

# AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO ENDOTÉLIO DA CÓRNEA DE COELHOS APÓS DUAS TÉCNICAS DE COLORAÇÃO DA CÁPSULA ANTERIOR DO CRISTALINO COM AZUL DE TRIPAN

## EVALUATION OF THE CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS OF RABBITS AFTER TWO TECHNIQUES OF STAINING OF THE ANTERIOR LENS CAPSULE WITH TRYPAN BLUE

FAGANELLO, C.S.<sup>1\*</sup>, BELLINI, L.P.<sup>2</sup>, ALBUQUERQUE, L.<sup>1</sup>, FRANZEN, A.A.<sup>3</sup>, RIGON<sup>4</sup>, G. M., HÜNNING, P.S.<sup>4</sup>, PIGATTO, J.A.T.<sup>5</sup>

### RESUMO

O azul tripan é utilizado rotineiramente para corar a cápsula anterior do cristalino durante a remoção da catarata. Objetivou-se avaliar as repercussões relativas à ultraestrutura das células do endotélio da córnea de coelhos de duas técnicas de coloração da cápsula anterior do cristalino com azul de tripan. Foram estudados 24 olhos de coelhos divididos em dois grupos. Nas amostras do GI injetou-se azul de tripan e nas amostras do GII injetou-se uma bolha de ar previamente a injeção de azul de tripan. A superfície posterior das células do endotélio da córnea foi analisada utilizando a microscopia eletrônica de varredura dez minutos após o procedimento cirúrgico. O endotélio corneano de coelhos constitui-se de células poligonais uniformes em tamanho e forma, e com interdigitações das bordas celulares. Vizibilizaram-se microvilosidades na superfície celular. Em ambas as técnicas de aplicação de azul de tripan não foram observadas alterações ultraestruturais nem perdas celulares endoteliais. Este estudo demonstrou que ambas as técnicas empregadas na coloração da cápsula anterior do cristalino de coelhos não apresentaram sinais de toxicidade no endotélio da córnea.

**Palavras-chave:** capsulotomia anterior, azul de tripan, endotélio da córnea, coelhos.

### ABSTRACT

The trypan blue has been used to help surgeons visualize the anterior lens capsule. The aim of this study was to examine the ultrastructure of the posterior corneal endothelial cells after two techniques of staining of the anterior lens capsule with trypan blue using scanning electron microscopy. Twenty four eyes of 12 rabbits had anterior capsule staining with trypan blue or trypan blue under an air bubble. Each stain was used in 12 eyes. Ten

---

<sup>1</sup> <sup>1</sup>Estudante de Graduação, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Médico, Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Médica Veterinária, Mestre, autônoma, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Médica Veterinária, Residente, Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>5</sup>Médico Veterinário, Doutor, Professor Adjunto, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

minutes after surgical procedures the endothelial posterior surface morphology was analyzed using scanning electron microscopy. The corneal endothelium of rabbits consisted of polygonal cells of uniform size and shape with interdigitations of the cell borders. Microvilli appeared on the cellular surface. Neither stain was associated with corneal endothelial cell damage. This study demonstrates that both techniques were found to be safe with reference to change in corneal endothelial cell.

**Key words:** capsulotomia anterior, trypan blue, corneal endothelial cell, rabbits.

## **INTRODUÇÃO**

A capsulotomia circular contínua é um passo extremamente importante na cirurgia de catarata. Entretanto, esse procedimento torna-se difícil de ser realizado em casos onde a cápsula anterior não é facilmente visibilizada devido à ausência parcial ou total do reflexo do fundo do olho (Chung et al., 2005). A visualização inadequada da cápsula anterior pode levar a uma capsulotomia incompleta ou deficiente. O corante mais utilizado para a coloração da cápsula anterior é o azul de tripan por proporcionar elevado grau de contraste aliado à baixa toxicidade endotelial e ser economicamente viável (Malta et al., 2006; Melles, et al., 2009). Várias técnicas têm sido utilizadas visando minimizar o efeito do corante sobre o endotélio da córnea (Dada et al., 2002). A integridade e a atividade metabólica do endotélio são essenciais para a manutenção da transparência corneana (Waring et al., 1982). Objetivou-se com este estudo avaliar a repercussão de duas técnicas de aplicação de azul de tripan para coloração da cápsula anterior do cristalino sobre o endotélio da córnea usando a microscopia eletrônica de varredura.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Estudaram-se 24 olhos normais de 12 coelhos, linhagem Nova Zelândia, machos ou fêmeas, com 6 meses de idade, eutanasiados por razões não relacionadas a este estudo. Os olhos foram avaliados para determinar as condições de higiene através de biomicroscopia com lâmpada de fenda (Portable Slit HSL 150, Heine Company, Alemanha) e transportados ao laboratório em câmara úmida. Somente bulbos oculares com córneas híidas foram utilizados. A pesquisa foi conduzida obedecendo-se aos critérios da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Nos bulbos oculares direitos foi realizada uma incisão da córnea com bisturi de 15° (Bisturi, Alcon do Brasil, São Paulo, SP), e com uma cânula acoplada a uma seringa de 1 ml foi injetado 0,1ml de azul de tripan. Após 10 minutos a câmara anterior foi irrigada com de solução salina balanceada e a córnea removida. Nos bulbos oculares esquerdos foi realizada uma incisão de córnea com bisturi de 15° e injetado com seringa de 1 ml 0,3 ml de ar e posteriormente 0,1 ml de azul de tripan. Após 10 minutos a câmara anterior foi irrigada com solução salina balanceada. As córneas foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio durante 8 horas. O processamento e a análise das amostras foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As córneas foram lavadas na solução tampão e desidratadas em concentrações ascendentes de acetona (30, 50, 70, 85, 90 e 100%), sendo 15 minutos para cada concentração, e três vezes na concentração de 100%. Ato contínuo foram secas em secador de ponto crítico utilizando-se dióxido de carbono líquido. Foram fixadas em porta-espécime, com fita condutiva de cobre e cola de carbono, e metalizadas com uma camada de ouro e paládio de 35 nm de espessura durante dois

minutos. Cada amostra foi examinada em microscópio eletrônico de varredura operado com 15 Kv. Foram feitas 10 eletromicrografias de cada córnea com aumento de 750 vezes. Ocasionalmente, obtiveram-se imagens com outros aumentos.

## RESULTADOS

O endotélio corneano de coelhos caracterizou-se por uma monocamada de células poligonais uniformes em tamanho e forma. As bordas celulares apresentaram interdigitações e sobre a superfície celular observou-se um número variável de microvilosidades. Em nenhuma eletromicrografia de varredura analisada foi observada perda celular ou dano na ultraestrutura das células do endotélio a córnea.

## DISCUSSÃO

A capsulotomia circular contínua é um passo crucial na cirurgia de catarata contemporânea. Entretanto, esta técnica pode ser dificultada quando a cápsula não é bem visualizada, como nos casos de catarata madura (Chung et al., 2005). Várias técnicas têm sido realizadas para compensar a falta de reflexo do fundo de olho. Dentre elas a diminuição da luz da sala cirúrgica, aumento da magnificação do microscópio, iluminação lateral e uso de viscoelástico de alto peso molecular (Chung et al., 2005). Porém a solução mais efetiva para visualização da cápsula anterior da lente é a utilização de um corante vital (Marques et al., 2004; Melles et al., 1999). Alguns dos corantes utilizados apresentam inúmeras desvantagens, a fluoresceína pode eventualmente corar a córnea e migrar para a cavidade vítrea devido ao seu baixo peso molecular e sua injeção subcapsular também cora o córtex dificultando a distinção deste e da cápsula anterior do cristalino (Dada, et al., 2002). A hemocoloração com sangue autólogo requer preparação prévia de hemoderivados. A utilização da combinação de violeta de genciana 0,1% com azul de metileno 1% apresenta edema corneal pós-operatório resultante de toxicidade endotelial. Dentre os corantes mais utilizados para a coloração da cápsula anterior do cristalino destaca-se principalmente o azul de tripan (Malta et al., 2006; Vasavada et al., 2007). Tal razão motivou avaliar duas maneiras de utilizar o azul de tripan na coloração da cápsula anterior do cristalino. Alguns autores relatam que a técnica de coloração da cápsula anterior da lente com azul de tripan e bolha de ar é tóxica ao endotélio corneal (Dada et al., 2002). Entretanto, no presente estudo não foram observados sinais de toxicidade nas células do endotélio da córnea de coelhos. Ambas as técnicas mostraram-se eficazes.

## CONCLUSÕES

Mediante os resultados encontrados é possível concluir que ambas as técnicas de coloração da cápsula anterior do cristalino com azul de tripan não apresentaram sinais de toxicidade endotelial.

## REFERÊNCIAS

Dada VK, Sudan R, Sharma N, Dada T. Trypan blue with a viscoelastic agent. **J Cataract Refract Surg.** 2002; 28:205-206.

Chung CF, Liang CC, Lai JSM, Lo ESF, Lam DSC. Safety of trypan blue 1% and indocianina green 0,5% in assisting visualization of anterior capsule during phacoemulsification in mature cataract. **J Cataract Refract Surg.** 2005;31:938-942.

Malta JBNS, Felberg S, Murça MAS, Barros MAC, Mimica LMG. Risco de contaminação do corante azul de tripano após primeira utilização. **Arq Bras Oftalmol.** 2006; 69:27-31.

Marques DMV, Marques FF, Osher RH. Three-step technique for staining the anterior lens capsule with indocyanine green or trypan blue. **J Cataract Refract Surg.** 2004;30:13-16.

Marques FF, Soccol FM, Marques DMV, Rehdler JRCL. Impregnação inadvertida da cápsula posterior do cristalino com azul de tripan durante facectomia extracapsular: relato de caso. **Arq Bras Oftalmol.** 2006; 69:111-113.

Melles GRJ, Waard PWT, Pameyer JH, Beekhuis H. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. **J Cataract Refract Surg.** 1999;25:7-9.

Vasavada AR, Praveen MR, Pandita D, Gajjar DU, Vasavada VA, Vasavada VA. Effect of stromal hydration of clear corneal incisions: Quantifying ingress of trypan blue into the anterior chamber after phacoemulsification. **J Cataract Refract Surg.** 2007;33:623-627.

Waring G.O., Bourne W.M. & Edelhauser H.F. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. **Ophthalmology.** 89: 1982, 89:531-590.