



Avaliação do endotélio da córnea suína após preservação em meio Eusol-C

Evaluation of porcine corneal endothelium after preservation in Eusol-C medium

Alessandra Fernandez da Silva¹ , Alana Pinto De Melo¹ , Anita Marchionatti Pigatto² , Rafaella Silva Rocha¹ , Maiara Poersch Seibel¹ , Natália Pons Méndez¹ , João Antonio Tadeu Pigatto*¹ 

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

2 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil 

*autor correspondente: pigatto@ufrgs.br

Recebido: 25 de junho de 2024. Aceito: 05 de maio de 2025. Publicado: 31 de julho de 2025. Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade do endotélio corneano suíno após acondicionamento em meio de preservação Eusol-C. Foram incluídos 12 olhos de seis suínos da raça Large White (*Sus scrofa domesticus*), machos, com seis meses de idade. A morfologia e a contagem de células endoteliais de todas as amostras foram avaliadas antes do armazenamento por microscopia especular de contato, para assegurar que somente córneas híginas seriam incluídas. As amostras foram aleatoriamente divididas em grupo controle (G1) e em grupo teste (G2). As córneas do G1 foram imediatamente submersas em frascos contendo glutaraldeído a 2,5%. As córneas do G2 foram armazenadas em Eusol-C a 4 °C por 14 dias. A porcentagem de perda de células endoteliais foi avaliada com microscopia eletrônica de varredura (MEV). As comparações entre regiões foram realizadas por meio de análise de variância de medidas repetidas (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $P < 0,05$. O G1 não apresentou perda celular. O G2 apresentou perda celular média de 3,01%. O meio hipotérmico Eusol-C preservou satisfatoriamente as córneas suínas por um período de 14 dias.

Palavras-chave: células endoteliais; transplante; oftalmologia; suíno.

Abstract: This study was conducted to evaluate the viability of porcine corneal endothelium after conditioning in the preservation medium Eusol-C. Twelve eyes from six 6-month-old male Large White pigs (*Sus scrofa domesticus*) were analyzed. Endothelial cell morphology and cell count of all samples were assessed prior storage using specular microscopy to ensure that only healthy corneas were included in the study. The samples were randomly divided into a control group (G1) and a test group (G2). Corneas from G1 were immediately submerged in bottles containing 2.5% glutaraldehyde, whereas corneas from G2 were stored in Eusol-C at 4°C for 14 days. The percentage of endothelial cell loss was evaluated using scanning electron microscopy (SEM). Comparisons between regions were performed using repeated measures Analysis of Variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. Corneal samples from G1 showed no areas of endothelial cell loss. In samples from G2, the average cell loss was 3.01%. In conclusion, the hypothermic medium Eusol-C satisfactorily preserved porcine corneas for up to 14 days.

Key-words: endothelial cells; transplantation; ophthalmology; porcine.



1. Introdução

O endotélio corneano é uma monocamada de células poligonais predominantemente hexagonais⁽¹⁾. A redução da densidade celular abaixo de um limite crítico leva ao edema corneano e à consequente perda de transparência da córnea^(1,2). Em doenças corneanas que resultam em perda de transparência, o transplante de córnea permanece como a única opção terapêutica para a restauração da visão⁽³⁻⁵⁾. A preservação da córnea tem como principal objetivo prolongar o tempo de armazenamento dos tecidos doadores, mantendo a viabilidade das células endoteliais⁽⁶⁾. Os métodos mais comumente utilizados para a preservação da córnea são os meios hipotérmicos e o cultivo em órgão⁽⁶⁾. Os meios hipotérmicos preservam a córnea por um período de 10 a 14 dias. O Eusol-C é um meio hipotérmico desenvolvido como uma alternativa eficaz ao Optisol-GS. A principal vantagem do Eusol-C em relação ao Optisol-GS é seu menor custo, o que pode aumentar sua aplicabilidade na Medicina Veterinária.

As córneas suínas apresentam características biológicas e morfológicas comparáveis às das córneas humanas, o que permite a comparação entre os resultados de estudos prévios com córneas humanas^(7, 8). As córneas de suínos têm sido utilizadas como modelos de estudo em meios de preservação hipotérmica para avaliar o uso de antibióticos, comparar diferentes meios e observar o desempenho e a segurança do armazenamento⁽⁹⁻¹¹⁾. No entanto, os estudos que avaliam o meio de preservação Eusol-C nessa espécie ainda são recentes e limitados, concentrando-se, principalmente, na avaliação endotelial por meio de microscopia especular^(10,11).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é amplamente utilizada para avaliar a morfologia endotelial, com diversos estudos publicados sobre toxicidade de medicamentos, avaliação após preservação e análises posteriores a procedimentos cirúrgicos corneanos ou intraoculares⁽¹²⁻¹⁸⁾. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a avaliar, por meio da MEV, a porcentagem de perda de células endoteliais após a preservação de córneas suínas em Eusol-C. Córneas suínas podem representar uma fonte promissora de tecido doador tanto para aplicações humanas quanto veterinárias^(2, 3, 19). O estabelecimento de bancos de tecidos oculares apresenta um potencial significativo, e pesquisas contínuas sobre métodos de preservação em animais são fundamentais para aumentar a segurança e o sucesso dos procedimentos de transplante de córnea⁽²⁰⁻²²⁾. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade do endotélio da córnea suína após o acondicionamento em meio de preservação Eusol-C.

2. Material e métodos

Foram incluídos no estudo doze olhos de seis suínos machos da raça Large White (*Sus scrofa domestica*), com seis meses de idade. Os olhos foram doados por um abatedouro (Avisui, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil). Imediatamente após o abate e antes da escalda, os olhos foram enucleados. Em seguida, foram individualmente colocados em uma câmara úmida contendo gaze e solução salina dentro de uma caixa térmica para manter a temperatura entre 2 °C e 8 °C. Dentro de uma hora após a enucleação, todos os globos oculares foram examinados por biomicroscopia com lâmpada de fenda (Portable Slit Lamp SL15; Kowa, Nagoya, Japão), coloração com fluoresceína (Fluoresceína sódica a 1%; Allergan Pharmaceuticals, Dublin, Irlanda) e microscopia especular de contato (Celmax Medical Service®; São Carlos, SP, Brasil). Apenas os olhos considerados saudáveis foram incluídos no estudo. As imagens

foram adquiridas durante a microscopia especular realizada para a seleção das córneas saudáveis antes da divisão em grupos. Posteriormente, essas imagens foram processadas com um software de imagem (Adobe Photoshop), e a morfologia de 50 células endoteliais por imagem foi analisada.

Os doze olhos selecionados foram descontaminados com lavagem, utilizando solução de povidona-iodo a 5% (PVP-I; Rioquímica S/A, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Em seguida, os botões córneo-esclerais foram removidos e as amostras foram divididas aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (G1) e grupo teste (G2). Os botões do G1 foram imediatamente submersos em frascos contendo glutaraldeído a 2,5%. Os botões do G2 foram colocados em frascos contendo Eusol-C e permaneceram refrigerados por 14 dias. Após esse período, os botões córneo-esclerais foram transferidos para frascos com glutaraldeído. Após a fixação em glutaraldeído a 2,5% e o armazenamento a aproximadamente 4 °C, as amostras foram preparadas individualmente para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS (CMM-UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). As amostras foram lavadas em tampão cacodilato e desidratadas por meio de uma série de soluções com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 85%, 90% e 100%), permanecendo 15 minutos em cada concentração, sendo submetidas três vezes ao etanol 100%. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem por ponto crítico com dióxido de carbono líquido. As córneas foram montadas em suportes de alumínio de 10 mm com fita adesiva dupla face e recobertas com ouro-paládio.

A superfície endotelial posterior de cada amostra foi analisada e fotografada, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (EVO MA10; Zeiss, Oberkochen, Alemanha), operando a 10 kV. Cinco micrografias eletrônicas foram obtidas de cada amostra (1000×) nas seguintes regiões correspondentes: I, central; II, superior; III, inferior; IV, lateral; e V, medial. Micrografias adicionais com aumento de 2000× foram obtidas para fornecer maior detalhamento do endotélio. As imagens com aumento de 1000× foram processadas individualmente com o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), utilizando uma ferramenta que permitia contornar porções da imagem onde havia perda endotelial. As medições foram obtidas em μm^2 e depois convertidas para mm^2 . A porcentagem de perda celular foi calculada, subtraindo-se as áreas demarcadas da área total da imagem.

2.1 Análise estatística

Os parâmetros endoteliais obtidos por meio da microscopia especular foram analisados, utilizando análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), com nível de significância de 5%. Para a análise por MEV, as regiões I a V de cada amostra foram comparadas internamente e com as regiões correspondentes entre diferentes amostras. A mediana da porcentagem de perda celular, juntamente com os valores mínimo e máximo de perda, foi calculada para cada grupo e para cada região. As comparações da perda celular entre os grupos G1 e G2 foram realizadas utilizando o teste U de Mann–Whitney, enquanto as comparações entre diferentes regiões foram conduzidas com o teste de Friedman. O teste de Dunn–Bonferroni foi aplicado para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as regiões. Um nível de significância de 5% foi adotado para todas as análises estatísticas.

3. Resultados

Todos os olhos enucleados avaliados por lâmpada de fenda e microscopia especular foram incluídos no estudo. A microscopia especular de contato permitiu a visualização do endotélio corneano suíno, revelando um padrão regular de células poligonais justapostas. A densidade média

das células endoteliais foi de $1867,8 \pm 78,0$ células/mm² no olho direito e de $1862,2 \pm 85,2$ células/mm² no olho esquerdo. Considerando a morfologia de todas as células analisadas, 53,8% apresentavam seis lados, 21,5% apresentavam cinco lados e 17,7% apresentavam sete lados. Além disso, 5% das células apresentavam quatro lados e 2% apresentavam oito lados. Não foram observadas diferenças significativas nas células endoteliais ao comparar os olhos direito e esquerdo. As amostras de córneas do grupo G1 não apresentaram áreas de perda de células endoteliais (Figura 1). Observou-se perda endotelial nas amostras preservadas no meio de preservação Eusol-C (Figura 2). Nas amostras do grupo G2, a perda celular média foi de 3,01%. Foi observada uma diferença significativa na perda endotelial entre os grupos G1 e G2. Não foram encontradas diferenças significativas entre as regiões estudadas no grupo G1. No entanto, foi detectada uma diferença estatisticamente significativa entre as regiões I e IV no grupo G2 (Tabela 1).

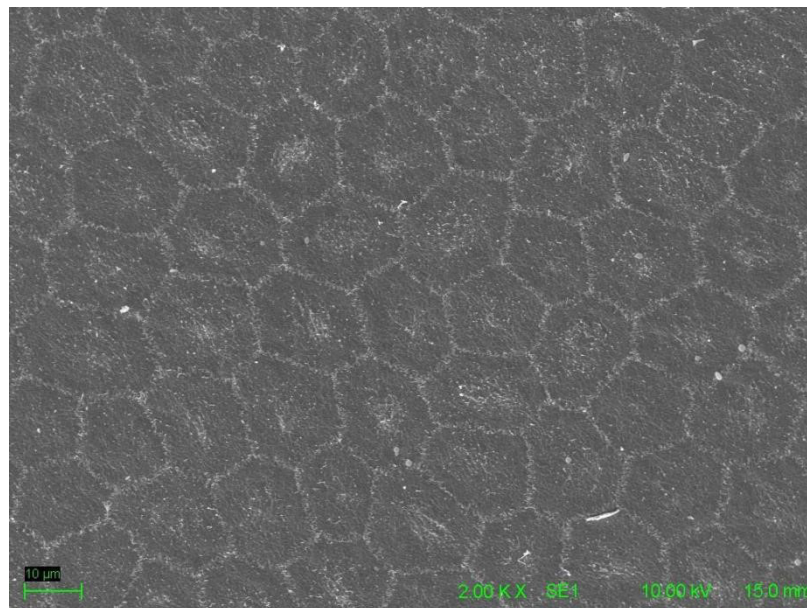


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura do endotélio corneano suíno no grupo G1. Observa-se um padrão endotelial corneano regular e a ausência de dano endotelial. Aumento: 2000x. Barra: 10 µm.

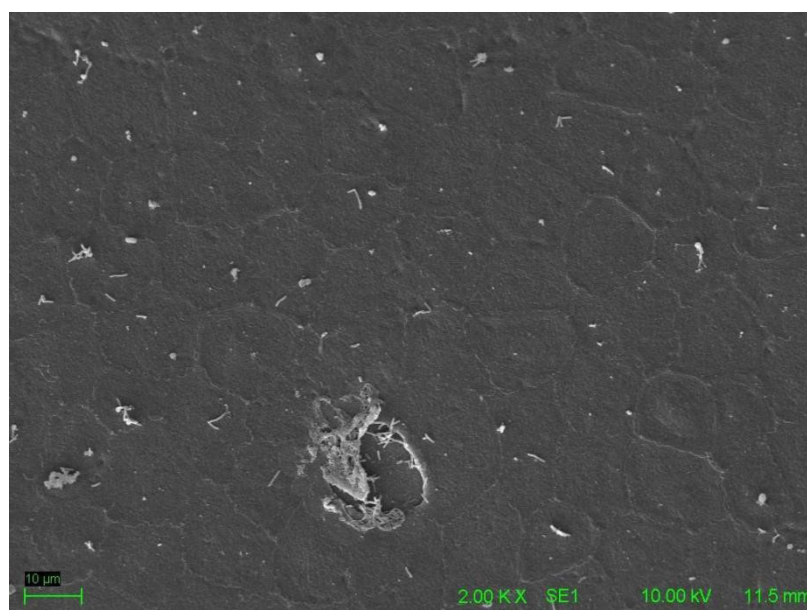


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura do endotélio corneano de porco na fase G2. Observa-se a área de perda endotelial (setas). Ampliação: 2000x. Barra: 10 µm.

Tabela 1. Comparação da porcentagem de perda celular entre os grupos e entre as regiões.

	G1 n=6	G2 n=6	p entre os grupos*
I - Central	0 (0-0,47)	1,65 (1,55-1,94) ^a	0,002
II – Superior	0 (0-0,56)	2,94 (2,25-4,62)	0,002
III – Inferior	0 (0-0)	3,21 (2,25-3,92)	0,002
IV - Lateral	0 (0-0)	3,70 (2,83-4,07) ^b	0,002
V – Medial	0 (0-0)	3,55 (2,36-4,46)	0,002
p entre as regiões**	0,558	0,007	

Os dados são apresentados como mediana (mínimo-máximo); *Teste de Mann-Whitney, Teste de Friedman seguido pelo teste post hoc de Dunn-Bonferroni; as letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes.

4. Discussão

Poucos estudos recentes analisaram a preservação do endotélio corneano em Eusol-C, tanto em humanos ⁽²³⁻²⁴⁾ quanto em animais ^(10-12, 25). A perda de células endoteliais foi avaliada em córneas equinas após 7 e 14 dias de armazenamento em Eusol-C, utilizando MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), observando-se uma preservação satisfatória por até 14 dias ⁽¹²⁾. A preservação satisfatória do endotélio corneano de porco, após 14 dias de armazenamento, no meio Eusol-C, foi demonstrada ⁽¹⁰⁾. O mesmo grupo de pesquisadores realizou um estudo comparativo envolvendo córneas humanas e porcinas. Após um período de 14 dias, os autores concluíram que córneas de ambas as espécies exibiram parâmetros de qualidade satisfatória após condicionamento em Eusol-C ⁽¹¹⁾. Outro estudo, avaliando córneas de bezerros, armazenadas a 2-8 °C por até 14 dias em Eusol-C, sugeriu que córneas bovinas e humanas compartilham requisitos de preservação comparáveis em condições ex vivo ⁽²⁵⁾.

Embora um estudo envolvendo córneas de coelho e córneas humanas tenha demonstrado a superioridade do meio de cultura de órgãos na preservação das células endoteliais da córnea por até 28 dias ⁽²⁶⁾, outro estudo retrospectivo apresentou resultados diferentes. Esse segundo estudo avaliou os desfechos clínicos de transplantes de córnea realizados com córneas de doadores humanos armazenadas em Eusol-C, em comparação com córneas armazenadas em cultura de órgãos. Os resultados cirúrgicos foram comparáveis entre os dois métodos de armazenamento, desde que fossem respeitados os períodos ideais de conservação para cada meio ⁽²⁷⁾. Em comparações de meios hipotérmicos, demonstrou-se que o Eusol-C é tão eficaz quanto o Optisol-GS na preservação da córnea por pelo menos cinco dias ⁽²⁸⁾.

Atualmente, as córneas humanas são a única fonte de doadores para transplante. Essa fonte de doadores tem se tornado cada vez mais escassa e essa escassez é o principal fator limitante para a cura de doenças da córnea ^(3-5, 29, 30). Para abordar essa questão, foram realizados estudos sobre xenotransplante de córnea, utilizando, principalmente, espécies porcinas ^(2,3,19). Embora as córneas de porco não possuam a membrana de Bowman, suas características biológicas e morfológicas têm se mostrado bastante semelhantes às das córneas humanas ^(7, 8, 15, 29, 31, 32). Essa espécie tem sido amplamente utilizada como modelo de estudo para doenças oculares e procedimentos cirúrgicos ^(7, 15, 33, 34).

Os autores optaram por utilizar olhos obtidos a partir de material descartado de matadouros no presente estudo para evitar a necessidade de eutanásia. Estudos anteriores realizados dentro de 4 a 6 horas pós-morte mostraram que a integridade endotelial foi mantida ⁽³⁵⁻³⁸⁾. Quanto ao tamanho da

amostra, estudos anteriores sob diferentes condições experimentais indicaram que a porcentagem esperada de mortalidade celular varia de 7,8% (DP = 3,5%)(11) a 3,07% (DP = 0,93%)(39). Com seis animais por grupo, é possível detectar diferenças de 7% e 1,86, considerando essas variabilidades, uma potência de 90% e um nível de significância de 0,05. Em resumo, um tamanho de amostra de 6 animais permite a detecção de uma diferença de 2 desvios padrão com uma potência de 90%, o que é considerado um grande tamanho de efeito. Esse cálculo foi realizado com a ajuda do WINPEPI 11.65⁽⁴⁰⁾.

A microscopia especular corneana foi utilizada para avaliar a saúde endotelial neste estudo. A microscopia especular é o método padrão para avaliação endotelial tanto em humanos quanto em animais e tem sido empregada para analisar córneas de várias espécies^(25, 35-38, 41, 42). Os parâmetros analisados por meio da microscopia especular foram a densidade celular endotelial e a hexagonalidade. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas na densidade endotelial ou hexagonalidade entre os olhos direito e esquerdo. Os valores encontrados no presente estudo, utilizando microscopia especular, foram semelhantes aos previamente reportados(38). Essa semelhança foi atribuída ao fato de que os animais, em ambos os estudos, eram saudáveis e pertenciam à mesma raça e faixa etária. Foi estabelecido que, em olhos saudáveis, não existem diferenças nos parâmetros endoteliais corneanos entre os olhos direito e esquerdo⁽³⁵⁻³⁸⁾.

Em estudos anteriores, utilizando o meio Eusol-C, as córneas foram analisadas ao longo de períodos, variando de 7 a 29 dias^(10, 12, 23, 24). No presente estudo, foi adotado um período de armazenamento de 14 dias, correspondente à duração recomendada pelo fabricante. Uma duração de armazenamento de 14 dias tem sido empregada em estudos que demonstram preservação endotelial satisfatória dentro desse intervalo de tempo para os meios Optisol, Optisol-GS e Eusol-C^(10, 13, 24, 25, 41, 43-45). O resfriamento das córneas estende a viabilidade das células endoteliais por períodos prolongados(6).

A viabilidade endotelial das córneas preservadas pode ser avaliada utilizando diferentes métodos, incluindo coloração vital, microscopia óptica e MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), entre outros^(46, 47). Dentre os métodos disponíveis, a microscopia óptica representa uma forma rápida e econômica para avaliar o endotélio corneano⁽⁶⁾. No presente estudo, foi escolhida a MEV para avaliar a porcentagem de perda endotelial após o período de preservação. A MEV é a ferramenta mais amplamente utilizada para analisar a morfologia endotelial, com diversos estudos publicados em humanos e em animais sobre toxicidade medicamentosa, avaliação após preservação e avaliações após procedimentos cirúrgicos corneanos ou intraoculares^(12, 13, 16, 18, 41). Na medicina veterinária, o campo ainda está em estágios iniciais de desenvolvimento. Os enxertos geralmente fornecem suporte tectônico, sendo a obtenção de um propósito óptico ainda um objetivo distante⁽²⁰⁻²²⁾. No entanto, o menor custo e os requisitos mínimos de equipamento associados ao meio hipotérmico Eusol-C tornam-no uma opção promissora para o estabelecimento de bancos de olhos animais, potencialmente transformando essa realidade.

Em um estudo publicado recentemente, um modelo ex vivo de córnea de suíno foi sugerido como uma alternativa à córnea humana para analisar a preservação endotelial após armazenamento sob condições hipotérmicas ou cultura de órgãos⁽¹⁰⁾. Imagens foram obtidas com uma câmera de alta resolução a partir de microscopia de luz com azul de tripano, e a taxa de mortalidade celular e outros parâmetros foram avaliados com o auxílio de software. Córneas de suínos e de humanos exibiram tendências comparáveis sob as condições de armazenamento investigadas por até 14 dias. A preservação de córneas humanas foi estudada em um novo meio de preservação hipotérmica chamado Kerasave, em

comparação com Optisol-GS⁽³⁹⁾. Para essa comparação, a MEV não foi utilizada, sendo empregadas, em vez disso, a coloração com azul de tripano e a microscopia especular para analisar a densidade celular, a mortalidade e a morfologia. No dia 14, a taxa média de mortalidade na região central da córnea foi de $0,54\% \pm 0,40\%$ para as córneas em Kerasave e de $0,14\% \pm 0,14\%$ para as córneas em Optisol-GS. Nas regiões periféricas da córnea, a taxa de mortalidade foi de $3,07\% \pm 0,93\%$ para as córneas em Kerasave e de $3,38\% \pm 0,78\%$ para as córneas em Optisol-GS. Essas taxas de mortalidade foram consideradas consistentes com uma preservação satisfatória durante o período analisado.

No único estudo publicado que analisou córneas de suínos preservadas em meio hipotérmico, por meio de MEV⁽⁹⁾, as córneas de porco foram armazenadas em 2,5% de sulfato de condroitina por até 10 dias. Taxas de mortalidade celular de 12%, no dia 5, e de 26%, no dia 10 de armazenamento, foram observadas, e essas taxas foram consideradas semelhantes às observadas para córneas humanas nesse meio. Rodella e colaboradores⁽¹⁰⁾ compararam os efeitos da preservação em Eusol-C e meio de cultura de órgãos, avaliando a densidade celular e a mortalidade, utilizando azul de tripano como marcador celular após um período de armazenamento de até 14 dias. A taxa de mortalidade foi estimada utilizando o software ImageJ. Ao final do período de armazenamento, as córneas de porco armazenadas no meio de cultura de órgãos e no Eusol-C apresentaram taxas de mortalidade de $<10\%$ e $<20\%$, respectivamente. Em um estudo semelhante, Giurgola *et al.*⁽¹¹⁾ investigaram a densidade, a morfologia e a mortalidade celular de córneas humanas e de porcinas após preservação em Eusol-C por 14 dias, lavagem com solução de limpeza e utilizando azul de tripano e microscopia especular. Ao final do período de armazenamento, a taxa de mortalidade endotelial aumentou em $3,1\% \pm 3,3\%$ nas córneas humanas e em $7,8\% \pm 3,5\%$ nas córneas de suínos. Com base nesses resultados, os autores concluíram que o uso do meio de preservação e da solução de limpeza foi seguro e eficaz, enfatizando o comportamento similar entre córneas de ambas as espécies.

No presente estudo, a perda celular endotelial foi de 3,01% após 14 dias de armazenamento, considerando as perdas médias nas regiões avaliadas. Em comparação com estudos anteriores sobre córneas de suínos, a porcentagem de perda celular obtida neste estudo foi menor do que a encontrada utilizando o mesmo período de armazenamento^(11, 10). No entanto, os métodos de análise empregados nesses estudos anteriores não envolveram a MEV. Em estudos anteriores de córneas humanas, nos quais a mortalidade endotelial foi estabelecida utilizando corantes vitais e visualização sob microscópio, a perda celular variou de 4% a 16% após 14 dias de armazenamento em meios de preservação⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾. Essas taxas também foram ligeiramente mais altas do que as encontradas em nossa pesquisa, embora ainda comparáveis, apesar das diferenças nos métodos de análise. Embora a diferença na perda endotelial entre G1 e G2 tenha sido estatisticamente significativa neste estudo, ela não foi considerada clinicamente relevante, já que se espera um certo grau de perda. Esse achado é consistente com os dados previamente publicados na literatura, indicando preservação satisfatória durante o período observado. No presente estudo atual, a porcentagem de perda celular foi avaliada como um parâmetro de preservação satisfatória com base nos estudos anteriores mencionados, pois a densidade celular pode ser significativamente diferente dependendo do método de fixação utilizado na amostra para MEV. Além disso, esses valores também podem variar dependendo do método de análise utilizado⁽³⁹⁾.

Este estudo avaliou a porcentagem de perda celular após preservação em meio Eusol-C. A densidade celular e a morfologia celular não foram avaliadas após o período de preservação. Em um estudo anterior, a densidade endotelial de córneas de porco avaliadas por MEV diminuiu após 10 dias

de armazenamento em meio de preservação⁽⁹⁾. Isso provavelmente ocorreu devido ao encolhimento celular e não seguiu o mesmo padrão da mortalidade celular, que aumentou durante ambos os períodos. Rodella *et al.*⁽¹⁰⁾ não observaram diferenças significativas na densidade endotelial de córneas de suínos e humanas armazenadas em Eusol-C por 14 dias. No entanto, a mortalidade endotelial aumentou significativamente ao longo do tempo. Esses resultados reforçam que a densidade celular não é um parâmetro confiável para esse tipo de avaliação. A morfologia celular foi avaliada apenas para garantir a inclusão de córneas saudáveis no estudo. Não se esperam mudanças significativas na morfologia celular em um estudo agudo.

As limitações do presente estudo incluem o tamanho reduzido da amostra, o tempo único de preservação, a ausência de avaliação funcional e a falta de estudos realizados com MEV, Eusol-C e análise da porcentagem de perda celular em suínos para comparar os resultados de forma mais precisa.

Este é o primeiro estudo a associar a avaliação do endotélio corneano de suíno preservado em meio hipotérmico Eusol-C com MEV, permitindo o cálculo da porcentagem de perda celular endotelial após o armazenamento. Os resultados demonstraram uma preservação satisfatória durante o período analisado, com taxas de perda celular comparáveis às reportadas em estudos anteriores, apesar das diferenças nos métodos de análise. Os autores sugerem estudos adicionais com amostras maiores e avaliação morfológica das córneas preservadas após o transplante.

5. Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram que o meio de preservação hipotérmico Eusol-C foi eficaz na preservação do endotélio corneano de suínos por até 14 dias.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados estarão disponíveis mediante solicitação

Contribuições do autor

Conceituação: A. F. Silva e J.A.T. Pigatto. Curadoria de dados: A. F. Silva e J.A.T. Pigatto. Investigação: A. F. Silva, A. P. Melo., A.M. Pigatto, R.S. Rocha, M.P. Seibel, N.P. Méndez e J.A.T. Pigatto. Gerenciamento do projeto: J.A.T. Pigatto. Redação (revisão e edição): A. F. Silva, A. P. Melo., A.M. Pigatto, R.S. Rocha, M.P. Seibel, N.P. Méndez e J.A.T. Pigatto.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Frigorífico Avisui e ao Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS (CMM-UFRGS) pelas suas contribuições para este estudo e agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que forneceu uma bolsa para dois dos autores (M.P.S. and N.P.M).

Referências

1. Joyce NC. 2012. Capacidade proliferativa das células endoteliais corneanas. *Exp Eye Res* 95: 16-23. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.08.014>
2. Lee SE, Mehra R, Fujita M, Roh DS, Long C, Lee W, Funderburgh JL, Ayares DL, Cooper DKC, Hara H. 2013. Caracterização do endotélio corneano de porco para xenotransplante. *Semin Ophthalmol* 29: 127-135. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/08820538.2013.787104>
3. Yoeurck E, Bayyoud T, Maurus C, Hofmann J, Spitzer MS, Schmidt KUB, Szurman P. 2012. Reconstrução do estroma corneano com xenógenos de córnea porcina decelularizada em um modelo de coelho. *Acta Ophthalmol* 90: 206-210. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02300.x>

4. Isidan A, Liu S, Li P, Lashmet M, Smith LJ, Hara H. 2019. Métodos de decelularização para o desenvolvimento de xenotransplantes de córnea porcina e perspectivas futuras. *Xenotransplantation* 26: e12564. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/xen.12564>
5. Yoon CH, Choi HJ, Kim MK. 2021. Xenotransplante de córnea: Qual é o nosso estágio atual? *Prog Ret Eye Res* 80: 1-40. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100876>
6. Saad HA, Terry MA, Shamie N, Chen ES, Friend DF, Holiman JD, Stoecker C. 2008. Um método simples e barato para análise quantitativa de dano endotelial utilizando coloração vital e software Adobe Photoshop. *Cornea* 27: 818-824. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181705ca2>
7. Menduni F, Davies LN, Madrid-Costa D, Fratini A, Wolffsohn JS. 2018. Caracterização do globo ocular suíno como modelo in vitro para síndrome do olho seco. *Cont Lens Anterior Eye* 41: 13-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clae.2017.09.003>
8. Crespo-Moral M, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y. 2020. Caracterização histológica e imuno-histoquímica da superfície ocular de suínos. *PLoS One* 15: 1-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227732>
9. Ellis MF, McGhee CNJ, Lee WR. 1992. Estudo do endotélio corneano suíno armazenado em sulfato de condroitina por microscopia eletrônica de varredura. *Cornea* 11: 127-132. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00003226-199203000-00006>
10. Rodella U, Bosio L, Ferrari S, Gatto C, Giurgola L, Rossi O, Ciciliot S, Ragazzi E, Ponzin D, Tothova JD. 2023. Modelo de armazenamento ex vivo de córnea suína como alternativa ao tecido de doadores humanos para investigações sobre preservação da camada endotelial. *Transl Vis Sci Technol* 12: 1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1167/tvst.12.4.24>
11. Giurgola L, Rodella U, Gatto C, Rossi O, Honisch C, Ragazzi E, Ruzza P, Ferrari S, Tothova JD. 2024. Avaliação de desempenho e segurança do armazenamento hipotérmico em câmara corneana e lavagem corneana com PSS-L em córneas humanas e suínas. *BMJ Open Ophthalmol* 9: e001453. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmjophth-2023-001453>
12. Albuquerque L, Pigatto AM, Pigatto JAT. 2020. Avaliação do endotélio corneano equino (*Equus caballus*) armazenado no meio de preservação Eusol-C®. *Semina: Cienc Agrar* 41: 3155-3164. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6Supl2p3155>
13. Arndt C, Reese S, Köstlin R. 2001. Preservação de tecido corneoescleral de cães e gatos em Optisol® GS. *Vet Ophthalmol* 4: 175-182. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1463-5216.2001.00146.x>
14. Kim SY, Park YH, Lee YC. 2008. Comparação do efeito da moxifloxacina, levofloxacina e cefazolina intracamerais sobre células endoteliais da córnea de coelhos. *Clin Exp Ophthalmol* 36: 367-370. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2008.01771.x>
15. Kunzmann BC, Hellwinkell OJC, Klameth C, Wenzel D, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS, Schultheiss M. 2017. Estabelecimento de um modelo de cultura organotípica do endotélio corneano suíno para fins de pesquisa. *Cell Tissue Banking* 19: 269-276. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9669-7>
16. Liou SW, Chiu CJ, Wang IJ. 2004. Efeito da injeção intracameral de lidocaína e carbacol sobre o endotélio corneano de coelhos. *J Cataract Refract Surg* 30: 1351-1355. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2003.10.032>
17. Pigatto JAT, Abib FC, Pizzetti JC, Laus JL, Santos JM, Barros PSM. 2005. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos por microscopia eletrônica de varredura. *Acta Sci Vet* 33: 41-45. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/20027>
18. Tamayo-Aranjo LJ, Baraldi-Artoni SN, Laus JL, Vicenti FAM, Pigatto JAT, Abib FC. 2009. Morfologia ultraestrutural e morfometria do endotélio corneano normal de suínos mestiços adultos. *Cienc Rural* 39: 117-122. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000100018>
19. Fujita M, Mehra M, Lee SE, Roh DS, Long C, Fundenburgh JL, Ayares DL, Cooper DKC, Hara H. 2013. Comparação da capacidade proliferativa de células endoteliais corneanas geneticamente modificadas de suínos e humanos. *Ophthalmic Res* 49: 127-138. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000342978>
20. Brooks DE, Plummer CE, Kallberg ME, Barrie KP, Ollivier FJ, Hendrix DVH, Baker A, Scotty NC, Utter ME, Blackwood SE, Nunnery CM, Ben-Sholmo G, Gelatt KN. 2008. Transplante de córnea para ceratopatias inflamatórias em equinos: Resultado visual em 206 casos (1993–2007). *Vet Ophthalmol* 11: 123-133. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00611.x>
21. Henriksen ML, Plummer CE, Mangan B, Ben-Sholmo G, Tsujita H, Greenberg S, Toft N, Brooks DE. 2012. Resultado visual após transplante de córnea por perfuração corneana e prolapso de íris em 37 cavalos: 1998–2010. *Equine Vet J* 44: 115-119. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00657.x>
22. Usha B, Kontsevaya S, Lutsay V, Nityaga IM, Lukashina UE. 2019. Ceratoplastia penetrante com córnea de doador preservada na oftalmologia veterinária. *J Mol Biol Res* 9: 71. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5539/jmbr.v9n1p71>
23. Kanavi MR, Javadi MA, Chamani T, Fahim P, Javadi F. 2014. Comparação dos índices quantitativos e qualitativos de córneas doadas mantidas em Optisol-GS com aquelas mantidas em Eusol-C. *Cell Tissue Bank* 16: 243-247. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9466-5>
24. Yuksel MB, Uzunel UD, Küsbeci T. 2016. Viabilidade de células endoteliais de córneas doadoras preservadas no meio de armazenamento corneano Eusol-C. *Exp Clin Transplant* 14: 441-444. Disponível em: <https://doi.org/10.6002/ect.2014.0295>
25. Rodella U, Piaia M, Giurgola L, Gatto C, Tóthová JD. 2025. Modelo ex vivo de córnea e globo ocular bovino para simular condições de armazenamento de córnea humana e cirurgias oculares. *Cell Tissue Bank* 26: 1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-025-10162-7>

26. Wang Q, Liu Y, Gao Y, Zhang M, Yang L, Hu J, Ren Y, Zhou Q, Zhu M. 2024. Comparação da integridade estrutural e qualidade do endotélio corneano armazenado em meio de cultura de órgão versus Eusol-C. *Cell Tissue Bank* 25: 839-850. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-024-10138-z>
27. Gisoldi RAMC, Pocobelli G, Rodella U, Giurgola L, Gatto C, Lodato G, Buffon G, Nucci C, Tóthová JD, Pocobelli A. 2024. Resultados clínicos retrospectivos de ceratoplastia utilizando córneas humanas doadoras preservadas em meio de armazenamento hipotérmico Eusol-C. *J Clin Med* 13: 1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm13247606>
28. Mena-Linares EE, Vásquez-Maya L, García-Carmona K, Martínez-Mijared MA, Baldivieso-Hurtado R. 2023. Viabilidade de células endoteliais comparando Eusol-C versus Optisol-GS como meio de preservação corneana. *Rev Med Hosp Gen Mex* 86: 129-134. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.24875/HGMX.22000083>
29. Kim DH, Kim J, Jeong HJ, Lee HJ, Kim MK, Wee WR. 2016. Compatibilidade biofísico-funcional da córnea de mini suíno da Universidade Nacional de Seul (SNU) como enxerto xenocorneano para uso em ensaio clínico humano. *Xenotransplantation* 23: 202-210. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/xen.12234>
30. Shi Y, Bikkuzin T, Song Z, Jin X, Jin H, Li X, Zhang H. 2017. Avaliação abrangente da córnea suína descelularizada após transplante clínico. *Xenotransplantation* 24: 1-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/xen.12338>
31. Heichel J, Wilhelm F, Kunert KS, Hammer T. 2016. Achados topográficos da córnea suína. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 5: 125-131. Disponível em: <https://mehdijournal.com/index.php/mehdiophthalmol/article/view/308>
32. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. 2011. Os parâmetros do globo ocular suíno. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249: 475-482. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00417-011-1617-9>
33. Chan KY, Cho P, Boost M. 2014. Viabilidade de células epiteliais corneanas em modelo ex vivo de olho suíno. *Clin Exp Optom* 97: 337-340. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cxo.12128>
34. Hwang, H, Kim M. 2009. Dano endotelial de uma córnea doadora dependendo do método de inserção do doador durante a ceratoplastia endotelial automatizada com retirada de Descemet em olhos suínos. *Jpn J Ophthalmol* 53: 523-530. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10384-009-0713-4>
35. Albuquerque L, Freitas LVRP, Pigatto JAT. 2016. Análise do endotélio corneano em olhos de galinhas utilizando microscopia especular de contato. *Semina: Ciênc Agrár* 36: 4199-4205. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4199>
36. Azevedo MG, Méndez NP, Cargnin LS, Rocha RS, Seibel MP, Silva AF, Pigatto JAT. 2023. Microscopia especular das células endoteliais da córnea de bovinos: um estudo ex vivo. *Open Vet J* 13: 1554-1561. Disponível em: <https://doi.org/10.5455/ovj.2023.v13.i12.5>
37. Bercht BS, Albuquerque L, Araújo ACP, Pigatto JAT. 2015. Microscopia especular para determinação da morfologia e morfometria das células endoteliais da córnea em chinchilas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Vet Ophthalmol* 48: 137-142. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vop.12236>
38. Vargas EVB, Pigatto AM, Rocha RS, Franceschini MEM, Pigatto JAT. 2023. Microscopia especular das diferentes regiões da córnea em olhos suínos enucleados – avaliação ex vivo. *Ciênc Anim Bras* 24: 1-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-75138E>
39. Mistò R, Giurgola L, Pateri F, Limongelli A, Ragazzi E, Tothova JD. 2020. Um novo meio de conservação contendo anfotericina B versus Optisol-GS para preservação de córneas humanas doadoras. *Br J Ophthalmol* 106: 1-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-317136>
40. Abramson, JH. 2011. WINPEPI atualizado: programas de computador para epidemiologistas e seu potencial didático. *Epidemiol Perspect Innov* 8: 1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1742-5573-8-1>
41. Andrew SE, Samuelson DA, Lewis PA, Kubilis PS. 1999. Comparação entre Optisol-GS e solução oftálmica de neomicina-polimixina B-gramicidina para armazenamento de córneas em cães. *Vet Ophthalmol* 2: 155-161. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.1999.00070.x>
42. Chaurasia S, Vanathi M. 2021. Microscopia especular na prática clínica. *Indian J Ophthalmol* 69: 517-524. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_574_20
43. Sharma N, Shaikh F, Nagpal R, Manumuraleekrishna, Maharana PK, Agarwal T, Sinha R, Satpathy G, Velpandian T, Titiyal JS. 2021. Avaliação de diversos meios de preservação para armazenamento de córneas doadoras. *Indian J Ophthalmol* 69: 2452-2456. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_258_21
44. Gimenes I, Pintor AVB, Sardinha MS, Marañón-Vázquez GA, Gonzalez MS, Presgrave OCF, Maia LC, Alves GG. 2022. Meios de armazenamento a frio versus Optisol-GS na preservação da qualidade corneana para ceratoplastia: uma revisão sistemática. *Appl Sci* 12: 1-30. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app12147079>
45. Javadi MA, Arkbarzadeh AR, Chamani T, Kanavi MR. 2021. Sinasol versus Optisol-GS para preservação a frio da córnea humana: estudo prospectivo ex vivo e clínico. *Cell Tissue Bank* 22: 563-574. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09930-y>
46. Guimarães CB, Albuquerque L, Torikachvili M, Vargas EV, Dall-Agnol CC, Silva TC, Pigatto JAT. 2019. Efeitos do besilato de atracúrio sobre o endotélio corneano de galinhas: estudo in vitro. *Pesq Vet Bras* 39: 70-74. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5595>

47. Park S, Fong A, Cho H, Zhang C, Gritz D, Mian G, Herzlich A, Gore P, Morganti A, Chuck R. 2012. Protocolo para coloração vital de células endoteliais da córnea. *Cornea* 31: 1476-1479. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ico.0b013e31824d0dda>
48. Means TL, Geroski DH, Hadley A, Lynn MJ, Edelhauser HF. 1995. Viabilidade do endotélio corneano humano após armazenamento em Optisol-GS. *Arch Ophthalmol* 113: 805-809. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archophth.1995.01100060131047>
49. Parekh M, Salvalaio G, Ferrari S, Amoureux MC, Albrecht C, Fortier D, Ponzin D. 2014. Um método quantitativo para avaliar a qualidade do tecido corneano doador utilizado em um estudo comparativo entre dois meios de preservação por hipotermia. *Cell Tissue Bank* 15: 543-554. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9424-2>