

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Aspectos epidemiológicos e morfológicos das córneas
retiradas para transplante no Distrito Federal/Brasil**

THAYSSA NEIVA DA FONSECA VICTER

THAYSSA NEIVA DA FONSECA VICTER

**Aspectos epidemiológicos e morfológicos das córneas retiradas para transplantes
no Distrito Federal/Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sônia Nair Bão.

Brasília – DF

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao mundo por mudar as coisas e nunca as fazer serem da mesma forma e à minha família por acreditar em meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus amados pais, João e Meire, os quais sempre primaram e incentivaram minha educação. Me ensinaram o verdadeiro valor e o potencial que a educação tem em minha formação tanto como pessoa quanto cidadã do mundo. Agradeço a eles todas as oportunidades e investimentos que fizeram para que eu pudesse trilhar meu caminho e conquistar meus sonhos. À toda minha família, registro aqui minha gratidão, pelo apoio inestimável e motivação durante todo o curso.

Ao meu grande amigo M.Sc Danilo Corazza, meu espelho de competência, esforço, inteligência e veterano na pós-graduação. Obrigada pelos momentos de conforto, motivação, leitura e releitura. Obrigada pelo esforço em aprender sobre um tema, o qual não é sua especialidade, apenas para me ajudar. Todas as trocas de experiência do mundo acadêmico foram essenciais para que eu pudesse continuar a cursar o mestrado da melhor forma que eu poderia. Obrigada pela companheirismo e longo futuro na área da saúde.

Agradeço à Dra. Thatiane Lima pela oportunidade de iniciar meus estudos e aprofundar meus conhecimentos em uma área tão inesperada e encantadora. Principalmente à Professora Dra. Sônia Nair Bão por me acolher em seu laboratório, aceitar os desafios desse novo projeto, paciência e orientação impecável durante a execução desse trabalho. Foi um prazer ter a oportunidade de vê-la gerenciar os projetos de pesquisa e, principalmente, admirar sua didática em sala de aula. Pode ter certeza que em mim há grande influência de sua determinação, seriedade e responsabilidade em minha personalidade pessoal e profissional. Os quais espero um dia poder também inspirar meus alunos como fui inspirada pela senhora.

Ao Diogo Loiola, meu braço direito e amigo fiel, não há palavras no mundo que sejam justas ao meu sentimento de gratidão. Obrigada pelo companheirismo, motivação, trabalho duro durante todos os minutos desse projeto. Poder contar com sua personalidade leve, engraçada e pró-ativa fez com que todos os desafios fossem conquistados. Sua perseverança e responsabilidade é admirável, portanto tenha certeza que aprendi muito mais com você, do que você pensa que aprendeu comigo.

Aos meus amigos do laboratório, Ingrid, Diogo, Letícia, Yasmin e todos os outros colegas, agradeço pelas disponibilidades, conselhos, companhia e motivação.

À equipe de profissionais do Banco de Olhos do DF, no Hospital de Base de Brasília, pela acessibilidade, paciência, cordialidade nas etapas de execução desse projeto. Espero que todos os resultados apresentados nesse trabalho possam ajuda-los a melhorar a rotina do processo de doação e assim oferecer à comunidade o melhor serviço possível. Obrigada por continuarem me mostrando a importância de trabalhar com saúde pública através do admirável objetivo da equipe, que é tentar dar segundas chances a todos que precisam por meio da doação de órgãos.

À Dra. Micheline Borges por toda a excelência técnica, colaboração e orientação, além de não medir esforços em compartilhar seus conhecimentos. Foi um prazer aprender e entender a necessidade da pesquisa no campo de transplante de córneas. Espero que os resultados que

encontramos sejam de utilidade para a comunidade científica no campo de oftalmologia, principalmente, aos cirurgiões transplantadores.

A todos os colegas da Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde (CGLAB), pelo apoio no início do curso de mestrado.

A todos meus colegas e amigos do Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis (DEVIT), em especial, ao Marcello Novaes, Mariana Siebra, Marcelo Yamada, Guilherme Sheldon e Luana D'Almeida pelo incontestável incentivo, paciência, acalento nos momentos de ansiedade e principalmente por tornar meus dias mais leves e divertidos até o final dessa etapa. Obrigada por acreditarem em mim e pela oportunidade de utilizar toda a experiência acadêmica e espero, um dia, deixá-los orgulhosos.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília e as agências financiadoras CAPES, CNPq, FINEP, FINATEC e FAP-DF.

Aos membros da banca que aceitaram prontamente o convite.

E o que dizer a vocês Felipe e Noah Victor? Os quais fazem absolutamente tudo ter sentido? Agradecer a vocês, talvez essa seja a parte mais difícil desse trabalho. O meu agradecimento mais profundo sempre será ao melhor marido e filho que eu poderia esperar. Incondicionalmente ao meu lado em todas as vitórias e dificuldades, sempre me fazendo acreditar que eu conseguiria finalizar e garantindo que eu sentisse a confiança de que estava fazendo sempre o meu melhor. O publicitário que melhor aprendeu a pipetar, que expandiu seu mundo profissional e tudo isso para dar apoio ao imergir no meu mundo. Portanto, acredito que juntos em família sempre venceremos os desafios da vida e sou grata ao amor incondicional.

EPÍGRAFE

“Você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. ”

(W. Shakespeare)

Sumário

1. Introdução	11
1.1 Morfologia da Córnea	12
1.2 Epidemiologia do Transplante de Córnea no Brasil	16
2. Justificativa	19
3. Objetivos	21
3.1 Objetivos Gerais	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. Materiais e Métodos	21
4.1 Tipo de Pesquisa	21
4.2 Desenho Experimental	21
4.3 Sujeitos da Pesquisa, critérios de inclusão e exclusão	23
4.4 Análise de Qualidade das Córneas	23
4.5 Dados Epidemiológicos	25
5. Resultados	26
5.1 Epidemiologia- Artigo 1	26
5.2 Morfologia- Artigo 2	42
6. Conclusões Gerais	66
7. Perspectivas	69
8 . Referências Bibliográficas	70
9. Anexo I (TCLE)	75

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema do globo ocular humano	04
Figura 2 – Esquema das estruturas da córnea	05
Figura 3 – Transplantes de córnea realizados no Brasil de 2008 a 2017	09
Figura 4- Desenho experimental do projeto	13
Figura 5- Desenho experimental da análise morfológica.....	13

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATPase	Adenosinatrifosfatase (enzimas catalizadoras)
BB	Técnica de BigBuble (injeção de ar na estrutura da córnea)
CO ₂	Dióxido de Carbono
DALK	Transplante Lamelar Anterior Profundo (Deep Anterior Lamelar Keratoplasty)
DF	Distrito Federal
DMEK	Transplante Lamelar da Membrana de Descemet (Descemet membrane endothelial keratoplasty)
DSAEK	Transplante Lamelar da Membrana de Descemet Automatizado (Descemet stripping automated endothelial keratoplasty)
EC	Endotélio Corneano
ECD	Densidade do Endotélio Corneano
H.E	Coloração com corantes Hematoxilina e Eosina
HEX	Taxa de Células Endoteliais Hexagonais
K	Potássio (Elemento Químico)
M	Massa Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Na	Sódio (Elemento Químico)
Optisol-GS	Meio de preservação oftalmológico comercial
PDF	Portable Document Folder
pH	Potencial de Hidrogênio
pmp	Milhão de População
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SES-DF	Secretaria de Saúde de Estado do Distrito Federal
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

°C Graus Celsius

µm Micrometros

RESUMO

O programa de transplante de órgãos sólidos e tecidos do Brasil é um dos maiores do mundo. O transplante de córnea é o procedimento aplicado para tratamento para a maioria dos casos de cegueira, os quais estão relacionados a problemas na córnea. Os Bancos de Olhos possuem a função primordial na procura, captação, preservação e distribuição de córneas para fins de transplante e ao longo dos anos vêm buscando meios para aumentar a qualidade das córneas ofertadas. Existem vários fatores que podem influenciar no aspecto qualitativo da córnea como idade do doador, número das células endoteliais, além do tempo entre morte, enucleação e preservação do tecido. Visando a melhor qualidade das córneas ofertadas pelo Banco de Olhos do Distrito Federal, este trabalho caracterizou a influência morfológica ao longo do tempo na preservação dos tecidos oculares, causa mortis dos doadores e motivos para o descarte das córneas retiradas do banco para transplantes. Identificamos 1547 notificações de potenciais doadores resultando em um total de 3074 córneas doadas ao Banco de Olhos do DF. As características sócio demográficas demonstraram diferença entre gêneros (masculino, 74,8% e feminino, 25,2%), média de idade dos doadores foi de $40 \pm 15,9$ anos. 25% das causas de morte foram por doenças cardiovasculares, seguido por 19,6% de perfuração por arma de fogo e 14,2% foram politraumatismos. Aproximadamente 60% (n=1836) foram transplantadas e 40% (n=1238) foram descartadas. Em relação às causas de descarte, 68% (n = 841) foram devidas a exames sorológicos positivos ou indeterminados e 39% (n = 486) por vencimento (período máximo garantido expirado de preservação da córnea). O tempo máximo de armazenamento conhecido para as córneas doadoras no meio de preservação Optisol-GS é limitado a 14 dias. Analisamos a morfologia de cada camada de 10 córneas preservadas em meio Optisol-GS, a 4 ° C, por microscopia especular em até 48 horas após a preservação e microscopia ótica, eletrônica de varredura e transmissão, com intervalos de preservação de 7, 10, 12, 14, 16 e 20 dias. Observamos discretas alterações morfológicas para as amostras do 10º dia e mais severas para o 14º, 16º e 20º dias. Como as lamelas estromais incompactas, diminuição ou ausência de células epiteliais e do endotélio, descontinuidade do padrão hexagonal, ruptura do citoplasma e desorganização stromal. Também registramos a estrutura morfológica da camada de Dua em imagem de alta qualidade. Tecidos da córnea armazenados por mais de 10 dias não são apropriados para transplantes ópticos.

Palavras chaves: transplante, córnea, morfologia, preservação, optisol-GS, epidemiologia.

ABSTRACT

The Brazilian solid and tissue organ transplantation program is one of the largest in the world. Corneal transplantation is the procedure used to treat most of the cases of blindness, which are related to corneal impairment. The Eye Banks have the primary function in the search, capture, preservation and distribution of corneas for the purpose of transplantation and over the years have been looking for ways to increase the quality of the corneas offered. There are several factors that influence the qualitative aspect of the cornea such as donor age, number of endothelial cells, plus time between death, enucleation and tissue preservation. Aiming at the best quality of the corneas offered by the Bank of Eyes of the Federal District, this work characterized the morphological influence over time in the preservation of ocular tissues, donors *causa mortis* and reasons for the disposal of the corneas removed from the bank for transplants. We identified 1547 notifications of potential donors resulting in 3074 corneas donated to DF Eye Bank. The socio-demographic characteristics showed a difference between genders (male, 74.8% and female, 25.2%), mean age of the donors was 40 ± 15.9 years. 25% of the causes of death were due to cardiovascular diseases, followed by 19.6% of firearms and 14.2% were polytrauma. Approximately 60% (n = 1836) were transplanted and 40% (n = 1238) were discarded. Regarding the causes of discharge, 68% (n = 841) were due to positive or indeterminate serological tests and 39% (n = 486) by maturity (maximum guaranteed expired period of corneal preservation). The known maximum storage time for donor corneas in the Optisol-GS preservation medium is limited to 14 days. We analyzed the morphology of each layer of 10 corneas preserved in Optisol-GS medium, at 4 ° C, by specular microscopy up to 48 hours and optical and electronic scanning and transmission electron microscopy, with preservation intervals of 7, 10, 12, 14, 16 and 20 days. We observed discrete morphological changes for the samples of the 10th day and more severe for the 14th, 16th and 20th days. Like uncompressed stromal lamellae, decreased or absent epithelial and endothelial cells, hexagonal pattern discontinuity, cytoplasmic rupture, and stromal disorganization. We also recorded the morphological structure of the Dua layer in high quality image. Corneal tissues stored for more than 10 days are not appropriate for optical transplants.

Key words: transplantation, cornea, morphology, preservation, optisol-GS, epidemiology.

1. Introdução

O globo ocular humano é um conjunto de estruturas biológicas cuja função é possibilitar a captação de luz para realizar a função óptica do olho humano (Ramos, 2006; Presland e Price, 2016). É considerado um globo esférico imperfeito devido a variação do raio de curvatura de uma de suas estruturas externa (córnea) em relação aos demais componentes do próprio globo (Almeida, 2016). É constituído por três membranas básicas: neurosensorial (retina), vascular (íris, corpo ciliar e coroide) e fibrosa (córnea e esclera). As estruturas principais do olho humano são formadas por dois segmentos: o anterior (espaço entre a córnea e a íris e anterior ao cristalino) e o posterior (delimitado pelo cristalino e envolvendo humor vítreo, retina, coroide e nervo óptico) (Silva et al, 2013) (Fig. 1). O desenvolvimento histológico do globo ocular inicia a partir do tubo neural na 3ª semana de gestação simultaneamente com o sistema nervoso central (Guimarães, 2003).

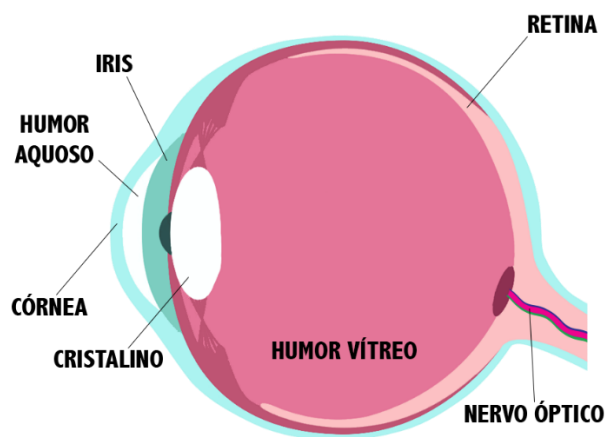


Figura 1: Esquema do globo ocular humano. Adaptado de Higgins (2009).

A córnea humana é o tecido oftalmológico que forma a camada externa transparente em cobertura da íris e é responsável por dois terços do poder refrativo total do olho humano (Delmonte e Kim, 2011; Almeida, 2016; Presland e Price, 2016; Alzahrani *et al.*, 2017). A morfologia e curvatura da córnea são gerenciadas pela estrutura biomecânica intrínseca e o ambiente exterior (Usp, 2010; Delmonte e Kim, 2011). A córnea mede de 11 a 12 mm no sentido horizontal e 9 a 11 mm no sentido vertical (Marfurt *et al.*, 2010; Delmonte e Kim, 2011; Jacob e Naveen, 2016). A espessura pode variar entre 0,5 mm na região central da córnea e aumenta em até 1 mm em regiões próximas ao

limbo, estrutura de transição entre a córnea e a esclera, sendo considerado o tecido innervado mais denso do corpo humano (Jacob e Naveen, 2016). O grau de hidratação e disposição das fibras colágenas é o que diferencia a córnea da esclera. Apesar de ser uma estrutura avascular, sua nutrição e oxigênio provem de vasos localizados na periferia no limbo do humor aquoso e no filme lacrimal. O poder de refração desse tecido é sua principal função, além de servir como barreira de proteção (Usp, 2010; Alzahrani *et al.*, 2017).

1.1 Morfologia da Córnea

A córnea é histologicamente caracterizada em seis camadas básicas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, camada de Dua, membrana de Descemet e endotélio (Fig. 2).



Figura 2: Esquema das estruturas da córnea. Adaptado (Peh *et al.*, 2011).

O epitélio é a primeira barreira para o ambiente exterior ao órgão, estrato tipo escamoso e não queratinizado. As células superficiais possuem desmossomas e junções que estão presentes principalmente ao longo da superfície proporcionando uma barreira eficaz contra microrganismos e à penetração de lágrimas (Jacob e Naveen, 2016). Rotineiramente podem sofrer apoptose e descamação involuntariamente ou causada por traumas (Usp, 2010). As células epiteliais apresentam o formato poligonal e formam de duas a três camadas. A camada mais profunda do epitélio da córnea é basal, a qual consiste em um único estrato de células colunares com aproximadamente 20 μm de altura e secreta colágeno tipo IV e laminina. (Delmonte e Kim, 2011).

A membrana de Bowman's é uma resistente camada acelular, medindo 10 a 15 μm e localiza-se entre o epitélio e o estroma. Tem a função de auxiliar na manutenção da forma do tecido, resistência ao trauma (protegendo o estroma e nervos associados), e proteção contra a radiação ultravioleta (Schlötzer-Schrehardt e Kruse, 2016). É composta

por arranjos de fibra de colágeno tipo I. Apresenta declínio de 0,06 μm em sua espessura a cada ano de vida, e perde, em média de 1/3 da espessura total entre os 20 a 80 anos de idade (Delmonte e Kim, 2011; Jacob e Naveen, 2016; Schlötzer-Schrehardt e Kruse, 2016; Alzahrani *et al.*, 2017).

O estroma é a principal membrana responsável pela estrutura mecânica e até 90% da espessura da córnea. É morfológicamente composta por fibras de colágeno heterodiméricas, principalmente tipos I e V e dentre essa organização, encontram-se os fibroblastos como componente celular. Possuem seu formato adequado ao espaçamento disponível pelas fibras de colágeno e formam uma rede celular através de ramificações dendríticas. Essa camada caracteriza-se por sua avascularidade e inervação localizada em maior quantidade na periferia do tecido do que na parte central. A transparência observada deve-se a organização em lamelas das fibras de colágeno, matriz de proteoglicanas altamente expressas nos espaços intra-fibrilares (Ishida *et al.*, 1984; West-Mays e Dwivedi, 2006; Usp, 2010; Delmonte e Kim, 2011; Alzahrani *et al.*, 2017).

Em 2013, o grupo de estudo liderado pelo Dr. Harminder S. Dua sugeriu a redefinição da estrutura morfológica da córnea ao propor a existência de uma sexta camada, chamada de Dua's (Dua's Layer), ao observar em seus resultados, uma estrutura bem definida localizada na parte posterior da córnea (entre o estroma e a membrana de Descemet). Para possibilitar a visualização desta nova camada, foi utilizada a técnica de *Big Bubble* (BB) que consiste em injeção de ar no estroma para estimular a separação entre as camadas citadas. Evidências clínicas, observadas durante o Transplante Lamelar Anterior Profundo (DALK) sinalizaram a formação dessa nova camada (Dua *et al.*, 2013). Desde então, outros estudos também estão realizando a caracterização morfológica desta nova camada (Agarwal *et al.*, 2014; Yahia Chérif *et al.*, 2015; Koçluk *et al.*, 2016)

A membrana de Descemet é composta por vários tipos de colágeno (IV, VIII, XVIII), laminina e outros componentes não-colagenosos. Sua espessura pode variar entre 8 a 12 μm . A membrana é dividida em zona anterior (espessura aproximada de 3 μm originada na fase de desenvolvimento fetal) e zona posterior (espessura aproximada de até 10 μm desenvolvida ao longo da vida) (Delmonte e Kim, 2011). Diversos componentes proteicos presentes nessa membrana conferem a característica de resistência à degradação enzimática biológica (Johnson *et al.*, 1982; Schlötzer-Schrehardt e Kruse, 2016)

O endotélio corneano (EC) é metabolicamente ativo (bomba Na^+ e K^+) e sua função, além de manter o estroma corneano hidratado, é estabelecer uma barreira ao movimento do fluido na córnea e uma bomba ativa que move íons, e remove a água osmoticamente (Bourne, 2003; Sopapornamorn *et al.*, 2008). A relação entre a morfologia e a função das células endoteliais da córnea tem sido discutida há mais de 25 anos e sua importância foi estabelecida devido sua característica de transparência e sua morfologia de mosaico (70 a 80% em formato hexagonal), que pode ser caracterizada pela densidade de células endoteliais (ECD) e pela morfologia celular. A morfologia das células endoteliais é comumente avaliada pela forma (pleomorfismo) e uniformidade de tamanho (polimegatismo) (Acquart *et al.*, 2010; Jacob e Naveen, 2016). A taxa de células endoteliais hexagonais (HEX) é usada como um marcador para o pleomorfismo celular (Mccarey *et al.*, 2008; Gasser *et al.*, 2015), assim como o desvio da hexagonalidade (Jacob e Naveen, 2016). Esse parâmetro morfológico é importante porque contribui para a avaliação do tecido e as evidências de polimorfismo indicam função anormal das células (Arici *et al.*, 2014). As membranas celulares não-uniformes, caracterizadas pelo pleomorfismo, correlacionam-se com a função não regular da bomba de Na^+ e K^+ ATPase dependente (Mccarey *et al.*, 2008; Usp, 2010; Delmonte e Kim, 2011).

Já está estabelecido que as células do endotélio corneano não possui atividade mitótica *in vivo*. Por não serem diferenciadas terminalmente, possuem suas atividades de proliferação celular fixas na fase G1 do ciclo celular (Bourne, 2003; Patel e Bourne, 2009; Igarashi *et al.*, 2016). Alguns estudos mostraram que o ECD é altamente hereditário com 82% contra 18% pela influência ambiental (Racz *et al.*, 2016). No momento do nascimento, a densidade celular é de aproximadamente 3000 a 4000 células/mm², mas diminui gradualmente em aproximadamente 0,3% a 2,4% por ano. Aos 70 e 80 anos de vida, o ECD é de aproximadamente 2.600 células/mm² (Arici *et al.*, 2014; Elbaz *et al.*, 2016; Mohammad Salih, 2016).

Várias doenças e agravos podem acometer o tecido oftalmológico, como infecções, inflamações, alergias e distrofias. Os tratamentos podem variar de formas simples até casos cirúrgicos (Usp, 2010; Columbia-University, 2015; Nih, 2016). Os agravos que acometem a córnea com potencial de alterar morfológicamente sua estrutura são chamados de distrofia, como exemplo a Distrofia de Fuchs, deposição anormal de fibras de colágeno tipo VIII (Kelliher *et al.*, 2011) modificando a morfologia da camada degradando a transparência, e o Ceratocone que são alterações morfológicas devido as

disfunções metabólicas celulares da camada endotelial (Hayashi *et al.*, 1988; Bourne, 2003; Bourget e Proulx, 2016).

O tecido corneano, devido suas características de avascularidade, possui capacidade limitada de se recuperar de traumas com graves extensões (Freire *et al.*, 2015). As doenças relacionadas à córnea, são a segunda maior causa de cegueira reversível e atingem, principalmente, jovens adultos (Sano *et al.*, 2010). A partir da segunda metade do século XX, a Ceratoplastia penetrante se tornou o método padrão-ouro para realização dos transplantes de córnea (Crespo, 2016; Rij e Dooren, 2016). Nas últimas duas décadas, a partir da modernização da intervenção, realiza-se apenas a substituição seletiva das camadas afetadas da córnea, diminuindo os riscos associados (Bourget e Proulx, 2016; Rij e Dooren, 2016).

O transplante de córnea pode ser definido como o procedimento de substituição de um tecido com o objetivo de restaurar a acuidade visual (óptico), restaurar a morfologia original (tectônico), remover o tecido lesionado que não responde a outras formas de tratamento (terapêutico) e melhorar o aspecto ocular (estético) ou provisório para outro procedimento definitivo (preparatório) (Marcon *et al.*, 2013; Crespo, 2016). Essa substituição pode ser realizada de forma penetrante (espessura total) ou lamelar anterior ou posterior (parciais). A flexibilização nos critérios de uso em relação a qualidade do tecido doador é uma vantagem do tipo de transplante lamelar anterior (DALK) em relação ao transplante penetrante, pois não utiliza a parte endotelial da córnea. Já o transplante lamelar posterior (DSAEK ou DMEK) possibilita que a camada endotelial seja substituída, desde que as outras camadas não estejam morfológicamente alteradas (Sano *et al.*, 2008; Marcon *et al.*, 2013; Crespo, 2016; Alzahrani *et al.*, 2017; Khaled *et al.*, 2017).

O transplante de córnea é o mais realizado no mundo, e no Brasil, com menor taxa de rejeição biológica observada. Este procedimento é utilizado como referência devido as altas taxas de realização em unidades privadas/conveniadas, quando comparada com os procedimentos em outros órgãos (Costa e Kara-José, 2008; Marcon *et al.*, 2013; Bourget e Proulx, 2016). Portanto, esse tipo de transplante permite que o paciente tenha o melhor prognóstico, em relação ao tempo de manutenção do enxerto quando comparada com outros órgãos e tecidos (Sano *et al.*, 2010; Silva, *et al.*, 2016).

No contexto do transplante, poucos estudos avaliaram as características da deterioração das células da córnea pós-morte do doador (Dogaroiu *et al.*, 2014). Já está estabelecido que a morte celular é um processo que ocorre gradualmente ao longo do tempo, dependendo da capacidade das células para sobreviver ao ambiente com baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia) causada pela cessação da circulação sanguínea e respiração (Kumar *et al.*, 2013; Dogaroiu *et al.*, 2014). Os principais efeitos desse evento são a desidratação, a anóxia e a acidose (Dogaroiu *et al.*, 2014). O acúmulo de piruvato e ácido láctico aumenta as atividades lisossômicas proteolíticas e provoca a autólise pós-morte das células da córnea (Mauger e Quartetti, 2011). Os efeitos celulares descritos acima consequentemente causam alterações nas junções celulares da camada epitelial e endotelial, comprometendo a função tecidual desta camada, a qual é evitar o contato de componentes prejudiciais nas camadas mais profundas da córnea (Ko *et al.*, 2008).

1.2 Epidemiologia do Transplante de Córnea no Brasil

Transplante é um procedimento cirúrgico de transferência de um órgão, tecidos e sangue de um indivíduo, sendo o doador, para outro, o receptor. O doador e receptor podem ser a mesma pessoa em casos específicos tais como transplantes de células ou tecidos (Moraes, 2018). O transplante é utilizado como indicação terapêutica quando alterações irreversíveis comprometem o funcionamento de um determinado órgão, ou conjunto deles, em indivíduos acometidos por diversos tipos de patologias, tais como hipertensão arterial sistêmica, diabetes, hepatopatias entre outras (Silva *et al.*, 2011). Portanto, o transplante possui o objetivo de reestabelecer uma função perdida através da transferência de um ou mais estruturas biológicas.

Atualmente os transplantes podem ser classificados como: autólogo, quando o tecido a ser transplantado é oriundo do próprio doador; isogênico, quando o receptor é geneticamente idêntico ao receptor no quesito de histocompatibilidade para antígenos; alogênico, quando o doador e receptor são da mesma espécie; e xenotransplante, quando o doador e receptor são de espécies diferentes (Kaneno, 2003; Matte, 2017). O desenvolvimento e aprimoramento das técnicas cirúrgicas sempre tiveram os objetivos de aumentar a segurança e recuperação do paciente além da redução do custo financeiro a fim de ampliar o acesso ao maior número de pessoas aos procedimentos (Matte, 2017). A partir desse cenário, vários países propuseram-se a organizar seus serviços de saúde para a realidade da necessidade de sua população. O maior desafio encontrado, em maior ou

menor grau e dependendo do tipo de transplante e quais órgãos, sangue ou tecidos necessários, é a disparidade entre a demanda e oferta para procedimentos terapêuticos (Silva *et al.*, 2011).

Em 1997 foi criado o Sistema Nacional de Transplantes (SNT), decreto N° 2.268 de 30 de junho, com o objetivo de controlar e monitorar o processo de captação e distribuição de órgãos, tecidos e partes retiradas do corpo humano com finalidade terapêutica. Vinte anos depois o decreto acima foi revogado por outro de N° 9.175 de 18 de outubro de 2017, o qual atualiza as definições propostas pelo primeiro, garantindo o acesso igualitário ao atendimento médico completo (ambulatorial e hospitalar) pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O Ministério da Saúde, é o órgão central desse sistema, mas também conta com a participação das secretarias estaduais, municipais de saúde além de todos os outros estabelecimentos públicos e privados autorizados a realizar transplantes. Devido a organização da rede, o SNT concentra seus esforços em ampliar o acesso da população ao serviço e assim reduzir o tempo de espera e melhoria na qualidade de vida dos pacientes (Brasil, 1997; 2017). O Brasil possui o maior sistema público de transplante do mundo tanto em número de procedimentos realizados quanto em financiamento realizado pelo SUS, cerca de 90- 95% dos procedimentos do país (Medina-Pestana *et al.*, 2011; Silva, *et al.*, 2016; Portal-Brasil, 2017).

No Brasil, foram realizados 120.549 transplantes de córnea entre 2008 a 2016 e 11.512 de janeiro a setembro de 2017 segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos e Tecidos (ABTO)(Abto, 2015; 2016; 2017). A região geográfica que apresenta a maior quantidade de transplante de córnea é a região Sudeste com 51,96% (68.632/132.061), seguido da região Nordeste com 18,93% (25.005/132.061), região Sul com 16,03% (21.175/132.061), região Centro-Oeste com 10,2% (13.557/132.061) e região Norte com 2,81% (3.712/132.061) do total realizado nesse período e descrito na Figura 3.

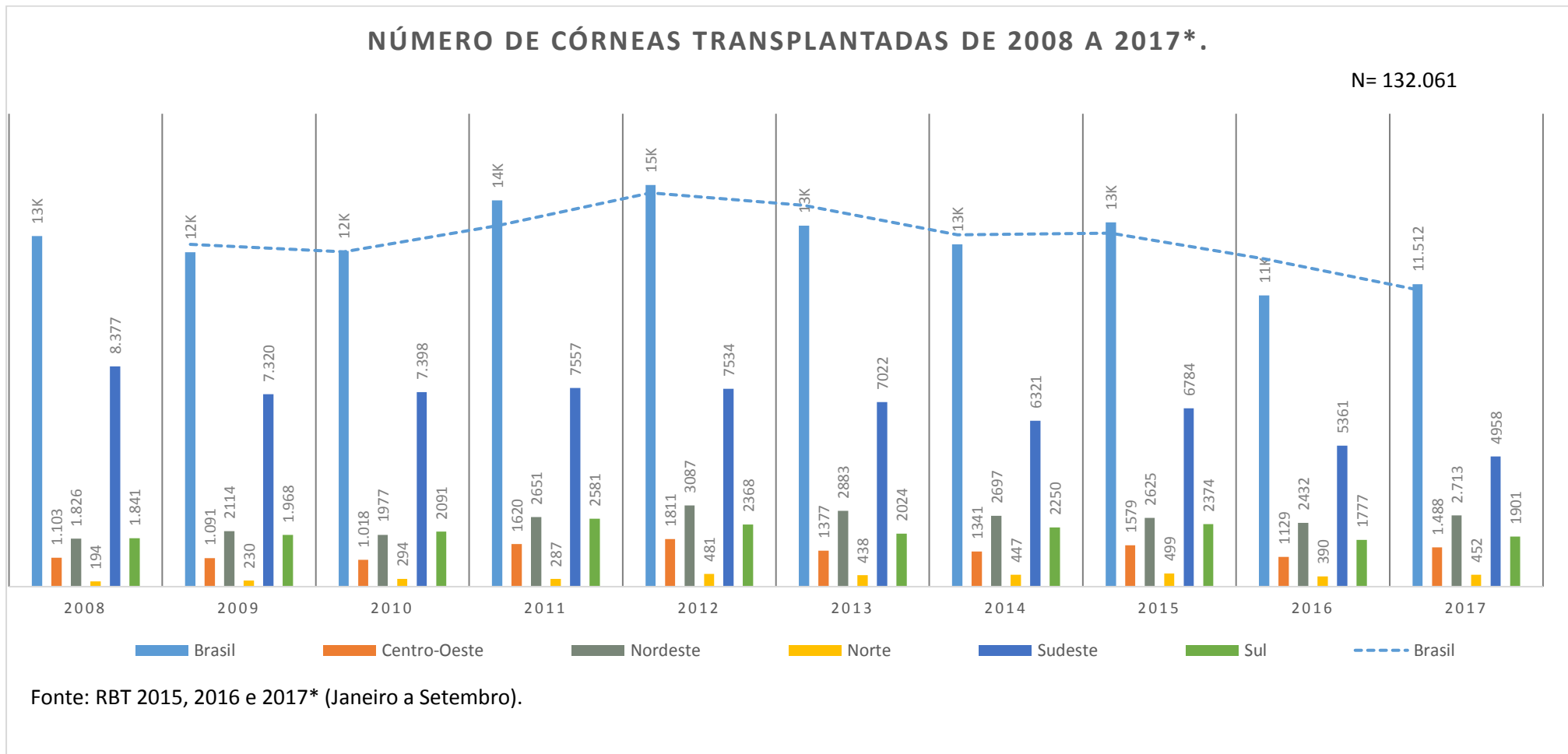


Figura 3: Número absoluto de transplantes de córnea realizados no Brasil de 2008 a 2017. Fonte: RBT 2015, 2016 e 2017.

O Brasil é o segundo maior país em números absolutos de transplantes renais e hepáticos realizados, porém ocupa o 27º lugar quando os números são analisados por milhão de população (pmp) para os mesmos órgãos citados (Abto, 2016). Vários fatores influenciam na dinâmica dos números de transplantes efetivos totais (todos os órgãos sólidos e tecidos), tais como dificuldade de acesso igualitário aos serviços de saúde e a heterogeneidade sócio-político-econômico e geográfico de cada estado e/ou município (Marinho *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2016). Além desses, outro aspecto importante é a proporção entre o número total de doadores de órgãos sólidos e tecidos potenciais e efetivos, pois no ano de 2009 houveram 6.490 notificações de potenciais doadores e 25,54% (1.658) se tornaram doadores efetivos. De 2009 a 2016 o número de potenciais doadores cresceu 36,10% (10.158) porém a proporção de efetivação da doação cresceu apenas 3,8% (2.981) (Abto, 2016). Vários fatores são descritos em estudos sobre as diversas variáveis que corroboram com o não aumento da taxa de efetivação dos doadores, tais como a escassez de doadores proporcional a população, falta de sensibilização da população e dos profissionais intensivistas e falta de infraestrutura física e técnica entre outras causas (Freire *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016).

Os números de transplantes de córnea apresentados, apesar de crescentes, não são suficientes para atender toda a demanda da população brasileira que, até setembro de 2017, ainda possui 9.355 pacientes na lista de espera para transplantes de córnea. Observa-se que o estado de São Paulo possui o maior número de indivíduos na lista de espera, 3.048, ainda que seja o estado que mais realizou transplantes em 2017 (3.315/11.512) e o tempo de espera para realização do transplante pode superar a sobrevida do paciente (Abto, 2017).

2. Justificativa

A análise morfológica da integridade tecidual das córneas doadas para transplante no Brasil é feita por microscopia especular e lâmpada de fenda, sendo que a microscopia especular pode ser realizada até 48 h após a preservação, devido à ocorrência de edema tecidual (Hirai *et al.*, 2002; Crespo, 2016). Até o presente momento, a literatura carece de dados que comprovem a influência do tempo de preservação na densidade celular das córneas doadas para transplantes. O tempo de preservação (tecido submerso) é baseado principalmente no prazo de validade indicado pelo fabricante dos meios comerciais, ou seja, após esse período o fabricante não garante a eficiência do meio de preservação em

manter o ambiente adequado para a manutenção das células do tecido córneo. Quanto menor for o tempo entre a enucleação e o transplante no receptor, melhor será a qualidade do tecido, porém diversos fatores do país nem sempre possibilitará que essa celeridade seja maximizada. Portanto, estudos são necessários para subsidiar o aprimoramento de técnicas de enucleação e preservação das córneas ofertadas, sendo que a utilização da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e transmissão vem a auxiliar na caracterização da morfologia celular em variados períodos de preservação permitindo assim a observação das modificações celulares ao decorrer de um período mais longo que a microscopia especular. A boa qualidade da córnea doada e a adequada manutenção do enxerto até sua utilização são de fundamental importância para um bom prognóstico visual final (Marcon *et al.*, 2013). As ferramentas estatísticas utilizando dados epidemiológicos quando correlacionados auxiliam no aprimoramento das medidas de ação das centrais de transplantes e conseqüentemente melhoram o acesso da população ao serviço com qualidade (Garcia *et al.*, 2013). Estudos relacionados à morfologia celular e dados epidemiológicos referente ao transplante de córneas analisados em conjunto podem fornecer ferramentas de melhorias para gestão dos Bancos de Tecidos em todo país.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os aspectos epidemiológicos e morfológicos relacionados a integridade das córneas doadas para transplante no Distrito Federal (DF).

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Descrever as variáveis demográficas e causas mortis dos doadores de córneas do DF no intervalo de tempo de 2014 a 2017;
- 2) Identificar as causas dos descartes de córneas do Banco de Olhos do DF;
- 3) Caracterizar a morfologia das córneas em diferentes tempos de preservação no meio OPTISOL-GS®;
- 4) Avaliar o uso da microscopia especular, microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e transmissão na análise da morfologia celular das córneas doadas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Tipo de pesquisa: trata-se de um estudo prospectivo observacional.

4.2 Desenho experimental: Inicialmente o projeto, foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (SES – DF) e da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília CAAE 45898115.8.0000.0030. A enucleação e preservação foi realizada pela equipe de enfermeiros do Banco de Olhos do DF, sendo que cada paciente recebe um número de identificação. A integridade das córneas foi verificada por microscopia especular e lâmpada de fenda durante o período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017 quando autorizado pela família por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado no anexo I. Os dados demográficos e epidemiológicos foram coletados nos prontuários desses doadores e analisados na Universidade de Brasília. A análise morfológica por microscopia óptica, eletrônica de varredura e transmissão das córneas descartadas pelo Banco de Olhos foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica. O desenho experimental completo encontra-se descrito na figura 4.

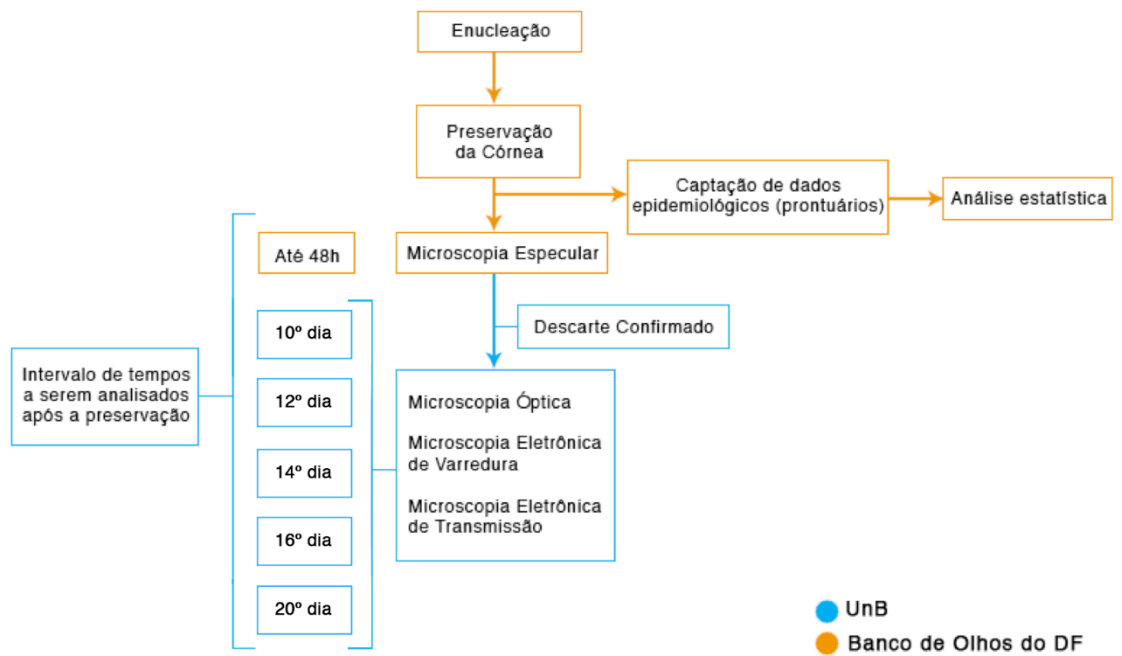


Figura 4: Desenho Experimental demonstrando o processamento das amostras por tempo e metodologia utilizadas. Etapas em cor laranja foram realizadas no Banco de Olhos do DF e as etapas em cor azul foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica/Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de Brasília.

4.3 Sujeitos da Pesquisa, critérios de inclusão e exclusão: Desde o início do estudo, a rotina do Hospital de Base de Brasília possibilitou a análise das córneas descartadas que possuíam os critérios de inclusão. Foram incluídas as córneas das quais os representantes legais dos doadores assinaram o TCLE.

4.4 Análise da qualidade das córneas: Após a parada cardiorrespiratória a equipe do Banco de Olhos era notificada e seus enfermeiros eram responsáveis por realizar a abordagem familiar para solicitação da doação dos tecidos. Nesse momento, o TCLE dessa pesquisa também foi apresentado pela equipe de pesquisa. Em seguida, o globo ocular foi captado (enucleação) e enviado ao Banco de Olhos para preservação em OPTISOL-GS® (meio de preservação). Após a preservação, era introduzida a técnica de microscopia associada a lâmpada de fenda (Dos Santos *et al.*, 2010) em intervalo de 48 a 72 h. A contagem das células endoteliais das córneas foi realizada por microscopia especular utilizando o microscópio Konan EB10 (Konan Medical, Irvine, EUA) e analisada, pelo software Konan Corneal Endothelial Analytics®, em até 48 h após a preservação. Fotos de três áreas diferentes da córnea foram obtidas para determinação da densidade celular e morfologia tecidual.

Dez amostras de córneas descartas para transplante e preservadas em meio Optisol-GS a 4°C, foram utilizadas para caracterização do morfológica dos tecidos (Figura 5). Os tecidos foram analisados em até 48h após a preservação por microscopia especular além da microscopia óptica (coloração de Hematoxilina e Eosina) e eletrônica de varredura e transmissão nos intervalos de 7, 10, 12, 14, 16 e 20 dias de preservação, com o objetivo de detalhar as alterações morfológicas nestes tempos de preservação.

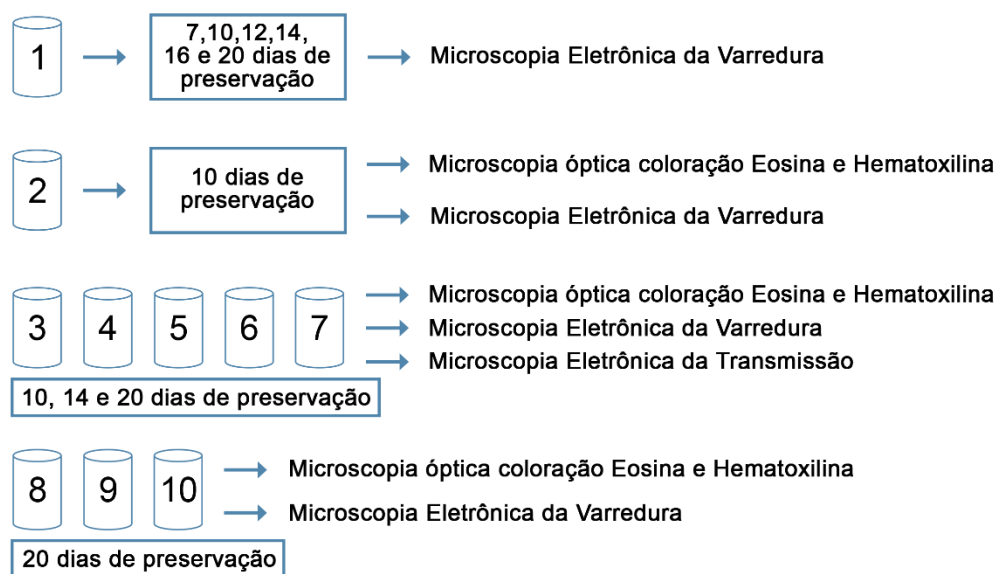


Figura 5: Desenho Experimental das análises morfológicas demonstrando a quantidade de córneas por metodologia utilizadas no estudo.

Para análise em microscopia óptica as córneas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por até 12 horas, desidratadas em soluções alcoólicas graduais, diafanizadas utilizando os reagentes xilol (ou clorofórmio) e emblocadas em parafina. Após a microtomia os cortes, de 3 μm , foram reidratados utilizando graduais soluções de xilol e álcool. A coloração do protocolo utilizou os corantes Hematoxilina e Eosina (H.E) (Sigma- Aldrich, USA).

Para análise por microscopia eletrônica de varredura (JEOL 7001F, Tóquio, Japão), o protocolo consistiu na fixação das amostras em solução de glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2. Após a fixação, o material foi lavado em solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, e pós-fixado, em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o material passou por um processo de desidratação gradativa com banhos de soluções aquosas de acetona de 30, 50, 70 e 90% e três banhos de acetona 100%, de 15 minutos cada, antes de sofrer a secagem ao ponto crítico com CO_2 e metalização de sua superfície com ouro.

As amostras para análise por microscopia eletrônica de transmissão foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2, por no mínimo 2 horas e máximo 24 horas, lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pós-fixado com tetróxido de ósmio (1%) e ferricianeto de potássio (0,8%),

lavado com água destilada, contrastadas *in bloc* com acetato de uranila 0,5%, desidratadas com acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), infiltrada em resina Spurr. Os cortes ultrafinos foram realizados em ultramictomo, os cortes ultrafinos foram contratados em contrastado com acetato de uranila (3%) e citrato de chumbo, e posteriormente analisados no equipamento JEOL 1011 (Tóquio, Japão) a 80kV.

4.5 Dados Epidemiológicos e Demográficos: Os dados epidemiológicos (*causa mortis*) e demográficos (idade e gênero) foram obtidos nos prontuários dos doadores e registros disponíveis no Banco do Olhos do Distrito Federal e cedidos com a autorização da equipe técnica. Os dados foram disponibilizados em documentos formato em PDF e transcritos em uma planilha do software Excel (Microsoft, USA). As variáveis descritivas (causa da morte, causa do descarte, mês da doação, idade, gênero, horário da morte, horário da enucleação, horário da preservação) foram analisadas no mesmo software e a análise estatística foi realizada no software SPSS (IBM, USA). Foram utilizados os testes não paramétrico Qui-quadrado de Pearson, *Independent-sample median* e *related-sample Wilcoxon signed rank*.

5. Resultados

Os resultados foram divididos em dois capítulos apresentados aqui em formato de artigo científico que serão submetidos para publicação.

5.1 Epidemiologia: Artigo 1 a ser submetido para a revista *Ophthalmic Epidemiology Journal* (editora Taylor & Francis- Londres/Inglaterra).

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo é identificar as causas do descarte de córneas no Banco de Olhos do Distrito Federal e descrever as variáveis sociodemográficas e causais de doador do Distrito Federal do Distrito Federal de 2014 a 2017.

Método: Foi realizado um estudo exploratório, sócio-epidemiológico e descritivo sobre a doação de córnea. As informações da base de dados foram obtidas a partir da análise dos prontuários dos doadores de córnea. Todos os registros dos potenciais doadores (causa da morte, causa do descarte de córnea, mês de doação, idade, sexo e tempo de morte, enucleação e preservação da córnea), de 2014 a 2017, foram incluídos no estudo.

Resultados: Analisamos 1.574 notificações de doadores de córnea. As características demográficas apresentaram diferenças significativas na distribuição por sexo (masculino, 74,8% e feminino, 25,2%), e a idade média do doador foi de $40 \pm 15,9$ anos. 25% das causas de morte foram de doenças cardiovasculares seguidas de 19,6% de perfurações por arma de fogo, 14,2% de múltiplos traumas. Descrevemos 3.074 córneas doadas do Banco de Olhos do DF, onde 2,6% não foram captadas. Dos 3.074 tecidos da córnea doados, aproximadamente 60% ($n = 1.836$) foram transplantados e 40% ($n = 1.238$) foram descartados. Em relação às causas de descarte, 68% ($n = 841$) foram devidas a exames sorológicos positivos ou indeterminados e 39% ($n = 486$) por vencimento (período máximo garantido expirado de preservação da córnea).

Conclusão: Conforme discutido neste estudo, questões específicas como causas violentas de morte, desproporção de gênero e tempo total de processamento da córnea podem ser melhor gerenciadas para reduzir o tempo de aquisição e a disponibilidade de tecido da córnea para transplante.

Title

CAUSES OF DEATH AND DISCARD OF DONATED CORNEAL TISSUES:
FEDERAL DISTRICT EYE BANK ANALYSIS 2014 -2017.

Authors and Affiliations

Thayssa Neiva da Fonseca Victor¹ B.Sc; Diogo Souza Loiola¹ B.Sc; Micheline Borges Lucas² M.D; Maria Regina Catai Chalita^{1,2}, M.D, Ph.D; Thatiane Lima Sampaio^{1,3} M.Sc, Ph.D; Sônia Nair Báo¹ M.Sc, Ph.D.

1. Department of Cell Biology, University of Brasilia, Federal District, Brazil;
2. Distrito Federal Eye Bank, Brasília, Brazil;
3. Federal Institute of Brasilia, Federal District, Brazil;

Corresponding author:

*Sônia Nair Báo, University of Brasilia, Federal District, Brazil, 73380-900, E-mail: snbao2009@gmail.com, Phone Number: +55.61.3107-3122.

Financial Support:

National Agency for Health Surveillance (ANVISA) and National Counsel for Scientific and Technological Development (CNPq) (grants #403360/2012-9 e 440029/2014-7). The sponsor or funding organization had no role in the design or conduct of this research.

Conflict of Interest

None of the authors have any proprietary interests or conflicts of interest related to this work.

Running head:

Corneal Banking Epidemiology

Abstract

Purpose: The aim of this study is to identify the causes for discarding corneas at the Eye Bank of the Federal District in Brasilia, Brazil and to describe the social and demographic variables and *Causa Mortis* of Federal District cornea donors from 2014 to 2017.

Method: We conducted an exploratory, social-epidemiologic, and technically descriptive study regarding cornea donation. The data base information was obtained from the corneal donor's medical records analysis. All of the potential donors' records (cause of death, cause of cornea discard, month of donation, age, gender, and time of death, corneal enucleation and preservation), from 2014 to 2017 were included in the study.

Results: We looked at 1,574 corneal donor notifications. Demographic characteristics displayed significant differences in gender distribution (male, 74.8% and female, 25.2%), and the average donor age was 40 ± 15.9 years. 25% of the causes of death were from cardiovascular disease followed by 19.6% from sharp or blunt instrument injury, 14.2% resulted from multiple traumas. We described 3,074 donated corneas from the DF Eye Bank, where 2.6% has not been uptaken. Of those 3,074 corneal tissues, nearly 60% (n=1,836) have been transplanted and 40% (n=1,238) were discarded. Regarding the causes of discard, 68% (n=841) were due to positive or indeterminate serological blood tests and 39% (n=486) because of matureness (expired medium guaranteed period of corneal preservation).

Conclusion: As we discuss in this study, specific issues such as violent causes of death, gender disproportion and total time of corneal processing can be better managed to reduce procurement times, and availability, of corneal tissue for transplantation.

Introduction

It is estimated that 36 million people are considered legally blind and another 216.6 million people are classified as vision impaired worldwide ^[1,2]. The main causes for these impairments are uncorrected refractive flaws, representing 43%, and cataracts with 33% of the cases. In cases of blindness, cataract corresponds to 51%, glaucoma 8%, and 34% from other disorders ^[3,4]. In this scenario, nearly 5.1% of vision impairment were caused by corneal opacities^[5]. Trachoma, and vitamin A deficiency, sclerocornea, limbal cornea dermoids and keratitis are diseases which causes corneal opacities^[5,6].

Corneal Transplantation is the most common and successful form of solid organ transplantation and is considered the primary treatment for restoring vision to patients with corneal blindness ^[7]. Corneal transplants have been performed all over the world and in 2012 alone almost 184.576 were done in 116 countries^[3]. Of those, 8% (nearly 15.000) were performed in Brazil ^[3,8].

From 2010 to 2017, 113,219 corneal transplant were performed in Brazil, which is significantly higher than other solid organs transplantation such as kidney (43.224) and liver (12.038)^[9, 10]. Beyond the increasing numbers of corneal transplantations, the procurement process has also increased when compared to transplantation per capita rate ^[3, 11]. Until December of 2017, 9,266 patients were on the general waiting list for corneal transplants and 2.14% (199/9,266) of those are from the Federal District (DF) ^[10]. From 2009 to 2016, the number of potential donors grew 36.10%, but the proportion of effective and potential donations increased only 3.8%, so the challenge of improving the donor selection process is still important ^[12, 13].

The collection, processing and distribution of corneal buttons is the responsibility of the Eye Banks (EB), which organize their workflow in accordance with the Pan American Association of Eye Banks (APABO) and the Eye Bank Association of America (EBBA). The standardization of procedures by the EB are necessary once they have had

a direct influence on the final quality of the cornea tissue and, consequently, the post-operative success [2, 11, 14].

The National Agency for Health Surveillance (ANVISA) in Brazil regulates the Eye Banks work through the ‘‘Resolução da Diretoria Colegiada’’ (RDC) n° 55/2015^[15], available on the institution website. This legal rule standardizes the potential donor selection process using the family interview, medical records analysis, the deceased body evaluation and the tissue quality itself ^[14, 15]. Because of the infectious and transmissible diseases risks, the RDC n° 55/2015 also establishes the tissue contraindication parameters, such as the donor serological tests for tissue approval for transplantation ^[16].

The aim of this study was to identify the causes for discarding corneas from the Eye Bank of the Federal District and to describe the social and demographic variables and mortis causes of corneal donors from 2014 to 2017.

Material and Methods

We conducted an exploratory and descriptive study regarding cornea donation to the DF Eye Bank located in an important tertiary public hospital. The DF Eye Bank was founded in 2003 as a non-profit entity, which conducts active searches for donations within the Instituto Hospital de Base do Distrito Federal (Latitude: 15° 46' 48" S, Longitude: 47° 55' 45" W), which is in the Central-Western region of the country and has a population of approximately 3 million people. This information is available on the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) website^[17].

The project was approved by the Ethics Committee for Human Experimentation of DF Health Secretary and the Health Sciences Faculty (University of Brasília) under the protocol number CAAE 45898115.8.0000.0030.

The data collection was performed through analysis of corneal donor's medical records, and organized in a database using Excel software (Microsoft Corporation, USA). All the potential donors' characteristics (cause of death, cause of cornea discard, month

of donation, age, gender, time interval of death, corneal enucleation and preservation) from 2014 to 2017 were included in the study. We processed and analyzed the data using the Statistical Package for Social Science software (SPSS) (IBM, USA). The collected information was described as measures of frequency and absolute numbers and percentages. For the results analyses the Person chi-square was used ($P > .05$).

Results

From 2014 to 2017, we observed 1,574 corneal donor notifications at DF Eye Bank Institution and 1.77% (28/1,574) of them were excluded from the medical records analysis because they did not have all the variable information. The year 2015 had the highest number (29.3%) of donations and 2017 had the lowest (21.6%) though they also had the greatest number of excluded registrations (16/28) (Table 1).

Demographic characteristics showed great differences in gender distribution (male, 74.8%, $n = 1,157$ and female, 25.2%, $n = 389$), as shown in Table 1.

Table 1. Demographic Characteristics From Cornea Donors From 2014 to 2017.

Year	Age		Female		Male		Total		P^{\dagger}
	Mean	SD	N	%	N	%	N	%	
2014	40	± 16.2	91	24.7	277	75.3	368	100	Reference
2015	41	± 15.6	118	26.0	336	74.0	454	100	.679
2016	39	± 16.1	86	22.1	303	77.9	389	100	.405
2017	41	± 15.1	95	28.4	240	71.6	335	100	.305
Total	40	± 15.9	389	25.2	1157	74.8	1546	100	

\dagger Chi-Square ($df=1$)

P value: Chi-square comparison between gender

SD: Standard Deviation

The average donor age during the studied period was 40 ± 15.9 years (Table 1). The age range of the majority of cornea donors was 51-60 (21.9%) but the 41-50 (21.5%) age range had almost the same number of donors, and all of them presented the same variance throughout the observed period, including those two most representative ranges cited below (Table 2).

Table 2. Age Distribution of Cornea Donors from the DF/Brazil Eye Bank of Brazil from 2014 to 2017.

Age Range	2014		2015		2016		2017		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
≤10	5	1.4	4	0.9	7	1.8	9	2.7	25	1.6
11 - 20	51	13.9	63	15.0	70	18.0	37	11.0	221	14.3
21 - 30	74	20.1	68	15.0	54	13.9	46	13.7	242	15.7
31 - 40	59	16.0	69	15.2	59	15.2	47	14.0	234	15.1
41- 50	64	17.4	107	23.6	74	19.0	87	26.0	332	21.5
51- 60	73	19.8	95	20.9	96	24.7	74	22.1	338	21.9
61-70	40	10.9	48	10.6	29	7.5	35	10.4	152	9.8
≥ 71	2	0.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.1
Total	368	100	454	100	389	100	335	100	1546	100

The monthly cornea donation average was about 128 ± 29.3 per year. The aggregate data demonstrated that June presented the biggest number of donations over the past 4 years as shown in Figure 1.

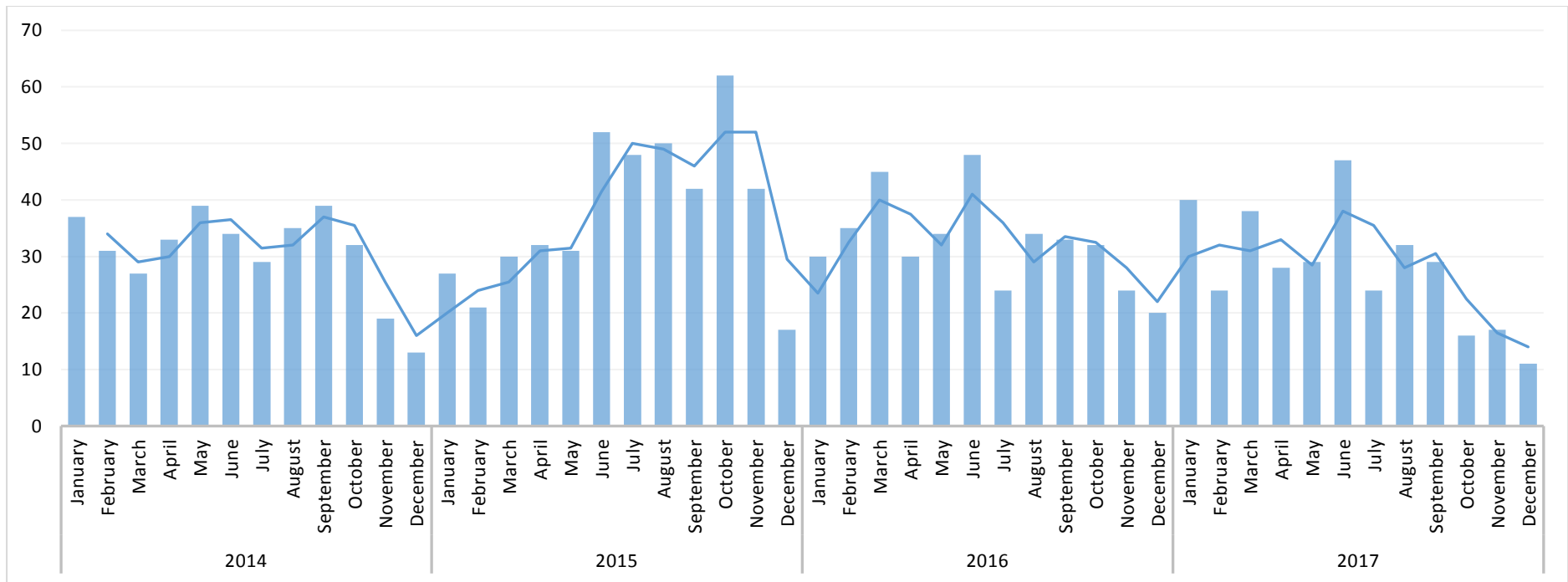


Figure 1. Corneal donations monthly distributed from 2014 to 2017.

The *causa mortis* classification results demonstrated that about 25% of the causes of death resulted from cardiovascular disease (n= 388/1546) followed by 19.6% from sharp or blunt instrument injury (n= 303/1546). 14.2% of deaths were from multiple trauma (n= 220/1546) and other causes as shown in Figure 2.

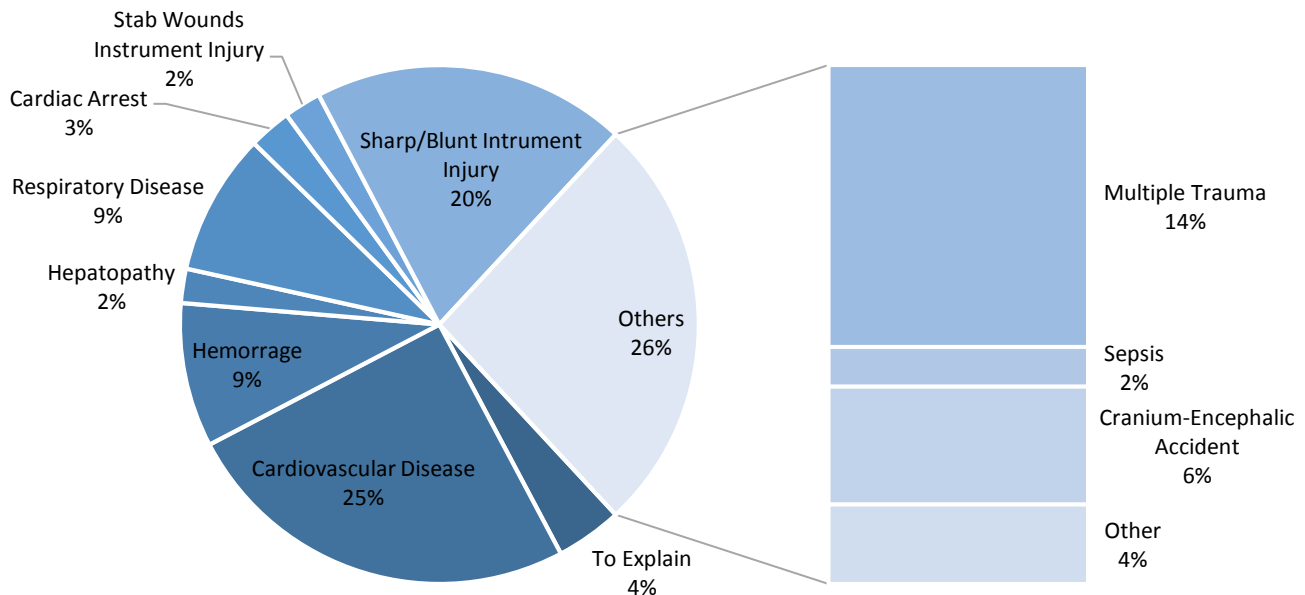


Figure 2. Cornea donors' causes of death.

The time intervals between death and eye globe enucleation (T1) and between eye globe enucleation and corneal button preservation in medium storage solution (T2) demonstrates that T1 averages in 2014 were 7.7 hours (h) and have decreased over the years to 7.3 h in 2015 and 2016 and 7.4 h in 2017 as shown in Table 3. A similar pattern is observed in T2 comparison, except for the increase between 2016 and 2017. The median values and comparison between the total time of corneal processing (from the moment of death until medium preservation) is not significantly related to the causes of death according to the result of the independent-sample median test, p value = 0,114. Despite these previous results, the statistical comparison between T1 and T2 for the same year are almost identical according to the related-sample Wilcoxon signed rank test result, p value <0,0001. Therefore, they are different from each other, and evidenced by the

increase of total time of 9.2 hours in 2017 when compared to 2014, demonstrating that in 2017, the T2 intervals had more hours than the T1.

Table 3. Comparison between the time of death, enucleation and preservation interval.

Interval Period	2014		2015		2016		2017	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
T1	7.7	5.5	7.3	4.7	7.3	5.3	7.4	4.9
T2	6.7	4.6	6.7	3.9	6.2	3.9	6.7	4.3
Total (T1 to T2)	8.2	5.2	8.4	5.0	8.0	4.6	9.2	5.6

T1= Time between death and enucleation (in hours)

T2= Time between enucleation and preservation in medium (in hours)

The causes for discarding corneal buttons' were distinguished in two different groups, one containing all the systemic causes, and the other ophthalmic or tissue intrinsic causes. 3,092 corneas were donated to the DF Eye Bank from 2014 to 2017 and 3% (n=18/3,092) have not been uptaken. So, in total 3,074 corneas were uptaken and processed by ANVISA's orientation^[15], nearly 60% (n=1,836) were transplanted and 40% (n=1,238) were discarded. As shown in Table 4, the major causes of discard from systemic causes were positive or indeterminate serological tests (68.3%, n=424) and indeterminate donor's *causa mortis* (14.4%, n= 90). For the corneal self-tissue, the most prevalent causes of discard were matureness, which is the exceeded time of tissue preservation storage, with 39.3% (n=245) and stromal infiltration with 37.2% (n=232). Considering that each donor has two corneal tissues, the number of samples not taken up (n=18) demonstrates the case that only one corneal tissue was preserved and the other was not.

Table 4. Causes Corneal Tissue Discard from 2014 to 2017

	N	%
Sistemic Causes		
Infectious <i>Causa Mortis</i> (sepsis)	58	9,3
Cancer	2	0,3
Indeterminated <i>Causa Mortis</i>	86	13,8
Contraindication	15	2,4
Positive or Indeterminate Serology	424	68,3
Total	585	47,0
Ophtalmic Causes		
Non-Biological Artifact	82	13,1
Stromal Infiltrate	232	37,2
Corneal Leukoma	1	0,2
Non-viable Tissue	40	6,4
Total	355	28,5
External Causes		
Technical Failure	8	1,3
Inadequate Serological Samples	27	4,3
Not Uptake	18	2,9
Matureness	245	39,3
Total	298	23,9

Discussion

The gender distribution results are similar when compared with data previously described by our study group, such as 73.3% for male and 26.5% for female from the 2004 to 2013 analysis [4]. Other studies worldwide have described different results; some of them with greater discrepancies [18, 19] and others with more equal proportion between genders [20-22]. Despite this, the male gender is almost always the largest proportion among all studies, principally due to the fact that they are the main victims of external causes of death [23]. Violent and non-violent causes of death may influence the discrepancy between genders among the population in the Federal District. External causes of death are expected, and have been discussed previously by this work group. [4, 18, 23]. Hopkinson *et al* [24] proposed that gender can influence the donor and recipient incompatibility related to corneal rejection and failure, thereby, the gender distribution information is used to improve technical procedures, health policies and clinical conduct.

The mean donor age of our study was 40 ± 15.9 years (Table 1) consistent with other recent studies [4, 18, 20], but still lower than other national and internationally published studies [21, 25-28].

From 2014 to 2017, the month of December had the lowest absolute number of donations, at least half (3.9% n= 61) when compared to the rest of the year's average as shown in Figure 1. Systematic monthly information regarding donations of corneas collected throughout the year and compared with other years improves the physical, technical and financial management of the eye bank^[29].

The scientific literature regarding epidemiological analysis of cause of death, for corneal tissue donors, demonstrates a heterogeneity of those causes nomenclature and classifications. Therefore, in order to analyze these types of results in a general way, the etiological cause of death must be considered even if the Eye Bank Association of America (EBAA) has established their own unique classifications^[30]. In light of that, the most frequent causes of death were cardiovascular diseases (25.1%, n=388) (Figure 2), which was previously described in the state of^[21, 31] and Cascavel city (Paraná State)^[28] in Brazil and agrees with U.S Eye Banks results from 2011 to 2016^[30]. Thus, other studies have also demonstrated the frequency and importance of the heart or cardiac disease as significant non-external cause of death, some with minor and others with higher representative results^[4, 25, 32]. The second most observed external cause of death was sharp/blunt instrument injury (19.6%) which was also described in DF, Brazil by our group, as well as worldwide^[18, 19, 27, 33]. The historical and increasing prevalence of this type of death may reflect the violent social environment in Brazil^[18, 23, 28].

ANVISA's RDC n° 55/2015 establishes the maximum range for time interval between death, eye globe enucleation, corneal preservation and storage conditions. The results observed in Table 3 showed a slight decrease in T1 interval from 2014 to 2017

and maintenance of T2 results. Overall average from time between and preservation was homogeneous throughout the analyzed period. The average time for the same period from the state of Goiás (6.5±4.3 hours) is lower when compared to our results ^[18]. The main concern is that this average (7.7 – 7.4 hours) does not comply with ANVISA's standardized time ^[15]. This T2 average and the total (T1+T2) time increased in 2017 (9.2 hours), when compared to 2014, 2015 and 2016, and resulted from the necessary changes to the adequacy of the Bank's services per the new ANVISA RDC n°55^[15] legal standards in 2015. Although Eye Bank studies in São Paulo have not observed any difference in the total time interval average, they have shown lower quality tissue samples ^[34].

Some studies demonstrated the proportion of discarded and transplanted cornea tissue as about 10-16.3% in São Paulo, 21.9% in the state of Rio Grande do Norte ^[35] and 24% in the state of Minas Gerais^[36]. Table 4 shows that we observed and almost 40% (n=1,238) discard rate in the Federal District, a higher result when compared to São Paulo and Rio Grande do Norte , and even the global average ^[37], about 35%, but lower than the state of Ceará at 49.1 ^[38]. In general, the causes for discarding are distributed and separated into three different groups: systemic, ophthalmic and external causes. Several studies have described positive diagnosis by blood screening for infectious diseases. Once all potential deceased organ donors are serologically screened^[15, 16] for HIV-1 and -2 antibody, human T cell lymphotropic virus (HTLV)-1 and -2 antibody, HCV antibody, Anti-HBc and HBsAg, the results of infectious disease prevalence are described in Brazil^[14, 19] and worldwide^[39]. Therefore, corroboration with positive or undetermined serological results are the major cause of corneal tissue discarding (68.3%. n=424) from our study. Despite the lower rate of positive cornea donor samples, compared to 20% worldwide ^[39] and 1—32% in local states ^[14, 27, 28], our results consider all the undetermined serological results that could explain the rate of increase when compared

to others. The reduced availability of validated serological cadaveric tests has been discussed as a possibility for false-positive results related to discrepancies between in vivo and postmortem serological performance [4, 16].

Analyzing social, demographic and technical indicators, using statistical tools to correlate epidemiological data, mitigates the improvement of public health measures of transplant centers and consequently improves the population's access to the quality service.

The Eye Banks have a new challenge to enhance safety and effectiveness of corneal transplantation. As discussed in this study, some specific issues such as violent causes of death, gender disproportion and total interval time of corneal processing management seek to reduce those procurement processes and increase availability of corneal tissue for transplantation. The donor's medical records analysis, personal clinical history, serological screening tests and tissue evaluation are influential factors for effective corneal transplantation. In this study, we noticed the significance of standardizing some Eye Bank procedures. We observed that the cause of death and discard classification is not standardized and as a result, it shows a heterogeneity of nomenclatures. For an effective data analysis, a reclassification based on etiological causes and guided by the Brazilian Ministry of Health's technical document "The death certificate: a necessary and important document"^[40] is highly recommended.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge MSc. Silvano Barbosa, from Health Ministry of Brazil, for his support with statistical execution and data analysis and all the Distrito Federal Eye Bank staff for the logistical and technical support.

References

1. Bourne, R R A, et al., *Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet, 2017. 5: p. e888-897.
2. Lambert, N G, *The structure and evolution of eye banking: a review on eye bank's historical, present, and future contribution to corneal transplantation*. Journal of Biorepository Science for Applied Medicine, 2017. 2017(5): p. 23-40.
3. Gain, P, et al., *Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking*. Journal of American Medical Association, 2016. 134(2): p. 167-173.
4. Sampaio, T L, et al., *Suitability of Corneal Tissue for Transplantation Derived from Violent Death: A 10-Year Analysis*. Transplantation Proceedings, 2015. 47(2015): p. 2973-2977.
5. Resnikoff, S, et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bulletin, 2004. 82(11): p. 811-890.
6. Katzman, L R and B J Reiser. *Pediatric Corneal Opacities*. Pediatric Ophthalmology Education Center 2016 [cited 2018; Available from: www.aao.org/disease-review/pediatric-corneal-opacities].
7. Yin, X-T, D A Tajfirouz, and P M Stuart, *Murine Corneal Transplantation: A Model to Study the Most Common Form of Solid Organ Transplantation*. Journal of Visualized Experiments, 2014. 93(e51830).
8. ABTO, *Registro Brasileiro de Transplantes RBT 2012: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado*, 2012.
9. ABTO, *Registro Brasileiro de Transplantes RBT 2015: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado*, 2015, Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos ABTO.
10. ABTO, *Registro Brasileiro de Transplantes RBT 2017: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado*, in Ano XXIII número 42017.
11. Almeida, H G, R Y Hida, and N Kara-Junior, *Review of developments in corneal transplantation in the regions of Brazil- Evaluation of corneal transplants in Brazil*. Clinics 2016. 71(9): p. 537-543.
12. ABTO, *Registro Brasileiro de Transplantes RBT 2016: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado*, 2016.
13. Torres, I B, et al. *Comparação entre potenciais e efetivos doadores de córnea no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba*. Jornal Brasileiro de Transplantes, 2006(9): p. 615-619.
14. Santos, C G d, et al. *Motivos do descarte de córneas captadas pelo banco de olhos do Hospital São Paulo em dois anos*. Revista Brasileira de Oftalmologia, 2010. 69(1): p. 18-22.
15. ANVISA, *Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico*, in RDC N° 55, DE 11 DE DEZEMBRO DE 2015, A.N.d.V.S. (ANVISA), Editor 2015, ANVISA: Brasília- Brasil.
16. Victer, T N F, et al. *Deceased tissue donor serology and molecular testing for HIV, hepatitis B and hepatitis C viruses: a lack of cadaveric validated tests*. Cell and Tissue Banking, 2016. 17(4): p. 543-553.
17. IBGE. *Population General Descriptive*. 2017 [cited 2017 13/01/2018]; Características gerais da população]. Available from: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao.html>.
18. Silva, R E d, et al. *Perfil epidemiológico dos doadores de córnea do Estado de Goiás*. Revista Brasileira de Oftalmologia, 2016. 75(4): p. 274-278.
19. Rocon, P C, A V d Almeida, and F M Paro, *Epidemiological profile of cornea and organ donors in five hospitals in the State of Espírito Santo, Brazil*. Rev. Bras. Pesq. Saúde, 2015. 17(1): p. 56-64.

20. Crawford, A Z, *et al.* *Corneal Transplantation in Auckland, New Zealand, 1999–2009: Indications, Patient Characteristics, Ethnicity, Social Deprivation, and Access to Services.* *Cornea*, 2017. 36(5): p. 546-552.
21. Adán, C B D, *et al.* *Dez anos de doação de córneas no Banco de Olhos do Hospital São Paulo: perfil dos doadores de 1996 a 2005.* *Arq Bras Oftalmol*, 2008. 71(2).
22. Michelon, V G, *et al.* *Activity of the Eyes bank at Santa Casa Hospital, Southern Brazil between 2003 and 2007.* *Jornal Brasileiro de Transplantes*, 2009. 2009(12): p. 1132-1137.
23. Moura, E C d, *et al.*, *Gender inequalities in external cause mortality in Brazil, 2010.* *Ciência & Saúde Coletiva*, 2015. 20(3): p. 779- 788.
24. Hopkinson, C L, *et al.*, *The influence of donor and recipient gender incompatibility on Corneal Transplant Rejection and Failure.* *American Journal of Transplantation*, 2017. 2017(210-217).
25. Krohn, J and G Hovding, *The influence of donor age and cause of death on corneal endothelial cell density.* *ACTA Ophthalmologica Scandinavica*, 2005(83): p. 746–750.
26. Andersen, J and N Ehlers, *The influence of donor age and post mortem time on corneal graft survival and thickness when employing banked donor material.* *Acta Ophthalmologica*, 1988. 66(3): p. 313–317.
27. Santos, N C, V L Bezerra, and E C d Melo, *Characteristics of corneal donations in state of Piauí.* *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 2014. 73(6): p. 351-357.
28. SHIRATORI, C N, F E HIRAI, and E H SATO, *Characteristics of corneal donors in the Cascavel Eye Bank: impact of the anti-HBc test for hepatitis B.* *Arq Bras Oftalmol*, 2011. 74(1): p. 17-20.
29. Marinho, A, S d S Cardoso, and V V d Almeida, *Desigualdade de transplantes de órgãos no Brasil: Análise do perfil dos receptores por sexo e raça ou cor*, in *Textos para Discussão*, IPEA, Editor 2011, IPEA: Brasília.
30. EBBA. *2016 Eye Banking Statistical Report*, 2016, Eye Bank Association of America: Washington.
31. Sano, R Y, *et al.*, *Analysis of the transplanted corneas at Santa Casa de São Paulo Eye Bank.* *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, 2010. 73(3): p. 254-258.
32. Chen, L-X and Q-H Liu, *Influence factors for successful corneal donation among Chinese adults: data from Nanjing between 2001 and 2012.* *International Journal of Ophthalmology*, 2014. 7(6): p. 984-987.
33. Paz, A C d A C, *et al.* *Caracterização dos doadores de órgãos e tecidos para transplante do estado do Piauí, de 2000 a 2009.* *Enfermagem em Foco*, 2011. 2(2): p. 124-127.
34. Zantut, F, *et al.*, *Comparative analysis of the donor cornea quality and of the interval between death and preservation before and after new sanitary and technique rules in a University Eye Bank.* *Arq Bras Oftalmol*, 2012. 75(6).
35. Freire, I L S, *et al.*, *Causas do descarte de córneas captadas pelo banco de tecidos oculares do Rio Grande do Norte.* *Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online*, 2015. 7(1): p. 1867-1874.
36. Saldanha, B O, *et al.*, *Causes of Nonuse of Corneas Donated in 2007 in Minas Gerais.* *Transplantation Proceedings*, 2009. 41: p. 802-803.
37. Farge, E J, W G Cox, and M M Khan, *An eye-banking program for selecting donor corneas for surgical distribution.* *Cornea*, 1995. 14(6): p. 578- 582.
38. Moscoso, L, *Descarte de córneas chega a quase 50%*, in *Diário do Nordeste* 2010, Diário do Nordeste: Fortaleza.
39. Bensoussana, *et al.*, *Analyses of the effects of collection and processing time on the results of serology testing of cadaveric cornea donors.* *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2010. 68(2010): p. 40-45.
40. Health, M of H, *Death Certificate: an important and necessary document.*, D.S. Secretariat, Editor 2007, Ministry of Health: Brasília.

5.2 Morfologia: Artigo 2 a ser submetido para a revista Investigative Ophthalmology and Visual Science (editora ARVO- Association for Research in Vision and Ophthalmology).

Resumo

Objetivo: O tempo máximo de armazenamento conhecido para as córneas doadoras no meio de preservação Optisol-GS é limitado a 14 dias. Tempos de armazenamento mais longos podem permitir melhores resultados em enxertos de alto risco. Aqui analisamos a morfologia de cada camada da córnea em armazenamento em Optisol-GS em diversos intervalos.

Método: 10 córneas preservadas em meio Optisol-GS a 4 °C foram analisadas por microscopia especular em até 48 horas após a preservação e microscopia óptica e eletrônica de varredura e transmissão, com intervalos de preservação de 7, 10, 12, 14, 16 e 20 dias.

Resultado: Observaram-se discretas alterações morfológicas para as amostras do 10º dia e mais severas para o 14º, 16 º e 20º dias. Como as lamelas estromais incompactas, diminuição ou ausência de células epiteliais e do endotélio, descontinuidade do padrão hexagonal, ruptura do citoplasma e desorganização estromal. Também registramos a estrutura morfológica da camada de Dua em imagem de alta qualidade.

Conclusão: Alterações morfológicas endoteliais significativas foram observadas no tecido corneano armazenado em Optisol-GS após o dia 10 a 4°C. Tecidos da córnea armazenados por mais de 10 dias não são apropriados para transplantes ópticos.

Title

Lifetime behavior of corneal tissue morphology during preservation in Optisol-GS.

Authors and Affiliations

Thayssa Neiva da Fonseca Victor¹ B.Sc; Diogo Souza Loiola¹ B.Sc; Micheline Borges Lucas² M.D; Emanuel Adelino Medeiros Damasceno³ M.D, M.Sc; Maria Regina Catai Chalita^{1,2} M.D, Ph.D; Thatiane Lima Sampaio⁴ M.Sc, Ph.D; Sônia Nair Bão¹ M.Sc. Ph.D.

1. Department of Cell Biology, University of Brasília, Federal District, Brazil;

2. Distrito Federal Eye Bank, Federal District, Brazil;

3. Taguatinga Regional Hospital, Federal District, Brazil;

4. Federal Institute of Brasília, Federal District, Brazil;

Corresponding author:

*Sônia Nair Bão, University of Brasilia, Federal District, Brazil, 73380-900, E-mail: snbao2009@gmail.com, Phone Number: +55.61.3107-3122.

Financial Support:

National Agency for Health Surveillance (ANVISA) and National Counsel for Scientific and

Technological Development (CNPq) (grants #403360/2012-9 e 440029/2014-7). The sponsor

or funding organization had no role in the design or conduct of this research.

Conflict of Interest

None of the authors have any proprietary interests or conflicts of interested related to this submission.

Keywords: Morphology, Cornea Tissue, Eye Bank, Cornea Discarding, Optisol-GS.

Running head:

Cornea Post-Preservation Morphology

Abstract

Purpose: Known maximum storage time for donor corneas in Optisol-GS is limited to 14 days. Longer storage times may allow for better outcomes in high-risk graft. Here we examine the morphology of each corneal layers stored in Optisol-GS at varying lengths.

Method: 10 corneas preserved in an Optisol-GS medium at 4°C, were analyzed using specular microscopy up to 48 hours, optical and electron microscopy methods of scanning and transmission at 7, 10, 12, 14, 16 and 20 day preservation intervals.

Result: We observed discreet morphological alterations for the 10th day samples and more severe for the 14th, 16th and 20th days. Like incompact stromal lamellae, decrease or lack of epithelium and endothelium cells, hexagonally pattern discontinuity, cytoplasm disruption and stromal disorganization. We also registered the Dua's layer morphological structure in high quality image.

Conclusion: Significant endothelial morphological changes were noted while corneal tissue was stored in Optisol-GS after day 10 at 4°C. Corneal tissue buttons stored longer than 10th days are not appropriate for optical transplants.

Introduction

Healthy morphology is essential for vision clarity conservation¹. A human cornea is composed of two segments and six layers: endothelium; Descemet's membrane; Dua's layer^{2,9,12-14}; stroma; Bowman's layer and epithelium, from posterior to anterior segments²⁻⁷. Corneal tissue, due to its non-vascular characteristics, has a limited capacity to recover from traumas with severe extensions compromising transparency and biochemical function^{8, 9}. Besides that, many ophthalmic conditions affect the corneal tissue structure, resulting in a lack of visual efficiency².

Cornea transplant is the most common type of transplant surgery worldwide. Greater quality cornea tissue improves the prognostic chances of visual reestablishment. One of the main causes of graft failure is endothelial cell loss, therefore corneal donors with sufficient endothelial cell density (ECD) deduce the risk of late endothelial failure. Specular microscopy is a useful, reliable and standardized method at eye banks around the world for ECD assessment¹⁰⁻¹³. This semi-automated, non-invasive, technique enables observation and recording of the image of the corneal endothelial cell layer, establishing baselines data of several morphological parameters and providing their functional states. Scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy improves the ultrastructure characterization of corneal cellular morphology^{13, 14}. SEM and TEM technologies, when performed at varying periods of preservation allows for the observation of cellular modifications for a longer time than specular microscopy¹⁵. Those observations are important for specular microscopy development, aimed ensuring corneal quality for better corneal transplant prognosis. Cornea storage in Optisol-GS (Bausch & Lomb Incorporated, Rochester, NY, USA), the most common storage medium in the United States and Brazil, maintains endothelial integrity for 14-16 days. It is a commercially available medium, which osmotically activates substances such as dextran

chondroitin sulfate, vitamins, and precursors of adenosine triphosphate to maintain the normal physiological thickness and clarity of the cornea¹⁶. Despite the viability of extension, endothelium cell density decreases over the time when storage in Optisol-GS^{®17, 18}.

Several previous studies have provided a considerable amount of information about the behavior of the epithelium, the stroma and the endothelium during storage in Optisol-GS and using light microscopy or specular microscopy. This is limited to the beginning of the storage period, and few studies provided profound information with SEM and TEM of the ultrastructure characterization of corneal cellular morphology. The purpose of this current study was to investigate the morphology of corneal tissue stored in Optisol-GS at different lengths of time.

Materials and Methods

The Federal District Eye Bank is located in an important tertiary public hospital and was founded in 2003 as a non-profit entity. The Federal District is the capital of Brazil (Latitude: 15° 46' 48" S, Longitude: 47° 55' 45" W). The study was approved by the ethics committee of the Federal District Health Secretariat and the Health Sciences Faculty from University of Brasília the protocol number CAAE 45898115.8.0000.0030. Only discarded corneas were included in the study. Corneal donors demographic characteristics regarding age, gender and *causa mortis* were collected.

Preservation of Human Corneal Tissue. For this study, corneal tissues from 10 human corneas were used as convenience samples. All eyes globes were harvested within 6 hours postmortem and had been preserved within 24 hours in Optisol-GS (Bausch & Lomb Incorporated, Rochester, NY, USA) and stored at 4°C. The excessive sclera, conjunctiva, and iris were removed; the corneal tissues were prepared for morphological

analysis or trimmed into six equal parts to obtain tissue cubes of 2 clock-hour width (i.e., a size of approximately 3×5 mm). The trimmed tissue cubes were placed inside airtight 4 mL glass jars containing 2 mL Optisol-GS corneal storage medium and were preserved, in submerged conditions.

Corneal lifetime preservation behavior. Ten corneal tissue samples were analyzed in triplicate using specular microscopy until 48h post-preservation in Optisol-GS and light microscopy, SEM and TEM after 7, 10, 12, 14, 16 and 20 days of post-preservation in Optisol-GS medium. They were performed in the Laboratory of Electron Microscopy at the University of Brasilia and Federal District Eye Bank.

Morphological analysis. Corneal tissue stored in Optisol-GS were verified by specular microscopy (Konan Cell Check EB10 microscope and the Konan Corneal Endothelial Analytics software, Irvine, USA) within 48 hours after preservation at the Eye Bank in order to assess the quality of endothelium^{19, 20}. Data from average cell size (AVE), endothelium cell density (ECD), cellular variation rate (CV) and hexagonality (HEX) were taken from 9 of the 10 samples. For analysis under light microscopy, the samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (PFA), and embedded in paraffin. Three μm sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H.E.) (Sigma-Aldrich, USA), and analyzed using light microscope (Primo Star and Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Germany). For scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy, the tissues were fixed in Karnovsky fixative solution (2% glutaraldehyde, 2% PFA in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2), and post-fixed with osmium tetroxide in 1% sodium cacodylate buffer. Then were processed for each method (SEM or TEM) standardized protocol²¹ as follow: in TEM (1011, JEOL, Tokyo, Japan) the material was dehydrated in an ascending acetone series (30-100%) and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

While for analysis in SEM (7001F, JEOL, Tokyo, Japan), following dehydration the material was subjected to a drying apparatus to the critical point of Balzers CPD 30, mounted on stubs and metalized on the device Sputter Coater, Balzers SCD 050.

Statistical Analysis. All numeric data obtained was expressed as mean and standard deviation. Comparisons of ECD; CV; Hex; AVE from positive serology for hepatitis B virus (HBV) markers donors and nonpositive donors were statistically analyzed using *T*-test ($P < 0.005$).

Results

The study included ten corneal tissues samples, and they were maintained for 7 to 20 days of storage to analyze, morphologically, analysis cornea lifetime preservation behavior. Five corneas had positive serology markers for Hepatitis B virus (HBV), two displayed tissue damage (non-biological artifact and stromal infiltrate) and other three were discarded by tissue matureness (reached the maximum preservation time in Optisol-GS). The positive serology samples demonstrated an ECD, CV, Hex and AVE average of, respectively, 2571 ± 332.05 cell/mm², 44 ± 4.36 , $46.67 \pm 9.29\%$, 393.67 ± 54.88 . The other samples showed ECD, CV, Hex and AVE average of, respectively, 2484 ± 303.80 cell/mm², 37.60 ± 7.89 , $59 \pm 8.04\%$, 407.20 ± 47.21 . Corneal donor's specular difference analysis results from corneas discarded due to statistically insignificant matureness ($P > 0.005$) rather than corneas discarded due positive serology for HBV (ECD $P = 0.7170$; CV $P = 0.2522$; Hex $P = 0.1180$; AVE $P = 0.7231$). Worldwide recommended parameters have been established¹¹ for a suitable cornea for transplantation, such as, ECD has to be more than 2.000 cells/mm². As shown in Table 1, all samples from our study were classified as suitable. Corneal donor's specular analysis results and personal characteristics are shown in Table 1.

Table 1. Specular microscopy analysis done 48 hours after preservation.

Sample	ECD (cells/mm ²)	SD	CV	Hex (%)	AVE	Donor Age	Discard Motivation	<i>Causa Mortis</i>
1	Not analyzed by specular microscopy					52	Stromal Infiltrate	Hemorrhage
2	2353	146	34	53	425	59	Non- Biological Artifact	Sharp/ Blunt Instrument Injury
3	2188	216	47	57	457	49	Matureness	Sharp/ Blunt Instrument Injury
4	2747	143	39	44	364	39		Traumatic Brain Injury
5	2778	165	46	39	360	30	Positive Serology for HBc	Suffocation
6	2252	144	32	56	444			
7	2232	143	32	71	448	53	Positive Serology for HBc	Politraumatism
8	2703	152	41	51	370			
9	2326	213	50	54	430	63	Positive Serology for HBsAg	Pneumonia
10	2907	112	33	55	344	18		

ECD: endothelium cell density; SD: standard deviation of ECD, AVE: average cell size, HBc: hepatitis B virus core, HBsAg: hepatitis B surface antigen, CV: cellular variation rate, Hex: hexagonality. Analysis done 48 h after preservation.

Normal corneal endothelium was characterized by a monolayer of polygonal cells of uniform size and shape (Figure 1-A). This is a specular photomicrograph taken from corneal endothelial presenting recognizable, typical endothelial-cell polygonal morphology. This micrograph represents well-defined images, which assist the technicians in performing the identification and selection of cells so the software can process the algorithm and provide the reliable results presented above. Figure 1-B, observed different cell size populations (CV), reflected as blurred cell borders and definition. A large dark area indicated degradation of endothelial cells. This type of image makes the endothelial cell identification and selection difficult.

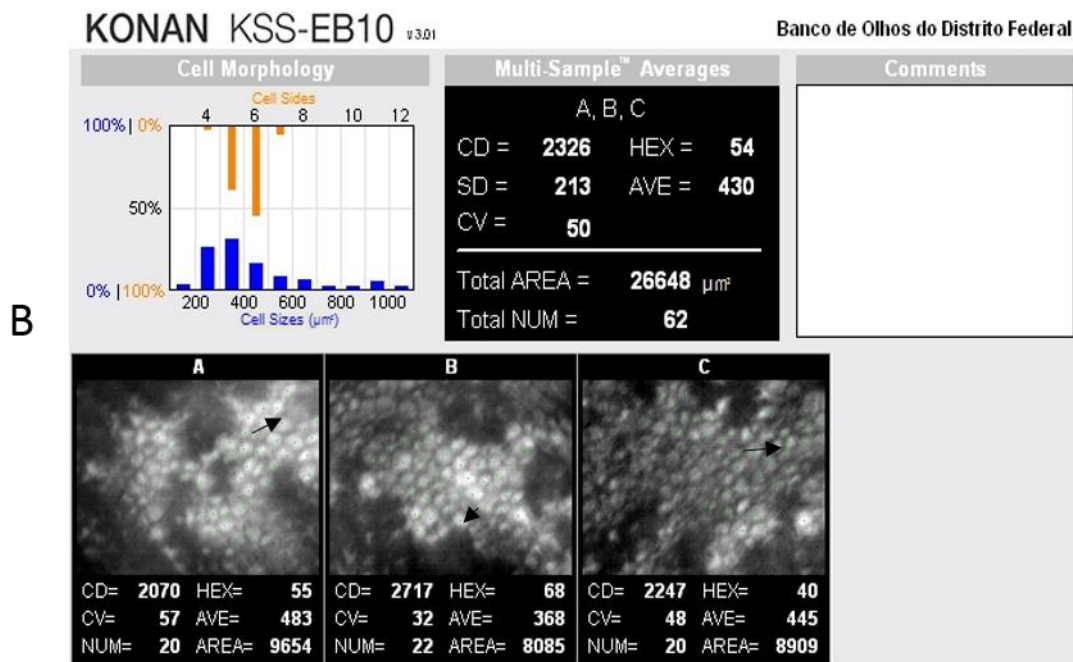
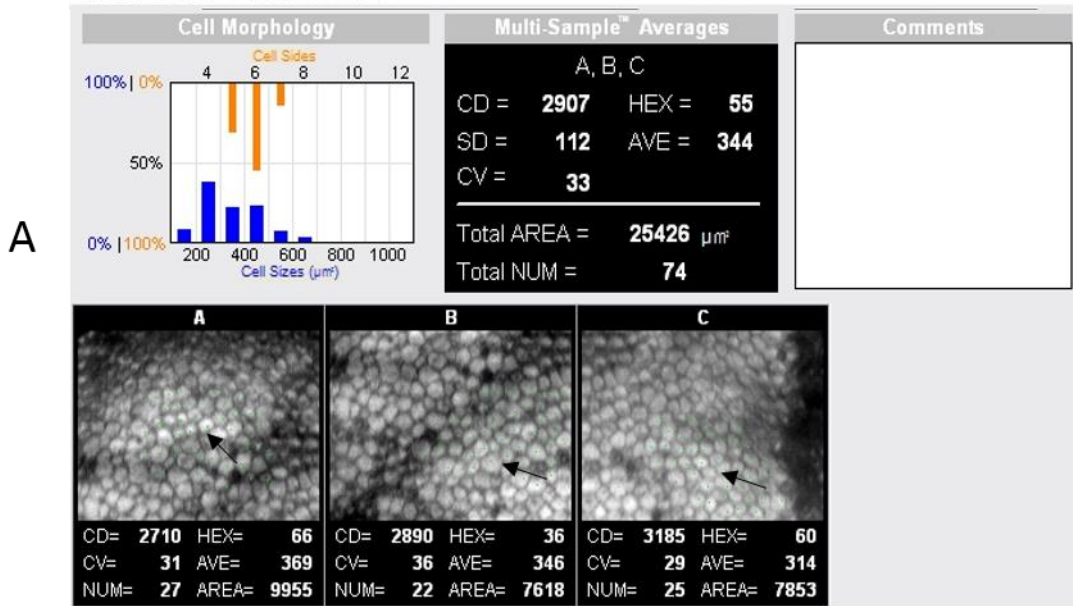


Figure 1. Specular photomicrograph of normal human endothelium took within 48h after Optisol-GS preservation. (A) Great specular parameters, as the dark well-defined cell borders, the regular hexagonal array, shown by the black arrows. (B) Blurred cell borders and definition, large dark areas indicate degradation of endothelial cells, shown by the black arrows. AVE: Average cell size, CD: Endothelium Density, CV: Cellular Variation Rate, HEX: Hexagonality, SD: Standard Deviation of CD.

Corneal Morphological Description at 10th day Post-Preservation

Hematoxylin and eosin (H.E) staining demonstrated that the limbal epithelium was nearly intact from the epithelium on day 10 (Figure 2-A). The layers preservation was observed by scanning Electron Microscopy (SEM) (Figure 2-B).

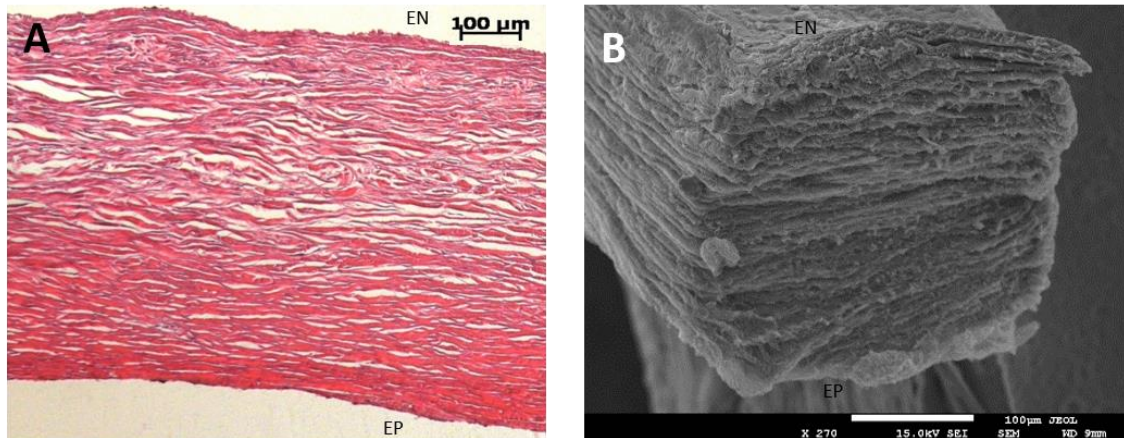


Figure 2. Histology of human cornea stored for 10 days in Optisol-GS. (A) Cross-sectional light microscopy of cornea (x32). (B) Cross-sectional scanning electron microscopy was able to delineate the corresponding distinct layers of the cornea with similar resolution to histology (x270). EN: Endothelium and EP: Epithelium.

The corneal epithelium (EP) showed a regular nucleus shape, dense chromatin and eosinophilic cytoplasm as observed in figure 3 (A- arrow). The SEM analysis showed the epithelium layer integral dispositions (Figure 3-B- arrow). For TEM analysis, a near normal structure with cubical basal was observed. Despite this, some of them began to lose adhesion of the tight junctions (Figure 3-C-arrow). The Bowman's layer (B), localized between the epithelium and the anterior stroma (S), appeared normal and were composed of compact collagen fibers arranged randomly (Figure 3-A and C).

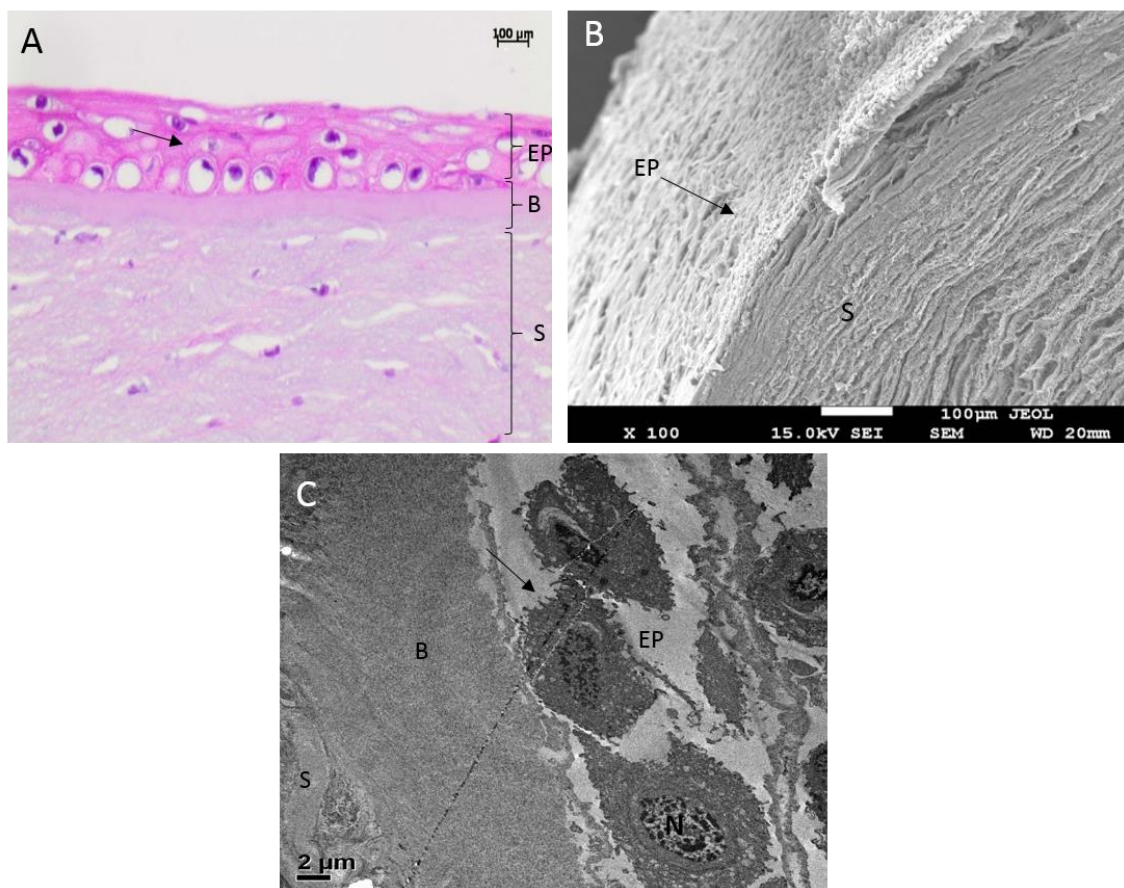


Figure 3. Human corneal epithelium (EP), Bowman's layer (B) and stroma (S) stored for 10 days in Optisol-GS. (A) Micrograph using light microscopy from epithelium layer (arrow) (x1000); (B) Scanning electron microscopy (SEM), epithelium layer integral disposition (arrow) (x100); (C) Transmission electron microscopy (TEM), showing the cubical basal cells (x4000); (N) Nucleus.

The stroma is the thickest layer composing 80% of total corneal tissue thickness, located between the Bowman's layer and the Descemet's membrane. The stroma was divided into an anterior portion, with tightly collagen fibrils better organized (Fig. 4-A,

star), closer to the bowman's layer, and a posterior portion, with soft collagen disposition (Fig. 4-A, triangle), closer to the Dua's layer. We observed stroma organization composed by lamellar (Fig. 4-B) collagen fibrils (Fig. 4-D) and fibroblasts (Fig. 4-A and C, arrows), with glycoproteins production for the extracellular matrix (Fig. 4-C, E.M).

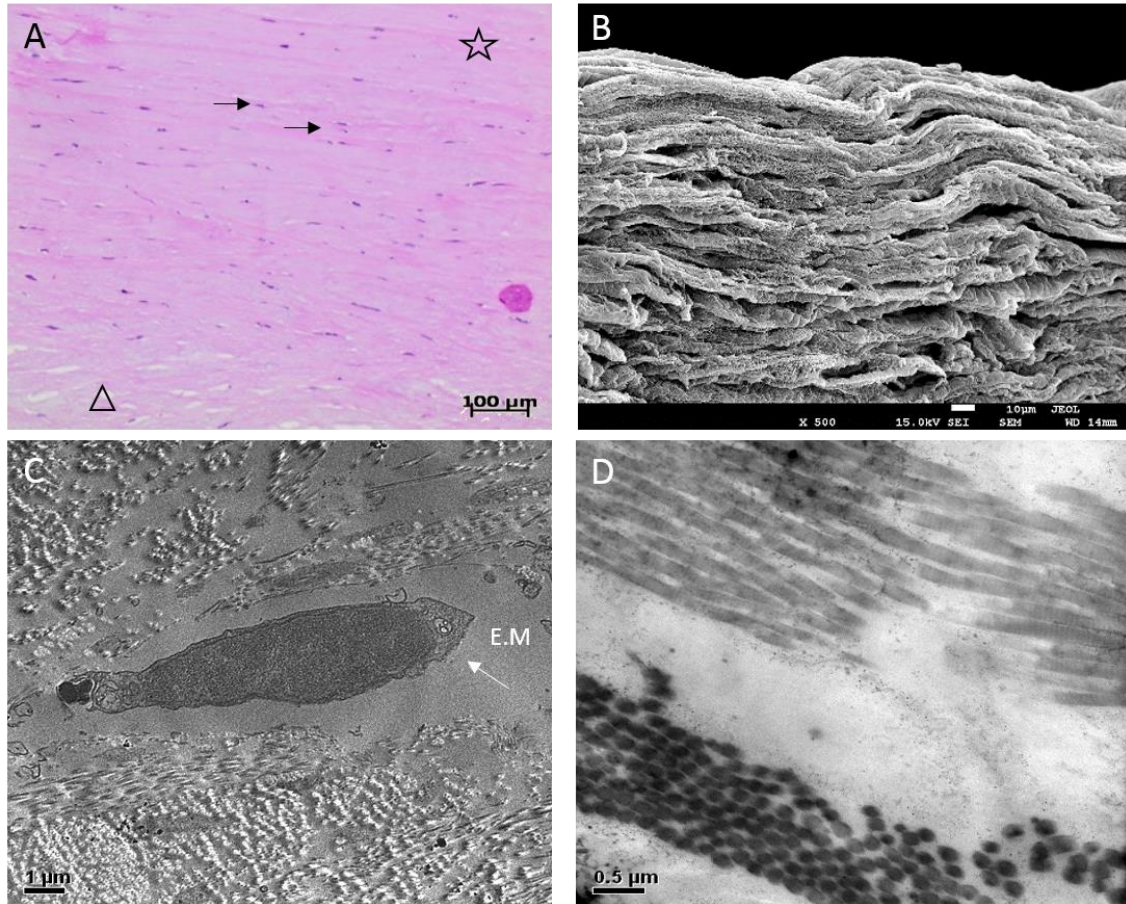


Figure 4. Human corneal stroma stored for 10 days in Optisol-GS. (A) Micrograph using light microscopy showing tightly collagen fibrils (star) and soft collagen disposition (triangle), fibroblasts (arrows) from the stroma (x100); (B) Scanning electron microscopy (SEM) of the collagen fibrils disposition (x500); (C-D) Transmission electron microscopy (TEM) showing a fibroblast (arrow) disposed into the lamellar structure and the transversal and horizontal collagen ultrastructure fibrils organization (C: x10000 and D: x25000).

The Dua's layer (D.L) showed a well-defined acellular structure between the deep posterior stroma and Descemet's membrane (D.M) as registered in figure 5-A (arrow). D.L was composed of tight collagen fibrils extending from the posterior stroma. In figure 5-A (indicated as D.M) we observed that there are two different morphological zones, an anterior banded zone (Fig. 5-A, 1), and a posterior non-banded zone (Fig. 5-A, 2). We

also observed evidence of peripherally trabecular beams (Figure 5-B-Stroma). The endothelium was disposed next to the Descemet's membrane (Fig. 5-B, End.) as a single layer of hexagonal cells (Fig. 5-C) with oval and elongated cytoplasm (Fig. 5-A).

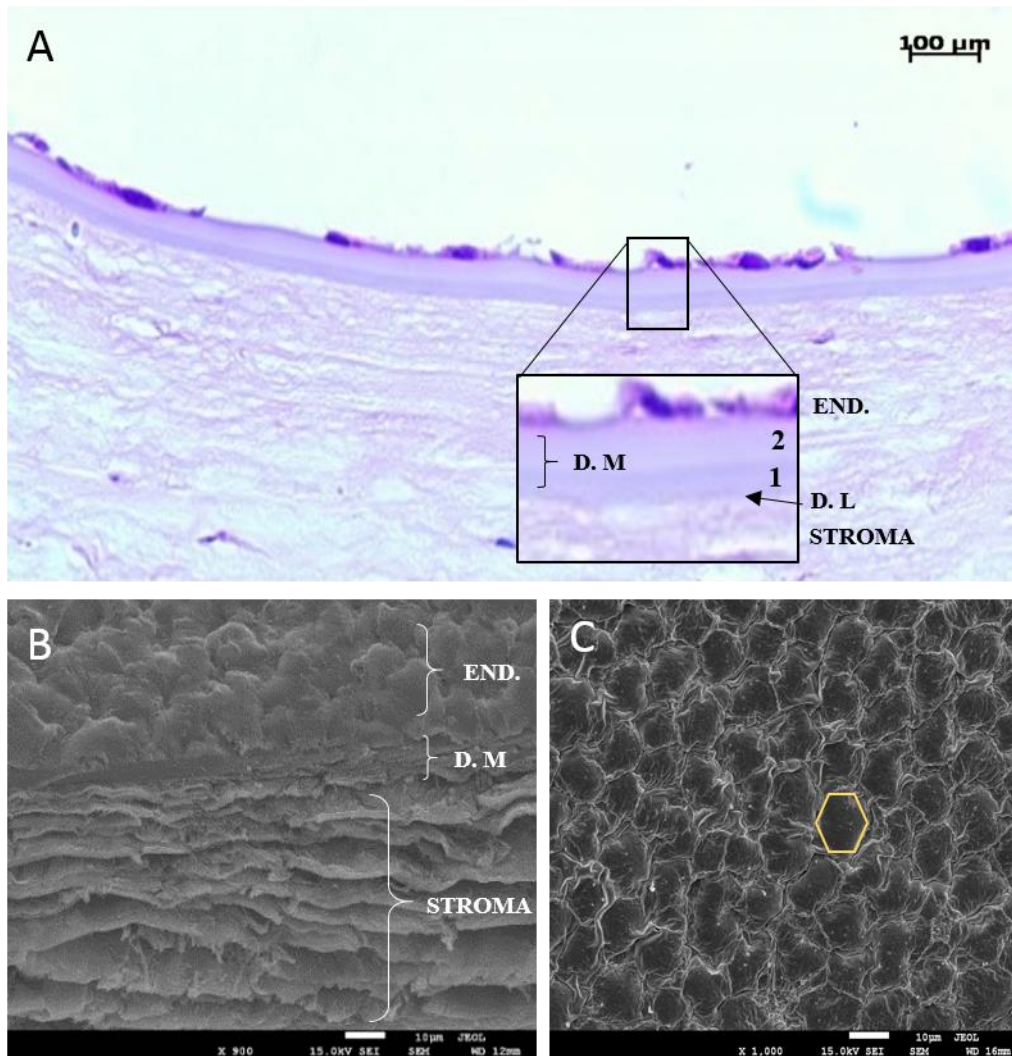


Figure 5. Human Corneal Dua's layer (D.L), Descemet's membrane (DM) and endothelium cells (END) stored for 10 days in Optisol-GS. (A) Light microscopy evidencing two banded (1) and not banded DM zone (2), Dua's layer better visualized in the inset image (arrow), (x400 and inset x1000); (B) Scanning electron microscopy (SEM) of endothelium, Descemet's membrane and stroma at high resolution disposition (x900); (C) Scanning electron microscopy (SEM), note the endothelium cells with standard pattern (hexagon) (x1000).

Corneal Life Time Post-Preservation Morphological Description

At the 7th day, the single layer endothelium presented the classical honeycomb-like mosaic morphology (70 – 80% of hexagonal shape), great evidence of the collagen fibrils between the juxtaposed cells, as observed in Figure 6- A. At the 10th day, the endothelial cells still presented a hexagon pattern, but some presence of pleomorphism (non-uniform cells membranes) was seen in Figure 6-B. From the 12th day, endothelial cells started to demonstrate localized cell loss or displacement, as shown in Figure 6-C (arrow) and lower connection of collagen fibrils. By the 14th day, the endothelium cell damage increased (Fig. 6-D- arrow), mischaracterizing the honeycomb-like pattern. At the 16th day, there were only a few clusters of cells, exposing the Descemet's membrane, as seen in Figure 6-E. The 20th day results demonstrated severe intra and extra cellular damages, as cellular lysis and cytoplasm disruption (Fig. 6-F).

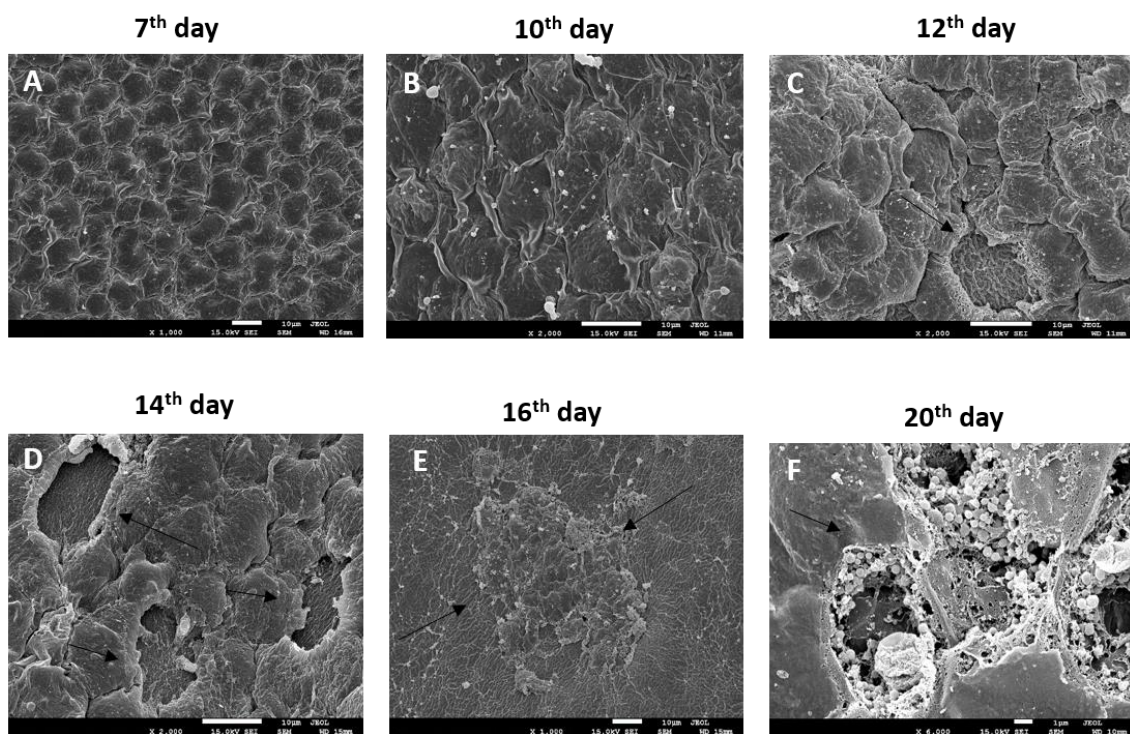


Figure 6. Human corneal endothelium morphological comparative analysis at 7th, 10th, 12th, 14th, 16th, 20th storage time in Optisol-GS by scanning electron microscopy (SEM). (A) 7th day: Endothelium classical honeycomb-like mosaic (x1000); (B) 10th day: discreet pleomorphic (x2000); (C) 12th day: localized cell loss or displacement (arrow) (x2000); (D) 14th day: cell damage increase (arrows) (x2000); (E) 16th day: few clusters of cells (arrows) (x1000); (F) 20th day: severe intra and extra cellular damages (arrow) (x6000).

Cellular death in a storage medium is a process that occurs gradually over time depending on cells ability to survive in an anoxic environment caused by cessation of nutrients. For more detailed information about the cellular death process in corneal tissue after 10 days of Optisol GS storage, we selected 10, 14 and 20 day intervals to perform light microscopy and SEM observation. The 10th day post-preservation corneal samples showed compact lamellar collagen fibrils, large number of fibroblasts, integral epithelium and endothelium (Fig. 7- A and D). The same tissue samples analyzed at the 14th day, already showed some morphological differences, such as adhered epithelial cells that were not adjacent (Fig.7-B and E- arrows), and the lamellar collagen fibrils presented remission patterns and lower numbers of fibroblasts (Fig. 7- B and E- star and triangle). The 20th day, post-preservation samples, showed lack of epithelium cells (Fig.7-C and F- arrows), disarranged stromal lamellar collagen fibrils and absence of fibroblasts (Fig. 7- C and F-triangle). The Bowman's and Descemet's membrane were integral by all the evaluated periods.

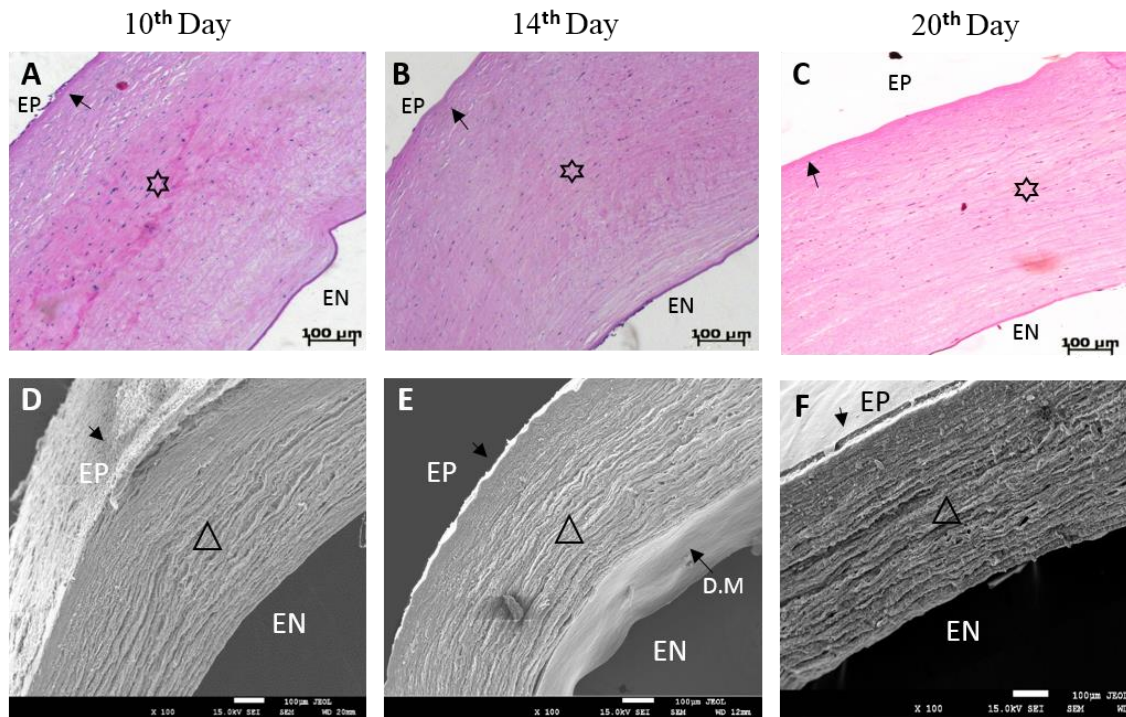


Figure 7. Human corneal tissue comparative analysis at 10th, 14th and 20th storage time in Optisol-GS and analyzed by light (A,B,C) and scanning electron microscopy (D,E,F). (A) 10th day, -Epithelium (arrow), compact lamellar stroma and large number of fibroblasts (star) is observed; (B) 14th day, not integral epithelium (arrow), soft lamellar stroma and lower number of fibroblasts (star) is observed; (C) 20th day, lack of epithelium (arrow), incompact lamellar, stroma and almost absence number of fibroblasts (star); (D) 10th day, preserved epithelium (arrow), compact lamellar stroma (triangle); (E) 14th day, epithelium (arrow), soft lamellar stroma (triangle), lack of endothelium (D.M-arrow) and (F) 20th day, lack of epithelium (arrow), incompact lamellar stroma (triangle). Magnification x100; EP: Epithelium, EN: Endothelium and D.M: Descemet's membrane.

We detailed the morphological description of the 20th day sample cornea stored in Optisol-GS storage. The lack of epithelium and endothelium were observed for both light microscopy and SEM analysis (Fig. 8-A- arrow). Lower number of fibroblasts, (Fig. 8-A- circle), incompact collagen (Fig. 8-B), disorganization of the horizontal lamellar aspect (Fig.8-B) were observed for all 20th day samples. The ultrastructure analysis done by SEM demonstrate the acute cell damage and disarranged endothelial cell pattern (Fig.8-C- circle, D-circle). Loss of cell junction (Fig. 8- C) and stromal acellular focus evidence presented by the absence of fibroblast making an blanc physical space (Fig. 8-D-arrow) were also observed.

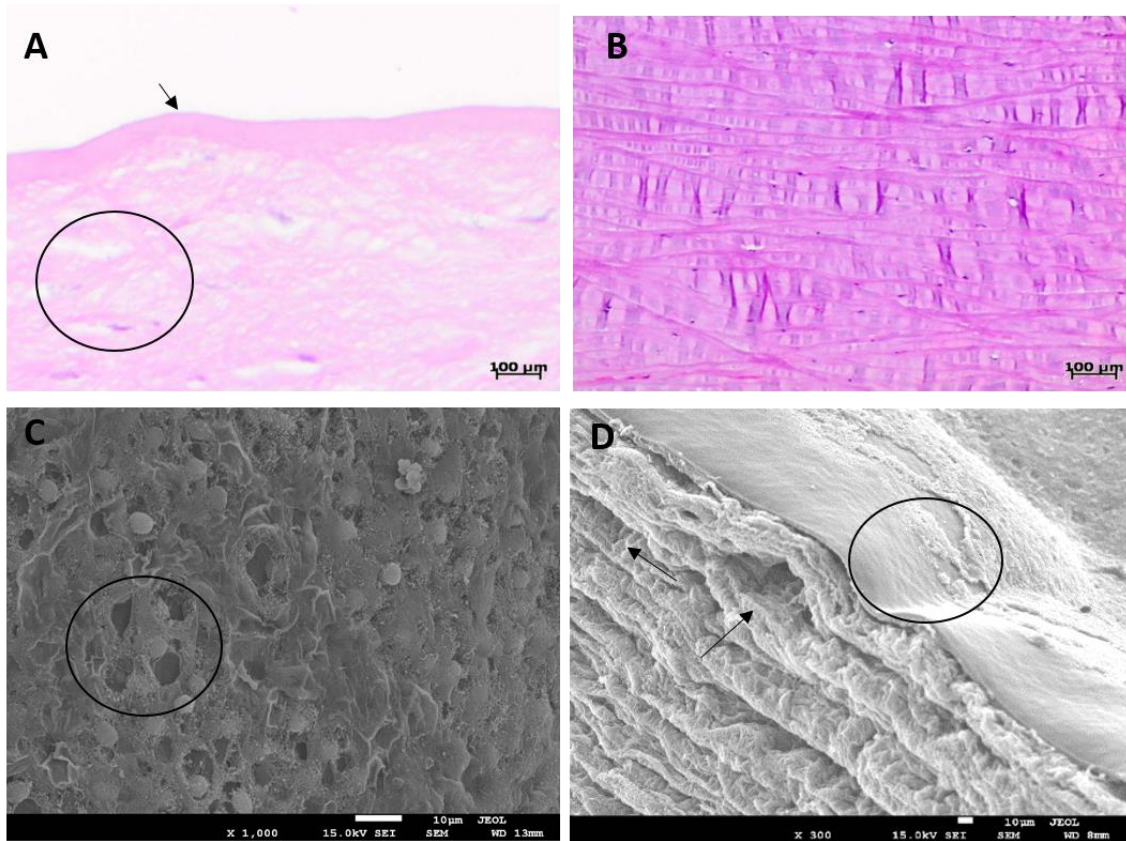


Figure 8. Human Cornea 20th day in Optisol-GS storage and analyzed under light (A,B) and scanning electron (C,D) microscopy; (A) Absent epithelial cells (arrow) and low number of fibroblasts (circles) (x200); (B) Incompact stroma (x200); (C) Endothelial layer damage (circle) (x1000) and (D) More evidence of disarranged endothelial cell pattern (circle) and stromal acellular focus (arrow) (x300).

The D.L morphological differences compared to the D.M collagen organization and normal size is clearly observed in the light microscope image (Fig.9-A) and SEM images (Fig.9- B and C). For those samples, the processing probably led to the loss of the endothelial cells (Fig. 9- C- END) but the Dua's layer and the Descemet's membrane are structures composed of collagen fibrils, and therefore being more resistant to the method of processing.

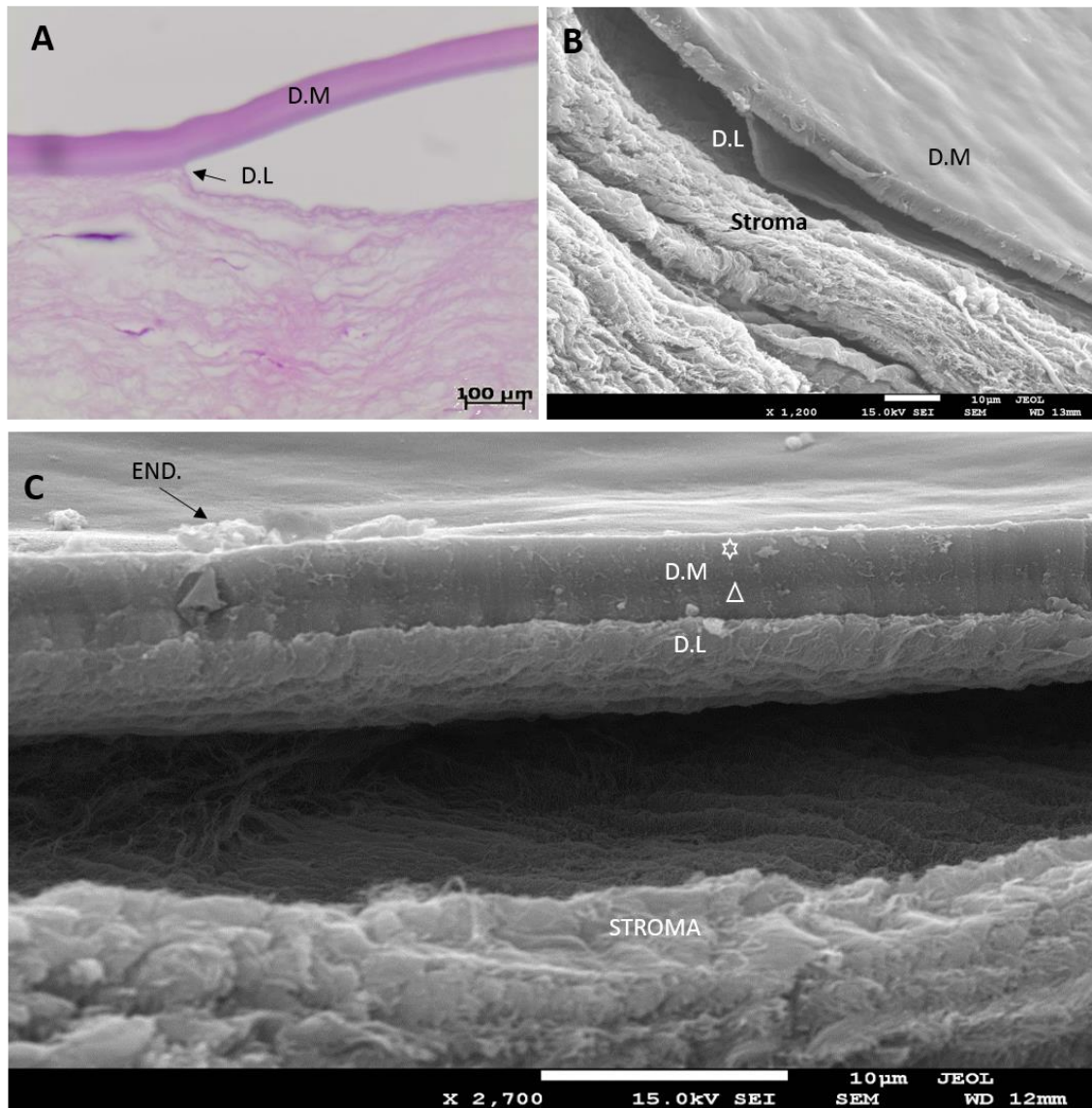


Figure 9. Dua's layer description. (A) Histological analysis with 20 days post-preservation in Optisol-GS evidencing the Descemet's membrane (D.M) and Dua's layer (D.L) (x1000); (B) Tightly acellular and thinner layer between the Descemet's membrane (D.M) and stroma, by scanning electron microscopy (SEM), with 14 days post-preservation (x1200); (C) The D.M anterior banded zone (star) and not banded zone (triangle), Dua's layer (D.L), stroma and a remaining endothelial cell (arrow), by SEM (x2700).

Discussion

Nowadays, the development of surgical techniques, along with qualified surgeons, aim to improve corneal graft survival, to perform selective replacement of the debilitated layers during corneal transplant procedures²². Our group has established the proportion of positive serology in corneal donors from the Federal District Eye Bank²³ corroborating

the epidemiological characteristics of our tissue donors where 50% (5/10) tissues were discarded by HBV positive serology. Despite the insignificant differences from seropositive tissues and discard motives, using specular microscopy endothelial analysis, our study is important and recommends continued the donor serological screening^{24, 25}. The Eye Banks performed, principally, specular microscopy to evaluate the donated corneal tissues. The specular microscopy can be only performed up to 48 hour after the corneal preservation, therefore cannot evaluate the tissue quality until the end of the preservation interval (14 days post-preservation in Optisol-GS)²⁰ and as such is an important disadvantage.

The morphological characteristics are important parameters for transplantation tissue evaluation¹¹ during the routine service at the eye banks. Each corneal layers function is relevant to the post-surgical success²⁶.

The tight epithelial junctions works as effective physical and chemical barriers²⁷, therefore, the 14th and 20th day post-preservation samples demonstrated a morphological epithelium wane and consequently compromised function. Mechanical trauma, corneal dryness and other causes are the most common consequences of epithelium disorders²⁸. The cornea is extremely touch sensitive to touch because of the nervous fibrils. A breakdown of the corneal epithelium causes great pain²⁹. Our results showed instability of corneal epithelium maintenance along the time post-preservation.

The Bowman's layer (B.L) showed preserved structure during all analyzed time intervals, because it's acellular morphological pattern. There are cytokine-mediation between the epithelium and fibroblasts, intermediating apoptotic effects on the fibroblasts³⁰. Because of this, the B.L may works as an epithelial and stromal relationship indicator, and when this interaction is deficient, as in bullous keratopathy disease, there are greater chances of morphological damage.

The stroma comprises almost 80-90% of the thickness of the cornea, It's 200 to 250 distinct lamellars organized at right angles to the adjacent fibers are responsible for transparency characteristics and the mechanical strength⁴. The results corroborate the already morphology described in the literature^{31, 32}. The 10th to 20th days post-preservation intervals demonstrate stromal evaluation differences of the lamellar disposition. Any kind of different pattern, usually compromises the stromal function³², as the decreased number of the fibroblasts along the interval observation, principally the 20th day post-preservation, which are involved in maintaining the extracellular matrix environment, and consequently, the homeostasis⁴. Some evidence of stromal dysregulation by systemic infection, such as keratitis^{33, 34}, correlates with the high number of corneal discard by serological infections at the Distrito Federal and worldwide eye banks^{23, 35}.

The Dua's layer (D.L), shown in figure 5, could not be visualized as well the corneal buttons analysis, thus, figure 9 evidence clarifies the existence and its morphological description. Despite the thinner thickness, is strong enough to resist up to two bars of pressure and are related to acute hydrops, Descematocele and pre-Descemet's dystrophies³⁶. The anterior banded zone and not banded zone confirmed the Descemet membrane (D.M) and the tightly acellular and thinner layer right above the Descemet's membrane is the Dua's layer (D.L).

The Descemet's membrane (D.M) showed two morphologically different zones, an anterior banded zone and non-banded zone³⁶. This result corroborates the classical literature and was essential to confirm the Dua's layer image finding. The D.M presented integral appearance at all post-preservation analysis. Corneal endothelium injuries may be associated with D.M morphological disorders. Foremost the D.M layers importance for the major types of corneal transplantations, the morphological analysis is relevant to improve the surgeon's techniques.

The corneal endothelium layer pumps water from stroma to the aqueous humor, by its metabolic activity, aiming to hydrate the stroma working as a barrier to fluid movement into the cornea and an active pump that moves ions, and draws water osmotically maintaining the corneal transparency³⁷. By the 10th day analysis, the endothelium was integral and continuous cells were separated from Descemet's membrane at some points and present in others. Even so, with most of our samples, they were not tightly attached to each other as expected from the literature, although did indeed present the honeycomb-like mosaic shape observed by specular microscopy⁴. The number of samples was sufficient to determine the sample processing or the biological effect caused the lack of endothelium for the 14th and 20th post-preservation samples. We found a consistent pattern with biological degradation.

Once the endothelial layer has maintained corneal clarity, as indicated by their honeycomb-like mosaic morphology, endothelial cell morphology is commonly evaluated by pleomorphism and polymegatism^{38, 39}. The eye bank routine standardized specular microscopy, a semi-automated analysis for corneal tissue evaluation utilizing a mathematical algorithm. We observed the endothelial cells integrity, along the proposed intervals. The alterations observed at the 7th and 10th day, post-preservation, were mainly hexagonal shape, evidence of collagen fibrils and juxtaposed cells corroborating with other studies⁴⁰ that also identified a hexagonal shape. The 14th and 16th day samples also displayed similar findings as that of 15th day analysis⁴⁰, such as widespread cellular damage, affecting small groups instead of only punctual cells, loss of the hexagonal shape pattern, and exposed Descemet's membrane. The 20th day had all the morphology described above and also evidence of the entire cell lysis (cytoplasm disruption).

Not many studies about corneal post-preservation, mainly up to the 20th day, observed an endothelial cells loss. Lower number of fibroblasts, collagen

homogenization, diffused horizontal lamellar aspects; acute cell damages, non-hexagonal pattern and other described cellular alterations indicate hard tissue quality management. We intended to compare and contribute to other studies related to corneal morphology description for longer storage periods, such as 21 days^{41,42}.

The Dua's layer has been morphologically described over a long the past years, since its proposal in 2013⁴³. Our results clearly demonstrated the different collagen composition of the Descemet's membrane and the Dua's layer tightly adhered, also observed by Meek and Knupp³ as collagen fibrils anchoring zone of interwoven. The Dua's lamellae and a significant number of proteoglycans are impervious to air. These morphological descriptions and high quality microscopy images are excellent for the lamellar transplants (DALK), improving the surgeons and their technique protocols.

Analyzing the same tissue using different microscopy methodologies will assist in the characterization of the cellular morphology for several periods of preservation, thus allowing for the observation of cellular modifications over a longer period than specular microscopy. This kind of research encourages ophthalmic physician's to improve the procurement process for good quality donor corneas and the adequate maintenance of the graft until its use is of fundamental importance for a visual prognosis.

References

1. Islam QU, Saeed MK, Mehbooba MA. Age related changes in corneal morphological characteristics of healthy Pakistani eyes. *Saudi J Ophthalmol* 2017;2017:86 - 90.
2. Mashige K. A review of corneal diameter, curvature and thickness values and influencing factors. *The South African Optometrist* 2013;72:185-194.
3. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research* 2015:1-16.
4. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2011;37:588-598.
5. Agarwal A, Dua HS, Narang P, et al. Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *The British Journal of Ophthalmology* 2014;98:1181-1185.
6. Yahia Chérif H, Gueudry J, Afriat M, et al. Efficacy and safety of pre-Descemet's membrane sutures for the management of acute corneal hydrops in keratoconus. *The British Journal of Ophthalmology* 2015;99:773-777.
7. Koçluk Y, Burcu A, Sukgen EA. Demonstration of cornea Dua's layer at a deep anterior lamellar keratoplasty surgery. *Oman Journal of Ophthalmology* 2016;9:179-181.
8. Sano RY, Sano FT, Dantas MCN, Lui ACF, Sano ME, Neto AL. Analysis of the transplanted corneas at Santa Casa de São Paulo Eye Bank. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 2010;73:254-258.
9. Freire ILS, Araújo RdOe, Almeida QLDd, et al. Causas do descarte de córneas captadas pelo banco de tecidos oculares do Rio Grande do Norte. *Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online* 2015;7:1867-1874.
10. Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesq Vet Bras* 2008;28:427-430.
11. McCarey BE, Edelhauser 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;27:1-16.
12. Abib FC, Barreto J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2001;27:1574- 1578.
13. Maurice DM. Cellular Membrane Activity in the Corneal Endothelium of the Intact Eye. *Specialia Chimica Biochimica* 1968;24:1094-1095.
14. Ruberti JW, Roy AS, Roberts CJ. Corneal structure and function. *Corneal Biomechanics and Biomaterials* 2011;2011:269-295.
15. Hashimoto Y, Hattori S, Sasaki S, et al. Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model. *Scientific Reports Nature* 2016;6:1-9.
16. Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, et al. Optisol corneal storage medium. *American journal of ophthalmology* 1992;114:345-356.
17. Sibayana SAB, Garcia-Arenal MCP, Corpus KD, et al. Serial Endothelial Cell Count of Donor Corneal Buttons in Optisol-GS. *Procedia Chemistry* 2015;14:394-397.
18. Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. In Vitro Comparison of Chen Medium and Optisol-GS Medium for Human Corneal Storage. *Cornea* 2000;19:782-789.
19. Santos CGd, Pacini KM, Adán CBD, Sato EH. Motivos do descarte de córneas captadas pelo banco de olhos do Hospital São Paulo em dois anos. *Revista Brasileira de Oftalmologia* 2010;69:18-22.
20. ANVISA ANdVS. Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico. In: (ANVISA) ANdVS (ed), *RDC N° 55, DE 11 DE DEZEMBRO DE 2015*. Brasília- Brasil: ANVISA; 2015.
21. Gracielle IMS, Tidon R, Bao SN. Structure and ultrastructure of spermatozoon in six species of Drosophilidae (Diptera). *Tissue and Cell* 2016;48:596- 604.
22. Ang M, Konstantopoulos A, Goh G, et al. Evaluation of a Micro-Optical Coherence Tomography for the Corneal Endothelium in an Animal Model. *Scientific Reports* 2016;6:29769.

23. Sampaio TL, Rodrigues IP, D.F.S.Pontes, et al. Suitability of Corneal Tissue for Transplantation Derived from Violent Death: A 10-Year Analysis. *Transplantation Proceedings* 2015;47:2973-2977.
24. Solves P, Mirabet V, Alvarez M. Hepatitis B transmission by cell and tissue allografts: How safe is safe enough? *World J Gastroenterol* 2014;21:7434–7441.
25. Victor TNF, et al., Deceased tissue donor serology and molecular testing for HIV, hepatitis B and hepatitis C viruses: a lack of cadaveric validated tests. *Cell and Tissue Banking* 2016;17:543-553.
26. Zavala J, et al., Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye* 2013;27:579–588.
27. Majumder PD. Anatomy of Cornea. In: eOphtha (ed), *Illustrated Ocular Anatomy*. India: eOphtha; 2017.
28. Weisenthal RW, Daly MK, Feder RS, et al. External Disease and Cornea. In: Ophthalmology AAo (ed), *Basic and Clinical Science Course*. United States of America: American Academy of Ophthalmology; 2017.
29. USP UdSP. Anatomia e Fisiologia. In: USP (ed), *Curso de Oftalmologia*. São Paulo: USP; 2010.
30. Wilson SE, Hong JW. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea* 2000;19:417- 420.
31. Bourget J-M, Proulx S. Characterization of a corneal endothelium engineered on a self-assembled stromal substitute. *Experimental Eye Research* 2016;145:125-129.
32. Zhang L, Anderson MC, Liu C-Y. The role of corneal stroma: A potential nutritional source for the cornea. *Journal of Nature and Science* 2017;3:e428.
33. Dua HS, Faraj LA, Said DG. Dua's Layer: its discovery, characteristics and applications. *Journal of Emmetropia* 2014;5:211-223.
34. Vemuganti GK, Murthy SI, Das S. Update on Pathologic Diagnosis of Corneal Infections and Inflammations. *Middle East African Journal of Ophthalmology* 2011;18:277-284.
35. Raj A, Mittal G, Bahadur H. Factors affecting the serological testing of cadaveric donor cornea. *Indian J Ophthalmol* 2018;66:61-65.
36. Levy SG, et al., Descemet's Membrane in the Iridocorneal-Endothelial Syndrome- Morphology and Composition *Exp Eye Res* 1995;1995:323-333.
37. Delshad S, Chun JM. Corneal endothelial cell density and morphology in low and moderate myopic Chinese eyes. *International Journal of Ophthalmology* 2013;6:467- 470.
38. Jacob S, Naveen P. Anatomy of the Cornea In: 2016 SI (ed), *Mastering Endothelial Keratoplasty*; 2016.
39. Acquart S, Gain P, Zhao M, et al. Endothelial Morphometry by Image Analysis of Corneas Organ Cultured at 31°C. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010;51:1356-1364.
40. Arndt C, Reese S, Köstlin R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. *Veterinary Ophthalmology* 2001;4:175-182.
41. Komuro A, et al., Cell Death during Corneal Storage at 4°C. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1999;40:2827-2832.
42. Jablonski-Stiemke MM, Edelhauser HF. Comparison of rabbit and human corneas stored in Optisol-GS: changes in stromal sodium. *Current Eye Research* 1998;17:1044-1048
43. Dua HS, et al., Human Corneal Anatomy Redefined. *American Academy of Ophthalmology* 2013;120:1778-1785.

6. Conclusão Geral

O Sistema Único de Saúde (SUS) garante o acesso à saúde como direito constitucional. Nesse cenário, a saúde pública pode ser utilizada como uma poderosa ferramenta para gestão, ampliando consideravelmente o seu espaço dentro desse sistema.

- **PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS DOADORES**

A epidemiologia utiliza ferramentas científicas e estatísticas para estudo de relações causais, analisa os fatores que determinam a frequência e a distribuição das doenças em grupos de pessoas. Portanto, a utilização da epidemiologia descritiva permitiu identificar as principais características dos doadores do Distrito Federal. Todas essas informações contribuem para o planejamento de estratégias com o objetivo de aprimorar as atividades técnicas e sociais (abordagem e sensibilização da população) aprimorando os serviços realizados no Banco de Olhos.

A faixa etária dos doadores assim como a desproporção entre os gêneros, onde o sexo masculino contribuiu com a maior parte e desta forma corroborou com as causas de morte analisadas pelo estudo.

- **CAUSA DE MORTE DOS DOADORES**

As discussões realizadas nesse trabalho sobre as principais causas de morte dos doadores reforçaram a contribuição equilibrada de morte violenta e não violenta. Os politraumatismos associados aos acidentes de trânsito, ferimentos por arma de fogo e arma branca além da predominância do gênero masculino dos doadores refletem direta e indiretamente a influência da violência na sociedade.

O impacto socioeconômico das doenças cardiovasculares, presente em nosso estudo como a maior causa de morte dos doadores, reforça a necessidade de realização de análises correlativas entre as informações epidemiológicas. Demonstrando a necessidade logística adequada e integrada dos serviços de saúde e segurança pública a fim de otimizar a captação e aumentar a disponibilidade de órgãos.

- **CAUSA DE DESCARTE DAS CÓRNEAS DOADAS**

A prevalência de doenças infecciosas relatados em outros estudos foi também observada nas causas de descarte das córneas deste estudo de acordo com os resultados, tal qual o impacto da triagem sorológica como resultados positivos e inconclusivos.

Diante deste fato, a utilização de testes sorológicos e/ou moleculares com parâmetros de precisão adequados podem diminuir a quantidade de córneas descartadas por resultados inconclusivos, além de garantir a confiabilidade dos resultados positivos e negativos.

Outra discussão significativa realizada no trabalho, foi a grande porcentagem de córneas descartadas devido a não utilização no prazo máximo de preservação em meio comercial Optisol-GS (tempo de vencimento). Quando o número de córneas descartadas por condições teciduais não adequadas para transplante é menor do que o descarte por tempo de vencimento, entende-se que a oferta de tecido estaria maior do que a necessidade da população. Porém, durante o período do estudo, ainda haviam pacientes na fila de espera pelo procedimento cirúrgico sugerindo, portanto, a necessidade de reavaliação dos processos de trabalho realizados no Banco de Olhos. Os resultados encontrados na avaliação epidemiológica, evidenciaram a importância das análises realizadas posteriormente, onde possibilitou a análise morfológica para aprimorar os métodos de avaliação da qualidade das córneas.

- **MORFOLOGIA DAS CÓRNEAS DOADAS**

As análises morfológicas realizadas no presente estudo demonstraram as mudanças celulares que afetam o tecido da córnea durante o período de preservação na rotina do Banco de Olhos. As microscopias de lâmpada de fenda e especular, realizadas na rotina, possuem limitado poder de visualização das camadas, portanto, as análises utilizando microscopias eletrônicas possibilitaram a análise da ultraestrutura da córnea quanto as alterações histológicas ao longo do tempo de preservação. Os resultados observados nesse trabalho, demonstraram alterações celulares a partir do 10º dia e se estendendo a proporção de danos até o 20º de armazenamento em meio de preservação Optisol-GS. A avaliação detalhada de córneas com 14, 16 e 20 dias de preservação comprovaram a impertinência desse tecido para transplante. Essa e outras evidências subsidiam a avaliação médica do tecido doado na rotina quanto aos aspectos de viabilidade endotelial da córnea, espessura e acuidade visual prognóstica.

O meio de preservação Optisol-GS atendeu a necessidade do Banco de Olhos para armazenamento dos tecidos até o 10º dia. Porém, os dados aqui apresentados reforçam a necessidade de aprimoramento da tecnologia de composição do meio com o objetivo de melhorar a integridade tecidual e a médio prazo, aumentar o tempo máximo de utilização.

De forma geral, todos os resultados apresentados nesse trabalho, auxiliarão na gestão interna das atividades realizadas pelo banco, por exemplo o método de análise da qualidade das córneas, e externa, como a descrição do perfil dos doadores e eficiência nas condutas de busca ativa dos tecidos. Desta maneira, possibilita e aprimora a implantação de políticas públicas direcionadas para o cumprimento das normas de regulamentação dos procedimentos de processamento dos tecidos, resultando na melhoria de efetividade no transplante utilizando tecidos adequados e seguros além de evitar desnecessariamente o descarte de tecidos. Os projetos de pesquisa realizados em conjunto com os serviços de saúde, estimulam e demonstram a importância do investimento em educação continuada dos profissionais da rede.

7. Perspectivas

A descrição morfológica do tecido da córnea se mostrou importante para o aprimoramento das técnicas de avaliação das córneas doadas para transplante. Porém, além da observação do padrão da forma e quantidade celular, em sua estrutura tecidual, seria importante também avaliar as condições da atividade metabólica das camadas celulares que são essenciais para a avaliação do tecido. Portanto, metodologias que possibilitem essa observação corroboram com os achados descritivos morfológicos.

- VIABILIDADE CELULAR

Ensaio de cultura celular do endotélio e epitélio da córnea com análise da citotoxicidade, limite de sensibilidade dessas camadas. Em alguns países já são realizadas a avaliação do endotélio da córnea por metodologias de viabilidade celular (trypan blue). Essa análise em diversos tempos de armazenamento no meio de preservação, apresentarão outro aspecto da qualidade do tecido para transplante.

- IMUNOHISTOQUÍMICA

Metodologias complementares, tais como imunohistoquímica e/ou imunofluorescência, possibilitam a avaliação qualitativa dos marcadores celulares da estrutura tecidual da córnea. A observação da distribuição dos tipos de fibras de colágeno, proteínas intrínsecas, marcadores de apoptose entre outros fatores presentes nos tecidos ao longo do tempo também corroboram com a avaliação morfológica realizada pelo nosso estudo.

- PRESERVAÇÃO POR MEIO DA CULTURA CELULAR

Em alguns países europeus, a utilização de preservação das córneas por meio de cultura celular já vem sendo utilizada rotineiramente pelos Bancos de Olhos. Neste cenário, o qual tem sido recomendada o uso, estende o tempo de preservação da córnea, aumentando a disponibilidade no banco de tecidos. Tal fato torna importante para avaliações futuras, a comparação entre o armazenamento hipotérmico (submersão em meio de preservação comercial a 4°C) e cultura celular.

Pensando nos futuros serviços dos bancos de olhos, quanto maior for o número de pesquisas na área utilizando diversas metodologias, maiores são as chances de adaptação para implementar novas análises de qualidade da córnea doadas para transplante adequadas a infraestrutura física e técnica dos Bancos de Olhos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes RBT 2015: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos ABTO. 2015

_____. Registro Brasileiro de Transplantes RBT 2016: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. 2016

_____. Registro Brasileiro de Transplantes RBT 2017: Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. 2017

ACQUART, S. et al. Endothelial Morphometry by Image Analysis of Corneas Organ Cultured at 31°C. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 51, n. 3, p. 1356-1364, 2010.

AGARWAL, A. et al. Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *The British Journal of Ophthalmology*, v. 98, n. 9, p. 1181-1185, 2014.

ALMEIDA, H. G.; HIDA, R. Y.; KARA-JUNIOR, N. Review of developments in corneal transplantation in the regions of Brazil- Evaluation of corneal transplants in Brazil. *Clinics* v. 71, n. 9, p. 537-543, 2016.

ALMEIDA, P. R. D. Estudo do Comportamento Mecânico de Córneas via simulações numéricas 2016. (Master). Engenharia de Sistemas e Automação, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

ALZHRANI, K. et al. Corneal clarity measurements in healthy volunteers across different age groups. *Medicine* v. 96, n. 46, p. 1-6 2017.

ARICI, C.; ARSLAN, O. S.; DIKKAYA, F. Corneal Endothelial Cell Density and Morphology in Healthy Turkish Eyes. *Journal of Ophthalmology*, v. 2014, 2014.

BOURGET, J.-M.; PROULX, S. Characterization of a corneal endothelium engineered on a self-assembled stromal substitute. *Experimental Eye Research*, v. 145, n. 2016, p. 125-129, 2016.

BOURNE, W. M. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye*, v. 17, p. 912-918, 2003.

BRASIL, M. D. S. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fim de transplante e tratamento, e dá outras providências. Decreto Nº 2.268, de 30 de jun. de 1997. Brasília 1997.

_____. Disposição de órgãos, tecidos, células e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento. Decreto nº 9.175, de 18 de out. de 2017. Brasília 2017.

COLUMBIA-UNIVERSITY. Corneal Disease, Facts About. UNIVERSITY, E. S. H. E. I. O. C. United States of America: Columbia University. 2016 2015.

COSTA, D. C.; KARA-JOSÉ, N. Rejeição de transplante de córnea. Revista Brasileira de Oftalmologia, v. 67, n. 5, p. 255-63, 2008.

CRESPO, A. A. Criopreservação y vitrificación de córneas humanas. 2016. (Master). Biotecnologia Avanzada, Universidade da Coruña, España.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. Journal of Cataract and Refractive Surgery, v. 37, p. 588-598, 2011.

DOGAROIU, C. et al. Postmortem corneal changes evaluated by fluorescent staining. Romanian Journal of Legal Medicine, v. 22, n. 1, 2014.

DOS SANTOS, C. G. et al. Motivos do descarte de córneas captadas pelo banco de olhos do Hospital São Paulo em dois anos. Rev Bras Oftalmol, v. 69, n. 1, p. 18-22, 2010.

DUA, H. S. et al. Human Corneal Anatomy Redefined. American Academy of Ophthalmology, v. 120, n. 9, p. 1778-1785, 2013.

ELBAZ, U. et al. Corneal Endothelial Cell Density in Children: Normative Data From Birth to Five Years Old American Journal of Ophthalmology, 2016.

FREIRE, I. L. S. et al. Causas do descarte de córneas captadas pelo banco de tecidos oculares do Rio Grande do Norte. Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online, v. 7, n. 1, p. 1867-1874, 2015.

GARCIA, C. D. et al. Manual de Doação e Transplantes. 1. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. ISBN 9788535274790.

GASSER, L.; REINHARD, T.; BÖHRINGER, D. Comparison of corneal endothelial cell measurements by two non-contact specular microscopes. BMC Ophthalmology v. 15, n. 87, 2015.

GUIMARÃES, M. R. Curso de Embriologia Ocular. Hospital de Olhos de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2003

HAYASHI, M. et al. Secretion of collagen types I and II by epithelial and endothelial cells in the developing chick cornea demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. Development. Cambridge, v. 103, n. 1, p. 27-36, 1988.

HIRAI, F. E. et al. Falência primária pós-transplante de córnea em serviço universitário. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 65, p. 655-657, 2002. ISSN 0004-2749. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492002000600011&nrm=iso >.

IGARASHI, T. et al. Hydrogen prevents corneal endothelial damage in phacoemulsification cataract surgery. *Scientific Report* v. 6, n. 31190, 2016.

ISHIDA, N. et al. Corneal Stromal Innervation. *Ophthalmic Research*, v. 16, p. 139-144, 1984.

JACOB, S.; NAVEEN, P. *Anatomy of the Cornea* In: 2016, S. I. (Ed.). *Mastering Endothelial Keratoplasty*, 2016.

JOHNSON, D. H.; BOURNE, W. M.; CAMPBELL, R. J. The Ultrastructure of Descemet's Membrane. *Arch Ophthalmol*, v. 100, p. 1941- 1947, 1982.

KANENO, R. *Imunologia do Transplante*. São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo 2003.

KELLIHER, C. et al. A Cellular Model for the Investigation of Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Exp. Eye Res.*, v. 93, n. 6, p. 880-888, 2011.

KHALED, M. L. et al. Molecular and Histopathological Changes Associated with Keratoconus. *BioMed Research International*, v. 2017, 2017.

KO, J.-A. et al. Upregulation of Tight-Junctional Proteins in Corneal Epithelial Cells by Corneal Fibroblasts in Collagen Vitrigel Cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 49, n. 1, 2008.

KOÇLUK, Y.; BURCU, A.; SUKGEN, E. A. Demonstration of cornea Dua's layer at a deep anterior lamellar keratoplasty surgery. *Oman Journal of Ophthalmology*, v. 9, n. 3, p. 179-181, 2016.

KUMAR, V. et al. Cell Injury, Cell Death, and Adaptations. In: SAUNDERS (Ed.). *Robbins Basic Pathology*. 9: Elsevier Inc, 2013.

MARCON, Í. M. et al. Transplante de Córnea e Banco de Olhos. In: ELSEVIER (Ed.). *Manual de Doação e Transplantes*. Rio de Janeiro: Elsevier, v.1, 2013. cap. XI, p.163- 174.

MARFURT, C. F. et al. Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental Eye Research*, v. 90, n. 2010, p. 478-492, 2010.

MARINHO, A.; CARDOSO, S. D. S.; ALMEIDA, V. V. D. Desigualdade de transplantes de órgãos no Brasil: Análise do perfil dos receptores por sexo e raça ou cor. In: IPEA (Ed.). Textos para Discussão. Brasília: IPEA, v.1629, 2011. ISBN ISSN 1415-4765.

MATTE, N. L. Tráfico de órgãos: a (im)possibilidade da legalização da comercialização de órgãos no Brasil e os entraves à doação. 2017. (Bacharel). Univates, Lajeado.

MAUGER, T.; QUARTETTI, E. The effects of the presence of the corneal epithelium and supplemental hydrocortisone on β -glucuronidase levels with corneal preservation. *Clinical Ophthalmology*, v. 5, p. 415-417, 2011.

MCCAREY, B. E.; EDELHAUSER, H. F.; LYNN, M. J. Review of Corneal Endothelial Specular Microscopy for FDA Clinical Trials of Refractive Procedures, Surgical Devices and New Intraocular Drugs and Solutions. *Cornea*, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2008.

MEDINA-PESTANA, J. O. et al. O contexto do transplante renal no Brasil e sua disparidade geográfica. *J. Bras. Nefro*, v. 33, n. 4, p. 472-474, 2011.

MOHAMMAD SALIH, P. A. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Malay Eyes. *Med J Malaysia*, v. 66, n. 4, p. 300-303, 2016.

MORAES, P. L. Importância do transplante de órgãos e tecidos. *Biologia*, 2018. Disponível em: < <http://brasilescola.uol.com.br/biologia/transplante-orgaos-tecidos.htm> >.

NIH, T. N. E. I. Facts About the Cornea and Corneal Disease. Estados Unidos da América, 2016. Disponível em: < <https://nei.nih.gov/health/cornealdisease> >.

PATEL, S. P.; BOURNE, W. M. Corneal Endothelial Cell Proliferation: A Function of Cell Density. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 50, n. 6, p. 2742 - 2746, 2009.

PEH, G. S. L. et al. Human Corneal Endothelial Cell Expansion for Corneal Endothelium Transplantation: An Overview. *Transplantation*, v. 91, n. 8, p. 811-819, 2011.

PORTAL-BRASIL. Número de brasileiros doadores de órgãos bate recorde em 2016. FEDERAL, G. Brasília. 2018 2017.

PRESLAND, A.; PRICE, J. Ocular anatomy and physiology relevant to anaesthesia. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, v. 18, n. 1, 2016.

RACZ, A. et al. The inheritance of corneal endothelial cell density. *Ophthalmic Genetics*, v. 37, n. 3, 2016.

RAMOS, A. Fisiologia da Visão. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC-Rio. Rio de Janeiro. 2006

RIJ, G. V.; DOOREN, B. T. H. V. The History of Corneal Transplantation Corneal Transplantation, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2016.

SANO, F. T. et al. Tendência de mudança nas indicações de transplante penetrante de córnea. Arq Bras Oftalmol, v. 71, n. 3, p. 400-4, 2008.

SANO, R. Y. et al. Analysis of the transplanted corneas at Santa Casa de São Paulo Eye Bank. Arquivo Brasileiro de Oftalmologia, v. 73, n. 3, p. 254-258, 2010.

SCHLÖTZER-SCHREHARDT, U.; KRUSE, F. E. Anatomy and Physiology: Considerations in Relation to Transplantation Corneal Transplantation, v. 2016, p. 9-22, 2016.

SILVA, O. D. C. E.; SOUZA, F. F.; NEJO, P. Doação de órgãos para transplantes no Brasil: O que está faltando? O que pode ser feito? Arq Bras Cir Dig, v. 24, n. 2, p. 93-94, 2011.

SILVA, R. E. D. et al. Perfil epidemiológico dos doadores de córnea do Estado de Goiás. Revista Brasileira de Oftalmologia, v. 75, n. 4, p. 274-278, 2016.

SILVA, S. B. et al. Cost comparison of kidney transplant versus dialysis in Brazil. Cad. Saúde Pública, v. 32, n. 6, 2016.

SOPAPORNAMORN, N.; LEKSKUL, M.; PANICHKUL, S. Corneal endothelial cell density and morphology in Phramongkutklao Hospital. Clinical Ophthalmology, v. 2, n. 1, p. 147-151, 2008.

USP, U. D. S. P. Anatomia e Fisiologia. Curso de Oftalmologia. USP. São Paulo: USP. 1 2010.

WEST-MAYS, J. A.; DWIVEDI, D. J. The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 38, n. 2006, p. 1625-1631, 2006.

YAHIA CHÉRIF, H. et al. Efficacy and safety of pre-Descemet's membrane sutures for the management of acute corneal hydrops in keratoconus. The British Journal of Ophthalmology, v. 99, n. 6, p. 773-777, 2015.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - Doador

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto: “QUALIDADE DAS CÓRNEAS RETIRADAS PARA TRANSPLANTE PELO BANCO DE OLHOS DO DISTRITO FEDERAL/BRASIL”.

O objetivo desta pesquisa é verificar se o tempo atual de remoção do tecido ocular e o tempo de preservação em meio poderiam ser prolongado para possibilitar o aumento na captação de córneas. O aumento da oferta de córneas pode reduzir o tempo de espera na fila pelo transplante. Essa pesquisa terá a duração de dois anos, a partir de maio de 2015, e auxiliará o Banco de Olhos a aprimorar as técnicas de captação e preservação de córneas para transplante e será conteúdo de formação de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado da UnB.

O seu consentimento na pesquisa, autoriza a coleta de informações do prontuário do doador e a utilização da córnea para pesquisa tecidual. **Asseguramos que seu nome e do doador será mantido no mais rigoroso sigilo** através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a) de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

O material ficará sob a guarda da pesquisadora Thatiane na UnB e enfermeiros/médicos do Banco de Olhos do DF. Todas as córneas serão avaliadas no Banco de Olhos quanto ao número de células e estado do tecido. As córneas que apresentarem contra-indicação médica para transplante pelo Banco de Olhos serão armazenadas na UnB para caracterização do estado do tecido segundo a Resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. O(a) senhor(a) poderá ter ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do material biológico do doador.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes, durante e no decorrer da pesquisa. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir dessa pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras. Habitualmente existe risco mínimo no desenvolvimento dessa pesquisa, mas segundo Resolução CNS Nº 196/96, pode haver danos à dimensão física do doador, que será minimizado pela equipe de captação.

A sua participação será através da aceitação do Termo de Autorização de Doação de Órgãos e Tecidos para fins de pesquisa que o(a) senhor(a) deverá assinar conforme a MP n 1.718. **Sua participação é voluntária**, isto é, não há pagamento por sua colaboração. O(a) senhor(a) tem plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento a qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma. O(a) senhor(a) será indenizado caso lhe sobrevenha algum dano decorrente da participação da pesquisa, podendo ser encaminhado para Universidade de Brasília, Instituto de Biologia Celular.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na UnB, ANVISA, Instituto Federal de Brasília e periódicos na área científica e utilizadas em pesquisas futuras.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para:

Thayssa Neiva da Fonseca VICTER, na Universidade de Brasília. Telefone: (61) 3107-3122, no horário: 09:00 às 18:00.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com os Pesquisadores Responsáveis e a outra com o sujeito da pesquisa.

Assinatura do responsável Legal do Doador: _____

Nome: _____

Registro do Doador _____

Pesquisadora