


Microscopia especular das diferentes regiões da córnea de suínos - estudo *ex vivo*

Specular microscopy of the different regions of the cornea in enucleated swine eyes - *ex vivo* evaluation

Eduarda Valim Borges de Vargas¹ , Anita Marchionatti Pigatto¹ , Rafaella Silva Rocha¹ , Maria Eduarda Mattos Franceschini¹ , João Antonio Tadeu Pigatto^{1*} 

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

*Autor correspondente: pigatto@ufrgs.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade endotelial e a hexagonalidade das células endoteliais nas diferentes regiões da córnea de suínos utilizando a microscopia especular de contato. Foram estudados 24 bulbos oculares de 12 suínos (*Sus scrofa domestica*), machos, com seis meses de idade e da raça Large White. A microscopia especular de contato foi realizada nas regiões central, superior, inferior, lateral e medial. A densidade endotelial média na região central foi de 1865 células/mm², na região superior foi de 1877 células/mm², na região inferior foi de 1854 células/mm², na região lateral foi de 1847 células/mm² e na região medial foi de 1831 células/mm². Na região central, a hexagonalidade foi de 53%, na região superior foi de 54%, na região inferior foi de 54%, na região lateral foi de 54%, na região medial foi de 54%. Não foram observadas diferenças significativas na densidade celular e na hexagonalidade nas diferentes regiões da córnea analisadas. Este estudo demonstrou que a densidade endotelial e a hexagonalidade da área central da córnea representam todo o mosaico endotelial.

Palavras-chave: córnea; endotélio; morfologia; contagem celular; suíno.

Abstract

The objective of this study was to determine the endothelial cell density (ECD) and hexagonality of the cornea in the different regions of healthy swine corneal endothelium using specular microscopy. Twenty-four eyeballs from 12 male, 6-month-old Large White pigs (*Sus scrofa domestica*) were studied. Contact specular microscopy was performed in the central, superior, inferior, lateral and medial regions. The corneal parameters analysed in this study were ECD and hexagonality. The ECD in the central region was 1865 cells/mm²; in the upper region, it was 1877 cells/mm², in the lower region, it was 1854 cells/mm², in the lateral region, it was 1847 cells/mm², in the medial region, it was 1831 cells/mm². Hexagonality in the central region, was 53%; in the upper region, it was 54%, in the lower region, it was 54%, in the lateral region, it was 54%, in the medial region, it was 54%. There was no significant difference regarding to the evaluated parameters in all corneal regions evaluated. No statistically significant differences were observed in ECD and hexagonality between the left and the right eyes. This study demonstrates that ECD and hexagonality of the central cornea area represent the entire endothelial mosaic.

Keywords: cornea; endothelium; morphology; cell count, swine.

1. Introdução

O endotélio é a camada mais interna da córnea e é formado por uma monocamada de células poligonais.⁽¹⁾ Essa camada pode ser examinada por técnicas histológicas^(2,3) microscopia eletrônica de varredura⁽⁴⁾, microscopia confocal⁽⁵⁾ e microscopia especular⁽⁶⁾. Para avaliação *in vivo*, a microscopia especular é o método mais utilizado para analisar o endotélio corneano⁽⁶⁾. O conhecimento dos parâmetros endoteliais pré-operatórios do endotélio corneano pode ajudar a minimizar a incidência de complicações pós-operatórias, principalmente nos procedimentos cirúrgicos utilizados para remoção de catarata⁽⁷⁾. A microscopia especular

também tem sido utilizada para estudar os parâmetros do endotélio corneano em diferentes espécies animais. O endotélio da córnea foi documentado com a microscopia especular em cães⁽⁸⁻¹⁰⁾, gatos^(11,12), ovelhas⁽¹³⁾, cavalos⁽¹⁴⁾, lhamas e alpacas⁽¹⁵⁾, galinhas⁽¹⁶⁾, chinchilas⁽¹⁷⁾, coelhos^(18,19) e cabras,⁽²⁰⁾ entre outros. Os olhos de suínos são empregados como modelo experimental em oftalmologia^(3,21-26). Devido às semelhanças entre suínos e humanos tem aumentado o interesse pela possibilidade de utilização de córneas suínas para transplante em humanos^(27,28). No entanto, estudos avaliando o endotélio corneano dessa espécie são escassos⁽²⁸⁻³¹⁾.

Devido às variações nos parâmetros endoteliais da

Recebido: 31 de janeiro de 2023. Aceito: 8 de março de 2023. Publicado: 15 de maio de 2023.



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

córnea entre as diferentes espécies, o conhecimento dos parâmetros normais de cada espécie é fundamental. Além disso, o conhecimento dos parâmetros endoteliais é um pré-requisito para o reconhecimento de alterações patológicas relacionadas a essa camada da córnea. Entre os parâmetros endoteliais da córnea que podem ser quantificados estão a densidade das células endoteliais (DCE), o coeficiente de variação do tamanho da célula (CV), a área celular (AC) e a hexagonalidade.⁽⁶⁾ O DCE é o número de células no endotélio da córnea por mm². Hexagonalidade é a porcentagem de células hexagonais. Os dados coletados no presente estudo auxiliarão em futuras avaliações do endotélio da córnea suína. O objetivo deste estudo foi determinar o DCE e a hexagonalidade em diferentes regiões do endotélio da córnea de suínos saudáveis usando microscopia especular de contato. Também foram comparados os valores obtidos na região central com aqueles obtidos nas regiões periféricas da córnea.

2. Materiais e métodos

Ao todo, 24 olhos saudáveis de 12 suínos (*Sus scrofa domesticus*), machos de 6 meses de idade, da raça Large White, foram utilizados neste estudo. Os olhos foram obtidos de um frigorífico local (Avisui Alimentos Ltda, Santa Maria, RS, Brasil) com Inspeção Federal de acordo com os preceitos técnicos e humanitários vigentes na legislação específica. Os animais foram abatidos por motivos alheios a este projeto. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram abatidos por eletroanestesia, seguida de sangria imediata com morte efetiva. Antes da escalda os olhos direito e esquerdo de cada animal foram enucleados e examinados com biomicroscopia de lâmpada de fenda (SL 15, Kowa, Japão) e coloração com fluoresceína (Fluoresceína, Ophthalmos, SP, Brasil). Os olhos que apresentaram evidência de alteração da córnea não foram incluídos no experimento. Após a enucleação, todos os olhos foram armazenados em câmara úmida. A câmara úmida foi revestida com uma gaze umedecida em solução fisiológica estéril e o globo ocular mantido com a córnea voltada para cima.

2.1 Microscopia especular

Os olhos foram avaliados em até quatro horas após a enucleação. Após serem retirados da câmara úmida os olhos foram colocados em um suporte e examinados no microscópio especular de contato (Figura 1).

A lente objetiva do microscópio foi posicionada sobre as regiões central, superior, inferior, lateral e medial para o registro fotográfico digital do endotélio. Os parâmetros estudados incluíram DCE e porcentagem de células hexagonais. Duas micrografias especulares de

cada região da córnea foram tiradas. De cada imagem, 50 células foram marcadas com um mouse pelo examinador para análise do DCE por um programa de *software* acoplado (*software* Celmax®). O método utilizado foi a marcação dos centros das células. A morfologia endotelial foi obtida por meio de um *software* para análise de imagem. O número de lados de cada célula foi analisado e a porcentagem de células hexagonais foi calculada. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo pesquisador.

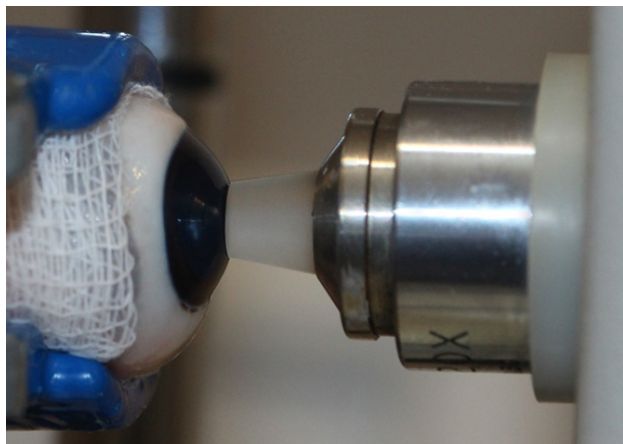


Figura 1. Posicionamento da objetiva do microscópio especular na córnea suína.

2.2 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos para todas as análises. Todos os dados foram analisados usando um *software* de computador (SPSS versão 21).

3. Resultados

Todos os olhos enucleados foram incluídos no estudo. Em todas as imagens captadas foi possível analisar o endotélio da córnea. Com o microscópio especular de contato foi possível observar um padrão regular de células poligonais com bordas nítidas, uniformes e justapostas em todas as regiões estudadas (Figura 2).

Em todos os olhos examinados com microscopia especular, as imagens endoteliais foram obtidas facilmente. A DCE foi de 1865 células/mm² na região central, 1877 células/mm² na região superior, 1854 células/mm² na região inferior, 1847 células/mm² na região lateral e 1831 células/mm² na região mediana. Não houve diferença significativa em relação ao DCE em todas as regiões da córnea avaliadas ($P=0,307$). Em todas as regiões da córnea analisadas, foram encontradas células endoteliais com quatro, cinco, seis, sete e oito

lados. Considerando a morfologia de todas as células analisadas, 54% das células tinham seis lados, 21% das células tinham cinco lados e 18% das células tinham sete lados. Além disso, 5% das células tinham quatro lados e 2% das células tinham oito lados. Na região central, o percentual médio de células hexagonais foi de 53%. Na região superior foi de 54%, na região inferior foi de 54%, na região lateral foi de 54%, na região medial foi de 54%. Não houve diferença significativa em relação ao DCE em todas as regiões da córnea avaliadas ($P = 0,735$). Não foram observadas diferenças em DCE e hexagonalidade entre os olhos esquerdo e direito.

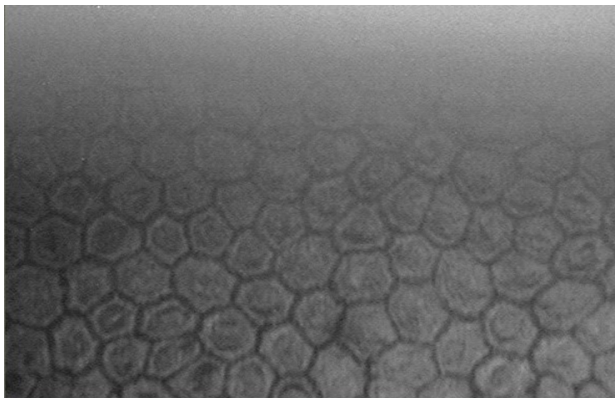


Figura 2. Imagem do endotélio corneano de um suíno de 6 meses de idade obtida com microscopia especular.

4. Discussão

A microscopia especular é a principal técnica para avaliação do endotélio *in vivo*⁽²⁾. O conhecimento das características endoteliais da córnea saudável é fundamental para a interpretação da microscopia especular. A análise dos parâmetros morfométricos e morfológicos do endotélio saudável da córnea tem sido realizada por microscopia especular em algumas espécies em animais vivos^(15,17,19) e em olhos enucleados^(14,10,12,13,16,20).

Os suínos tem sido amplamente utilizados como modelo experimental em oftalmologia devido às semelhanças de suas córneas com a córnea humana^(27,32,33,28). No entanto, estudos avaliando o endotélio corneano saudável de suínos são escassos^(28,30,31,34), e variações interespecies nas características do endotélio corneano impedem a extrapolação dos dados obtidos de uma espécie para outra. Devido a essa variação dos parâmetros endoteliais, o ideal é estabelecer valores de referência em córneas saudáveis para cada espécie.

Vários estudos foram realizados em animais com microscópio especular, mas apenas a região central da córnea foi analisada^(10,12,35). O presente estudo relata dados de células endoteliais de diferentes regiões de córneas

suínas saudáveis usando um microscópio especular de contato. Este é o primeiro estudo realizado para analisar esses dados em suínos. A utilização de olhos de suínos destinados ao abate foi uma alternativa viável, evitando que animais fossem sacrificados por motivos exclusivamente relacionados à pesquisa. No presente estudo, a coleta ocular *post mortem* e o armazenamento individual em câmara úmida por até 4 horas permitiram a preservação da integridade endotelial para microscopia especular. Essa metodologia já foi utilizada por outros autores e se mostrou eficaz, permitindo a análise do endotélio corneano até 6 horas após a morte^(10,12,16,17).

A microscopia especular pode ser utilizada tanto para avaliação *in vivo* quanto *ex vivo* e é um dos métodos mais validados para avaliação dos parâmetros do endotélio corneano⁽³⁶⁻³⁸⁾. Ao contrário de outras técnicas *ex vivo* com a microscopia especular, não há deformação ou distorção das células endoteliais durante a fixação ou coloração⁽³⁹⁾. Os olhos examinados no microscópio especular até 6 horas após a enucleação ainda mostram uma estrutura endotelial preservada^(12,13,20). Dessa forma, todos os dados obtidos poderão ser utilizados em estudos futuros onde serão examinados animais vivos.

De acordo com o contato ou não da objetiva com a córnea, existem dois modelos de microscópios especulares disponíveis para avaliação do endotélio^(15,38,40). No presente estudo, foi utilizada a microscopia especular de contato. Com o microscópio de contato especular, foi possível fotografar as células do endotélio corneano de córneas suínas saudáveis. Além disso, com um microscópio de contato especular, foi possível examinar o endotélio de diferentes áreas da córnea. No presente estudo, a enucleação foi realizada antes de esaldar os animais para evitar danos à córnea devido à água quente. Assim, foi possível selecionar apenas olhos com epitélio íntegro. Todos os olhos foram examinados com lâmpada de fenda e corante de fluoresceína antes do início do experimento. Em olhos com epitélio danificado, não é possível visualizar o endotélio da córnea com um microscópio especular. Além disso, a microscopia especular não é adequada para avaliar áreas com trauma endotelial devido ao edema que dificulta a obtenção de imagens nessas regiões⁽²⁾. No presente estudo, em todos os olhos enucleados, foi possível analisar e fotografar o endotélio corneano, pois apenas olhos saudáveis foram examinados.

Os parâmetros mais utilizados para análise endotelial são a hexagonalidade, a área celular média, o coeficiente de variação da área celular e a DCE^(6,38). No presente estudo, foram analisadas a DCE e a hexagonalidade de diferentes regiões da córnea.

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para realizar a análise do endotélio corneano^(6,38). A determinação manual da DCE pelo método do centro representa uma análise precisa empregada na microscopia

especular⁽⁴⁰⁾. A precisão da avaliação depende da qualidade da imagem endotelial obtida pela microscopia especular. No presente estudo, foram selecionados apenas olhos saudáveis com córnea transparente para obtenção de imagens com boa qualidade. Com auxílio do *software* disponível no microscópio especular foi possível realizar a contagem endotelial pelo método semiautomático. O método de marcação do centro da célula foi usado para determinar a DCE. Após a marcação das células selecionadas o *software* forneceu a densidade celular. Não há uniformidade quanto ao total de células endoteliais contadas em cada estudo realizado para obter a máxima precisão. Andrew et al.⁽¹⁵⁾ selecionaram 15 células endoteliais num estudo utilizando a microscopia especular para analisar o endotélio corneano de lhamas e de alpacas. Alguns autores incluíram 30 células endoteliais na análise⁽²⁰⁾ enquanto outros incluíram 50 a 100 células endoteliais em cada córnea analisada⁽¹²⁾. No presente estudo, 100 células de cada região da córnea foram analisadas para avaliar a morfologia celular. Novos estudos devem ser realizados para determinar um número mínimo de células que devem ser contadas em cada amostra para minimizar possíveis erros de amostragem.

Considerando todas as imagens analisadas, no estudo aqui relatado, a DCE média foi de 1855 células/mm². Valores médios da DCE de 2669 células/mm² para lhamas e 2275 células/mm² para alpacas foram encontrados usando o microscópio especular sem contato⁽¹⁵⁾. Brambati e colaboradores⁽¹⁹⁾ encontraram valores semelhantes em coelhos, com DCE de 1867/mm². Nas chinchilas, a DCE calculada por microscopia especular em grupos de diferentes idades ficou entre 2124 e 3423 células/mm², sendo a maior média encontrada em animais com idade de 2 a 4 meses⁽¹⁷⁾. Em corujas, outros autores obtiveram valores entre 2602 e 2864 células/mm², demonstrando também maior densidade celular em animais mais jovens⁽⁴¹⁾. O efeito da idade na densidade endotelial já foi estudado por meio de microscopia especular em humanos⁽⁴²⁾, cães⁽⁸⁾, coelhos⁽¹⁸⁾, cavalos⁽¹⁵⁾, lhamas/alpacas⁽¹⁵⁾, gatos⁽¹²⁾, suínos⁽²⁸⁾, ovelhas⁽¹³⁾, chinchilas⁽¹⁷⁾, e outras espécies. A DCE diminuiu com o avanço da idade⁽¹⁵⁾. No presente estudo, como todos os animais eram da mesma idade, não foram analisados os efeitos do envelhecimento. Tanto em humanos quanto em animais, há diminuição do DCE com o envelhecimento^(6,12,13,28,42).

No presente estudo, não houve diferença significativa na DCE entre as cinco regiões estudadas. Não há consenso na literatura consultada sobre as diferenças de DCE entre as regiões centrais e periféricas de uma córnea saudável. Segundo Coyo et al.⁽¹³⁾ essa controvérsia pode ser devida aos diferentes métodos utilizados e às diferentes distâncias das imagens periféricas obtidas em relação ao limbo. Em humanos, alguns autores já compararam o DCE das regiões centrais

e periféricas de córneas saudáveis e não encontraram diferença estatística^(43,44).

Existem diferentes tipos de microscópios especulares com *software* integrado que permitem análises automáticas ou semiautomáticas, e muitos pacotes de *softwares* calculam automaticamente os parâmetros endoteliais. No presente estudo, a morfologia do endotélio da córnea foi estudada usando o Adobe photoshop. Um padrão hexagonal regular é a configuração mais geométrica e termodinamicamente estável. Porcentagens mais baixas de hexagonalidade indicam uma diminuição do estado de saúde do endotélio. No presente estudo, observou-se que o endotélio suíno é constituído por uma monocamada de células poligonais, com predominância de células hexagonais em todas as regiões avaliadas. Considerando todas as imagens analisadas, 54% das células endoteliais eram hexagonais. Em humanos, na córnea saudável normal, 70%-80% das células endoteliais da córnea têm formato hexagonal⁽³⁸⁾. Nas diferentes espécies animais em que a morfologia endotelial já foi estudada em córneas saudáveis, a maioria das células tinham seis lados^(10,12). A porcentagem de hexagonalidade encontrada depende da espécie e da idade dos animais avaliados.

Smeringova et al.⁽³⁾ estudaram o endotélio corneano sadio de suínos com idade entre 5 e 6 meses e encontraram uma porcentagem de 51% de células com seis lados. Semelhante ao nosso estudo, Lee et al.⁽²⁸⁾, utilizando um microscópio confocal, encontraram uma porcentagem de células hexagonais de 54% em suínos com idade entre 5 e 10 meses. Em humanos, espera-se que a porcentagem de células hexagonais diminua com avanço da idade⁽⁶⁾. Entretanto, em suínos, no que diz respeito à morfologia, não há correlação entre a idade e a porcentagem de células hexagonais⁽²⁸⁾. No presente estudo, não houve diferença significativa na porcentagem de células hexagonais entre as cinco regiões avaliadas. Da mesma forma, Clerot et al.⁽³¹⁾, usando microscopia óptica e corantes vitais, também não encontraram diferenças significativas na hexagonalidade de diferentes regiões de uma córnea suína saudável. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que não houve diferenças na DCE e na hexagonalidade quando os olhos direito e esquerdo foram comparados. Em córneas saudáveis, não há diferenças nos parâmetros endoteliais quando o olho esquerdo é comparado como o olho direito^(10, 12,16,17,19,41).

No presente estudo, foram analisados apenas olhos de animais machos. Estudos anteriores mostraram que em córneas saudáveis, não há diferença nos parâmetros endoteliais relacionados ao gênero dos animais estudados⁽¹⁶⁾.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que a densidade das

células endoteliais (DCE) e a hexagonalidade da área central da córnea suína representam todo o mosaico endotelial.

Conflitos de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições do autor

Conceituação: E.V.B. Vargas e J.A.T. Pigatto. **Metodologia:** E.V.B. Vargas, A.M. Pigatto, R.S. Rocha, M.E.M. Franceschini e J.A.T. Pigatto. **Investigação:** E.V.B. Vargas, A.M. Pigatto, R.S. Rocha, M.E.M. Franceschini e J.A.T. Pigatto. **Administração do projeto:** J.A.T. Pigatto. **Redação (esboço original, revisão e edição):** E.V.B. Vargas, R.S. Rocha, J.A.T. Pigatto.

Agradecimentos

À Avisui Alimentos Ltda pela doação dos olhos de suínos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de uma bolsa de pesquisa para um dos autores (E.V.B.V.).

Referências

- Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye*. 1990;4(3):389-424. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/eye.1990.53>.
- Saad HA, Terry MA, Shamie N, Chen ES, Friend DF, Holiman JD et al. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and adobe photoshop software. *Cornea*. 2008;27(7):818-824. Disponível em: <http://doi.org/10.1097/ico.0b013e3181705ca2>.
- Smeringaiova I, Merjava SR, Stranak Z, Studeny P, Bednar J, Jirsova K. Endothelial wound repair of the organ-cultured porcine corneas. *Current Eye Research*. 2018;43(7):856-865. Disponível em: <http://doi.org/10.1080/02713683.2018.1458883>.
- Pigatto JAT, Andrade MC, Laus JL, Santos JM, Brooks DE, Guedes PM, et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Veterinary Ophthalmology*. 2004;7(3):205-208. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2004.04025>.
- Selig B, Vermeer KA, Rieger B, Hillenaar T, Hendriks CLL. Fully automatic evaluation of the corneal endothelium from *in vivo* confocal microscopy. *BMC Medical Imaging*. 2015;15(1):1-15. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s12880-015-0054-3>.
- McCarey BE, Edelhofer HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea*. 2008;27(1):1-16. Disponível em: <http://doi.org/10.1097/ico.0b013e31815892da>.
- Van Schaick W, van Dooren BT, Mulder PG, Völker-Dieben HJ. Validity of endothelial cell analysis methods and recommendations for calibration in Topcon SP-2000P specular microscopy. *Cornea*. 2005;24(5):538-544. Disponível em: <http://doi.org/doi:10.1097/01.ico.0000151505.03824.6c>.
- Gwin RM, Lerner I, Warren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1982;22(2):267-271. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7056641/>.
- Pigatto JAT, Abib FC, Pereira GT, Barros PSM, Freire CD, Laus JL. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2006; 43(4): 476-480. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26462>.
- Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, Abib FC, Bellini LP, Barros PSM, et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;28(9):427-430. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1590/s0100-736x20080009000006>.
- Chan-Ling T, Curmi J. Changes in corneal endothelial morphology in cats as a function of age. *Current Eye Research*. 1988;7(4):387-392. Disponível em: <http://doi.org/doi:10.3109/02713688809031788>.
- Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13(4):222-226. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2010.00787.x>.
- Coyo N, Peña MT, Costa D, Ríos J, Lacerda R, Leiva M. Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. *Veterinary Ophthalmology*. 2016;19(5):367-372. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/vop.1230>.
- Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanized horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2001;62(4):479-482. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.479>.
- Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *American Journal of Veterinary Research*. 2002;63(3):326-329. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.326>.
- Albuquerque L, Pigatto JAT, Pacicco LVR. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. *Semina: Ciências Agrárias*. 2015; 36(2): 4199-4206. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6supl2p4199>.
- Bercht BS, Albuquerque L, Araujo ACP, Pigatto JAT. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Veterinary Ophthalmology*. 2015; 18(1): 137-142. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1111/vop.12236>.
- Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1995;57(2):273-277. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1292/jvms.57.273>.
- Brambatti G, Albuquerque L, Pigatto JAT, Vargas EDB, Neumann CF. Corneal endothelial cell density and morphology in rabbits' eyes using contact specular microscopy. *Ciência Rural*. 2017;47(12):1-5. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1590/010103-8478cr20170027>.
- Coyo N, Leiva M, Costa D, Ríos J, Peña T. Corneal thickness, endothelial cell density, and morphological and morphometric features of corneal endothelial cells in goats. *American Journal of Veterinary Research*. 2018;79(10):1087-1092. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.2460/ajvr.79.10.1087>.
- Hashimoto C, Kurosaka D, Uetsuki Y. Teaching continuous curvilinear capsulorhexis using a postmortem pig eye with sim-

- ulated cataract. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2001;27(6):814-816. Disponível em: doi: [http://doi.org/10.1016/s0886-3350\(00\)00728-8](http://doi.org/10.1016/s0886-3350(00)00728-8).
- 22 Kermani O, Oberheide U. Comparative micromorphologic *in vitro* porcine study of IntraLase and Femto LDV femtosecond lasers. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2008;34(8):1393-1399. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1016/j.jcrs.2008.04.037>.
- 23 Nicholls S, Bailey M, Mitchard L, Dick A. Can the corneal endothelium of the pig proliferate *in vivo*? *Acta Ophthalmologica*. 2009;87:0. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.2271.x>.
- 24 Heichel J, Wilhelm F, Kunert K, Schlueter R, Stuhlraeger U, Hammer T. Influence of microkeratome parameters on the stromal bed and flap edge quality in laser *in situ* keratomileusis. *Clinical Ophthalmology*. 2014;8: 61-69. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.2147/ophth.s51200>.
- 25 Heichel J, Blum M, Duncker GIW, Sietmann R, Kunert KS. Surface quality of porcine corneal lenticules after Femtosecond Lenticule Extraction. *Ophthalmic Research*. 2011;46(2):107-112. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1159/000323814>.
- 26 Gros-Otero J, Ketabi S, Cañones-Zafra R, Garcia-Gonzalez M, Parafita-Fernandez A, Villa-Collar C, et al. Analysis of corneal stromal roughness after iFS 150 kHz and LenSx femtosecond LASIK flap creation in porcine eyes. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2019;257(12):2665-2670. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1007/s00417-019-04497-7>.
- 27 Hara H, Cooper DK. Xenotransplantation - the future of corneal transplantation? *Cornea*. 2011;30(4):371-378. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181f237ef>.
- 28 Lee SE, Mehra R, Fujita M, Roh DS, Long C, Lee W, et al. Characterization of porcine corneal endothelium for xenotransplantation. *Seminars in Ophthalmology*. 2014;29(3):127-135. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.3109/08820538.2013.787104>.
- 29 Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Robinson BJ, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1986;27(1):44-51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3941037/>.
- 30 Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artori SM, Laus JL, Vicenti FAM, Pigatto JAT, Abib FC. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult cross-bred pig. *Ciência Rural*. 2009;39(1):117-122. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1590/s0103-84782009000100018>.
- 31 Clerot LL, Hünning PS, Bettio M, Torikachvili M, Petersen MB, Silva AF, et al. Morphology of endothelial cells from different regions of the swine cornea. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2019; 47:1-6. Disponível em: <http://doi.org/10.22456/1679-9216.89436>.
- 32 Zeng Y, Yang J, Huang K, Lee Z, Lee X. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *Journal of Biomechanics*. 2001;34(4):533-537. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/s0021-9290\(00\)00219-0](http://doi.org/10.1016/s0021-9290(00)00219-0).
- 33 Fujita M, Mehra R, Lee SE, Roh DS, Long C, Funderburgh JL, et al. Comparison of proliferative capacity of genetically-engineered pig and human corneal endothelial cells. *Ophthalmic Research*. 2013;49(3):127-138. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1159/000342978>.
- 34 Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry*. 1998;81(6):245-254. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1111/j.1444-0938.1998.tb06744.x>.
- 35 Stapleton S, Peiffer RL Jr. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research*. 1979;40(12):1803-1804. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/525905/>.
- 36 Price NC, Cheng H. Contact and noncontact specular microscopy. *British Journal of Ophthalmology*. 1981;65(8):568-574. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1136/bjo.65.8.568>.
- 37 Abib FC, Holzchuh R, Schaefer A, Schaefer T, Godois R. The endothelial sample size analysis in corneal specular microscopy clinical examinations. *Cornea*. 2012;31(5):546-550. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181cc7961>.
- 38 Chaurasia S, Vanathi M. Specular microscopy in clinical practice. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2021;69(3):517-524. Disponível em: doi: http://doi.org/10.4103/ijo.IJO_574_20.
- 39 Doughty MJ. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy - a comparison of two different methods of corneal fixation. *Veterinary Ophthalmology*. 2006;9(2):127-135. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2006.00449.x>.
- 40 Huang J, Maram J, Tepelus TC, Modak C, Marion K, Sadda SR, et al. Comparison of manual & automated analysis methods for corneal endothelial cell density measurements by specular microscopy. *Journal of Optometry*. 2018;11(3):182-191. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1016/j.optom.2017.06.001>.
- 41 Coyo N, Leiva M, Costa D, Molina R, Nicolás O, Ríos J, et al. Endothelial cell density and characterization of corneal endothelial cells in the Tawny Owl (*Strix aluco*) using specular microscopy. *Veterinary Ophthalmology*. 2019;22(2):177-182. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1111/vop.12578>.
- 42 Abib FC, Barreto Junior J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2001;27(10):1574-1578. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1016/s0886-335>.
- 43 Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *American Journal of Ophthalmology*. 2003;135(5):584-590. Disponível em: doi: [http://doi.org/10.1016/s0002-9394\(02\)02237-7](http://doi.org/10.1016/s0002-9394(02)02237-7).
- 44 Müller A, Craig JP, Grupcheva CN, McGhee CN. The effects of corneal parameters on the assessment of endothelial cell density in the elderly eye. *British Journal of Ophthalmology*. 2004;88(3):325-330. Disponível em: doi: <http://doi.org/10.1136/bjo.2003.019315>.