

KELLY CRISTINE DE SOUSA PONTES

**UTILIZAÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA COMO
BANDAGEM NO TRATAMENTO DE ÚLCERA EXPERIMENTAL DA
CÓRNEA – ESTUDO CLÍNICO, HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO
EM COELHOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

KELLY CRISTINE DE SOUSA PONTES

**UTILIZAÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA COMO BANDAGEM NO
TRATAMENTO DE ÚLCERA EXPERIMENTAL DA CÓRNEA - ESTUDO
CLÍNICO, HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO EM COELHOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2007.

Prof. Cláudio César Fonseca
(Co-orientador)

Prof. José Antônio Viana
(Co-orientador)

Prof. Renato Linhares Sampaio

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo

Prof^a. Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

“Importa, porém, caminhar hoje, amanhã e no dia seguinte.”

(Jesus)

AGRADECIMENTO

A todos os animais, meus agradecimentos e meu pedido de desculpas;

A Deus pela companhia eterna;

Aos meus pais, Francisca e Edmilsom. Em especial à minha amada mãe por ser dona de uma força sem tamanho e por nunca medir esforços para que eu pudesse concluir este trabalho, superando grandes obstáculos e dificuldades nesta caminhada, sempre ao meu lado;

À professora e orientadora Andrea Pacheco, que depositou a sua confiança neste projeto e na nossa capacidade para desenvolvê-lo;

À Universidade Federal de Viçosa por ter me acolhido tão bem desde a graduação, permitindo que eu faça parte da sua história e me transformando em uma profissional cada dia melhor;

À Ophthalmos Fórmulas Oficinas Ltda e à Petrovich Instrumental Cirúrgico pela confiança e apoio a esta pesquisa;

Ao professor Cláudio pela paciência e pelos ensinamentos na coorientação deste trabalho;

Ao professor Renato Linhares Sampaio por todas as orientações e pela atenção de sempre;

Ao Dr. Paulo Daquer, médico oftalmologista que me apoiou e me incentivou colaborando com este experimento;

Ao Dr. José do Carmo e ao laboratório de patologia Prevent de Viçosa por toda colaboração;

À Vânia do laboratório de patologia Prevent pelo aprendizado e pela confecção das lâminas histológicas;

Ao professor José Antônio pelo incentivo;

Ao professor Luiz Gonzaga pela paciência e pela colaboração;

Ao professor Eduardo Paulino pela cooperação na análise estatística deste trabalho;

À professora Marlene pela credibilidade e pelas palavras de amiga;

Ao professor Laércio pelas palavras de alegria;

Ao professor Ricardo pelo profissionalismo;

Aos estagiários Gláucia, Vinícius e Renato por toda ajuda, amizade e paciência;

À Emily pela colaboração;

Aos meus irmãos e ao meu cunhado Luciano pelo apoio e pela torcida;

Às minhas amadas irmãs Bete e Regina, somos as três para sempre;

Aos sobrinhos pela admiração, em especial a Denise pela felicidade concedida;

Ao amigo Róberson pela torcida e alegria de sempre;

Aos amigos Abelardo e Camila, pela amizade sincera e pelos momentos de descontração;

À amiga de sempre Vera, por todo carinho e apoio;

Aos amigos e companheiros da pós-graduação pelos momentos de alegria;

Às amigas Cláudia, Renata e Fábria pela alegria;

Aos funcionários do DVT, em especial à Maninha, Divina, Sônia, Paulo, Cláudio, Luiz Carlos e Adão, pela colaboração neste experimento;

À Rosi pelo seu profissionalismo, pela sua ajuda e pela sua boa vontade;

À irmã e amiga Tatiana, hoje e para sempre, pelo incentivo para iniciar esta caminhada, pela paciência e pelo apoio.

A todo pessoal da ACEAK.

Às fiéis companheiras Sade, Kate e Beatriz por ficarem sempre ao meu lado e à Cindy por estar em meu coração.

BIOGRAFIA

Kelly Cristine de Sousa Pontes, filha de Edmilsom Martins Pontes e Francisca de Sousa Pontes, nasceu na cidade de São Paulo em 14 de Maio de 1975.

Em Janeiro de 2004, graduou-se Médica Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em Março de 2004, deu início ao curso de Especialização em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, concluindo em Março de 2005.

Em Março de 2005, ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Cirurgia, junto ao Departamento de Veterinária, nesta mesma instituição.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS..... | vii |
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| LISTA DE TABELAS | x |
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| INTRODUÇÃO..... | 01 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 02 |
| 1. ANATOMIA, FISIOLOGIA E HISTOLOGIA DA CÓRNEA..... | 02 |
| 2. ETIOLOGIA DAS ÚLCERAS DE CÓRNEA E PROCESSO DE REPARAÇÃO..... | 06 |
| 2.1. Progressão das Úlceras de Córnea Complicadas..... | 09 |
| 3. TRATAMENTO DAS ÚLCERAS DE CÓRNEA..... | 09 |
| 3.1 Tratamento Clínico..... | 10 |
| 3.2 Tratamento Cirúrgico..... | 11 |
| 4. MEMBRANA AMNIÓTICA..... | 15 |
| 5. GLICERINA COMO MEIO DE PRESERVAÇÃO..... | 18 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 1. OBTENÇÃO E PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA..... | 20 |
| 2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS MEMBRANAS..... | 21 |
| 3. GRUPOS EXPERIMENTAIS..... | 21 |
| 4. TÉCNICA CIRÚRGICA E PÓS-OPERATÓRIO..... | 22 |
| 5. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO..... | 24 |
| 5.1. Avaliação clínica..... | 24 |
| 5.2. Avaliação histológica..... | 25 |
| 5.3. Estudo morfométrico..... | 26 |
| 5.4. Avaliação estatística..... | 27 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| CONCLUSÕES..... | 46 |
| REFERÊNCIAS..... | 47 |
| APÊNDICES..... | 57 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| % | - Porcentagem |
| ATP | - Adenosina trifosfato |
| EDTA | - Ácido etilenodiaminotetracético dissódico |
| ° | - Grau |
| °C | - Graus Celcius |
| b-FGF | - Fator de crescimento fibroblástico básico |
| EGF | - Fator de crescimento epidermal |
| KGF | - Fator de crescimento ceratócito |
| HGF | - Fator de crescimento hepatócito |
| mRNA | - Ácido ribonucléico mensageiro |
| IL-1RA | - Interleucina 1 receptor antagonista |
| IL 10 | - Interleucina 10 |
| UI | - Unidades internacionais |
| µm | - Micrômetro |
| Mm | - Milímetro |
| Cm | - Centímetro |
| Ml | - Mililitro |
| mcg | - Micrograma |
| mg | - Miligrama |
| kg | - Quilograma |
| ARVO | - Association for Research in Vision and Ophthalmology |
| UFV | - Universidade Federal de Viçosa |
| ® | - Marca registrada |
| HE | - Hematoxilina eosina |
| TG | - Tricrômico de gômori |
| GC | - Grupo controle |
| GT | - Grupo tratado |
| Tab. | - Tabela |
| MA | - Membrana amniótica |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1 - Fotomicrografias da córnea de coelho do grupo tratado com 30 dias de pós-operatório exemplificando a disposição das gradículas sobre o estroma. | 42 |
| Figura 2 - Fotomicrografia da área normal de epitélio corneano de coelho exemplificando a disposição das medidas realizadas. | 42 |
| Figura 3 - Representação gráfica dos valores médios atribuídos ao blefarospasmo nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 29 |
| Figura 4 - Representação gráfica dos valores médios atribuídos à secreção ocular nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 30 |
| Figura 5 - Representação gráfica dos valores médios atribuídos à congestão dos vasos conjuntivais nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 31 |
| Figura 6 - Representação gráfica dos valores médios atribuídos ao desconforto nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 32 |
| Figura 7 - Fotomicrografias demonstrando epitélio da córnea de coelho. | 42 |
| Figura 8 - Representação gráfica dos valores médios atribuídos ao teste de fluoresceína nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 34 |
| Figura 9 - Fotomicrografia de córnea de coelho do grupo controle 24 horas após a realização de ceratectomia superficial. | 43 |
| Figura 10 - Fotomicrografia de córnea de coelho do grupo tratado 24 horas após ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina preservada. | 43 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 11 - | Fotomicrografia de epitélio da córnea e membrana amniótica de animal do grupo tratado. | 43 |
| Figura 12 - | Fotografias das córneas de coelhos do grupo controle (A) e do grupo tratado (B) 30 dias após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 44 |
| Figura 13 - | Representação gráfica dos valores médios atribuídos à neovascularização nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 36 |
| Figura 14 - | Fotomicrografia do estroma corneano de animal do grupo tratado 15 dias após realização de ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina. | 44 |
| Figura 15 - | Fotomicrografia de córnea de coelho do grupo tratado 30 dias após a realização de ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina. | 44 |
| Figura 16 - | Representação gráfica dos valores médios atribuídos à opacidade corneana nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 40 |
| Figura 17 - | Fotomicrografia da córnea de coelho do grupo tratado 24 horas após a realização de ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina. | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | | Página |
|-------------|---|---------------|
| Tabela 1 - | Classificação microscópica da epitelização da córnea em coelhos após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 25 |
| Tabela 2 - | Classificação microscópica da incorporação do implante à córnea em coelhos submetidos a ceratectomia superficial e tratados com membrana amniótica. | 26 |
| Tabela 3 - | Valores médios atribuídos ao blefarospasmo nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 29 |
| Tabela 4 - | Valores médios atribuídos à secreção ocular nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 30 |
| Tabela 5 - | Valores médios atribuídos à congestão dos vasos conjuntivais nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico. | 30 |
| Tabela 6 - | Valores médios obtidos relacionados ao desconforto nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico. | 32 |
| Tabela 7 - | Valores médios atribuídos ao teste de fluoresceína nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico. | 34 |
| Tabela 8 - | Resultados da análise pelo qui-quadrado para células polimorfonucleares presentes na área lesada dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico. | 35 |
| Tabela 9 - | Valores atribuídos à neovascularização observada pelo exame clínico nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico. | 36 |
| Tabela 10 - | Resultados da análise pelo qui-quadrado dos fibroblastos presentes na área lesada dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 38 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 11 - | Resultados da análise pelo qui-quadrado dos fibroblastos presentes na área normal dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos. | 38 |
| Tabela 12 - | Valores médios obtidos relacionados a opacidade corneana nos animais dos grupos tratado e controle após a realização de ceratectomia superficial e implante com membrana amniótica canina. | 39 |
| Tabela 13 - | Valores médios em μm da espessura das camadas da córnea nos animais do grupo tratado após a realização dos procedimentos cirúrgicos | 41 |
| Tabela 14 - | Valores médios em μm da espessura das camadas da córnea nos animais do grupo controle após a realização de ceratectomia superficial. | 41 |

RESUMO

PONTES, Kelly Cristine de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Utilização de membrana amniótica canina como bandagem no tratamento de úlcera experimental da córnea – estudo clínico, histológico e morfométrico em coelhos.** Orientadora: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-Orientadores: Cláudio César Fonseca e José Antônio Viana.

A membrana amniótica tem sido amplamente utilizada na reparação de úlceras de córnea, demonstrando resultados satisfatórios por possuir efeito antiadesivo, propriedades bacteriostáticas, promover a proteção da lesão, reduzir a dor, auxiliar na epitelização e não possuir imunogenicidade. Esta membrana pode ser utilizada em lesões da córnea como enxerto ou como bandagem dependendo do seu posicionamento. Neste estudo, foi realizada a ceratectomia superficial em 28 coelhos. No grupo tratado, composto por 14 animais, utilizou-se a membrana amniótica canina como bandagem, suturada com sua face epitelial aplicada sobre o leito da úlcera experimental. O grupo controle não recebeu tratamento. A avaliação clínica foi realizada a partir de 24 horas após a realização dos procedimentos, em intervalos de 2 dias na primeira semana e de 4 dias da segunda semana até os 180 dias de pós-operatório. A avaliação histológica e morfométrica foram realizadas aos 1, 2, 7, 15, 30, 60 e 180 dias após a cirurgia. Observaram-se os efeitos da membrana amniótica como bandagem e sua incorporação à córnea. Comparou-se o tempo de reparação da córnea entre os grupos e verificou-se o período para que a córnea apresentasse transparência completa. Avaliaram-se ainda a eficácia da glicerina a 99% como meio de preservação das membranas e da lupa binocular como instrumento de magnificação do campo operatório nos procedimentos cirúrgicos. A opacidade corneana esteve presente em todos os animais, tanto no grupo tratado como no grupo controle, durante os 180 dias. A membrana atuou contendo as células inflamatórias em sua superfície e promoveu um avanço no início do processo de reparação, porém a partir de determinado momento retardou a sua conclusão; e juntamente com o trauma causado pela agulha de sutura causou desconforto, congestão conjuntival, secreção ocular e estimulou a neovascularização e a fibrose na córnea. Não houve incorporação da membrana à córnea. A glicerina a 99% atuou satisfatoriamente como meio de preservação da membrana no que diz respeito à contaminação, mas

suas características antiangiogênicas foram perdidas. A lupa binocular mostrou ser eficiente na realização dos procedimentos cirúrgicos envolvidos neste trabalho.

Palavras-chave: membrana amniótica, úlcera de córnea, glicerina, oftalmologia veterinária, bandagem.

ABSTRACT

PONTES, Kelly Cristine de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february of 2007. **Canine amniotic membrane as a patch in treatment of superficial corneal ulcer - a clinical, histological and morphometric study.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-Advisers: Cláudio César Fonseca and José Antônio Viana.

The amniotic membrane has been widely used in the repair of corneal ulcers showing good results as it exhibits anti-adhesive effect and bacteriostatics properties, it protects the wound, reduces pain, participates in the epithelization and is not immunogenic. This membrane can be used on corneal ulcers as a graft or a patch depending on its position. A superficial keratectomy was made on all of the 28 animals included in this study. On the resulted corneal ulcer of the 14 animals of the treated group an amniotic membrane was used as patch sutured with its epithelial surface over the experimentally made ulcer. The control group did not receive the patch. The animals were submitted to clinical evaluations 24 hours after the proceedings, at a two-day interval during the first week and at a four-day interval from the second week until 180 days after surgeries. The histological and morphometric analysis were undertaken at 1, 2, 7, 15, 30, 60 e 180 days after surgery. The amniotic membrane's effect as a patch and its incorporation to the cornea were evaluated. The time needed for the corneal repair of the treated group was compared to the control and the time needed for the cornea's complete transparenance was observed. Glycerin at 99% was evaluated as a preservation medium and the binocular magnifying glass was evaluated during surgeries. The corneal opacity was always present both in the treated and the control group during 180 days. The membrane retained the inflammatory cells on its surface and provided an improvement on the repair process at the beginning, but at some point it delayed this process and its conclusion. The membrane and the trauma caused by the suture needle leaded to discomfort, conjunctival congestion, ocular secretion and stimulated neovascularization and corneal fibrosis. There was no incorporation of the membrane to the cornea. The glycerin at 99% acted efficiently as a preservation medium when analyzing contamination, but its anti-angiogenesis characteristics were lost. The binocular magnifying glass was efficient during these works' proceedings.

Key-words: amniotic membrane, corneal ulcer, glycerin, veterinary ophthalmology, patch.

INTRODUÇÃO

A úlcera de córnea é uma das doenças oculares mais comuns em cães e gatos. Na ceratite ulcerativa grave, ou penetrante, pode ocorrer a perda do globo ocular devido a complicações como endoftalmites. No entanto, a ceratite ulcerativa é uma das doenças oculares que melhor responde ao tratamento entre as doenças oftálmicas (Whitley, 1991), podendo se tornar complicada quando o mecanismo de reparação normal é inibido ou desequilibrado, quando o agente etiológico não foi eliminado ou a lesão é contaminada (Kern, 1990).

Algumas das ceratites ulcerativas persistentes, não responsivas ao tratamento clínico, requerem a terapia cirúrgica para a sua reparação. Os objetivos do tratamento cirúrgico são reparar a úlcera e prevenir a sua progressão, proteger a superfície da córnea durante a fase de reparação e evitar a degeneração do estroma (Portnoy et al., 1989).

Muitos tipos de membranas biológicas vêm sendo estudados em cirurgias oftálmicas reconstrutivas. Já foram pesquisados implantes de membranas autógenas, alógenas e xenógenas na tentativa de reconstruir superfícies oculares após traumas ou excisões cirúrgicas, obtendo-se resultados considerados satisfatórios. Dentre os diversos tipos de membranas biológicas, a membrana amniótica tem demonstrado excelentes resultados em cirurgias oculares (Matthews et al., 1982; Barros et al., 1998; Azuara-Blanco et al., 1999; Dua e Azuara-Blanco, 1999; Woo et al., 2001; Dua et al., 2004; Barros et al., 2005).

O epitélio da membrana amniótica reflete em muitas funções especializadas, entre as quais se destacam efeito antiadesivo, propriedades bacteriostáticas, proteção da lesão, redução da dor, efeito na epitelização e ausência de imunogenicidade nas membranas homólogas e a fresco (Trelford e Trelford-Sauder, 1979; Azuara-Blanco et al., 1999).

A utilização da membrana amniótica em cirurgias oftálmicas pode se dar de duas formas. Como enxerto, quando a membrana é usada como um substrato para a migração celular, tornando-se epitelizada e incorporada ao tecido receptor, devendo ser posicionada com sua face epitelial voltada para cima; e como bandagem, primariamente para conter a reação inflamatória enquanto a epitelização está

ocorrendo sob ela. Neste caso, a membrana deverá ser posicionada com a sua face epitelial para baixo, em contato com o leito da ferida (Dua et al., 2004).

Acredita-se que pela facilidade na obtenção e disponibilidade dessa membrana no meio veterinário, ela deva ser empregada com mais freqüência no tratamento das doenças oculares, com destaque para as úlceras de córnea superficiais não responsivas ao tratamento clínico.

Os objetivos para a realização deste trabalho foram estudar os efeitos da utilização da membrana amniótica canina como bandagem, em úlceras superficiais da córnea de coelhos; comparar por meio de exame histológico o tempo de epitelização da córnea de ambos os grupos; avaliar clinicamente qual o tempo necessário para que houvesse a restauração da transparência da córnea após o processo de reparação nos dois grupos; avaliar por meio de exame histológico se existiu incorporação da membrana amniótica à córnea quando a mesma foi utilizada como bandagem; avaliar a eficácia da glicerina a 99%, em temperatura ambiente, como meio de preservação de membrana amniótica canina e a viabilidade na utilização de lupa binocular microcirúrgica, com aumento de 2,5 vezes, na realização de ceratectomia superficial.

Neste contexto, objetivou-se estudar os efeitos da membrana amniótica canina conservada em glicerina a 99%, como bandagem, no tratamento de úlceras superficiais da córnea de coelhos, utilizando-se a avaliação clínica, histológica e morfométrica.

Esta dissertação foi elaborada conforme normatização da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

REVISÃO DE LITERATURA

1. ANATOMIA, FISILOGIA E HISTOLOGIA DA CÓRNEA

O bulbo ocular possui três túnicas que, estando em estreita aposição, formam uma folha laminada que circunda o centro parcialmente líquido, parcialmente gelatinoso. A túnica fibrosa externa confere forma e proteção ao bulbo ocular. Compreende a córnea e a esclera. A túnica média, ou úvea, é formada por vasos

sanguíneos e músculos lisos, estando envolvida com a nutrição do bulbo e a regulação do formato da lente e do tamanho pupilar. É composta pela íris, corpo ciliar e coróide. A túnica nervosa interna é a camada relacionada com a neurofisiologia da visão, sendo denominada retina (Samuelson, 1991; Dyce et al., 2004).

O limbo é a região de transição entre a córnea e a esclera. É rico em vasos sanguíneos que desempenham importante função nos processos inflamatórios da córnea (Junqueira e Carneiro, 1994). Nesta região é encontrada a linhagem de células-tronco, responsável pela reparação de lesões na superfície da córnea. Esta região fornece um microambiente favorável para abrigar tais células, favorecendo a sua sobrevivência e diferenciação. (Dua e Azuara-Blanco, 2000; Anderson et al., 2001).

A córnea é transparente e ocupa um sexto da porção anterior do globo ocular nos cães, sendo que o seu raio de curvatura é maior do que o do restante do globo (Startup, 1984). Sua espessura central nos animais da espécie canina é de $0,61 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$ e a espessura periférica é de $0,67 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$ (Slatter e Hakanson, 1998), podendo variar de acordo com a idade (Stapleton e Peiffer, 1979; Montiani-Ferreira et al., 2003) e a espécie dos animais (Gwin et al., 1982; Bahn et al., 1986; Wilkie e Whittaker, 1997).

Os fatores anatômicos que contribuem para a transparência da córnea são a ausência de vasos sanguíneos e linfáticos, o epitélio não queratinizado, a ausência de pigmentação, o tamanho e disposição das fibrilas de colágeno que compõem o estroma, o estado de deturgescência e as fibras nervosas amielínicas (Samuelson, 1991).

As funções da córnea são fornecer suporte para as estruturas intra-oculares e permitir a refração e a transmissão da luz devido, respectivamente, à sua curvatura e transparência. A nutrição da córnea se dá por meio do humor aquoso e da lágrima, que também é responsável pela limpeza da superfície ocular. As pálpebras e a membrana nictitante proporcionam proteção contra agressões do meio externo (Samuelson, 1991).

Histologicamente, na espécie canina, a córnea é composta por quatro camadas, da porção anterior à posterior: o epitélio, o estroma ou substância própria, a membrana de Descemet e o endotélio (Spreull, 1966; Startup, 1984; Slatter e

Hakanson, 1998; Gelatt, 2003). Alguns autores consideram o filme lacrimal como uma quinta camada (Slatter, 1992). Os primatas e as aves possuem ainda a membrana de Bowman, uma camada situada entre o epitélio e o estroma considerada a membrana basal do epitélio, ou seja, a lâmina limitante anterior do estroma (Samuelson, 1991).

Na espécie canina, o epitélio corneano é composto por células pavimentosas estratificadas simples, não queratinizadas, fixadas à sua membrana basal por meio de hemidesmossomos (Startup, 1984; Slatter e Hakanson, 1998) e possui a espessura aproximada de 0,08 mm com 7 a 15 camadas celulares (Startup, 1984). Consiste em uma camada simples de células basais, duas a três camadas de células poliédricas e duas ou três camadas de células escamosas não queratinizadas (Samuelson, 1991). À medida que ocupam uma posição mais superficial, as células profundas tornam-se achatadas e sofrem as descamações naturais (Slatter, 1992).

As células basais constituem a camada epitelial germinativa e estão aderidas à membrana basal através de hemidesmossomos, que atuam ancorando o epitélio ao estroma (Samuelson, 1991). Os agrupamentos de células poligonais, ou *células em asa*, estão dispostos em duas ou três camadas, dependendo da espécie e da localização na córnea, formando uma zona de transição entre as células colunares basais e as células escamosas mais superficiais (Samuelson, 1991). A camada celular epitelial superficial é composta por células achatadas e poligonais contendo microvilos e micropregas que podem ter a função de estabilizar o filme lacrimal na superfície corneana (Samuelson, 1991).

O estroma ou substância própria compreende 90% da espessura da córnea, mede de 0,5 mm a 0,6 mm e é formado por fibroblastos, fibrilas de colágeno, substância fundamental e fibrócitos, também denominados ceratócitos. Esta camada é limitada anteriormente por células epiteliais basais e posteriormente pela membrana de Descemet (Spreull, 1966; Startup, 1984). A organização precisa do estroma é o fator mais importante na manutenção da transparência da córnea. As fibrilas de colágeno são posicionadas em paralelo, formando lamelas entremeadas e separadas por substância fundamental, cuja composição é colágeno, glicosaminoglicanos e mucopolissacarídeos que são sintetizados pelos ceratócitos. Os ceratócitos são células fixas que contribuem para a formação e manutenção das

lamelas. Entre as lamelas são ocasionalmente encontrados linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Samuelson, 1991; Slatter, 1992; Slatter e Hakanson, 1998).

A membrana de Descemet é uma estrutura elástica que forma o limite posterior do estroma e é considerada a membrana basal do endotélio. A sua espessura mede 14µm, sendo composta por fibrilas delgadas de colágeno, arranjadas paralelamente, que são depositadas durante toda a vida do indivíduo, fazendo com que a espessura aumenta com a idade (Samuelson, 1991; Slatter, 1992; Slatter e Hakanson, 1998). Segundo Startup (1984), esta membrana seria incapaz de se regenerar, mas Slatter (1992) afirma que em pequenas lesões corneanas penetrantes, as células endoteliais secretam uma nova membrana de Descemet.

O endotélio, ou epitélio posterior, é composto por uma camada simples de células retangulares sendo contínuo com as células da face anterior da íris. No interior das células que compõem o endotélio existem numerosas mitocôndrias, o que confere a elas uma alta atividade metabólica. O endotélio atua como uma barreira entre a córnea e o humor aquoso e está situado posterior e adjacente à membrana de Descemet (Spreull, 1966; Startup, 1984; Slatter, 1992; Stevens e Lowe, 1995; Slatter e Hakanson, 1998). As células endoteliais impedem a opacificação da córnea através da regulação da hidratação corneana por bombeamento de fluido do estroma corneano (Stevens e Lowe, 1995). A sua capacidade regenerativa pode variar com a idade e a espécie animal (Samuelson, 1991).

O filme lacrimal está presente sobre a córnea e a conjuntiva, constituído por três camadas diferentes. A camada superficial externa, composta por materiais gordurosos e fosfolipídios; a camada média ou aquosa, formada predominantemente por água; e a camada mucóide interna, composta por mucoproteínas. Suas funções são eliminar materiais estranhos, lubrificar a passagem das pálpebras sobre a córnea, fornecer um meio para a transferência de oxigênio atmosférico, células inflamatórias e anticorpos para a córnea, e contribuir na manutenção de uma superfície lisa para que a córnea desempenhe perfeitamente sua função óptica (Gum, 1991; Slatter, 1992). Imunoglobulinas como IgA e IgG foram encontradas no filme lacrimal de cães, o que constitui importante defesa contra patógenos (Gum, 1991).

A córnea possui nervos sensoriais derivados do ramo oftálmico do nervo trigêmeo (Startup, 1984; Samuelson, 1991). Fibras nervosas amielínicas passam da periferia da córnea em direção ao centro do estroma, estando dispostas em dois

planos. O plano superficial forma um plexo com terminações na camada epitelial, onde existem terminações táteis e de dor. As fibras situadas em um plano mais profundo, as quais são distribuídas através do estroma, têm somente terminações táteis (Spreull, 1966).

O humor aquoso, os capilares do limbo e o filme lacrimal fornecem os metabólitos necessários para a córnea. Para manter o seu estado de hidratação, ela exige energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) gerada pela degradação da glicose, fornecida principalmente pelo humor aquoso (Gum, 1991; Slatter, 1992). Alguns fatores podem interferir no estado de hidratação da córnea. A integridade do epitélio e do endotélio corneano funciona como uma barreira física contra a entrada do filme lacrimal e humor aquoso para o estroma; a evaporação da lágrima faz com que ela atue como agente osmótico criando um gradiente na superfície ocular que drena a água do estroma através do epitélio; um aumento na pressão intra-ocular pode induzir à passagem do humor aquoso para o estroma, levar à perda da função do endotélio ou desorganizar o arranjo das fibras de colágenos pelo seu estiramento (Gum, 1991; Slatter, 1992).

2. ETIOLOGIA DAS ÚLCERAS DE CÓRNEA E PROCESSO DE REPARAÇÃO

As úlceras de córnea podem ter como causas primárias os traumas físicos ou químicos, e como causas secundárias os agentes infecciosos, o aumento na pressão intra-ocular e as alterações metabólicas (Wilcock, 1993; Slatter e Hakanson, 1998). Também são citadas alterações imunomediadas e ceratopatias senis como causas de úlceras de córnea (Startup, 1984; Whitley, 1991). Dentre os traumas físicos, podem-se citar os agentes externos como as anormalidades palpebrais, ciliares e do sistema lacrimal (Startup, 1984; Slatter e Hakanson, 1998).

A córnea intacta é muito resistente às infecções, mas uma quebra na barreira epitelial permite a entrada de microrganismos, podendo predispor-la à ulceração (Startup, 1984). Muitas bactérias têm sido isoladas de córneas ulceradas, incluindo *Streptococcus haemolytic*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas spp.*, *Moraxella*, *Proteus*, *Micrococcus* e *Echerichia coli*, e dentre os fungos isolados estão a *Cândida* e o *Aspergillus* (Startup, 1984). O vírus da hepatite canina invade a córnea através do humor aquoso causando úlcera corneana (Slatter e Hakanson, 1998). O vírus da

cinomose pode levar a ulceração na córnea por causar ceratoconjuntivite seca com infecção bacteriana secundária (Startup, 1984).

As alterações metabólicas que causam úlcera de córnea são raras, mas podem ocorrer nos casos de deficiência de vitamina A em filhotes mal nutridos (Startup, 1984).

A cicatrização de lesões na córnea varia com a sua profundidade. As lesões podem envolver apenas o epitélio, ou o epitélio e o estroma superficial. A reparação pode ocorrer pelo deslizamento ou migração das células epiteliais para cobrir a área lesada; e por mitose, com o objetivo de reconstituir o número de células epiteliais normais (Samuelson, 1991; Wilcock, 1993).

A migração celular ocorre quase imediatamente após a lesão epitelial. Fibrina, fibrinogênio e fibronectina são secretados do epitélio adjacente para a face desnuda (Kern, 1990; Samuelson, 1991; Wilcock, 1993). Leucócitos polimorfonucleares chegam até a área através do filme lacrimal e iniciam o processo de debridamento dos restos celulares (Kern, 1990). As células epiteliais que estão situadas nas margens do defeito se estendem e deslizam sobre a ferida, sofrendo mitose e restaurando a arquitetura epitelial normal. Esse processo tem início uma hora após a ocorrência da lesão e num período de 4 a 7 dias o epitélio estará completamente regenerado (Spreull, 1966; Kern, 1990). Os processos de migração celular e mitose podem ser influenciados pelo sistema nervoso simpático, por hormônios, fatores de crescimento, citocinas e mensageiros químicos (Kern, 1990). Segundo Wilcock (1993), a atividade mitótica é estimulada pelo fator de crescimento epidermal derivado do epitélio lesado e do filme lacrimal e é mais marcante nas células epiteliais basais próximas ao limbo.

Quando a membrana basal epitelial estiver intacta, as células epiteliais podem utilizá-la para sua adesão ao estroma. Nos casos de perda da membrana basal, a reconstituição dos seus novos complexos será iniciada entre 5 a 7 dias após a lesão, sendo necessárias 6 a 8 semanas para a sua completa reconstrução. Durante este tempo, a adesão do epitélio ao estroma estará ausente (Kern, 1990).

Em lesões que envolvem o epitélio e parte do estroma, a reparação ocorre mais lentamente, sendo por migração e replicação epitelial juntamente com fibroplasia estromal. Uma lesão penetrante no estroma causa a morte dos ceratócitos situados nas margens da ferida. Um coágulo de fibrina é depositado no defeito e há a

formação de edema em sua volta (Kern, 1990). Em poucas horas após a injúria, neutrófilos chegam à ferida através do filme lacrimal, atraídos por proteases liberadas do epitélio lesado. Eles migram pelo estroma e controlam a contaminação bacteriana, degradam o colágeno danificado e estimulam a fibroplasia e vascularização pela produção de várias citocinas (Wilcock, 1993; Wilkie e Whittaker, 1997). Passados 3 dias, os ceratócitos ativados da periferia da lesão começam a secretar fibrilas de colágeno que são orientadas aleatoriamente. Os ceratócitos invadem a ferida e a secreção de fibrilas de colágeno continua durante semanas. O novo colágeno secretado é remodelado e torna-se mais compacto, mas não consegue atingir a organização uniforme de antes. Essa desorganização vai levar a uma opacidade corneana permanente (Spreull, 1966; Kern, 1990; Wilcock, 1993).

A perfuração da membrana de Descemet resulta na lesão das células endoteliais. As extremidades da membrana se enrolam e um coágulo de fibrina se deposita cobrindo a ferida. Em poucas horas, as células endoteliais adjacentes migram para cobrir o defeito criado. Esse processo é lento e pode ser completado em até 6 semanas (Befanis et al., 1981; Kern, 1990; Wilcock, 1993). A habilidade mitótica do endotélio varia segundo as espécies, sendo que nos gatos é limitada e nos cães é bem desenvolvida (Befanis et al., 1981). Spreull (1966) afirmou que a membrana de Descemet era incapaz de sofrer regeneração. Posteriormente, foi confirmado que se a lesão tiver origem interna, as células endoteliais próximas ao defeito vão deslizar e sofrer mitose até cobrir a área e produzir nova membrana de Descemet, e nos casos em que a origem da lesão for externa, o endotélio pode ser incapaz de recobrir o defeito originando uma área de edema persistente (Slatter, 1992; Wilcock, 1993; Slatter e Hakanson, 1998).

Os sinais clínicos que acompanham o processo de reparação se manifestam pela dor evidenciada por blefarospasmo, epífora, fotofobia e protrusão da terceira pálpebra (Startup, 1984; Gelatt, 2003). De acordo com o tipo de lesão, grau de contaminação, tipo de microrganismo envolvido na infecção e com a resposta do organismo, pode estar presente secreção ocular, hiperemia conjuntival, miose, vascularização, pigmentação e edema corneanos (Startup, 1984).

A dor associada à ceratite ulcerativa é derivada da estimulação direta dos nervos sensoriais presentes na córnea (ramo oftálmico do nervo trigêmeo) e do espasmo do músculo ciliar secundário à uveíte reflexa (Kern, 1990). Um reflexo

axonal (que não requer uma sinapse) induz à vasodilatação da íris e corpo ciliar, resultando em miose, hipotonia e espasmo ciliar proporcionalmente a severidade da lesão (Kern, 1990).

2.1. Progressão das Úlceras de Córnea Complicadas

As úlceras de córnea tornam-se complicadas quando o mecanismo de reparação normal é inibido ou desequilibrado, quando a causa que está levando à ulceração não foi eliminada ou a lesão foi infectada com agentes infecciosos (Kern, 1990).

As enzimas proteolíticas produzidas pelos ceratócitos e por células epiteliais e inflamatórias destroem o colágeno estromal, o que pode resultar em descemetocele e perfuração da córnea (Kern, 1990).

Os ferimentos não complicados cicatrizam sem vascularização, mas as lesões infectadas ou destrutivas recompõem-se com vascularização, e neste caso a infiltração celular é mais extensa. Ocorre invasão da área lesada por vasos sanguíneos provenientes do plexo vascular límbico. A deposição de tecido de granulação forma a cicatriz, que será mais densa, portanto mais opaca, do que nos casos em que há a cicatrização avascular. Os vasos sanguíneos são colapsados após a reparação, mas não desaparecerem completamente, podendo ser visualizados através de lâmpada de fenda (Slatter, 1992; Slatter e Hakanson, 1998).

3. TRATAMENTO DAS ÚLCERAS DE CÓRNEA

As doenças da córnea podem ser classificadas como inflamatórias e não inflamatórias. As doenças inflamatórias podem ser divididas em ceratite não ulcerativa e ceratite ulcerativa. As ceratites ulcerativas podem ser subdivididas segundo a profundidade da lesão como superficial, estromal profunda e descemetocele. As úlceras superficiais podem ser classificadas como não complicadas, progressivas e refratárias (Whitley, 1991, Gelatt, 2003).

Devido às inúmeras causas de ulcerações corneanas, um simples plano terapêutico não é eficiente para todas as circunstâncias. Geralmente o tratamento é direcionado no sentido de cumprir vários objetivos. Dentre eles estão a prevenção ou a eliminação da contaminação ou da infecção, além de outros agentes físicos e químicos; o controle da uveíte anterior, a analgesia, o controle da destruição tecidual,

a preservação da transparência e das funções da córnea e suporte para o tecido (Kern, 1990). São citados ainda, como princípios fundamentais no tratamento da ceratite ulcerativa, a identificação e a remoção da causa da úlcera, a determinação do estágio e da severidade da úlcera e a seleção de uma modalidade terapêutica apropriada (Whitley, 1991). Assim, pode-se citar dois tipos de terapia: a clínica e a cirúrgica.

3.1. Tratamento Clínico

A limpeza da córnea e do saco conjuntival é essencial no tratamento das úlceras corneanas e pode ser feita utilizando-se solução fisiológica e algodão, tomando cuidado para não agredir a córnea. Com este procedimento, a utilização de antibióticos poderá ser mais efetiva. A remoção de tecido necrótico, quando presente, pode ser necessária (Startup, 1984).

A via de administração e o tipo de antibiótico utilizado serão decididos de acordo com a avaliação clínica, considerando-se a severidade da lesão. A escolha do antibiótico depende dos resultados da citologia e da coloração de Gram, além da cultura e antibiograma (Kern, 1990).

O tratamento tópico utilizado em úlceras superficiais deve ser feito de 4 a 6 vezes ao dia, enquanto em úlceras estromais envolvendo menos de um terço do estroma devem ser tratadas mais agressivamente, de 6 a 8 vezes ao dia (Kern, 1990).

A dor pode ser minimizada pelo uso de ciclopégicos (atropina 0,5% a 1%). Estes agentes causam midríase e ciclopegia pelo bloqueio dos nervos parassimpáticos da íris e do corpo ciliar, prevenindo a formação de sinéquias em casos de úlceras perfurantes com envolvimento da úvea e aliviando o espasmo ciliar (Startup, 1984; Whitley, 1991). Recomenda-se a utilização da atropina tópica de uma a quatro vezes ao dia (Whitley, 1991).

A utilização de anestésicos tópicos deve ser restrita apenas no auxílio do exame oftálmico, pois são tóxicos para o epitélio corneano, interferindo na reparação das lesões (Startup, 1984; Kern, 1990).

Os corticosteróides inibem a regeneração epitelial e endotelial, a infiltração por células inflamatórias e a atividade fibroblástica. A resistência à tensão da ferida em processo de cicatrização fica diminuída, as colagenases são potencializadas e aumenta o risco de infecção (Kern, 1990; Slatter, 1992; Slatter e Hakanson, 1998). A terapia com os corticosteróides reduz o , mas deve ser evitada, pois pode levar à

perfuração da córnea e perda do olho. Nos casos em que este tipo de tratamento tenha que ser feito, deve-se associá-lo aos agentes anticolagenolíticos tópicos (Startup, 1984). Os corticosteróides são úteis depois que termina o processo de reparação epitelial diminuindo a formação das cicatrizes (Slatter e Hakanson, 1998). Também podem ser utilizados para reduzir a neovascularização após a cicatrização de uma úlcera corneana complicada (Kern, 1990).

Os agentes anticolagenolíticos inibem a colagenase e protegem o estroma contra a rápida deterioração vista em alguns casos de úlceras. Os mais conhecidos são a acetilcisteína, o soro autólogo, o ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) e a heparina (Startup, 1984; Kern, 1990; Whitley, 1991).

Os agentes lubrificantes são indicados nos casos em que a produção do filme lacrimal está prejudicada por alguma razão, tornando o olho ressecado e predisposto à ulcerações. Os mais utilizados são aquele à base de metilcelulose (Startup, 1984).

Startup (1984) recomendou o uso das vitaminas A, C e E no tratamento de úlceras refratárias e citou que estas vitaminas estimulam a cicatrização corneana. Outras terapias para úlceras refratárias são os agentes hiperosmóticos tópicos, que reduzem o edema subepitelial e melhoram a aderência do epitélio ao estroma; a fibronectina, uma glicoproteína plasmática que estimula a adesão celular, migração celular e síntese protéica e promove adesão epitelial e cicatrização tanto em humanos como em coelhos; o fator de crescimento epidérmico, um polipeptídeo que ocorre naturalmente, aumenta a regeneração epitelial e promove mitose do epitélio corneano e a aprotinina, um inibidor das enzimas plasmina, calicreína, tripsina e quimotripsina (Gelatt, 2003).

3.2. Tratamento Cirúrgico

As úlceras de córnea persistentes, não responsivas ao tratamento clínico, requerem a terapia cirúrgica para a sua reparação (Portnoy et al., 1989). Os objetivos da terapia cirúrgica são reparar a úlcera e prevenir a sua progressão, proteger a superfície da córnea durante a fase de reparação e retardar a degeneração do estoma. Os procedimentos cirúrgicos podem ser classificados como procedimentos protetores, de sustentação e reconstrutivos (Kern, 1990). Os procedimentos protetores têm aplicação específica, mas limitada no tratamento de ceratite ulcerativa (Kern, 1990). São eles o “flap” de terceira pálpebra e a tarsorrafia. Os seus efeitos

são cobrir a córnea e minimizar a irritação causada pelas pálpebras sobre a córnea durante o ato de piscar (Startup, 1984; Kern, 1990). Estes procedimentos estão indicados na prevenção de ceratopatas por exposição nos casos de proptose pós-traumática, no tratamento conservativo de úlcera epitelial recorrente após a realização de debridamento epitelial (Kern, 1990) e após a realização de cirurgia intra-ocular (Huff, 1975). No entanto, a aplicação deste tipo de técnica cirúrgica limita a realização de novos debridamentos epiteliais e impossibilita a avaliação da córnea (Whitley, 1991), além de impedir o tratamento clínico (Kern, 1990). Wilkie e Whittaker (1997), não indicaram a utilização de “flap” de terceira pálpebra e tarsorrafia nos casos de úlceras estromais ou profundas, por não promoverem suporte nas áreas adjacentes da córnea e interferirem no processo da eliminação de debris necróticos da superfície corneana, facilitando a infecção.

As várias formas de recobrimentos conjuntivais compreendem os procedimentos de sustentação, os quais são opções versáteis no tratamento de úlceras de córnea de qualquer tamanho, forma e profundidade (Kern, 1990). São eles os enxertos pediculados de conjuntiva e em ponte e os recobrimentos conjuntivais em 180° e 360°. Estas técnicas atuam como sustentação para as áreas fragilizadas, fornecem fibroblastos, vasos sanguíneos e células epiteliais para atuar na reparação dos defeitos corneanos, além de contribuírem com propriedades antimicrobianas e antiprotease/anticolagenase (Kern, 1990; Whitley, 1991; Wilkie e Whittaker, 1997). Também permitem a preservação da visão e possibilitam o acesso do cirurgião à câmara anterior durante o processo de reparação dependendo da sua localização na córnea (Kern, 1990). No entanto, necessitam de anestesia geral para a sua realização, possuem potencial para a formação de cicatriz e requerem mais tempo e gastos do que os outros métodos terapêuticos (Kern, 1990; Whitley, 1991).

Os procedimentos cirúrgicos reconstrutivos são aqueles que envolvem a reparação direta da córnea lesada através da utilização de suturas ou enxertos. Estes procedimentos permitem a preservação da transparência da córnea (dependendo do tipo de enxerto) e de sua função e estão indicados nos casos de úlceras profundas ou extensas, mas requerem experiência do cirurgião e instrumentos cirúrgicos específicos (Kern, 1990).

A sutura direta de pequenas úlceras e perfurações da córnea com menos de 3 mm de diâmetro é recomendada (Kern, 1990), mas não é tão apropriada como os

procedimentos que envolvem a utilização de enxertos, por alterarem a curvatura da córnea (Whitley, 1991; Wilkie & Whittaker, 1997).

Os enxertos de córnea autógenos, alógenos e xenógenos são pouco realizados na prática veterinária porque requerem habilidade do cirurgião, instrumentos adequados e magnificação do campo operatório para a sua realização (Jensen, 1963; Khodadoust, 1968; McEntyre, 1968; Keller et al., 1973; Dice et al., 1973; Richard e Paton, 1978; Panchbhai e Kulkarni, 1986; Ehrlich et al., 1988; Portnoy et al., 1989; Slatter, 1992; Laus et al., 1996; Wilkie e Whittaker, 1997; Hansen e Guandalini, 1999). Existe ainda a dificuldade na obtenção de córnea doadora (Hacker, 1991; Slatter, 1992; Slatter e Hakanson, 1998). Estes procedimentos podem também resultar em opacidade do enxerto e rejeição ao tecido devido à excessiva vascularização da córnea receptora (Brightman et al., 1989).

Os enxertos de conjuntiva também requerem habilidade cirúrgica e instrumentos adequados para a sua realização. São amplamente utilizados em medicina veterinária por serem técnicas mais fáceis do que o enxerto de córnea, porém resultam em maior grau de opacidade da córnea após a sua cicatrização (Peiffer et al., 1977; Kuhns, 1979; Hakanson et al., 1988; Blogg et al., 1989; Morales et al., 1996).

As transposições corneoesclerais ou corneconjuntivais são mais difíceis e requerem maior tempo para serem realizadas do que os enxertos conjuntivais, porém não necessitam de doadores e não ocorre reação imunomediada, pois os tecidos utilizados são do próprio receptor. Neste caso, a formação de cicatriz é diminuída, mas a área de onde foi retirado o tecido doador fica danificada (Parshall, 1973; Kern, 1990). Segundo Wilkie e Whittaker (1997), as desvantagens desta técnica estão no fato de que o enxerto fornece apenas espessura parcial e falha em produzir um endotélio para lesões penetrantes, além do que a presença de suprimento sanguíneo faz com que o enxerto possa ser vascularizado, resultando em cicatriz.

Muitos tipos de tecidos biológicos vêm sendo estudados em cirurgias reconstrutivas na medicina humana e veterinária. São utilizados implantes de tecidos autógenos, alógenos e xenógenos na tentativa de reconstruir superfícies oculares após traumas ou excisões cirúrgicas, obtendo-se resultados considerados satisfatórios. São utilizados como implante o peritônio (Garcia et al., 1996), a submucosa de intestino delgado (Lewin, 1999; Bussieres et al., 2004), a escama de sardinha (Laus et al.,

2000), o pericárdio (Barros et al., 1995), a cápsula renal (Andrade et al., 1999; Andrade et al., 2004) e a membrana amniótica (Trelford e Trelford-Sauder, 1979; Matthews et al., 1982; Kim e Tseng, 1995; Barros et al., 1998; CHIOU, A.G-Y. et al., 1998; Azuara-blanco et al., 1999; Dua e Azuara-Blanco, 1999; Chen et al., 2000; Monteiro et al., 2000; Park e Tseng, 2000; Woo et al., 2001; Espana et al., 2002; Solomon et al., 2002; Fairbanks et al., 2003; Dua et al., 2004; Barros et al., 2005; Poonyathalang et al., 2005; Tamhane et al., 2005). Outros tipos de tratamentos para as úlceras refratárias incluem a utilização de lentes de contato terapêuticas, a aplicação de adesivos e a realização de ceratotomias em grade e pontilhada (Whitley, 1991).

As lentes de contato flexíveis promovem a migração epitelial, a regeneração da membrana basal e a adesão do epitélio ao estroma pela proteção da superfície ocular contra o atrito das pálpebras durante o ato de piscar (Whitley, 1991; Wagoner, 1997). Segundo Wada et al. (2000), as lentes de contato terapêuticas induzem à vascularização corneana, mas diminuem a dor por proteger a córnea de agressões externas, como irregularidades palpebrais, auxiliando no processo de reparação da córnea. As desvantagens das lentes de contato são o custo elevado e a possibilidade das lentes serem deslocadas e perdidas (Startup, 1984; Whitley, 1991). O seu uso está contra-indicado nos casos de ceratoconjuntivite seca e ceratite bacteriana (Kern, 1990), pois estes tipos de ceratopatias apresentam grande predisposição para a contaminação ou já estão contaminadas, e o uso das lentes de contato pode agravar a doença, por facilitar o acúmulo de debris e aumentar a proliferação bacteriana. O sucesso na terapia com as lentes de contato está na curvatura correta para cada paciente. A curvatura inadequada irá resultar em , edema de córnea, neovascularização, infecção secundária e perda da lente (Kern, 1990; Whitley, 1991).

As ceratotomias em grade e pontilhada promovem a exposição das células epiteliais migratórias ao colágeno subepitelial do tipo I, proporcionando a adesão mais efetiva do epitélio ao estroma (Kirschner, 1990; Whitley, 1991; Stanley et al., 1998). Estas são técnicas que envolvem baixo custo, porém apresentam o risco de perfuração da córnea, especialmente quando o animal está apenas sob anestesia tópica (Stanley et al., 1998; Miller, 2001).

A utilização de adesivos em cirurgia vem sendo estudada ao longo dos anos. Para serem eficientes, os adesivos devem apresentar efeito hemostático, provocar a

aderência firme dos tecidos sem alterar o processo de reparação e não possuir efeitos colaterais ou ação carcinogênica (Morandini e Ortiz, 1992).

Os adesivos sintéticos surgiram como uma alternativa viável e vários estudos foram realizados com o cianoacrilato (Dellevigne et al., 1971; Su e Lin, 2000; Ollivier et al., 2001). As indicações para a sua utilização em oftalmologia incluem as úlceras penetrantes da córnea, as descemetoceloses, as úlceras estromais profundas e as úlceras indolentes (Kern, 1990). O adesivo protege a córnea, possui propriedades antimicrobianas e promove uma barreira contra microrganismos, parecendo ser mais benéfico do que as lentes de contato, no entanto a técnica para a sua aplicação é mais difícil (Whitley, 1991). A córnea deve ser debridada e seca antes da aplicação de pequena quantidade do cianoacrilato, com o animal sob sedação ou anestesia geral (Portnoy, et al., 1989; Erdey et al., 1991; Wilkie e Whittaker, 1997). Após a reparação da lesão, ocorre a queda do adesivo naturalmente (Wilkie e Whittaker, 1997).

Sampaio (1999) comparou a utilização de adesivo de fibrina e de cianoacrilato em córneas de coelhos, concluindo que nenhum desses adesivos foram completamente eficientes. O adesivo biológico não forneceu estabilidade sobre o tecido corneano na forma de coágulo e o adesivo sintético agravou as manifestações clínicas comuns à ceratectomia, retardando o processo de reparação corneana.

4. MEMBRANA AMNIÓTICA

A membrana fetal é composta por duas camadas principais: o córion, que é a camada externa da placenta que entra em contato com as células maternas e a membrana amniótica, camada mais interna que está em contato íntimo com o feto, separada dele apenas pelo líquido amniótico (Dua e Azuara-Blanco, 1999).

A membrana amniótica, ou âmnion, é uma membrana translúcida composta por uma camada simples de células colunares firmemente aderida à camada mais interna, mesenquimal, que contém grande quantidade de colágeno (Dua e Azuara-Blanco, 1999).

Externamente ao âmnion está localizado o córion, compreendendo um tecido conjuntivo contendo os vasos fetais (corioalantóicos) (Dua et al., 2004).

Na espécie humana a membrana amniótica surge após 7 a 8 dias da concepção. A sua espessura varia de 0,02mm a 0,5mm e não apresenta

vascularização nem suprimento sanguíneo direto (Dua et al., 2004). Esta membrana é composta por cinco camadas, do meio interno para o externo: o epitélio, que está em contato direto com o líquido amniótico, a membrana basal, a camada compacta, a camada fibroblástica e a camada esponjosa (Matthews et al., 1982; Dua et al., 2004).

As células amnióticas possuem numerosos microvilos em sua face apical (Wynn e Corbet, 1969) e processos celulares se estendendo na membrana basal como podócitos. Estes processos celulares apresentam junções tipo hemidesmossomos aderindo a membrana basal aos tonofilamentos. No citoplasma são encontradas muitas vesículas pinocitóticas, organelas em abundância, incluindo retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os núcleos celulares têm sua configuração irregular e indentações na membrana nuclear, com nucléolos sempre grandes e homogêneos, o que sugere atividade nucleolar. A ultra-estrutura do epitélio da membrana amniótica tem muitas funções especializadas, entre elas destacam-se: como epitélio de revestimento, como atividade epitelial secretória e como intenso transportador transcelular e intercelular (Dua e Azuara-Blanco, 1999). Além disso, possui efeito antiadesivo, propriedades bacteriostáticas, proteção da lesão, redução da dor, efeito na epitelização e não possui imunogenicidade nos casos em que for utilizada como transplante homólogo (Trelford e Trelford-Sauder, 1979; Azuara-Blanco et al., 1999). A ausência de leucócitos no âmnion permite a prática do halo-transplante por não induzir a rejeição (Trelford e Trelford-Sauder, 1979).

A membrana amniótica preservada é considerada um tecido inerte com células inviáveis. A habilidade das membranas preservadas influenciarem na reparação da lesão através de fatores de crescimento e citocinas pode estar muito limitada ou até inexistente (Dua et al., 2004).

Woo et al. (2001), pesquisaram os efeitos da membrana amniótica humana na reparação de úlceras de córnea em coelhos e concluíram que o epitélio da membrana amniótica contém vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento ceratócito (KGF) e o fator de crescimento hepatócito (HGF), que atuam facilitando a migração epitelial promovendo a epitelização. Koizumi et al. (2000), afirmaram que estes fatores de crescimento foram expressos pelo âmnion nas suas regiões epitelial e estromal.

Park e Tseng (2000) estudaram a ceratectomia fotorefrativa transepitelial na córnea de coelhos e chegaram a conclusão que a morte dos ceratócitos está associada com a infiltração de células polimorfonucleares na lesão e que a membrana amniótica impede a infiltração destas células, diminuindo, desta maneira, a morte dos ceratócitos e a inflamação.

Hao et al. (2000) identificaram a presença de mRNA para citocinas IL-1RA (receptor antagonista) e IL-10, que são potentes inibidores da inflamação, nas células amnióticas epiteliais e mesenquimais. Woo et al. (2001) afirmaram que a inflamação está ligada ao grau de opacidade da córnea após a sua reparação e que com a utilização da membrana amniótica ocorre a diminuição da inflamação reduzindo esta opacidade.

Hao et al. (2000) demonstraram a ação antiangiogênica da membrana amniótica através da expressão da trombospondina-1, um potente antiangiogênico químico, em todas as células epiteliais e em 20% das células mesenquimais do âmnion. Além disso, os mesmos autores afirmaram que as propriedades antiinflamatórias da membrana amniótica diminuem o estímulo à angiogênese e conseqüentemente a neovascularização corneana.

Segundo Azuara-Blanco et al. (1999) e Dua et al. (2004) a membrana amniótica deve ser coletada de doadora saudável, que não apresente sinais de qualquer tipo de infecção e por meio de cesariana, sendo que o seu processamento e a sua preparação deverão ser realizados sob condições estéreis.

O método de preparação da membrana amniótica proposto por Kim e Tseng (1995), consiste em realizar a coleta da placenta por meio de cesariana em ambiente livre de contaminação, remover os coágulos sanguíneos através de lavagem com solução salina, separar a membrana amniótica do córion manualmente e colocá-la sobre papel de nitrocelulose com a superfície epitelial voltada para cima. Na próxima etapa mergulha-se o papel com a membrana 3 vezes em solução contendo 1.000 UI/ml de penicilina, 20 mg/ml de estreptomicina e 2,5 mcg/ml de anfotericina B, secciona-se o papel em discos de 1,5 cm de diâmetro e estoca-se em glicerina a 100% a 4°C. Barros et al. (2005), sugeriram que as membranas podem ser estocadas em glicerina a 98% em temperatura ambiente.

Foram descritos outros métodos de preservação e estocagem da membrana amniótica, entre eles estão a liofilização, o ar seco, o tratamento com glutaraldeído e politetrafluorelitenos e a irradiação (Dua et al., 2004).

Souza et al. (2004) verificaram a contaminação da membrana amniótica humana a fresco no tempo zero e em vários tempos diferentes após o parto e verificaram que todas as membranas apresentaram contaminação bacteriana. Os mesmos autores sugeriram cuidados assépticos durante o manuseio da membrana antes da sua utilização. Dua et al. (2004), afirmaram que existe o risco de infecção e que devem ser realizados procedimentos de anti-sepsia não apenas durante a preparação e estocagem da membrana, mas periodicamente, durante o seu uso clínico.

Quando a membrana amniótica é usada para cobrir a superfície ocular e é removida ou desprende-se espontaneamente, ela é referida como uma bandagem e, neste caso, a epitelização ocorre sob a membrana. Quando ela é utilizada na expectativa de tornar-se epitelizada e incorporada ao tecido do receptor, ela será referida como um enxerto (Dua et al., 2004).

Nos casos em que a membrana amniótica é requerida como um substrato para a migração celular, isto é, quando é usada como um enxerto, a mesma deverá ser posicionada no local com a sua face epitelial, ou membrana basal, voltada para cima, sem entrar em contato com a superfície ocular. Já nos casos em que a membrana é requerida como uma bandagem, primariamente para conter a reação inflamatória enquanto a epitelização está ocorrendo sob ela, a mesma será posicionada com a sua face epitelial em contato com a superfície ocular (Dua et al., 2004). Hao et al. (2000) sugeriram que nesta posição, ocorre a liberação de alta concentração de fatores antiinflamatórios presentes na membrana amniótica, para a superfície ocular lesada.

5- GLICERINA COMO MEIO DE PRESERVAÇÃO

A glicerina a 98% é um dos meios de preservação mais utilizados em casos clínicos e em pesquisas (Rodaski et al., 2000; Filgueiras et al., 2004; Brun et al., 2004).

Sabe-se que a glicerina a 98% desidrata o tecido e preserva a concentração iônica das células mantendo a integridade celular (Pigossi, 1964). Esta capacidade de desidratação confere à glicerina um poder anti-séptico (Chirife et al., 1982) contra

fungos e bactérias (Pigossi, 1967), porém não tem ação sobre vírus (Coronado et al., 1998).

Filgueiras et al. (2004) realizaram estudo utilizando a glicerina a 98% na preservação de aloenxertos ósseos e constataram que este meio não só reduziu as características imunogênicas do enxerto como também o manteve livre de contaminação. O caráter anti-séptico e anti-imunogênico da glicerina também foi encontrado por Brun et al. (2004).

Em estudo realizado por Cavassini et al. (2001), a glicerina preservou a função osteoindutora de implante ósseo em tecido subcutâneo e intramuscular de ratos. Mota et al. (2002) analisaram a ultra-estrutura da túnica muscular de intestino delgado de cães preservada em diferentes meios e concluíram que os meios estudados não são capazes de manter a integridade celular, mas a glicerina a 98% foi o meio de preservação que melhor manteve a ultra-estrutura celular. Os mesmos autores sugeriram a realização de novos estudos para se encontrar um meio ideal para a preservação de tecidos.

Krauspenhar (2003) afirmaram que o período mínimo para se obter o efeito anti-imunogênico e anti-séptico da glicerina a 98% corresponde a 30 dias, pois as bactérias Gram negativas podem levar até 27 dias para estarem ausentes no tecido preservado.

O tempo proposto de hidratação do tecido que foi conservado em glicerina a 98% foi de 15 minutos antes da sua utilização (Sartori Filho et al., 1997).

Estudos em cirurgias oftálmicas envolvendo a utilização da glicerina como meio de preservação de membrana amniótica em temperatura ambiente ou refrigerada a 4°C, têm demonstrado resultados satisfatórios (Kim e Tseng, 1995; Barros et al., 1998; Monteiro et al., 2000). Além das características supracitadas conferidas à glicerina como meio de preservação, ela ainda é de baixo custo e de fácil manuseio, estimulando mais estudos com a sua utilização.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto para a realização deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - UFV, com o protocolo de número 85/2006.

Este estudo está em conformidade com as normas para experimentação oftalmológica, seguindo os critérios da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO), a qual exige que apenas um dos olhos de cada animal seja comprometido, para que as alterações relacionadas ao ato cirúrgico e ao processo de reparação corneana não interfiram com o bem estar do animal durante o período pós-operatório.

1. OBTENÇÃO E PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

As membranas amnióticas utilizadas neste experimento foram obtidas de uma cadela gestante, hígida, encaminhada ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, que foi submetida à cesariana eletiva com fetos a termo.

A coleta das membranas foi feita de forma asséptica. Inicialmente as placentas foram lavadas com solução fisiológica estéril¹ a 0,9%, em temperatura ambiente, para a remoção de coágulos sanguíneos. As membranas amnióticas foram separadas manualmente do córion, lavadas com solução fisiológica estéril¹ a 0,9% e imersas em solução tampão fosfato² estéril, contendo 1000UI/ml de penicilina G, 20mcg/ml de estreptomicina e 2,5mcg/ml de anfotericina B².

Em seguida, as membranas foram estendidas sobre papel de nitrocelulose com sua face epitelial voltada para cima e com a membrana basal (estroma) voltada contra o papel. O papel com a membrana aderida, foi cortado em dimensões de dois centímetros por dois centímetros e imerso em frascos individuais contendo glicerina a 99%, segundo técnica descrita por Kim e Tseng (1995).

As membranas foram estocadas em temperatura ambiente por um período mínimo de trinta dias antes da avaliação microbiológica, como sugerido por Barros et al. (2005).

¹ Solução fisiológica – Cloreto de Sódio 0,9% - Biosintética Farmacêutica Ltda - São Paulo - Brasil

² Ophthalmos Fórmulas Oficiais LTDA - São Paulo - Brasil

2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS MEMBRANAS

Os fragmentos das membranas foram coletados assepticamente, triturados com solução salina a 0,85% estéril e inoculados em placas contendo ágar-sangue e em placas contendo ágar Sabouraud. As amostras inoculadas em ágar-sangue foram incubadas a 37°C por 48 horas para a análise bacteriológica, e as em ágar Sabouraud foram incubadas a 25°C durante 10 dias e a 37°C por 48 horas para a análise micológica. No ágar Sabouraud dependendo da temperatura em que as amostras inoculadas forem incubadas poderá crescer tipos de fungos diferentes. Este meio a 37°C por 48 horas é mais seletivo para leveduras, enquanto a 25°C por 10 dias poderão se desenvolver outros tipos de fungos.

3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Por se tratar de uma espécie dócil, de fácil manuseio, com baixo custo para manutenção e por ter um globo ocular de bom tamanho em relação ao corpo, os coelhos têm sido amplamente utilizados como modelo animal de experimentação em pesquisas tanto na medicina humana como na veterinária. Estas pesquisas se acumulam ao longo dos anos, facilitando a interpretação de novas investigações. No presente trabalho escolheu-se a utilização desta espécie porque a sua córnea possui um tamanho maior, ocupando cerca de 25% da área total do globo ocular. Isto facilita a realização do procedimento cirúrgico. Além disso, o exame clínico nesta espécie não necessita de contenção química, pois pode ser realizado apenas com a contenção manual (Bellhorn, 1991). Um outro fator determinante é a cor da íris nestes animais, fator que favorece a avaliação pós-cirúrgica da córnea e da câmara anterior.

Foram utilizados 28 coelhos da raça Nova Zelândia brancos, com 150 dias de idade, fêmeas, híginas, pesando entre 3,0 e 4,5 kg, obtidos junto ao setor de cunicultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos de 14 animais cada, sendo um grupo tratado e um controle. Os animais do grupo tratado receberam o implante de membrana amniótica xenógena. Todos os animais foram mantidos na coelheira do Departamento de

Veterinária da UFV recebendo água, feno e ração específica para coelhos³ *ad libitum*.

4. TÉCNICA CIRÚRGICA E PÓS-OPERATÓRIO

Antes de todo o procedimento anestésico e cirúrgico nos dois grupos, os animais foram submetidos a jejum hídrico de duas horas e sólido de doze horas. Todos os animais foram sedados com acepromazina⁴ na dose de 0,1 mg/kg de peso vivo por via intravenosa. Passados quinze minutos, os animais receberam anestesia à base de tiletamina/zolazepam⁵, na dose de 30 mg/kg de peso vivo por via intramuscular. Durante todo o procedimento cirúrgico o olho operado recebeu colírio anestésico à base de lidocaína a 4%².

Após o posicionamento em decúbito lateral direito, com a córnea voltada paralelamente à mesa, procedeu-se o corte dos pêlos e a lavagem da região periorcular com solução de iodopovidona a 10%. Em seguida, foi feita a proteção do campo operatório e a anti-sepsia da córnea, da conjuntiva palpebral e bulbar com a utilização de solução de iodopovidona a 0,5%² seguida pelo enxágüe com solução fisiológica estéril¹ a 0,9%.

As cirurgias foram realizadas com auxílio de lupa oftálmica binocular de 2,5 vezes de aumento⁶ e 340 mm de distância focal. A fixação do globo ocular foi efetuada com a utilização de duas suturas de apoio utilizando fio de nylon 3-0⁷ e pinças mosquito colocadas na posição 6 e 12 horas através da conjuntiva bulbar a 0,5 cm do limbo. Para a obtenção da blefarostase, foi inserido um espéculo ocular de Barraquer⁸ entre as pálpebras e uma sutura de apoio na terceira pálpebra com fio de nylon 3-0⁷ e pinça mosquito.

Em seguida, procedeu-se a ceratectomia superficial a 3 mm do limbo na posição 2 horas, retirando-se um fragmento corneano de 5,0 mm de diâmetro e 0,15 mm de espessura com auxílio de trépano de Castroviejo⁸, lâmina número 15 montada em bisturi cabo número três e instrumental microcirúrgico oftálmico⁸.

³ Ração peletizada para coelhos Agrocere® - Minas Gerais - Brasil

⁴ Acepran® - Univet - São Paulo - Brasil

⁵ Zoletil® - Virbac - São Paulo - Brasil

⁶ Lupa cirúrgica OPTON - Ortovet – Ortopedia Veterinária Comercial Ltda. São Paulo - Brasil

⁷ Fio nylon monofilamentar 3-0 Ethicon® - São Paulo - Brasil

⁸ Petrovich Instrumental Cirúrgico – São Paulo - Brasil

Finalizando o procedimento de ceratectomia superficial foi instilada uma gota de fluoresceína⁹ no olho operado. Após a lavagem com solução fisiológica estéril a 0,9%¹, a impregnação do corante no estroma confirmou a remoção do epitélio corneano.

No grupo tratado, um fragmento da membrana amniótica de aproximadamente 2cm², previamente hidratado por 15 minutos em solução fisiológica estéril a 0,9%¹, foi posicionado sobre o defeito corneano com sua face epitelial em contato com a córnea. A fixação da membrana à córnea se deu através de sutura com pontos simples separados ao redor do defeito corneano, utilizando-se fio de nylon 9-0¹⁰. A sutura deixou as bordas do defeito livre e atravessou totalmente o implante, mas não totalmente a córnea receptora, ou seja, não atingiu a membrana de Descemet. Inicialmente foram aplicados quatro pontos cardeais e posteriormente, os demais para a fixação adequada do implante à córnea, totalizando 8 pontos. Após a finalização da sutura, foi realizado novo teste de fluoresceína com o objetivo de delimitar a porção excedente da membrana a ser excisada. Com a membrana corada pela fluoresceína, procedeu-se ao corte e a remoção da porção não suturada da membrana amniótica. Durante o trans-operatório, o implante e a córnea foram irrigados constantemente com solução fisiológica estéril a 0,9%¹.

Após a cirurgia todos os animais receberam uma gota de colírio a base de neomicina 0,175%, polimixina B 10.000 UI/ml e bacitracina 0,025%², além de uma gota de colírio à base de atropina a 0,5%².

No tratamento pós-operatório de todos os animais foi realizada a limpeza do olho operado com gaze e solução fisiológica estéril a 0,9%¹, uma vez ao dia. No mesmo período, foi feita a aplicação de colírio à base de neomicina 0,175%, polimixina B 10.000 UI/ml e bacitracina 0,025%² e de colírio à base de atropina a 0,5%², na dose de uma gota a cada quatro horas, durante o período diurno, por quinze dias. Todos os animais foram mantidos, durante todo o experimento, com a utilização de colar do tipo elizabetano e em gaiolas individuais.

A remoção da sutura e da membrana amniótica dos animais do grupo tratado foi feita no sétimo dia após a realização da cirurgia, independente do estado em que a

⁹ Fluoresceína sódica® – Solução oftálmica estéril/ Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda - Minas Gerais - Brasil

¹⁰ Poliamida Monofilamento 9-0, agulha 3/8 espatulada, NP6590 Oftalmologia/ PolySuture Ind. e Com. LTDA. São Paulo - Brasil

membrana amniótica se encontrasse. Para isto, os animais foram submetidos à sedação com acepromazina⁴ na dose de 0,1 mg/kg por via intravenosa e aplicou-se colírio anestésico à base de lidocaína a 4%².

5. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO

5.1. Avaliação clínica

O exame clínico constou de iluminação direta utilizando-se lanterna¹¹ para a avaliação de blefarospasmo, secreção ocular, congestão de vasos conjuntivais, neovascularização corneana e permanência do implante. No exame clínico também foi avaliada a presença de desconforto. Realizou-se o teste de fluoresceína para verificar a presença da membrana no grupo tratado e o grau de epitelização da área que sofreu a ceratectomia no grupo controle e no grupo tratado após a remoção do implante.

O exame clínico foi realizado antes de se instilar qualquer colírio para que os parâmetros observados não sofressem alterações. Em seguida o olho operado foi lavado com solução fisiológica a 0,9%¹ para a remoção de qualquer impureza e, só então, se procedeu ao teste de fluoresceína.

Todos os parâmetros foram verificados 24 horas após a cirurgia, a cada 48 horas durante os primeiros sete dias de pós-cirúrgico e a cada quatro dias até o final do período de observação de cada grupo.

Os parâmetros blefarospasmo, secreção ocular, congestão de vasos conjuntivais, neovascularização da córnea e desconforto, foram classificados como presente ou ausente.

A opacidade da córnea e do implante foram classificados como ausente (grau 0), quando a córnea ou o implante apresentaram-se completamente transparentes, discreta (grau 1), quando se apresentaram com coloração branca, mas ainda permitindo a visualização da câmara anterior, e intensa (grau 2) quando se apresentaram com coloração branca sem permitir a visualização da câmara anterior. Esta classificação nos animais do grupo tratado foi feita somente a partir da remoção da sutura e do implante, 7 dias após o procedimento cirúrgico.

¹¹ Mini Maglite® - MAG Instrument – Ontário – Califórnia - USA

5.2. Avaliação histológica

Os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia nos dias 1, 2, 7, 15, 30, 60 e 180 após o procedimento cirúrgico. Para isso, os animais foram sedados com acepromazina⁵ na dose de 0,1 mg/kg por via endovenosa, após quinze minutos foi aplicado tiopental pela mesma via em dose suficiente para provocar parada respiratória e cardíaca, e só então seguiu-se a aplicação de cloreto de potássio por via intravenosa.

Após a eutanásia os olhos em estudo foram enucleados e fixados em líquido de Bouin. Decorrido um período de 24 horas as peças foram imersas em álcool a 70%, seccionadas longitudinalmente de maneira a se avaliar principalmente a córnea, e após sofrerem processamento histológico rotineiro, foram incluídas em parafina, seccionadas a espessura de 4µm em micrótomo rotativo manual e coradas por Hematoxilina-Eosina (H.E.) e Tricrômio de Gomori (T.G.).

O processo de reparação da córnea foi estudado por microscopia óptica, avaliando-se o grau de epitelização da córnea e a incorporação do implante quando presente, a presença de leucócitos, de edema e de infiltração vascular, e a proliferação de fibroblastos. A epitelização da córnea e a incorporação do implante foram classificadas de acordo com as tabelas 1 e 2, respectivamente; o edema e a infiltração vascular foram classificados como presente ou ausente e as demais variáveis foram classificadas de acordo com o resultado do estudo morfométrico.

Tabela 1. Classificação microscópica da epitelização da córnea em coelhos após a realização dos procedimentos cirúrgicos.

| GRAU | EPITELIZAÇÃO DA CÓRNEA |
|------|------------------------|
| 0 | Ausente |
| 1 | Incompleta |
| 2 | Completa |

Tabela 2. Classificação microscópica da incorporação do implante à córnea em coelhos submetidos a ceratectomia superficial e tratados com membrana amniótica.

| GRAU | INCORPORAÇÃO DO IMPLANTE |
|------|--------------------------|
| 0 | Ausente |
| 1 | Incompleta |
| 2 | Completa |

5.3. Estudo Morfométrico

Após a preparação das lâminas histológicas, foram obtidas fotomicrografias dos cortes histológicos com aumento de 100X e de 400X de todos os animais nos períodos pré-determinados.

Foi desenhada no programa de informática PowerPoint uma gradícula composta por 10 linhas dispostas paralelamente em distâncias iguais em posição vertical, e 10 linhas dispostas paralelamente em distâncias iguais em posição horizontal, totalizando 100 pontos de intersecção. Esta gradícula foi posicionada em três regiões diferentes de cada fotomicrografia da área normal e da área lesada de todos os animais, tomando o cuidado para a grade não sobrepor o local onde foi posicionada anteriormente (Aherne e Dunnill, 1982).

Foram realizadas contagens de todos os tipos celulares superpostos pelos pontos de intersecção da gradícula. Assim, cada tipo celular foi quantificado em 3 diferentes regiões do corte histológico da área normal e em 3 regiões do corte histológico da área lesada, totalizando 4200 pontos em cada área, de cada grupo (Fig.1).

De cada lâmina histológica também foram realizadas medidas em μm utilizando uma régua acoplada à ocular de um microscópio óptico. Para isto, cada corte histológico de todos os animais nos períodos pré-determinados foi dividido em área normal e área lesada. A área normal foi subdividida em 3 regiões, sendo que de cada região foram obtidas dez mensurações com distâncias iguais entre elas. O mesmo procedeu-se com a área lesada, totalizando 30 mensurações da área normal e 30 da área lesada em cada animal (Aherne e Dunnill, 1982) (Fig.2).

Desta forma foram obtidas as medidas em μm da espessura das regiões normais e lesadas do estroma em aumento de 100X e do epitélio e da membrana de Descemet em aumento de 400X totalizando 5040 medidas histológicas.

5.4. Avaliação estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran). Como não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Wilcoxon (SAEG, 1999).

As variáveis qualitativas foram submetidas ao teste não-paramétrico de Wilcoxon (SAEG, 1999).

As variáveis qualitativas dicotômicas foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

Para a realização do teste não-paramétrico de Wilcoxon utilizando o programa SAEG, as classificações presente e ausente das variáveis blefarospasmo, secreção ocular, desconforto, congestão dos vasos conjuntivais e neovascularização da córnea foram transformadas em valores 1 e 2 respectivamente. Para o teste de fluoresceína atribuiu-se o valor 1 para a classificação de resultado positivo e o valor 2 para a classificação de resultado negativo. À variável opacidade da córnea atribuiu-se o valor 1 para a classificação ausente (grau 0), valor 2 para a classificação discreta (grau 1) e valor 3 para classificação intensa (grau 2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação microbiológica das membranas amnióticas utilizadas nos procedimentos cirúrgicos do grupo tratado teve como finalidade constatar a ausência de fungos ou bactérias no material preservado em glicerina a 99%, durante 30 dias, em temperatura ambiente. Na avaliação realizada, não foram encontrados quaisquer tipos de microorganismos, permitindo a utilização das membranas nos procedimentos cirúrgicos. Assim, a glicerina mostrou-se eficiente como meio de preservação da membrana amniótica canina em temperatura ambiente. O mesmo foi constatado por Barros et al. (2005) quando utilizaram a membrana amniótica canina preservada em glicerina a 98% para a reconstrução da superfície corneana em um cão e por Laus et al. (2000) quando testaram o emprego da escama de sardinha, também conservada neste meio, em ceratoplastias lamelares.

Antes da utilização do microscópio cirúrgico para a realização de microcirurgias, as cirurgias oftálmicas eram realizadas com a utilização de materiais alternativos como a lupa binocular para a magnificação do campo operatório. No presente estudo, a lupa binocular com aumento de 2,5 vezes e distância focal de 340mm mostrou-se eficiente para a magnificação do campo cirúrgico, facilitando a realização das cirurgias e diminuindo os riscos de perfuração das córneas. Durante todo o período pós-operatório, constatou-se pelo exame clínico a não ocorrência de sinéquias ou uveíte nos olhos estudados, confirmando que em nenhum procedimento houve perfuração da córnea. Dice et al. (1973) utilizaram uma lupa binocular na realização de transplante de córnea experimental em cães e também obtiveram resultados satisfatórios. O custo de equipamento para estereoscopia, como o microscópio cirúrgico, chega a ser no mínimo 30 vezes mais elevado do que o custo de uma lupa binocular com aumento de 2,5 vezes e distância focal de 340mm. Frente aos benefícios alcançados com a utilização da lupa binocular nos tipos de procedimentos envolvidos nesta pesquisa e ao preço do microscópio cirúrgico que algumas vezes limita a sua utilização na veterinária, pode-se concluir que a lupa binocular especificada deva ser utilizada com mais frequência na medicina veterinária.

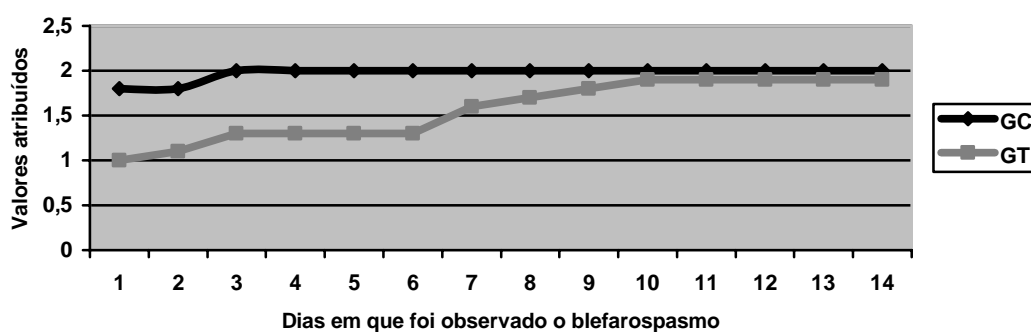
O blefarospasmo, sinal clínico que indica dor (Startup, 1984; Gelatt, 2003), esteve presente em apenas 3 animais do grupo controle por até dois dias. No grupo tratado, este sinal clínico se manifestou em 12 animais, persistindo por tempo variável. Estatisticamente, o blefarospasmo mostrou significância até o nono dia de pós-operatório nos animais do grupo tratado. A partir do décimo dia não existiu diferença estatística entre os grupos (Tab.3 e Fig.3). Acredita-se que o atrito do fio de sutura com a conjuntiva palpebral causou o blefarospasmo (Barros et al., 1998) e sua resolução espontânea pode ser atribuída a remoção da sutura e da membrana amniótica, 7 dias após a cirurgia. A perpetuação da dor nos animais do grupo tratado também se deve ao atraso no processo de reparação constatado neste grupo.

Tabela 3 – Valores médios atribuídos ao blefarospasmo nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos

| <i>Dia</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| GT | 1,0 ^a | 1,1 ^a | 1,3 ^a | 1,3 ^a | 1,3 ^a | 1,3 ^a | 1,6 ^a | 1,7 ^a | 1,7 ^a | 1,8 ^a | 1,8 ^a | 1,8 ^a | 1,8 ^a | 1,9 ^a |
| GC | 1,8 ^b | 1,8 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^a | 2,0 ^a | 2,0 ^a | 2,0 ^a | 2,0 ^a |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

Figura 3 – Representação gráfica dos valores médios atribuídos ao blefarospasmo nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos



Nota: em valores atribuídos 1 = Fenômeno presente, 2 = Fenômeno ausente.

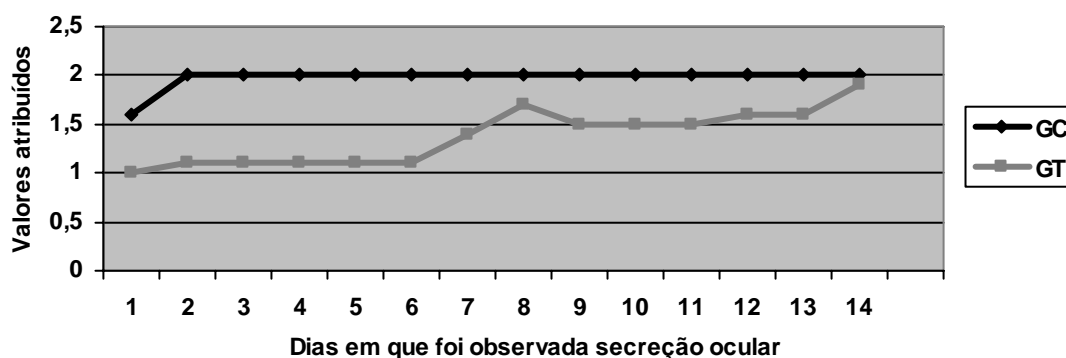
A secreção ocular do tipo serosa mostrou-se evidente em 5 animais do grupo controle por apenas um dia e todos os animais do grupo tratado apresentaram secreção ocular do tipo mucosa por períodos variados. Estatisticamente, até o décimo terceiro dia de pós-operatório houve diferença, que a partir do décimo quarto dia não existiu entre os grupos (Tab.4 e Fig.4). A congestão dos vasos conjuntivais esteve presente em todos os animais do grupo tratado e em 10 animais do grupo controle, sendo que persistiu por mais tempo no grupo tratado do que no grupo controle. Assim, a congestão mostrou-se significativa nos animais do grupo tratado até o décimo quinto dia de pós-operatório e a partir do décimo sexto dia esta variável não foi significativa (Tab.5 e Fig.5).

Tabela 4 – Valores médios atribuídos a secreção ocular nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos

| <i>Dia</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| GT | 1,0 ^a | 1,1 ^a | 1,1 ^a | 1,1 ^a | 1,1 ^a | 1,1 ^a | 1,4 ^a | 1,7 ^a | 1,5 ^a | 1,5 ^a | 1,5 ^a | 1,6 ^a | 1,6 ^a | 1,9 ^a |
| G | 1,6 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^a |
| C | | | | | | | | | | | | | | |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

Figura 4 – Representação gráfica dos valores médios atribuídos à secreção ocular nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos



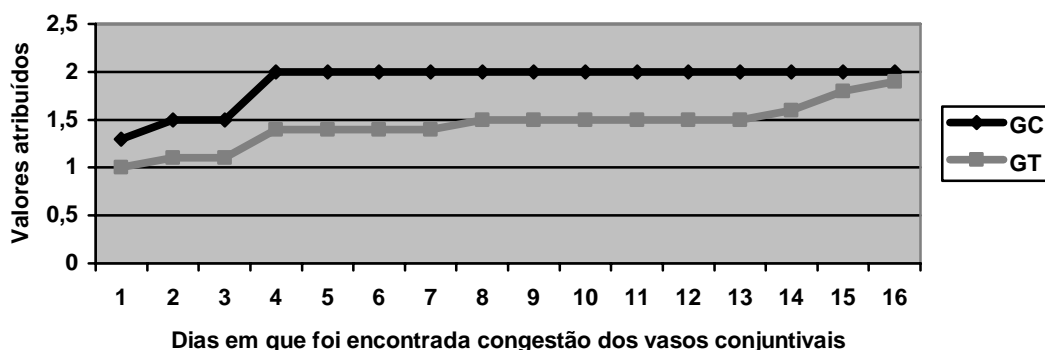
Nota: em valores atribuídos 1 = Fenômeno presente, 2 = Fenômeno ausente.

Tabela 5 – Valores médios atribuídos à congestão dos vasos conjuntivais nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico

| <i>Dia</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GT | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,6 | 1,8 | 1,9 |
| | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| GC | 1,3 | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | a |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios atribuídos à congestão dos vasos conjuntivais nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos



Nota: em valores atribuídos 1 = Fenômeno presente, 2 = Fenômeno ausente.

No presente trabalho foram utilizadas membranas amnióticas xenógenas e preservadas, assim estes sinais sugerem a ocorrência de reação inflamatória à membrana amniótica e ao fio de sutura, que atuaram como corpo estranho no local levando à ocorrência de secreção ocular do tipo mucosa e de congestão conjuntival persistente nos animais que utilizaram este tipo de tratamento. Como descrito por Azuara-Blanco et al. (1999), a membrana amniótica apresenta propriedades bacteriostáticas e não possui imunogenicidade se for homóloga. Também foi identificada a presença de inibidores inflamatórios nas células epiteliais da membrana amniótica a fresco (Hao et al., 2000) e a ausência de leucócitos no âmnion, permitindo a prática do halo-transplante por não induzir à rejeição (Trelford e Trelford-Sauder, 1979).

Os animais do grupo controle apresentaram secreção ocular do tipo serosa, o que é considerado normal nos processos ulcerativos da córnea e está relacionado aos processos conjuntivais e da córnea por estímulo das células calciformes (Startup, 1984; Kern, 1990); e a congestão dos vasos conjuntivais com menor significado nos animais deste grupo se deu como resultado do trauma causado pelas suturas de apoio aplicadas para a imobilização do globo ocular durante o procedimento cirúrgico. Este mesmo achado também foi constatado por Souza (2003).

Somente os animais do grupo tratado apresentaram desconforto, que persistiu por até sete dias durante o período pós-operatório, mesmo período em que foi

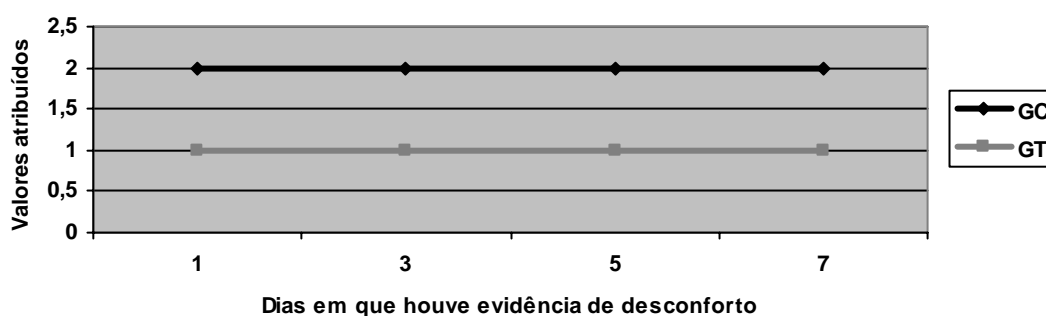
realizada a remoção da sutura e da membrana amniótica que já apresentava um aspecto necrótico e de decomposição (Tab.6 e Fig.6). Assim, houve diferença ao nível de 5% de significância entre os grupos durante o período em que o desconforto esteve presente. Este achado indica que a membrana amniótica, presente no local até este período, e o fio de sutura atuaram como corpo estranho.

Tabela 6 – Valores médios obtidos relacionados ao desconforto nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico

| <i>Dia</i> | 1 | 3 | 5 | 7 |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Grupo Tratado | 1,0 ^a | 1,0 ^a | 1,0 ^a | 1,0 ^a |
| Grupo Controle | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

Figura 6 – Representação gráfica dos valores médios atribuídos ao desconforto nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos



Nota: em valores atribuídos 1 = Fenômeno presente, 2 = Fenômeno ausente.

Através do estudo histológico pôde-se constatar que não houve a incorporação da membrana amniótica às córneas receptoras (Apêndice A). Este achado confirma uma das funções do epitélio da membrana amniótica, que é o de promover a proteção da lesão e possuir efeito antiadesivo. A característica de não incorporação da membrana quando esta é utilizada como bandagem também foi descrita por Dua et al. (2004).

Segundo Jones et al. (2000), se a velocidade de proliferação dos ceratinócitos estiver aumentada (hiperplasia) sem que ocorram aumentos relativos na

diferenciação e descamação, então aumenta a espessura do epitélio, sobretudo das camadas basal e espinhosa. Assim, a acantose é definida como a presença de um epitélio espessado.

Histologicamente, nos animais do grupo tratado foi constatada a epitelização corneana atrófica, apresentando apenas uma camada celular, em um animal aos 2 dias e em dois animais aos 7 dias. Dentre os dois últimos, um apresentou o epitélio não aderido ao estroma e o outro não apresentou epitelização em algumas áreas. Aos 15 dias, dois animais apresentaram acantose epitelial, sendo que em um deles o epitélio estava atrófico no centro da lesão e em outro estava atrófico e ausente na mesma região. Aos 30, 60 e 180 dias a epitelização mostrou-se completa e acantótica em todos os animais (Apêndice A; Fig. 7).

Nos animais do grupo controle notou-se epitelização completa vacuolizada em dois animais aos 7 dias. Aos 15 dias, dois animais apresentaram epitelização completa e acantótica nas extremidades da lesão e atrófica no seu centro. Aos 30, 60 e 180 dias a epitelização estava completa, sendo que em um animal aos 60 dias e em dois animais aos 180 dias ocorreu acantose epitelial (Apêndice B; Fig.7).

Notou-se pela análise histológica que a epitelização foi iniciada já aos 2 dias no grupo tratado enquanto no grupo controle iniciou-se aos 7 dias, porém aos 7 e 15 dias ainda existia epitelização incompleta no grupo tratado, mas no grupo controle, no mesmo período, a epitelização mostrou-se completa.

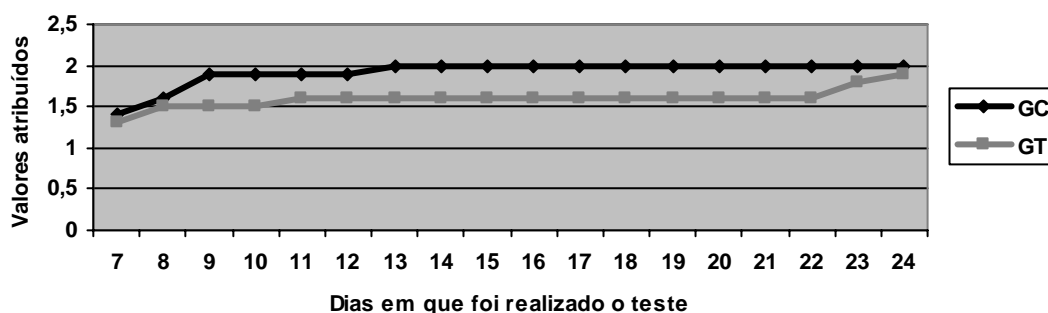
Em relação ao teste de fluoresceína, que identifica clinicamente a epitelização, realizado no período pós-operatório, os animais do grupo tratado demonstraram resultado positivo por mais tempo do que os animais do grupo controle. No grupo tratado o resultado do teste foi positivo em alguns animais por mais de 20 dias enquanto nos animais do grupo controle, o mesmo resultado se mostrou por no máximo 11 dias em apenas um animal. Os grupos comparados não demonstraram diferenças significativas nos primeiros oito dias após a cirurgia. Do nono ao vigésimo terceiro dia houve diferença entre os tratamentos e a partir deste dia o mesmo parâmetro não apresentou diferença entre os grupos (Tab.7 e Fig.8).

Tabela 7 – Valores médios atribuídos ao teste de fluoresceína nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico

| Dia | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| GT | 1, 3 ^a | 1, 5 ^a | 1, 5 ^a | 1, 5 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 6 ^a | 1, 8 ^a | 1, 9 ^a |
| GC | 1, 4 ^a | 1, 6 ^a | 1, 9 ^b | 1, 9 ^b | 1, 9 ^b | 1, 9 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^b | 2, 0 ^a |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

Figura 8 – Representação gráfica dos valores médios atribuídos ao teste de fluoresceína nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos



Nota: em valores atribuídos 1 = Resultado positivo, 2 = Resultado negativo.

No presente trabalho, os resultados histológicos confirmaram os resultados clínicos obtidos pelo teste de fluoresceína e indicaram que a membrana amniótica acelerou o início do processo de reparação da córnea como descrito por Woo et al. (2001), mas a partir de um determinado momento a membrana atuou como um corpo estranho, retardando a conclusão dos fenômenos de reparação da córnea. O mesmo achado também foi descrito por Sampaio (2004).

O número de células do tipo polimorfonucleares invadindo o estroma das córneas dos animais do grupo controle foi maior do que naquelas do grupo tratado (Fig.9), por isto a reparação da lesão nos animais deste último grupo se manifestou de forma mais lenta. Um dos papéis desenvolvido pela membrana amniótica preservada é o de conter as células inflamatórias vindas da superfície ocular. As

células polimorfonucleares não foram encontradas na área normal nos dois grupos e na área lesada do grupo tratado foram encontradas apenas circundando o fio de sutura (Fig.10). Porém foram observadas em grande número sobre as membranas utilizadas como tratamento nos animais do último grupo (Fig.11). Na área lesada do grupo controle este tipo celular correspondeu a 1,3% dos 4200 pontos avaliados (Tabela 8).

De acordo com Cassatella (1995) os leucócitos participam no processo de reparação de lesões através de sua capacidade em liberar citocinas e fatores de crescimento. As células do tipo polimorfonucleares invadem a lesão em grande número e produzem o fator de transformação de crescimento β -1, que atua na estimulação da proliferação de ceratócitos. Gan et al. (1999) afirmaram que a resposta proliferativa do epitélio, estroma e endotélio corneanos mostrou-se aumentada nas áreas onde os leucócitos estavam presentes.

Tabela 8 – Resultados da análise pelo qui-quadrado para células polimorfonucleares presentes na área lesada dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico

| Grupos | Polimorfonucleares | | Sem polimorfonucleares | | Total Geral |
|--------|--------------------|-----|------------------------|-------|-------------|
| | Total | % | Total | % | |
| GC | 54 ^a | 1,3 | 4146 ^a | 98,7 | 4200 |
| GT | 0 ^b | 0,0 | 4200 ^b | 100,0 | 4200 |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância.

A infiltração por células inflamatórias foi caracterizada principalmente por células polimorfonucleares, mas ocorreu também a presença de células mononucleares. Nos animais do grupo tratado com período de avaliação de 1 e 2 dias a presença de polimorfonucleares foi baixa e concentrada ao redor do fio de sutura (Fig.10). Enquanto no grupo controle, foi expressiva nos animais com período de observação de 1 (Fig.11) e 2 dias e em um animal aos 7 dias. Ainda no mesmo grupo, em dois animais avaliados histologicamente aos 15 dias notou-se a presença discreta de mononucleares, representados por linfócitos.

Ao exame clínico, a neovascularização da córnea surgiu a partir do quarto dia após a cirurgia e persistiu por tempo variável em dez animais do grupo tratado. No

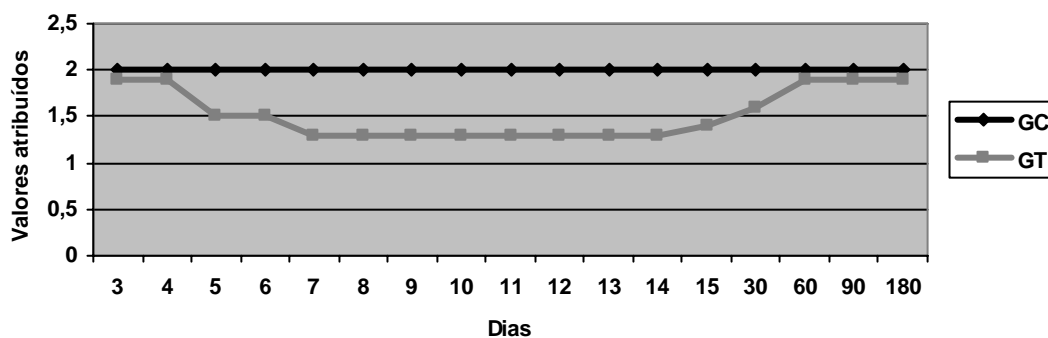
grupo controle a neovascularização não se manifestou. Estatisticamente não houve diferença entre os grupos para este parâmetro até o quarto dia após a cirurgia. Entre o quinto e o trigésimo dia, a neovascularização foi significativa nos animais do grupo tratado (Fig. 12A e 12B). A partir deste período não houve diferença entre os grupos comparados (Tab.9; Fig.13), pois houve a regressão dos vasos neoformados nos animais do grupo tratado.

Tabela 9 – Valores atribuídos à neovascularização observada pelo exame clínico nos animais dos grupos tratado e controle após a realização do procedimento cirúrgico

| <i>Dia</i> | 4 | 5 | 6 | 7 | 15 | 30 | 60 | 180 |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| GT | 1,9 ^a | 1,5 ^a | 1,5 ^a | 1,3 ^a | 1,4 ^a | 1,6 ^a | 1,9 ^a | 1,9 ^a |
| GC | 2,0 ^a | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^b | 2,0 ^a | 2,0 ^a |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

Figura 13 – Representação gráfica dos valores médios atribuídos à neovascularização nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos



Nota: em valores atribuídos 1 = Fenômeno presente, 2 = Fenômeno ausente.

Os resultados observados quanto a neovascularização da córnea indicam que a membrana amniótica preservada perdeu o seu poder antiangiogênico e que ela, a partir de um determinado momento, retardou a reparação da córnea e levou à formação de vasos devido à sua presença insistente agredindo a córnea. Deve-se também levar em consideração que a passagem da agulha de sutura pela córnea

causou trauma e permitiu a invasão do estroma por células polimorfonucleares levando à neoformação vascular. Estes fatos contribuíram para a perpetuação da agressão e indicaram um aspecto de cronicidade nos animais do grupo tratado. Nos animais do grupo controle não houve a presença da membrana amniótica e nem o trauma à córnea causada pela agulha de sutura, assim a reparação ocorreu mais rapidamente do que nas córneas do grupo tratado e não permitiu a formação de vasos.

Dua et al. (2004) afirmaram que os inibidores químicos da angiogênese encontrados na membrana amniótica estariam presentes em membranas frescas. Deste modo estas seriam mais efetivas neste aspecto do que as membranas preservadas. Hao et al. (2000) demonstraram a ação antiangiogênica da membrana amniótica a fresco através da expressão de um potente antiangiogênico químico, em todas as células epiteliais e em 20% das células mesenquimais do âmnion. Além disso, os mesmos autores afirmaram que as propriedades antiinflamatórias da membrana amniótica diminuem o estímulo à angiogênese e conseqüentemente a neovascularização corneana. A neovascularização da córnea pode ou não estar presente dependendo do tipo e da duração da agressão (Startup, 1984) e as lesões não complicadas são reparadas sem vascularização (Slatter, 1992; Slatter e Hakanson, 1998).

Embora a neovascularização tenha sido clinicamente evidente em dez animais do grupo tratado, na avaliação histológica este fenômeno foi observado em apenas um animal com período máximo de observação de 15 dias (Fig. 14). Nos animais do grupo controle o exame histológico não mostrou sinal de neovascularização. A ocorrência de vasos na avaliação histológica, em apenas uma córnea do grupo tratado, pode ser explicada devido a incidência dos cortes histológicos realizados durante a preparação das lâminas, que não incluíram os vasos observados clinicamente.

A proliferação de tecido conjuntivo fibroso nas córneas esteve evidente em sete animais do grupo tratado. Em um animal com período de avaliação de 7 dias com proliferação baixa e nos seis animais com períodos de avaliação de 15, 30 e 60 dias com proliferação alta (Fig.15). Nos animais do grupo controle este achado foi constatado em cinco animais. Nos quatro animais com períodos de avaliação de 15 e 30 dias e em um animal com período de avaliação de 60 dias, sendo que a

proliferação de tecido conjuntivo fibroso foi elevada em todos estes (Apêndices A e B).

No estudo morfométrico dos animais do grupo tratado, foram observados 1012 fibroblastos na área lesada, correspondendo a 24,1% e 534 fibroblastos na área normal, correspondendo a 12,7%, (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 – Resultados da análise pelo qui-quadrado dos fibroblastos presentes na área lesada dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos

| Grupos | Fibroblastos | | Sem fibroblastos | | Total Geral |
|----------------|-------------------|------|-------------------|------|-------------|
| | Total | % | Total | % | |
| Grupo Controle | 615 ^a | 14,6 | 3585 ^a | 85,4 | 4200 |
| Grupo Tratado | 1012 ^b | 24,1 | 3188 ^b | 75,9 | 4200 |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância

Tabela 11 – Resultados da análise pelo qui-quadrado dos fibroblastos presentes na área normal dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos

| Grupos | Fibroblastos | | Sem fibroblastos | | Total Geral |
|----------------|------------------|------|-------------------|------|-------------|
| | Total | % | Total | % | |
| Grupo Controle | 469 ^a | 11,2 | 3731 ^a | 88,8 | 4200 |
| Grupo Tratado | 534 ^b | 12,7 | 3666 ^b | 87,3 | 4200 |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância

Predominou-se no grupo controle a opacidade corneana em grau 0 (ausente) após a cirurgia por 4 a 13 dias. A partir daí as córneas mostraram grau 1 (discreta) de opacidade pelo restante do período de observação, exceto em 4 animais que mostraram evolução da opacidade corneana para o grau 2 (intensa). Três destes quatro animais apresentaram regressão da opacidade da córnea do grau 2 para o grau 1, persistindo neste grau de opacidade até o período máximo de observação de cada um.

Os animais do grupo tratado apresentaram opacidade corneana em grau 1 (discreta) no primeiro dia após o procedimento devido à presença do implante, permanecendo por até 15 dias com a mesma intensidade. O grau de opacidade 2

(intensa) foi observado em 7 animais por até 29 dias e regrediu para grau 1 em 6 animais cujos períodos de observação foram 15, 30, 60 e 180 dias. Não houve a regressão da opacidade da córnea para o grau 0 (ausente) após a realização dos procedimentos cirúrgicos em nenhum dos animais, de ambos os grupos, durante o período em que foram observados.

Houve diferença entre os tratamentos para os animais do grupo tratado com relação a opacidade corneana até o décimo oitavo dia após os procedimentos cirúrgicos, que não se mostrou a partir deste período. Esta variável esteve presente em todos os animais do grupo tratado e do grupo controle durante o período em que foram observados (Tab.12; Fig.16). A explicação para este resultado consiste na agressão prolongada à córnea provocada pela presença da membrana amniótica preservada e na sutura das córneas, levando ao retardo na reparação e a estimulação da neovascularização. Esta permitiu a deposição de tecido de granulação e a formação de cicatriz, que foi mais densa e mais opaca neste período do que nos animais do grupo controle, onde a reparação se deu de forma avascular (Slatter, 1992; Slatter e Hakanson, 1998).

Tabela 12 – Valores médios obtidos relacionados a opacidade corneana nos animais dos grupos tratado e controle após a realização de ceratectomia superficial e implante com membrana amniótica canina.

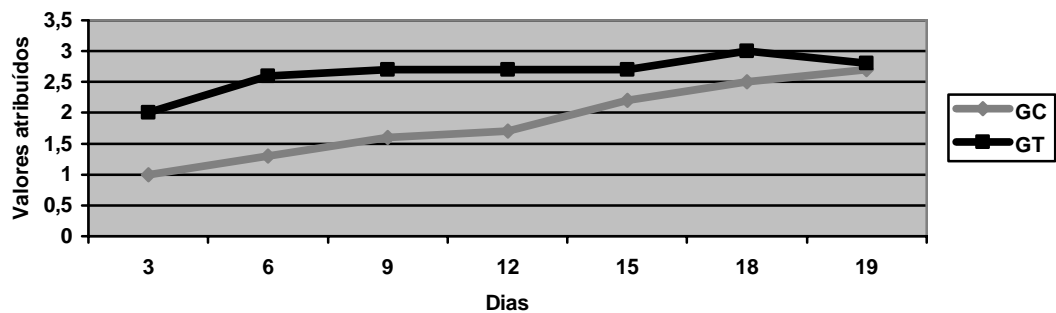
| <i>Dia</i> | <i>3</i> | <i>6</i> | <i>9</i> | <i>12</i> | <i>15</i> | <i>18</i> | <i>19</i> |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Grupo Tratado | 2,0 ^a | 2,6 ^a | 2,7 ^a | 2,7 ^a | 2,7 ^a | 3,00 ^a | 2,83 ^a |
| Grupo Controle | 1,0 ^b | 1,3 ^b | 1,6 ^b | 1,7 ^b | 2,2 ^b | 2,50 ^b | 2,67 ^a |

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

O edema da córnea foi constatado em ambos os animais dos dois grupos com período de avaliação de 1 dia (Fig. 17) e nos dois animais com período de avaliação de 2 dias, e em um animal do grupo tratado com período de avaliação de 7 dias. Destes animais, apenas o com período de avaliação de 7 dias apresentou epiteliação incompleta com característica atrófica e epitélio não aderido ao estroma, no restante

dos animais a epitelização estava ausente (Apêndices A e B). Como descrito por Slatter e Hakanson (1998), o caráter hidrofílico do colágeno e dos mucopolissacarídeos estromais influenciam a entrada de água na córnea e o epitélio atua como uma barreira contra este mecanismo. No presente trabalho, apenas os animais onde a regeneração epitelial estava ausente ou incompleta apresentaram sinal de edema estromal, confirmando a função do epitélio em proteger o estroma contra a entrada de água.

Figura 16 – Representação gráfica dos valores médios atribuídos à opacidade corneana nos animais dos grupos tratado e controle após a realização dos procedimentos cirúrgicos



Nota: em valores atribuídos 1 = Opacidade ausente (grau 0), 2 = Opacidade discreta (grau 1), 3 = Opacidade intensa (grau 2).

Das 5040 medidas histológicas das espessuras obtidas através do estudo morfométrico nos animais dos dois grupos, o grupo tratado não apresentou diferença estatística entre a área normal e lesada da córnea em nenhuma de suas camadas histológicas (tab.13) e o grupo controle apresentou diferença estatística significativa entre as áreas normal e lesada da camada estromal e da membrana de Descemet (Tab. 14).

Segundo Spencer (1996), o estroma apresenta um aumento em sua espessura quando há edema ou quando há invasão de células inflamatórias na fase inflamatória aguda (Spencer, 1996). Esta afirmação explica o fato de o valor médio ser maior no estroma da área lesada do que na área normal dos animais do grupo controle, pois os mesmos apresentaram infiltração por células inflamatórias significativa nesta área. O grupo tratado não apresentou infiltração por células inflamatórias significativa,

exceto ao redor do fio de sutura, por isso não houve a diferença estatística entre as áreas normal e lesada do estroma.

Tabela 13 - Valores médios em μm da espessura das camadas da córnea nos animais do grupo tratado após a realização dos procedimentos cirúrgicos

| | Estroma | Epitélio | Membrana de Descemet |
|-------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Área Normal | 457,5 ^a | 42,3 ^a | 21,6 ^a |
| Área Lesada | 470,0 ^a | 41,0 ^a | 20,0 ^a |

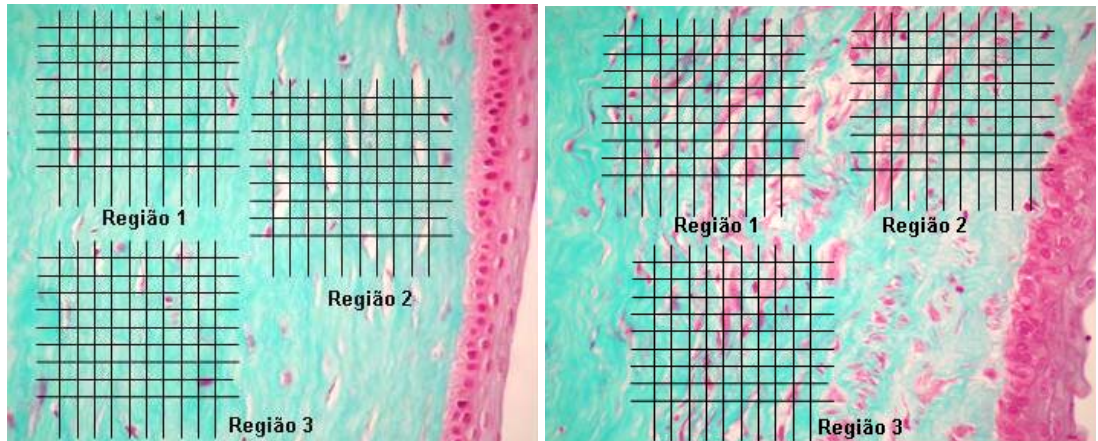
Nota: Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

Tabela 14 - Valores médios em μm da espessura das camadas da córnea nos animais do grupo controle após a realização de ceratectomia superficial.

| | Estroma | Epitélio | Membrana de Descemet |
|-------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Área Normal | 285,7 ^a | 30,0 ^a | 14,2 ^a |
| Área Lesada | 300,0 ^b | 29,0 ^a | 13,7 ^b |

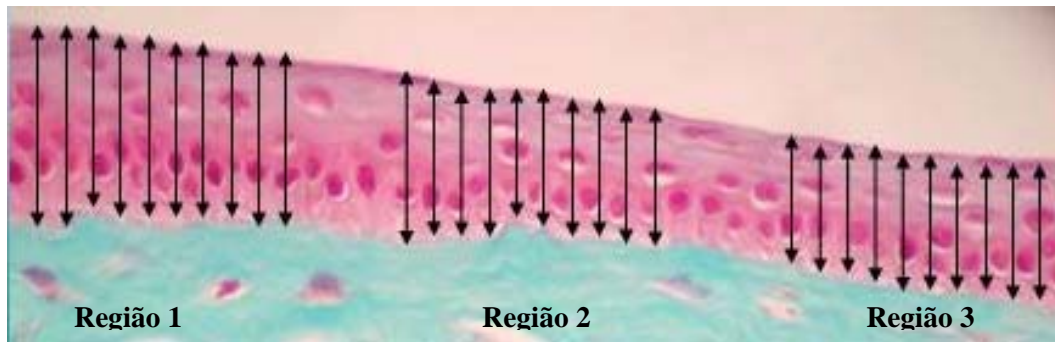
Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 5% de significância pelo teste de Wilcoxon.

A diferença estatística encontrada entre os valores médios da espessura da membrana de Descemet no grupo controle não demonstrou significado clínico. No exame histológico a membrana de Descemet de todos os animais do grupo controle e do grupo tratado apresentou-se normal, sem sinais de ruptura. Isto indica que a membrana de Descemet não foi atingida durante o procedimento cirúrgico e que a sua espessura não foi alterada pela ocorrência de edema.



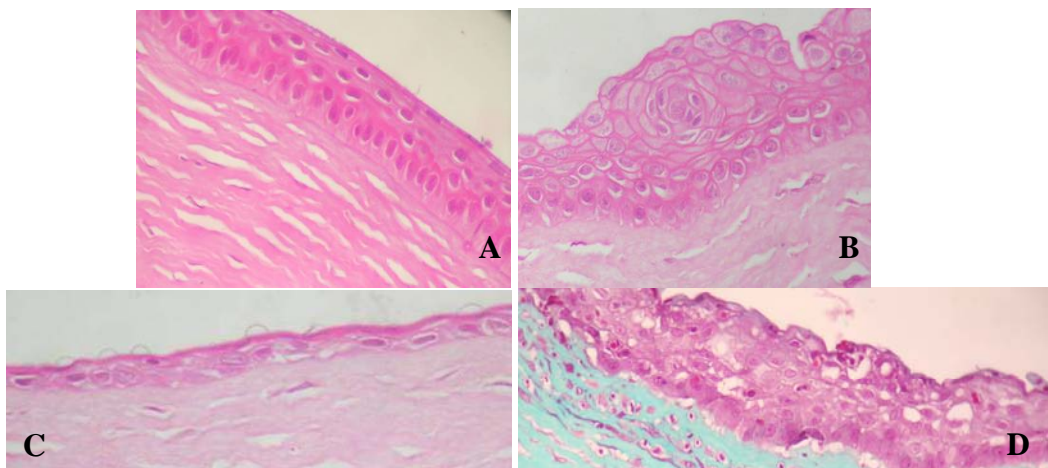
Kelly C. S. Pontes

Figura 1. Fotomicrografias da córnea de coelho do grupo tratado com 30 dias de pós-operatório exemplificando a disposição das gradículas sobre o estroma. A – Área normal; B – Área lesada. (400X – TG).



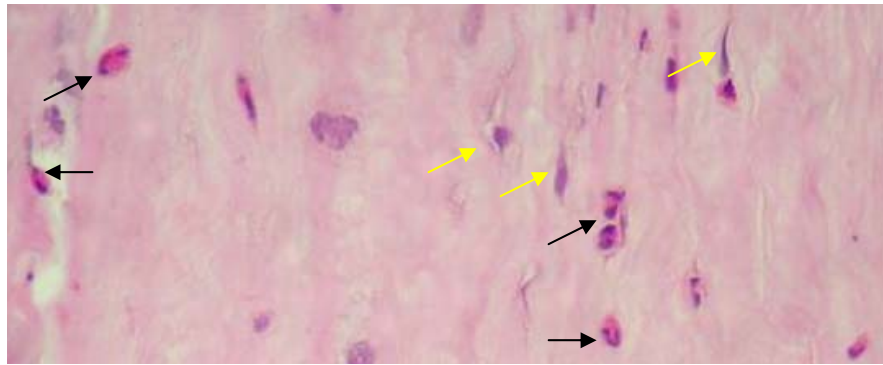
Kelly C. S. Pontes

Figura 2. Fotomicrografia da área normal de epitélio corneano de coelho exemplificando a disposição das medidas realizadas. (400X – TG).



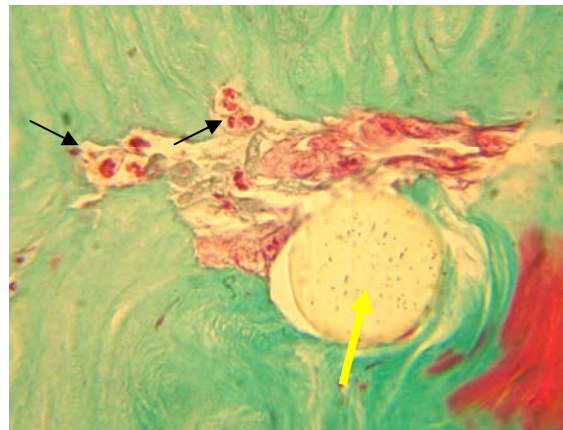
Kelly C. S. Pontes

Figura 7 – Fotomicrografias demonstrando epitélio da córnea de coelho. **A** – Epitélio normal, **B** – Acanthose epitelial, **C** – Epitélio atrófico. (HE, 400X); **D** – Epitélio vacuolizado. (TG, 400X).



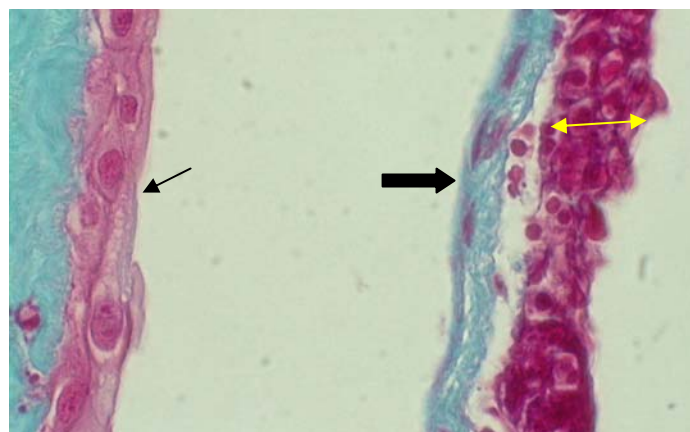
Kelly C. S. Pontes

Figura 9 – Fotomicrografia de córnea de coelho do grupo controle 24 horas após a realização de ceratectomia superficial. Nota-se a presença de ceratócitos (setas amarelas) e a infiltração de células polimorfonucleares no estroma (setas pretas) (HE, 400X).



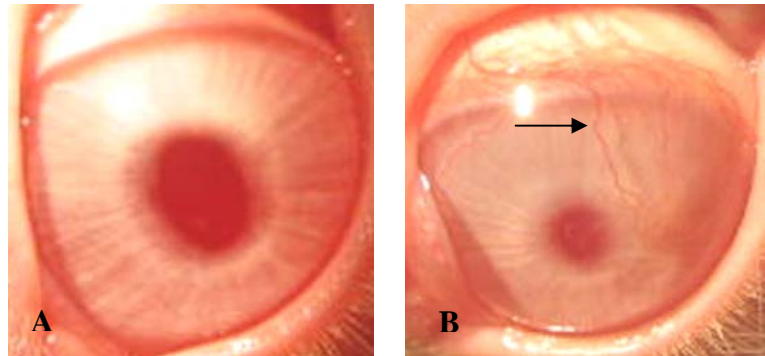
Kelly C. S. Pontes

Figura 10 – Fotomicrografia de córnea de coelho do grupo tratado 24 horas após ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina preservada. Notar a presença de células polimorfonucleares (setas pretas) próximas ao fio de sutura (seta amarela) na região estromal. (TG, 1000X).



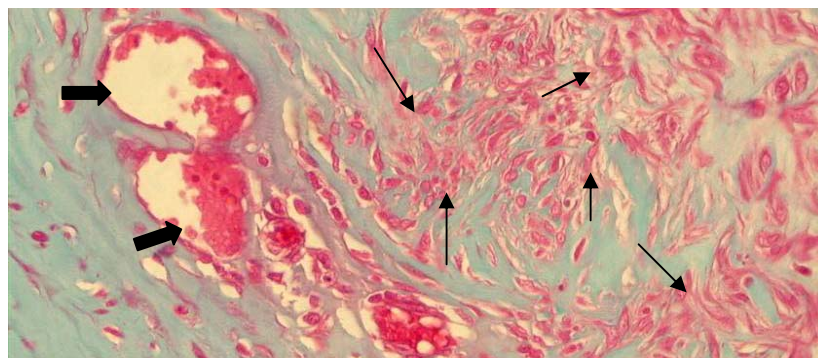
Kelly C. S. Pontes

Figura 11 – Fotomicrografia de epitélio da córnea (seta simples) e membrana amniótica (seta larga) de animal do grupo tratado. Notar a concentração de células inflamatórias sobre a membrana amniótica (seta amarela com duas cabeças). (1000X – TG).



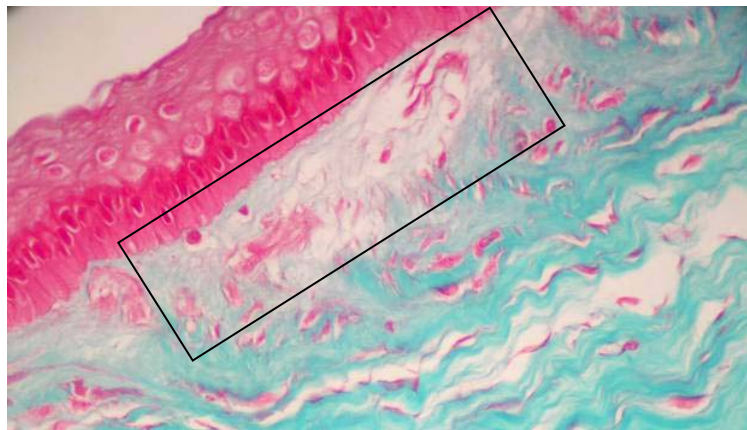
Kelly C. S. Pontes

Figura 12 – Fotografias das córneas de coelhos do grupo controle (A) e do grupo tratado (B) 30 dias após a realização dos procedimentos cirúrgicos. **A** - Córnea normal de coelho do grupo controle; **B** - Presença de neovascularização originada no limbo em direção ao centro da córnea (seta fina).



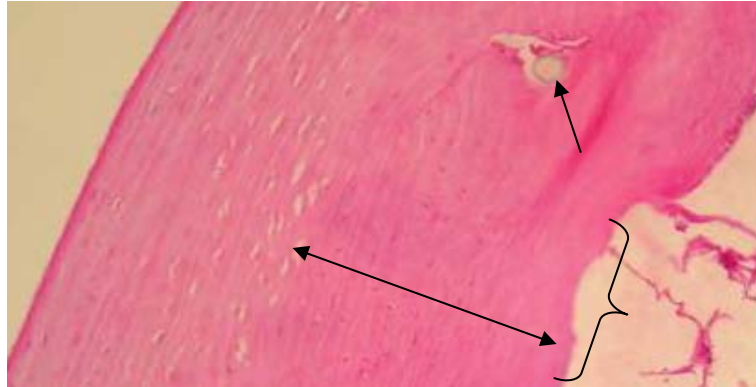
Kelly C. S. Pontes

Figura 14 - Fotomicrografia do estroma corneano de animal do grupo tratado 15 dias após realização de ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina. Nota-se a presença de neovascularização (setas largas) e a alta proliferação de fibroblastos (setas finas) (TG, 400X).



Kelly C. S. Pontes

Figura 15 – Fotomicrografia de córnea de coelho do grupo tratado 30 dias após a realização de ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina. Presença de proliferação de tecido conjuntivo fibroso (retângulo) (TG, 400X).



Kelly C. S. Pontes

Figura 17 – Fotomicrografia da córnea de coelho do grupo tratado 24 horas após a realização de ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina. Nota-se a presença de edema estromal superficial (seta com duas cabeças), do fio de sutura (seta com uma cabeça) e a ausência de epitélio (chave) (HE, 100X).

CONCLUSÕES

A epitelização da córnea após a realização de ceratectomia superficial iniciou-se mais cedo nos animais do grupo tratado, porém foi finalizada em período de tempo maior do que nos animais do grupo controle.

Até o período máximo de observação (180 dias) dos animais envolvidos neste estudo não foi notada a transparência completa das córneas estudadas.

A membrana amniótica canina preservada em glicerina a 99% utilizada como bandagem em úlceras de córneas superficiais atuou contendo as células inflamatórias em sua superfície, impedindo a invasão do estroma por estas células.

A agulha de sutura utilizada nos animais do grupo tratado traumatizou as córneas e permitiu a invasão de polimorfonucleares no estroma.

A membrana amniótica canina preservada em glicerina a 99% e a agulha de sutura utilizada para a sutura da membrana, provocaram retardo na reparação das córneas dos animais do grupo tratado perpetuando a dor, o desconforto, a congestão conjuntival e a secreção ocular. Estes fatores também levaram ao surgimento de vascularização na córnea, por levar à cronicidade do processo de reparação, com conseqüente fibrose e opacidade corneana.

Não foi observada histologicamente a incorporação da membrana amniótica canina à córnea lesada quando a mesma foi utilizada como bandagem.

A glicerina a 99% em temperatura ambiente atuou satisfatoriamente como meio de preservação da membrana amniótica canina no que diz respeito à contaminação, sendo que as características antiangiogênicas desta membrana foram perdidas.

A lupa binocular mostrou ser eficiente na realização dos procedimentos cirúrgicos envolvidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. AHERNE, W.A.; DUNNILL, M.S. Point counting and the estimation of volume fraction. In: _____. **Morphometry**. Londres: Edward Arnold Ltd., 1982, Cap.4, p.33-45.
2. ANDERSON, D.F.; ELLIES, P.; PIRES, R.T.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.85, n.5, p.567-575, 2001.
3. ANDRADE, A.L.; EUGÊNIO, F.R.; VASCONCELOS, R.O. et al. Repair of lamellar scleral lesions in dogs with preserved equine renal capsule – short report. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.67, p.169-171, 2004.
4. ANDRADE, A.L.; LAUS, J.L.; FIGUEIREDO, J. et al. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.2, p.79-82, 1999.
5. AZUARA-BLANCO, A. PILLAI, C.T.; DUA, H.S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.83, p.399-402, 1999.
6. BAHN, C.F.; GLASSMAN, R.M.; MacCALLUM, D.K. et al. Postnatal development of corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 27, n.1, p.44-51, 1986.
7. BARROS P.S.M.; GARCIA J.A.; LAUS, J.L. et al. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, p.119-123, 1998.
8. BARROS P.S.M.; SAFATLE, A.M.V.; GODOY, C.A. et al. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.3, p.189-192, 2005.
9. BARROS, P.S.M.; SAFATLE, A.M.V.; MALERBA, T.A. et al. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprosthesis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.32, n.4, p.251-255, 1995.
10. BEFANIS, P.J.; PEIFFER, R.L.; BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n.4, p.590-595, 1981.

11. BELLHORN, R.W. Laboratory animal ophthalmology. In: GELATT, K.N. Veterinary ophthalmology. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, Cap.17, p.656-679.
12. BLOGG, J.R.; DUTTON, A.G.; STANLEY, R.G. Use of third eyelid grafts to repair full-thickness defects in the cornea and sclera. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.25, n.5, p.505-512, 1989.
13. BRIGHTMAN, A.H.; McLAUGHLIN, S.A.; BROGDON, J.D. Autogenous lamellar corneal grafting in dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, n.4, p. 469-475, 1989.
14. BRUN, M.V.; PIPPI, N.L.; DRIEMEIER, D. et al. Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.147-153, jan.fev. 2004.
15. BUSSIERES, M.; KROHNE, S.G.; STILES, J. et al. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n.5, p.352-359, 2004.
16. CASSATELLA, M.A. The production of cytokines by polymorfonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v.16, p.21-26, 1995.
17. CAVASSINI, M.M.; MORAES, J.R.E.; PADILHA FILHO, J.G. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%. Estudo experimental em ratos. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.445-448, 2001.
18. CHEN, H.; PIRES, R.T.F.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, n.84, n.8, p.826-833, 2000.
19. CHIOU, A.G-Y.; FLORAKIS, G.J.; KAZIM, M. Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular surface dysfunction. **Survey of Ophthalmology**, v.43, n.1, 19-46, 1998.
20. CHIRIFE, J.; SCARMATO, G.A.; HERSZAGE, L. Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. **The Lancet**, v.1, p.560-561, 1982.

21. CORONADO Jr., G.S.; MARTINEZ, S.A.; SWENSON, C.L. Virucidal and osteogenic effects of 98% glycerol and ethylene oxide preservation of bone allograft in the cat. In: Annual Conference of Veterinary Orthopedic Society, 25, 1998, Colorado, USA. **Proceedings...** Snowmass: Veterinary Orthopedics Society. 1998, p.31.
22. DELLEVIGNE, W.; WOLFERTH, C.C.; JONES, N. et al. Cyanoacrylate monomers as an adhesive. **Archives of Surgery**, v.102, p.493-495, 1971.
23. DICE, P.F.; SEVERIN G.A.; LUMB, W.V. Experimental autogenous and homologous corneal transplantation in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.9, n.3, p.245-251, 1973.
24. DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.83, p.748-752, 1999.
25. DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey of Ophthalmology**, v.44, n.5, p.415-425, 2000.
26. DUA, H.S.; GOMES, J.A.P.; KING, A.J. et al. The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v.49, n.1, p.51-77, 2004.
27. DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. Órgãos do sentido. In: _____. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2004, Cap.9, p.318-340.
28. EHRLICH, M.I.; PHINNEY, R.B.; MONDINO, B.J. et al. Techniques of lamellar keratoplasty. **International Ophthalmology Clinics**, v.28, n.1, p.24-29, 1988.
29. ERDEY, R.A.; LINDAHL, K.J.; TEMNYCKY, G.O. et al. Techniques for application of tissue adhesive for corneal perforations. **Ophthalmic Surgery**, v.22, n.6, p.352-354, 1991.
30. ESPANA, E.M.; PRABHASAWAT, P.; GRUETERICH, M. et al. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.86, n.6, p.640-645, 2002.
31. FAIRBANKS, D.; VIEIRA, L.A.; SANTOS, W.D. et al. Membrana amniótica no tratamento dos afinamentos corneais e esclerais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, p.71-76, 2003.

32. FILGUEIRAS, R.R.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. Aloenxerto ósseo, preservado em glicerina, na reconstrução isquiopúbica após acesso ventral à cavidade pélvica de cadelas. **Revista Ceres**, v.51, n.298, p.719-728, 2004.
33. GAN, L.; FAGERBOLM, P.; KIM, H-J. Effect of leucocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.40, n.3, p.575-581, 1999.
34. GARCIA, J.A.; BARROS, P.S.M.; LAUS, J.L. et al. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, p.290-294, 1996.
35. GELATT, K.N. Doenças e cirurgia da córnea e esclera do cão. In: _____. **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2003, Cap.7, p.125-164.
36. GUM, G.G. Physiology of the eye. In: Gelatt, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, Cap.2, p.124-161.
37. GWIN, R.M.; LERNER, L.; WARREN, J.K. et al. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.22, n.2, p.267-271, 1982.
38. HACKER, D.V. Frozen corneal grafts in dogs and cats: a report on 19 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, n.4, p.387-398, 1991.
39. HAKANSON, N.; LORIMER, D.; MERIDETH, R.E. Further comments on conjunctival pedicle grafting in the treatment of corneal ulcers in the dog and cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.24, n.6, p.602-605, 1988.
40. HANSEN, P.A.; GUANDALINI, A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v.2, p.233-241, 1999.
41. HAO, Y.; MA, D.H.; HWANG, D.G. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. **Cornea**, v.19, p.348-352, 2000.

42. HUFF, R.W. Indications for tarsorrhaphy. **Modern Veterinary Practice**, v.56, n.3, p.223-226, 1975.
43. JENSEN, E.C. Experimental corneal transplantation in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.142, n.1, p.11-22, 1963.
44. JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. A pele e seus apêndices. In: _____.. 6.ed. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000, Cap.17, p.831-886.
45. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Órgãos dos sentidos. In: _____. 7.ed. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, Cap.23, p.360-373.
46. KELLER, W.F.; BLANCHARD, G.L.; KUHNS, E.L. The clinical application of homologous corneal and scleral grafts in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.9, p.265-269, 1973.
47. KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v.20, n.3, p.643-666, 1990.
48. KHODADOUST, A.A. Lamellar corneal transplantation in the rabbit. **American Journal of Ophthalmology**, v.66, n.6, p.1111-1117, 1968.
49. KIM, J.C.; TSENG, S.C.G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v.14, n.5, p.473-484, 1995.
50. KIRSHNER, S.E. Persistent corneal ulcers. What to do when ulcers won't heal. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.20, n.3, p.627-642, 1990.
51. KOIZUMI, N.; FULLWOOD, N.J.; BAIKAKTARIS, G. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Vision Science**, v.41, p.2506-2513, 2000.
52. KRAUSPENHAR, L.C. **Viabilidade bacteriana no meio de conservação glicerina 98% do tendão calcâneo comum**. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em cirurgia veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
53. KUHNS, E.L. Conjunctival path grafts for treatment of corneal lesions in dogs. **Modern Veterinary Practice**, v.60, p.301-304, 1979.

54. LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L.; ANDRADE, A.L. Emprego de escama de sardinha (*Sardinella brasilienses* – STEIDACHNER, 1859), conservada em glicerina, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.1, p.00-00, 2000.
55. LAUS, J.L.; SOUZA, M.S.B.; MORALES, A. et al. Comparação entre ceratoplastias lamelares por enxertos autógenos, livres, de córnea e pediculados de conjuntiva. Estudo experimental no cão (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n.1, p.41-46, 1996.
56. LEWIN, G.A. Repair of a full thickness corneoscleral defect in a German shepherd dog using porcine small intestinal submucosa. **Journal of Small Animal Practice**, v.40, n.7, p.340-342, 1999.
57. MATTHEWS, R.N.; FAULK, W.P.; BENNETT, J.P. A review of the role of amniotic membranes in surgical practice. **Obstetric and Gynecology Annual**, n.11, p.31-58, 1982.
58. McENTYRE, J.M. Experimental penetrating keratoplasty in the dog. **Archives Ophthalmology**, v.80, n.3, p.372-376, 1968.
59. MILLER, W.W. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.16, n.1, p.51-57, 2001.
60. MONTEIRO, E.C.L.; SCHELLINI, S.A.; MARQUES, M.E.A. et al. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.63, n.1, p.33-37, 2000.
61. MONTIANI-FERREIRA, F.; PETERSEN-JONES, S.; CASSOTIS, N. et al. Early postnatal development of central corneal thickness in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.6, n.1, p.19-22, 2003.
62. MORALES, A.; LAUS, J.L.; SOUZA, M.S.B. et al. Comparação entre enxertos autógenos livres e pediculados de conjuntiva no reparo de ceratectomias superficiais. Estudo experimental no cão (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.33, n.1, p.28-31, 1996.

63. MORANDINI, W.; ORTIZ, V. Adesivos biológicos em cirurgia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.7, n.2, p.80-85, 1992.
64. MOTA, F.C.D.; EURIDES, D.; BELETTE, M.E. Análise ultra-estrutural da túnica muscular de intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p.13-17, 2002.
65. OLLIVIER, F.; DELVERDIER, M.; REGNIER, A. Tolerance of the rabbit cornea to an n-butyl-ester cyanoacrylate adhesive (Vetbond®). **Veterinary Ophthalmology**, v.4, n.4, p.261-266, 2001.
66. PANCHBHAI, V.S.; KULKARNI, P.E. Lamellar corneal transplantation in buffalo calves – II (Heterogeneous grafts). **Indian Veterinary Journal**, v.63, n.10, p.823-826, 1986.
67. PARK, W.C.; TSENG, S.C.G. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.41, n.10, p.2906-2914, 2000.
68. PARSHALL, C.J. Lamellar corneal-scleral transposition. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.9, p.270-277, 1973.
69. PEIFFER, R.L.; GELATT, K.N.; GWIN, R.M. Transconjunctival pedicle grafts for deep corneal ulceration in the dog and cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.13, p.387-391, 1977.
70. PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter**. 1967. 36f. Tese (Livre docência) Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo.
71. PIGOSSI, N. **Implantação de dura-máter homóloga conservada em glicerina. Estudo experimental em cães**. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1964. 62p. (Tese de doutorado).
72. POONYATHALANG, A.; PREECHAWAT, P.; POMSATHIT, J. et al. Reconstruction of contracted eye socket with amniotic membrane graft. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, v.21, n.5, p.359-362, 2005.

73. PORTNOY, S.L.; INSLER, M.S.; KAUFMAN, H.E. Surgical management of corneal ulceration and perforation. **Survey of Ophthalmology**, v.34, n.1, p.47-58, 1989.
74. RICHARD, J.M.; PATON, D. A comparison of penetrating keratoplasty and lamellar keratoplasty in the surgical management of keratoconus. **American Journal of Ophthalmology**, v.86, n.6, p.807-811, 1978.
75. RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.D.; PERRONI, M.A. Esfincteroplastia anal externa experimental com membrana de peritônio bovino preservada em glicerina a 98%, em cães. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.55-60, 2000.
76. RUSIC, R.; LOCKWOOD, C.J.; LACHAPELLE, L. Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. **Journal of Clinic Endocrinology Metabolic**, v.83, p.660-666, 1998.
77. SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
78. SAMPAIO, R.L. **Avaliação histopatológica e imunohistoquímica de córneas tratadas por ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco e preservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos.** 2004. 196f. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
79. SAMPAIO, R.L. **Estudo comparativo entre o adesivo biológico de fibrina e o adesivo sintético n-butil-cianoacrilato nas ceratoplastias lamelares experimentais em cães.** 1999. 108f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
80. SAMUELSON, D.A. Ophthalmic embryology and anatomy. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, Cap.1, p.3-123.
81. SARTORI FILHO, R.; GANDOLFI, W.; BANDARRA, E.P. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação de lesões tendíneas de coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v.9, p.69-77, 1997.
82. SISTEMA de análise estatística e genética (SAEG), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa – MG, 1999.

83. SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. In: _____. 2. ed. Buenos Aires: Inter-Médica Editorial, 1992. 739 p.
84. SLATTER, D.; HAKANSON, N. Córnea e esclerótica. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998, Cap.86, p.1436-1461.
85. SOLOMON, A.; MELLER, D.; PRABHASAWAT, P. et al. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetoceles, and deep ulcers. **Ophthalmology**, v.109, p.694-703, 2002.
86. SOUZA, C.E.B.; ENGEL, D.P.; BRANCO, B.C. Avaliação da contaminação microbiana da membrana amniótica e líquido amniótico. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, 67, n.5, p.709-712, 2004.
87. SOUZA, M.S.B. **Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica**. 2003. 161f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Departamento de Cirurgia – Universidade de São Paulo - São Paulo.
88. SPENCER, W.H. Cornea. In: _____. **Ophthalmic Pathology**. 4th edition. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996, v.1, p.157-133.
89. SPREULL, J.S.A. Symposium: The corneal ulcer – I. Anatomy and physiology of the cornea of the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 7, n.3, p.253-255, 1966.
90. STANLEY, R.G.; HARDMAN, C.; JOHNSON, B.W. Results of grid keratotomy, superficial keratectomy and debridement for the management of persistent corneal erosions in 92 dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, p.233-238, 1998.
91. STAPLETON, S.; PEIFFER, R.L. Specular microscopic observation of the clinically normal canine corneal endothelium. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.12, p.1803-1804, 1979.
92. STARTUP, F.G. Corneal ulceration in dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.25, n.12, p.737-752, 1984.
93. STEVENS, A.; LOWE, J.S. Órgãos especiais dos sentidos. In: _____. **Histologia**. São Paulo: Manole, 1995, Cap.12, p.187-205.

94. SU, C-Y.; LIN, C-P. Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation: a case report. **Ophthalmic Surgery and Lasers**, v.31, n.2, p.151-154, 2000.
95. TAMHANE, A.; VAJPAYEE, R.B.; BISWAS, N.R. et al. Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns. **Ophthalmology**, v.112, p.1963-1969, 2005.
96. TRELFOED, J.D.; TRELFOED-SAUDER, M. The amnion in surgery, past and present. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.134, n.7, p.833-845, 1979.
97. WADA, S.; YOSHINARI, M.; MIZUNO, Y. Practical usefulness of a therapeutic soft contact lens for a corneal ulcer in a racehorse. **Veterinary Ophthalmology**, v.3, p.217-219, 2000.
98. WAGONER, M.D. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. **Survey of Ophthalmology**, v.41, n.4, p.275-313, 1997.
99. WHITLEY, R.D. Canine cornea. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, Cap.9, p.357-356.
100. WILCOCK, B.P. The eye and ear. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4 ed. London: Academic Press Limited, 1993, Cap.4, p.461-464.
101. WILKIE, D.A.; WHITTAKER, C. Surgery of the cornea. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v.27, n.5, p.1067-1107, 1997.
102. WOO, H-M, KIM, M.S.; KWEON, O-K. et al. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodeling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.85, n.3, p.345-349, 2001.
103. WYNN, R.M.; CORBETT, J.R. Ultrastructure of the canine placenta and amnion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.103, n.6, p.878-887, 1969.

APÊNDICES

Apêndice A – Descrição dos achados histopatológicos, nos períodos pré-determinados, das córneas dos animais do grupo tratado (GT) após realização de ceratectomia superficial e tratamento com membrana amniótica canina.

| Parâmetros | Polimorfonucleares | Fibrose | Edema | Neovascularização | Incorporação da Bandagem à Córnea | Epitelização da Córnea | Observações |
|--------------|---|---------|-------|-------------------|-----------------------------------|------------------------|--|
| 1 dia | | | | | | | |
| 1 | + ao redor do fio de sutura | - | + | - | - | - | Presença de MA não aderida ao estroma |
| 2 | + ao redor do fio de sutura e nas extremidades da lesão | - | + | - | - | - | Presença de MA não aderida ao estroma; polimorfonucleares em pequena quantidade. |

| | | | | | | | |
|---------------|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|
| 2 dias | | | | | | | |
| 3 | + ao redor do fio de sutura | - | + | - | - | Camada celular única e ausente em algumas regiões. | Epitelização sob a MA; |
| 4 | + em pouca quantidade | - | + | - | - | - | Presença de MA não aderida ao estroma |
| 7 dias | | | | | | | |
| 5 | - | - | + | - | - | Camada celular única e ausente em algumas áreas. | Células epiteliais alongadas e não aderidas ao estroma em algumas áreas. MA presente e não aderida ao epitélio. |
| 6 | - | + | - | - | - | Camada celular única com áreas não aderidas ao estroma. | Pouca proliferação de fibroblastos. |

| 15 dias | | | | | | | |
|----------------|---|----------------------------------|---|---|---|---|--|
| 7 | - | + no estroma superficial | - | - | - | Completa e acantose epitelial nas extremidades da lesão. | Epitélio atrófico no centro da lesão; proliferação de fibroblastos desarranjados no estroma superficial. |
| 8 | - | + nas áreas periféricas da lesão | - | + | - | Acantose, incompleta, ausente no centro da lesão e não aderido ao estroma no seu terço médio. | Alta proliferação de fibroblastos no estroma superficial; células epiteliais basais indefinidas. |
| 30 dias | | | | | | | |
| 9 | - | + | - | - | - | Completa e acantose epitelial. | Camada celular basal indefinida; proliferação de fibroblastos desarranjados no estroma superficial. |
| 10 | - | + | - | - | - | Completa e acantose epitelial | Áreas com camada de células basais indefinidas; proliferação de fibroblastos desorganizados. |

| | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---------------------------------|---|
| 60 dias | | | | | | | |
| 11 | - | + | - | - | - | Completa e acantose epitelial. | Camada celular basal indefinida; proliferação de fibroblastos desarranjados no estroma superficial. |
| 12 | - | + | - | - | - | Completa e acantose epithelial. | Camada celular basal indefinida; proliferação de fibroblastos desarranjados no estroma superficial. |
| 180 dias | | | | | | | |
| 13 | - | - | - | - | - | Completa | Camada celular basal indefinida. |
| 14 | - | - | - | - | - | Completa e acantose epitelial. | Camada celular basal indefinida. |

MA – Membrana amniótica; (+) Presente; (-) Ausente

Apêndice B – Descrição dos achados histopatológicos, nos períodos pré-determinados, da córneas dos animais do grupo controle (GC) após a realização de ceratectomia superficial.

| Parâmetros | Polimorfonucleares | Fibrose | Edema | Neovascularização | Epitelização | Observações |
|---------------------|---------------------------|----------------|--------------|--------------------------|---------------------|--------------------|
| Animais (GC) | | | | | | |
| 1 dia | | | | | | |
| 15 | + em grande quantidade | - | + | - | - | |
| 16 | + em grande quantidade | - | + | - | - | |
| 2 dias | | | | | | |
| 17 | + | - | + | - | - | |
| 18 | + | - | + | - | - | |

| | | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|--|
| 7 dias | | | | | | |
| 19 | + | - | - | - | Completa e com epitélio vacuolizado | Proliferação de fibroblastos e presença de polimorfonucleares no estroma superior |
| 20 | - | - | - | - | Completa e com epitélio vacuolizado | |
| 15 dias | | | | | | |
| 21 | - | + | - | - | Completo com camada celular única; acantose nas extremidades da lesão | Fibrose e proliferação de fibroblastos no estroma superior |
| 22 | - | + | - | - | Completo com camada celular única | Fibrose e proliferação de fibroblastos no estroma superior |
| 30 dias | | | | | | |
| 23 | - | + | - | - | Completa e irregular | Pouca fibrose em estroma superior |
| 24 | - | + | - | - | Completa com áreas acantóticas e áreas delgadas | Células da membrana basal indefinidas; fibrose em estroma superior com desorganização de colágeno e proliferação de fibroblastos |

| | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|-------------------------------------|--|
| 60 dias | | | | | | |
| 25 | - | + | - | - | Acantose epitelial | Pequena região estromal superficial com fibrose; camada celular basal bem definida, mas desorganizada. |
| 26 | - | - | - | - | Completa | Estroma com pouca desorganização de fibroblastos e colágeno. |
| 180 dias | | | | | | |
| 27 | - | - | - | - | Completa com acantose não acentuada | |
| 28 | - | - | - | - | Completa com acantose não acentuada | |

(+) Presente; (-) Ausente