos.¹⁹ No trabalho de Kwang e Kim (2009), a média do dano endotelial foi de 17% com a técnica do Taco, 17,3% utilizando uma pinça e de 18,8 valendo-se de um fio de sutura.

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram por intermédio da análise estatística que a etapa de introdução do botão endotelial no leito receptor utilizando a guia de Busin ocasionou maior perda endotelial quando comparado ao momento de confecção do botão doador. É importante ressaltar que ao mesmo tempo em que as técnicas de transplante endotelial apresentam como grande vantagem a pequena incisão de córnea, elas exigem que o botão endotelial seja dobrado para sua inserção, o que resulta em manipulação e trauma endotelial adicional.²⁷ A preocupação com o dano endotelial no momento da inserção tem sido o tema de muitos estudos. Koenig e Covert³⁴ (2007) demonstraram que uma diminuição de 5mm para 3mm no tamanho da incisão de córnea para inserção do botão doador, aumenta consideravelmente os danos endoteliais em virtude da manipulação extra ao tecido.

Na tentativa de minimizar o trauma endotelial, cirurgiões, pesquisadores e empresas desenvolveram diferentes técnicas e instrumentais para a introdução do botão doador no leito receptor, sendo que o enxerto pode ser inserido e/ou puxado para o interior da câmara anterior.²⁹

O instrumental de Busin foi idealizado com o intuito de evitar a dobra do endotélio ao meio como ocorre a exemplo da técnica do “Taco”, da utilização de fio de sutura ou de agulha. Outra preocupação na sua concepção foi proporcionar que o endotélio deslizesse facilmente e consigisse se desenrolar espontaneamente quando introduzido na câmara anterior sendo o menos traumático possível.^{12, 35}

GANGWANI; OBI; HOLLICK³⁶ (2012) publicaram um estudo comparativo entre a utilização do injetor de Busin e do EndoGlide. Nessa ocasião, os autores encontraram uma perda de células significativamente maior utilizando o Busin, cerca de 40% em relação ao EndoGlide onde obtiveram perda de aproximadamente 25%.

Contudo, esses valores foram contestados por Busin que justificou esse alto percentual de perda celular devido à falha na realização do procedimento cirúrgico pelos cirurgiões do estudo.³⁷ Essa grande perda endotelial também contradiz os resultados encontrados por Chen e colegas em 2009³⁸ que compararam a perda endotelial ao introduzir o botão doador utilizando o Busin em relação a técnicas que realizassem a dobragem 60/40 do botão endotelial. A perda encontrada pelos autores nesse estudo foi de 26% após 6 meses do procedimento. Em uma pesquisa semelhante, Metha e colaboradores 2009³⁹ avaliaram o dano endotelial existente em diferentes técnicas de inserção do tecido doador na DSAEK. Nesse trabalho Metha e colaboradores encontraram uma perda de 25,3% das células endoteliais após 6 meses da utilização do introdutor de Busin. Esse pequeno dano endotelial ocasionado pelo introdutor de Busin foi o mesmo encontrado em estudos de demais autores como o de Bahar e colaboradores em 2009⁴⁰ e de Price e associados em 2010.⁴¹

No presente estudo, optou-se pelo uso do introdutor de Busin. Esse instrumental cirúrgico mimetiza um funil com a finalidade do perfeito deslizamento do botão doador até a câmara anterior. Ele é constituído por um tubo oco no qual o tecido doador é posicionado com a face endotelial voltada para o exterior ficando o estroma em contato com a parede de deslizamento. No momento da introdução do enxerto, o instrumental é girado 180° e posicionado com o endotélio voltado para baixo. O inseridor é ancorado na margem da incisão de córnea e utilizando uma pinça de controle distal inserida em uma incisão auxiliar o botão endotelial é deslizado para dentro da câmara anterior. O instrumental Busin tem como vantagem eliminar o trauma ocasionado pela compressão da pinça e pelo contato endotélio-endotélio presente na técnica do “taco”.⁴⁰ Nos estudos publicados, os autores atribuíram o baixo índice de perda endotelial ao fato de que o endotélio não é dobrado ao meio como nas técnicas que utilizam pinças, fórceps e agulhas.³⁸⁻⁴⁰

No presente trabalho, optou-se pela utilização do introdutor de Busin devido aos bons resultados reportados na literatura, pela facilidade de manuseio do instrumental e também pela disponibilidade de aquisição do mesmo.

Com presente estudo, nas condições experimentais realizadas foi possível concluir que a inserção do botão doador induziu maiores danos ao endotélio corneano de suínos, comparativamente à sua confecção.

Referências

1. Abib FC. Microscopia especular de córnea: Manual e atlas. Rio de Janeiro, Rio Med. Livros, 2000.
2. Abib FC, Barreto JR. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. J Cataract Refract Surg 2001; 27:1574-1578.
3. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. Arch Ophthalmol 1979; 97: 1714-1719.
4. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF. et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. Invest Ophthalmol Vis Sci 1985; 26:443-449.
5. Nita M, Strzałka-Mrozik B, Grzybowski A. Ophthalmic transplantology: Anterior segment of the eye - Part I. Med Sci Mon 2012; 18: 64-72.
6. Young AL. et al. A new era in corneal transplantation: paradigm shift and evolution of techniques. Hong Kong Med J 2012; 18:509-516.
7. Price MO, Price FW. Descemet's stripping endothelial keratoplasty. Curr Opin Ophthalmol 2007;18:290-294.
8. Price MO, Price FW Jr. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. Ophthalmol 2006;113:1936-1942.
9. Terry MA, Ousley PJ. Small-incision deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): six month results in the first prospective clinical study. Cornea 2005; 24: 59-65.
10. Terry MA, Chen ES, Shamie N, et al. Endothelial cell loss after Descemet's stripping endothelial keratoplasty in a large prospective series. Ophthalmol 2008;115:488-496.
11. Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, et al. Comparison of posterior lamellar keratoplasty techniques to penetrating keratoplasty. Ophthalmol 2008; 115: 1525-1533.
12. Busin M, Bhatt PR, Scorcia V. A modified technique for Descemet membrane stripping automated endothelial keratoplasty to minimize endothelial cell loss. Arch Ophthalmol 2008; 126: 1133-1137.
13. Balachandran C, Ham L, Birbal RS, et al. Simple technique for graft insertion in Descemet-stripping (automated) endothelial keratoplasty using a 30-gauge needle. J Cataract Refract Surg 2009; 35: 625-628.
14. Nicholls S, Bailey M, Mitchard L. et al. Can the corneal endothelium of the pig proliferate in vivo? Acta Ophthalmol 2009; 87: 0.
15. Neronov A, Giurov P, Cholakova M. et al. Cryoprotection of porcine cornea: a scanning electron microscopy study. Vet. Med 2005; 5: 219-224.

16. Fujita M, Mehra R, Lee SE. et al. Comparison of Proliferative Capacity of Genetically-Engineered Pig and Human Corneal Endothelial Cells. *Ophthalmol Res* 2013; 49:127-138.
17. Heichel J, Blum M, Duncker GI. et al. Sietmann R, Kunert KS. Surface quality of porcine corneal lenticules after femtosecond lenticule extraction. *Ophthalmic Res* 2011; 46:107-112.
18. Heichel J, Wilhelm F, Kunert KS. et al. Influence of microkeratome parameters on the stromal bed and flap edge quality in laser in situ keratomileusis. *Clin Ophthalmol* 2013; 8:61-69.
19. Hwang H, Kim M. Endothelial Damage of a Donor Cornea Depending on the Donor Insertion Method During Descemet- Stripping Automated Endothelial Keratoplasty in Porcine Eyes. *Jpn J Ophthalmol* 2009;53:523-553.
20. Pigatto JAT, Andrade MC, Laus JL. et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of *Yacare caiman* (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Vet Ophthalmol* 2004; 7: 205-208.
21. Pigatto JAT. Abib FC, Pizzeti JC. et al. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci Vet* 2005; 33:41-45.
22. Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM et al. Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Zoo Wildl Med* 2005; 36:702-705.
23. Pigatto JAT, Franzen AA, Quartierro F. et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciencia Rural* 2009; 39: 926-929.
24. Aboalchamat B, Engelmann K, Bonhke M. Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial after transplantation. *Exp Eye Res* 1999; 69:547-553.
25. Polack FM. Scanning electron microscopy of corneal graft rejection: Epithelial rejection, endothelial rejection, and formation of posterior graft membranes. *Invest Ophthalmol* 1972; 11: 1-11.
26. Khor WB, Mehta JS, Tan TD. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty with a graft insertion device: surgical technique and early clinical results. *Am J Ophthalmol* 2011; 151: 223-232.
27. Rose L, Clare K, Albert S. et al. Endothelial keratoplasty: historical perspectives, current techniques, future directions. *Can J ophthalmol* 2009; 44: 401-405.
28. Rose L, Briceno CA, Stark WJ. et al. Assessment of eye bank-prepared posterior lamellar corneal tissue for endothelial keratoplasty. *Ophthalmol* 2008; 115:279-286.
29. Daneshgar F, Ziagarib H. Review of posterior lamellar keratoplasty techniques. *J Transplant Technol Res* 2011; 7:1-8.
30. Rice A, Spokes DM, Anand S. et al. Endothelial cell survival and graft profile analysis in Descemet stripping endothelial keratoplasty 2011; *Cornea*; 30: 865-871.

31. Price MO, Baig KM, Brubaker JW, Price FW, Jr. Randomized, prospective comparison of precut vs surgeon-dissected grafts for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008;146:36–41.
32. Price FW, Jr., Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg* 2006;32:411-418.
33. Allan BD, Terry MA, Price FW. et al. Corneal transplant rejection rate and severity after endothelial keratoplasty. *Cornea* 2007;26:1039-1042.
34. Koenig SB, Covert DJ. Early results of small-incision Descemet's stripping and automated endothelial keratoplasty. *Ophthalmol* 2007;114:221-226.
35. Busin M, Bhatt PR, Scorcia V. A modified technique for descemet membrane stripping automated endothelial keratoplasty to minimize endothelial cell loss. *Arch Ophthalmol* 2008; 126:1133-1137.
36. Gangwani VA, Obi E, Hollick J. A prospective study comparing EndoGlide and Busin Glide insertion techniques in descemet stripping endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2012; 153: 138-143.
37. Busin M, Scorcia V. A prospective study comparing EndoGlide and Busin Glide insertion techniques in descemet stripping endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2012; 154: 416-417.
38. Cheen ES, Shamie N, Terry MA. et al. Busin Glide vs forceps in Descemet stripping endothelial keratoplasty: not all forceps insertions are created equal. *Am J Ophthalmol* 2009; 148:175-176.
39. Mehta JS, Por YM, Poh R, et al. Comparison of donor insertion techniques for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 2008;126:1383-138.
40. Bahar I, Kaiserman I, Sansanayudh W. et al. Levinger E, Rootman DS. Busin guide vs forceps for the insertion of the donor lenticule in Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2009;147:220-226.
41. Price MO, Gorovoy M, Benetz BA, et al. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty outcomes compared with penetrating keratoplasty from the Cornea Donor Study. *Ophthalmol* 2010;117:438-444.

4 Considerações finais

- Foi possível com a microscopia eletrônica de varredura avaliar e comparar a perda celular endotelial após a realização de duas etapas distintas do DSEK em bulbos oculares de suínos;
- Perdas celulares ocorreram no botão doador e variaram de acordo com o grupo estudado;
- A manipulação para implante do botão doador suscitou maiores danos ao endotélio corneano, comparativamente à sua criação;
- Espera-se que a metodologia apresentada possa ser útil na orientação de futuras pesquisas na área do transplante posterior de córnea.

REFERÊNCIAS

- ABIB, F.C. In: **Microscopia especular de córnea: manual e atlas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 2000, p.140.
- ABIB, F.C.; BARRETO, J.R. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.27, p.1574-78, 2001.
- ABOALCHAMAT, B.; ENGELMANN, K.; BONHKE, M. Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial after transplantation. **Experimental Eye Research**, v.65, n.9, p.547-553,1999.
- ACAR, T.B. *et al.* Endothelial cell loss after phacoemulsification in eyes with previous penetrating keratoplasty, previous deep anterior lamellar keratoplasty, or no previous surgery. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.37, n.11, p. 2013–2017,2011.
- ALLAN, B.D. *et al.* Corneal transplant rejection rate and severity after endothelial keratoplasty. **Cornea**, v26, n.9, p.1039-1042, 2007.
- ANDREW *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p.479-482, 2001.
- ANDREW, S.E; WILLIS A.M. & ANDERSON, D.E. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.326-329, 2002.
- ANWAR M.; TEICHMAN, K.D. Big-bubble technique to bare Descemet' membrane in anterior lamellar keratoplasty. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.28, n.3, p.398-403, 2002.
- ARDJOMAND, N.; HAU, S.; McALISTER, J.C. Quality of vision and graft thickness in deep anterior lamellar and penetrating corneal allografts. **American Journal Ophthalmology**, v.143, n.2, p.228-235, 2007.
- AZAR, D.T. *et al.* Microkeratome-assisted posterior keratoplasty. **Journal of cataract and Refractive Surgery**, v.27, n.2, p.353-356, 2001.
- BAHAR, I. *et al.* Comparison of posterior lamellar keratoplasty techniques to penetrating keratoplasty. **Ophthalmology**, v.115, n.2, p.1525-1533, 2008.
- BAHAR, I.; KAISERMAN, I.; SANSANAYUDH, W. Busin Guide vs Forceps for the insertion of the donor lenticule in descemet stripping automated endothelial keratoplasty. **American Journal Ophthalmology**. v. 147, n.2, p.220-226, 2009.
- BALACHANDRAN, C. *et al.* Simple technique for graft insertion in Descemet-stripping (automated) endothelial keratoplasty using a 30-gauge needle. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.35, n.4, p.625-628, 2009.
- BOURNE, W.M.; HODGE, D.O.; NELSON, L.R. Corneal endothelium five years after transplantation. **American Journal Ophthalmology**, v.118, n.2, p.185-196, 1994.

- BOURNE, W.M. Cellular changes in transplanted human corneal. **Cornea**, v.20, n.6, p. 560-569, 2001.
- BRANDÃO, C.V.S. *et al.* Mensuração da espessura corneana em ovinos com paquimetria ultra-sônica e microscopia especular de não contato. **Archives Of Veterinary Science** v. 11, n.2, p.76-77,2006.
- BRUINSMA, M. *et al.* Are polymegethism, pleomorphism and “poor swelling” valid discard parameters in immediate postmortem evaluation of human corneal endothelium. **Cornea**, v.32, n.3, p. 285-289, 2013.
- BUSIN, M.; ARFFA, R.C.; SEBASTIANI, A. Endokeratoplasty as an alternative to penetrating keratoplasty for the surgical treatment of diseased endothelium: initial results. **Ophthalmology**, v.107, n.11, p.2077-2082, 2000.
- BUSIN, M.; BHATT, P.R.; SCORCIA, V. A modified technique for Descemet membrane stripping automated endothelial keratoplasty to minimize endothelial cell loss. **Archives of Ophthalmology**, v.126, n.8, p.1133-1137, 2008.
- BUSIN, M.; SCORCIA, V. A prospective study comparing EndoGlide and Busin Glide insertion techniques in descemet stripping endothelial keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology**, v.154, n.2, p.416-417, 2012.
- CAVANAGH, H.D. *et al.* Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. **Cornea**, v.19, n.5, p.712-722, 2000.
- CHEEN, E.S.*et al.* Busin Glide vs forceps in Descemet stripping endothelial keratoplasty: not all forceps insertions are created equal. **American Journal of Ophthalmology**, v.148, n.1, p.175-176, 2009.
- CHENG, YY. *et al.* Corneal endothelium viability after femtosecond laser preparation of posterior lamellar discs for Descemet-stripping endothelial keratoplasty. **Cornea**, v.26, n. 9, p118-1122, 2007.
- CHENG, Y.Y. *et al.* Histologic evaluation of human posterior lamellar discs for femtosecond laser Descemet’s stripping endothelial keratoplasty. **Cornea**, v.28, n.1, p.73-79, 2009.
- CHENG, Y.Y. *et al.* Efficacy and safety of femtosecond laser-assisted corneal endothelial keratoplasty: a randomized multicenter clinical trial. **Transplantation**, v.88, n. 11, p. 1294-1304, 2009.
- CHIOU, A.G.Y. *et al.* Clinical corneal confocal microscopy. **Diagnistical and Surgical Techniques**, v.51, n.5, p. 482-501, 2006.
- COLIN, S.P.; COLLIN, H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. **Clinical and Experimental Optometry**, v.81, n.6, p. 245-256, 1998.
- CULBERTSON, W.W. Endothelial replacement: flap approach. **Ophthalmology Clinical of North America**, v.16, n.1, 113-118,2003
- DANESHGAR, F; ZIAGHARIB, H. Review of posterior lamellar keratoplasty techniques. **Journal Transplant Technologie Research**, v.7, n.2 p.1-8, 2011.

DAWSON, D.G. *et al.* Ex Vivo Confocal Microscopy of Human LASIK Corneas with Histologic and Ultrastructural Correlation. **Ophthalmology**, v.112, n.4, p.634-644, 2005.

DOUGHTY M.J. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium ex vivo. **Tissue and Cell**, v.30, p.634-643, 1998.

EDELHAUSER, H.F. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. **Cornea** v.19, n.3 p.263-273, 2000.

FARIAS, R.J.M. *et al.* Evaluation of corneal tissue by slit lamp and specular microscopy during the preservation period. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, vol.70, n.1, p.79-83, 2007.

FLYNN TH, O.M. *et al.* Use of ultrasonic pachymetry for measurement of changes in corneal thickness in mouse corneal transplant rejection. **The British Journal of Ophthalmology**, v.94, n.3, 368-371, 2010.

FRANZEN, A. *et al.* Use of microscope specular to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cats. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.4, p.222-226, 2010.

FUJITA, M. *et al.* Comparison of Proliferative Capacity of Genetically-Engineered Pig and Human Corneal Endothelial Cells. **Ophthalmic Research**, v.49, n.3, p.127-138, 2013.

GALERA, P.D.; LAUS, J.L.; ORIÁ, A.P. Afecções da túnica fibrosa. **In: Oftalmologia clínica e cirurgia em cães e gatos**. São Paulo: Roca; 2009. p. 69-97.

GANGWANI, V.A.; OBI, E.; HOLLICK, J. A prospective study comparing EndoGlide and Busin Glide insertion techniques in descemet stripping endothelial keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology**, v.153, n.1, p.138-143, 2012.

GILGER, B.C. *et al.* Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.2, p.228-230, 1993.

GOROVOY, MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. **Cornea**, v.25, n.8, p.886-889, 2006.

Grupo estudo de acompanhamento transplante de cornea. Donor Age and Corneal Endothelial Cell Loss 5 Years after Successful Corneal Transplantation Specular Microscopy Ancillary Study Results. **Ophthalmology**, v. 115, n.4, p.627-632, 2008.

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

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.

HEICHEL, J. *et al.* Surface quality of porcine corneal lenticules after femtosecond lenticule extraction. **Ophthalmic Research** v.46, n.2, p.107-112, 2011.

HEICHEL J, WILHELM F, KUNERT KS. *et al.* Influence of microkeratome parameters on the stromal bed and flap edge quality in laser in situ keratomileusis. **Clinical Ophthalmology**, v.8, p.61-69, 2013.

HOLLINGSWORTH, J. *et al.* A population study of the normal cornea using an *in vivo* slit-scanning confocal microscope. **Optometry & Visual Science**, v.78, p.706-711, 2001.

HWANG H, KIM M. Endothelial Damage of a Donor Cornea Depending on the Donor Insertion Method During Descemet- Stripping Automated Endothelial Keratoplasty in Porcine Eyes. **Japanese Journal Ophthalmology**, v.53, n.5, p.523-553, 2009.

IDE, T. *et al.* Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty: effect of inserting forceps on DSAEK donor tissue viability by using an *in vitro* delivery model an vital dye assay. **Cornea**, v.26, n.9, p.1079-1081, 2007.

IGNACIO, T.S. *et al.* A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. **American Journal of Ophthalmology**, v.139, n.2, p.325-330, 2005.

INOUE, K.; YAMASAKI, K. Ultrastructural Changes in the Rat Corneal Endothelium Preserved at Low Temperature. **Yonago Acta Medica**, v.44, n.2, p.17-24, 2001.

INOUE, K. *et al.* Risk factors for corneal graft failure and rejection in penetrating keratoplasty. **Acta Ophthalmologica Scandinavica** v.79, n.3, p.251-255, 2001.

JONUSCHEIT, S. *et al.* *In vivo* confocal microscopy of the corneal endothelium: comparison of three morphometry methods after corneal transplantation. **Eye**, v.25, n.9, p.1130-1137, 2011.

JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.22, p.359-389, 2003.

JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, v.95, n.1, p.16-23, 2012.

KAFARNICK, C.; FRISTSCHKE, J.; REESE, S. *In vivo* confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n.4, p.222-230, 2007.

KAUFMAN, S.C. *et al.* Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. **Ophthalmology**. v.111, n.2, p.396-406, 2004.

KERN, T.J. Diseases of the cornea and sclera. **In: Saunders Manual of Small Animal Practice**. 3 ed. Pennsylvania : WB Saunders , 1994, cap. 11, p. 1197- 1207.

KHOR, W.B. *et al.* Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty With a Donor Insertion Device: Clinical Results and Complications in 100 Eyes. **American Journal Ophthalmology**, v.156, n.4, p. 773-779, 2013.

KLAIS, C.M.C.; BÜHREN, J.; KOHNEN, T. Comparison of endothelial cell count using confocal and contact specular microscopy. **Ophthalmologica**, v. 272, n.2, p.99-

103, 2003.

KO, W. *et al.* Experimental posterior lamellar transplantation at the rabbit cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 34 (Suppl):1102S, 1993.

KOENIG, S.B.; COVERT, D.J. Early results of small-incision Descemet's stripping and automated endothelial keratoplasty. **Ophthalmology**, v.114, n.2, p.221-226, 2007.

KUBALOGLU, A. *et al.* Corneal endothelium after deep anterior lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty for keratoconus: A four-year comparative study. **Indian Journal Ophthalmology**, v.60, n.1, p.35-40, 2012.

LAING, R.A.; SANDSTROM, M.M.; LEIBOWITZ, H.M. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. **Archives Of Ophthalmology**, v.93, n. 2, p. 143-145, 1975.

LAING, R.A.; SANDSTROM, M.M.; LEIBOWITZ, H.M. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. **Archives of Ophthalmology**, v.97, n.9, p.1714-1719, 1979.

LEIBOWITZ, H.M.; LAING, R.A. **Specular microscopy**. In: Leibowitz HM, ed, Corneal Disorders; Clinical Diagnosis and Management. Philadelphia, PA, WB Saunders, 1984; 123-163.

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.

MAU, K. What DSAEK is going on? An alternative to penetrating keratoplasty for endothelial dysfunction. **Optometry**, v.80, n.9, p. 513-523, 2009.

MEANS, T.L. *et al.* Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. **Archives of Ophthalmology**, v.113, n.6, p.805-809, 1995.

MELLES, G.R.J. *et al.* Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. **American Journal Ophthalmology**. v.127, n.6, p.340-341, 1999.

MELLES, G.R.J. *et al.* A new surgical technique for deep stromal, anterior lamellar keratoplasty. **British Journal of Ophthalmology**, v.83, n.3, p.327-333, 1999.

MELLES, G.R.; LANDER, F.; RIETVELD, FJ. Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. **Cornea**, v.21, n.8, p.415-418, 2002.

MELLES, G.R.; WIJDH, R.H.; NIEUWENDAAL, C.P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). **Cornea**, 23, n.3, p.286-288, 2004.

MEHTA, J.S. *et al.* Comparison of donor insertion techniques for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. **Archives of Ophthalmology**, v.126, n.2, p.1383-1388, 2008.

MILLER, WW. Evaluation and management of corneal ulcerations: A systematic approach. **Clinical Techniques Small Animal Practice**, v.6, n.1, p.51-57, 2001.

MISHIMA, S. Clinical investigations on the corneal endothelium. **American Journal of**

Ophthalmology, v.93, n.1, p.1-29, 1982.

MURPHY, C. *et al.* Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.25, p.312-322, 1984.

NERONOV, A. *et al.* Cryoprotection of porcine cornea: a scanning electron microscopy study. **Veterinary Medical**, v. 50, n.5: 219-224, 2005.

NICHOLLS, S. *et al.* Can the corneal endothelium of the pig proliferate in vivo? *Acta Ophthalmol* Nicholls S, Bailey M, Mitchard L2, *et al.* Can the corneal endothelium of the pig proliferate in vivo? **Acta Ophthalmologica**, v.87, s244, p.0, 2009.

NITA, M. *et al.* Ophthalmic transplantology: Anterior segment of the eye – Part I. **Medical Science Monitor**, v.18, n.5, p.64-72, 2012.

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

OLAFSDOTTIR, E. Making the transition from PK to DSEK: Experiences during the learning curve. **Acta Ophthalmologica**, v.89, p.290-292, 2011.

OLIVEIRA, F.; MOTTA, A.C.O.; MUCCIOLI, C. Corneal specular microscopy in infectious and noninfectious uveitis. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v.72, n.4, p.457-461, 2009.

PADILLA, M.D.; SIBAYAN, S.A.; GONZALES, C.S. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Filipino eyes. **Cornea**, v.23, n.2, p.129-135, 2004.

PARK, S. Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelial Cells. **Cornea**, v.31, n.12, p.476-479, 2012.

PARK, S. *et al.* Effect of Intracameral Bevacizumab Injection on Corneal Endothelium in Rabbits. **Cornea**, v.27, n.10, p.1151-1155, 2008.

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

PÉREZ-RICO, C. *et al.* Effect of topical 0.05% cyclosporine A on corneal endothelium in patients with dry eye disease. **International Journal Ophthalmology**. v.18, n.4, p.471-474, 2013.

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

PIGATTO, J.A.T. *et al.* Morphometric analysis of the corneal endothelium of rabbits using scanning electron microscopy. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.41-45, 2005a.

PIGATTO, J.A.T. *et al.* Corneal endothelium of the Magellanic penguin (*Spheniscus Magellanicus*) by scanning electron microscopy. **Journal of Zoo and Wildlife**

Medicine, v.36, n.5, p.702-705, 2005b.

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

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

PIPPI, N.L.; GONÇALVES, G.F.; Anatomofisiologia ocular. **In: Oftalmologia Clínica e Cirurgia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca; 2009. p. 01-10.

POLACK, F.M. Scanning electron microscopy of corneal graft rejection: Epithelial rejection, endothelial rejection, and formation of posterior graft membranes. **Investigative Ophthalmology**, v.11, n. 1, p. 1-11, 1972.

POWER, W.J.; NEVES, R.A. Anatomia e Fisiologia da Córnea. In: BELFORT Jr, R. & KARA-JOSE, N. **Córnea Clínica Cirúrgica**. São Paulo: Roca, 2005, cap.1, p. 3-15.

PRICE, F.W.; PRICE, M.O. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 50 eyes: a refractive neutral corneal transplant. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.21, n.4, p. 339-345, 2005.

PRICE, M.O.; PRICE, F.W. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. **Ophthalmology**, v.113, n.11, p.1936-1942, 2006.

PRICE, M.O.; PRICE, F.W. Descemet's stripping endothelial keratoplasty. **Current Opinion in Ophthalmology**, v.18, n.4, p.290-294, 2007

PRICE, O.M.; PRICE, F.W. Endothelial Cell Loss after Descemet Stripping with Endothelial Keratoplasty Influencing Factors and 2-Year Trend. **Ophthalmology**, v.115, n.5, p.857-865, 2008.

PRICE, M.O. *et al* Descemet's membrane endothelial keratoplasty: Prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival. **Ophthalmology**, v.116, n. 12, p. 2361-2368, 2009.

PRICE, M.O. *et al.* Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty outcomes compared with penetrating keratoplasty from the Cornea Donor Study. **Ophthalmology**, v.117, n.3, p.438-444, 2010.

PRICE, M.O.; FAIRCHILD, K.M.; PRICE, F.W. Comparison of manual and automated endothelial cell density analysis in normal eyes and DSEK eyes. **Cornea**, v.35, n.5, 567-573, 2013.

RANZANI, J.J.T. *et al.* Espessura corneana mensurada pelo paquímetro ultra-sônico e pelo microscópio especular Topcon SP-2000P em gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.356-358, 2008.

REALINI, T.; LOVELACE, K. Measuring central corneal thickness with ultrasound pachymetry. **Optometry Vision Science**, v.80, n.6, 437 - 439, 2003.

- RICE, A. et al. Endothelial cell survival and graft profile analysis in Descemet stripping endothelial keratoplasty. **Cornea**, v.3, n.2, p.865-871, 2011.
- 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.
- ROSE, L. et al. Endothelial keratoplasty: historical perspectives, current techniques, future directions. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 44, n.4, p.401-405, 2009.
- ROSE, L. et al. Assessment of eye bank-prepared posterior lamellar corneal tissue for endothelial keratoplasty. **Ophthalmology**, v.115, n.2, p.279-286, 2008.
- SAAD, H.A. *et al.* An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. **Cornea**, v.27, n.7, p.818-824, 2008.
- SAILSTAD, D.M.; PEIFFER, R.L. Specular microscopic observation of the corneal endothelium in the normal rabbit. **Laboratory Animals**, v.15, p.393-395, 1981.
- SAMUELSON, P. 2011. Córnea. In_____ **Tratado de Histologia Veterinária**. London: Elsevier Editora Ltda, 2011, cap.20, p. 487-491.
- SANCTIS, U. *et al.* Corneal endothelial evaluation with 2 noncontact specular microscopes and their semiautomated methods of analysis. **Cornea**, v.25, n.5, p.501-506, 2006.
- SANCTIS, U. *et al.* Graft central thickness measurement by rotating Scheimpflug camera and ultrasound pachymetry after penetrating keratoplasty. **Ophthalmology**, 2007 v.114, n.8, p.1461-1468, 2007.
- SEITZ, B. *et al.* Nonmechanical posterior lamellar keratoplasty using the femtosecond laser (femto-plak) for corneal endothelial decompensation. **American Journal of Ophthalmology**, v.136, n.4, p. 769-772, 2003.
- SHENG, H.; BULLIMORE, M.A.M. Factors affecting corneal endothelial morphology. **Cornea**, v.26, n.4, p.520-525, 2007.
- SILVA, M.R.B.; APARECIDA GREGÓRIO, E.A. Toxicidade da mitomicina C ao endotélio da córnea de coelhos. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v.72, n.2, p.152-158, 2009.
- SINGH, G. *et al.* Vital staining of corneal endothelium. **Cornea**, v.4, n.2, p.80-89, 1985.
- SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p.283-338.
- SPENCE, D.J; PEIMAN, G.A. A new technique for the vital staining of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.15, n.7, p.1000-1002.
- STADES, F.C. et al. Córnea e esclera. In. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 10, p.107-126.
- SVEDBERGH, B.; BILL, A. Scanning electron microscopy studies of the corneal endothelium in man and monkeys. **Acta Ophthalmologica**, v.50, n.3, p.321-335, 1972.

SZAFSLICK, J.P.; KAMINSKA, A.; UDZIELA, M. et al. In vivo confocal microscopy of corneal grafts shortly after penetrating keratoplasty. **European Journal of Ophthalmology**, v.17, n.6, p.891-896, 2007.

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

TAN, T.H.D. *et al.* In vivo confocal microscopy of the corneal endothelium: comparison of three morphometry methods after corneal transplantation. Corneal transplantation. **Ophthalmology**, v.25, n.3, p.1130-1137, 2011.

TAYLOR, M.J.; HUNT, C.J.. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. **British Journal of Ophthalmology**, v. 65, n.12, p.815-819, 1981.

TERRY, M.A.; OUSLEY, P.J. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. **Cornea**, v.20, n.3, p.239-243, 2001.

TERRY, M.A.; OUSLEY, P.J. Replacing the endothelium without corneal surface incisions or sutures: the first United States clinical series using the deep lamellar endothelial keratoplasty procedure. **Ophthalmology**, v.110, n.8, p.755-764, 2003.

TERRY, M.A. Deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): pursuing the ideal goals of endothelial replacement. **Eye**, v.17, n.8, p.982-988, 2003.

TERRY, M.A.; OUSLEY, P.J. Small-incision deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): six month results in the first prospective clinical study. **Cornea**, v.24, n.1, p.59-65, 2005.

TERRY, M.A. *et al.* Endothelial cell loss after Descemet's stripping endothelial keratoplasty in a large prospective series. **Ophthalmology**, v.115, n.3, p.488-496, 2008.

TERVO, T.; MOILANEN, J. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. **Progress in Retinal and Eye Research** v.22, p.339-358, 2003.

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

VAN DOOREN, B.T.; BEEKHUIS, W.H.; PELS, E. Biocompatibility of trypan blue with human corneal cells. **Archives of Ophthalmology**, v.122, n.4, p.736-742, 2004.

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

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

YAMASAKI, K.; INOUÉ, T. Ultrastructural Changes in the Rat Corneal Endothelium Preserved at Low Temperature. **Yonago Acta Medica**, v.44, n.1, p.17-24, 2001.

YOUNG, A. L. *et al.* A new era in corneal transplantation: paradigm shift and evolution of techniques. **Hong Kong Medical Journal**, v.18,n.6, p.509-516, 2012.

WAITE, A.; DAVIDSON, R.; TARAVELLA, RJ. Descemet Stripping automated endothelial keratoplasty donor tissue preparation using the double-pass microkeratome technique. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.39, n.3, p.446-450, 2013.

WASILEWSKI, D. *et al.* Technique for separating Descemet membrane for corneal endothelial cells transplantation: experimental study in rabbits. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v.73, n.1, p.22-27, 2010.

WATT, I. M. **The Principles and Practice of Electron Microscopy**. 2. Ed. New York: Cambridge University Press, 1997, p.205.

WILHELMUS, K.R. *et al.* Primary corneal graft failure. A national reporting system. Medical Advisory Board of the Eye Bank Association of America. **Archives of Ophthalmology**, v.113, n.12, p.1497-1502, 1995.