

**KELLY CRISTINE DE SOUSA PONTES**

**MEMBRANA AMNIÓTICA XENÓGENA, ASSOCIADA OU NÃO AO N-BUTIL  
2-CIANOACRILATO, NO TRATAMENTO DE LESÃO CORNEAL  
PERFURADA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**KELLY CRISTINE DE SOUSA PONTES**

**MEMBRANA AMNIÓTICA XENÓGENA, ASSOCIADA OU NÃO AO N-BUTIL  
2-CIANOACRILATO, NO TRATAMENTO DE LESÃO CORNEAL  
PERFURADA. ESTUDO EXPERIMENTAL 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 01 de junho de 2010.

---

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

---

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo  
(Co-orientador)

---

Prof. Lissandro Gonçalves Conceição

---

Prof. André Lacerda de Abreu Oliveira

---

Prof<sup>ª</sup> Andréa Pacheco Batista Borges  
(Orientadora)

*Dedico esta tese ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Que ela possa conduzir os alunos desta Universidade e ser apenas o princípio de muitos outros trabalhos que, futuramente, possam ser desenvolvidos nesta área.*

## AGRADECIMENTOS

Aos animais, meu eterno agradecimento.

À Deus por fazer-me parte Dele.

Aos meus pais, Francisca e Edmilsom, por ajudarem na minha formação profissional e terem papel fundamental no desenvolvimento de meu caráter. Quero ser simples assim como vocês, sempre.

À minha amiga e orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrea que sempre acreditou e confiou em minha capacidade.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de permitir-me fazer parte de sua história.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

À Ophthalmos Indústria Farmacêutica Ltda. pelo apoio concedido. Em especial aos senhores Acácio e Cássio por terem acreditado na pesquisa e por toda a atenção atribuída.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante esses meses.

À UNESP Jaboticabal, em especial ao Prof. Dr. Laus pela co-orientação e por ter me recebido tão. Agradeço ao profissionalismo, à simplicidade e aos ensinamentos.

Ao laboratório PREVENT, em especial ao Dr. José do Carmo pela atenção e colaboração.

À Vânia do laboratório PREVENT que, além de ser uma excelente profissional e colaborar na confecção das lâminas histológicas, transformou-se em uma grande amiga. Meus sinceros agradecimentos a toda atenção, carinho e paciência.

Ao Prof. Dr. Ricardo por tudo que fez por mim durante esses anos, pelo respeito e pelo carinho.

Ao laboratório de microbiologia no BIOAGRO, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Catarina, pela colaboração com a microscopia de polarização.

À amiga e companheira de sempre Tatiana. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando nos momentos importantes da minha vida. Você me incentivou a chegar até aqui.

À Lukiya e ao Evandro por todo apoio na estatística, pela amizade e pela alegria.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina pelo incentivo, amizade e alegria de sempre. Obrigada por me apressar. Foi bom para mim.

Ao Prof. Dr. Lissandro pelo respeito e credibilidade em meu trabalho.

Aos ilustres estagiários Daniel, Ana Carolina, Rodrigo, Priscila e Natália por toda paciência comigo e todo carinho com as “meninas”. Vocês foram essenciais.

Ao amigo Renato pela grande colaboração em todos os momentos do desenvolvimento do trabalho. Você realmente “esteve” neste experimento.

Ao grande Pablo pela amizade e colaboração com a edição fotográfica.

À amiga Emily pelo apoio e por ser minha confidente nos momentos de impaciência.

Aos amigos da pós-graduação Liana, Betânia, Jair, Laila, João Paulo, Simone, Fabrício, Marcus, Gabriel, Moacir e Fábio por terem feito parte dos meus dias e me feito sorrir durante a rotina.

Aos alunos de graduação e do Curso de Especialização que me acompanharam nessa jornada. Em especial àqueles que participaram do grupo de estudo de oftalmologia na hora do almoço. Vocês me incentivaram a continuar.

Aos alunos do Curso de Especialização em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais pela paciência e pelas perguntas que me forçaram a estudar cada vez mais.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, em especial ao Luiz Carlos e a Maninha por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Rosi por ser uma funcionária exemplar e por sempre saber a resposta para o que estamos procurando. Igual nunca vai existir.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida pelos esclarecimentos na microbiologia.

Ao querido amigo Prof. Dr. Gonzaga pelos ensinamentos durante minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Dantas aos ensinamentos e estímulos para que eu conseguisse sempre o melhor profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Cláudio pelo apoio e esclarecimentos.

Ao Prof. Dr. Patarroyo pela credibilidade e incentivo de sempre.

Aos amigos Richard e Fernanda pelas palavras de apoio e por todo incentivo.

Aos queridos amigos Fabiana e Mário pelos momentos maravilhosos e engraçadíssimos.

Ao Prof. Dr. Jackson, coordenador do Programa de Pós-Graduação pelos esclarecimentos, pelo apoio e pela amizade.

Ao amigo Abelardo. Sei que sempre poderei contar com você.

Ao amigo Róberson pela torcida, mesmo distante.

À toda a minha família pela compreensão de ter que ficar distante por muito tempo e perto por pouco. Amo todos vocês.

A todos os amigos da ACEAK.

Às pequenas e eternas amigas Kate, Sade e Beatriz que viveram minha ausência muitas vezes sem dar trabalho e à querida Cindy por estar em meu coração.

À todos que tenham me faltado à memória agora, mas que de alguma forma participaram deste trabalho e estarão sempre em meu coração. Muito obrigada.

## **BIOGRAFIA**

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

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

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 Técnicas Cirúrgicas e Anestésicas Aplicadas aos Animais, junto ao Departamento de Veterinária, nesta mesma instituição, adquirindo o título de mestre em Fevereiro de 2007.

Em Março de 2007, deu continuidade ao curso de pós-graduação ingressando no curso de Doutorado em Medicina Veterinária, na mesma área e instituição.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Córnea – Morfologia e Fisiologia.....	3
Fibras Colágenas.....	7
Causas de Úlceras de Córnea e Processo de Reparação.....	8
Membrana Amniótica.....	17
Adesivos em Cirurgia.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Obtenção e Preparo da Membrana Amniótica.....	28
Avaliação Microbiológica da Membrana Amniótica.....	29
Grupos Experimentais.....	29
Técnica Anestésica e Cirúrgica.....	30
Protocolo de Avaliação.....	36
Avaliação Clínico-oftalmológica.....	36
Avaliação Histopatológica.....	37
Avaliação Histomorfométrica.....	38
Avaliação à Estatística.....	39
RESULTADOS.....	39
Avaliação Clínico-oftalmológica.....	39
Tempo de Operação.....	39
Tempo de permanência do n-butil 2-cianoacrilato nas córneas.....	39
Tempo de permanência da sutura no G4.....	40
Fotofobia e blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival e quemose	40
Teste do tingimento pela fluoresceína.....	42
Pigmentação, vascularização e edema corneal.....	42
Sinéquias, opacidade na cápsula anterior da lente.....	44

Achados à Histopatologia.....	44
Epitélio.....	44
Membrana amniótica.....	48
Estroma.....	49
Achados à Histomorfometria.....	52
Fibroblastos.....	52
Epitélio e estroma.....	53
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXO.....	75

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Fórmula estrutural química do n-butil-2-cianoacrilato.	25
Figura 2. Imagens fotográficas ilustrando o preparo da membrana amniótica bovina.	28
Figura 3. Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G1.	31
Figura 4. Imagens fotográficas ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G1.	32
Figura 5. Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G2.	32
Figura 6. Imagens fotográficas ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G2.	33
Figura 7. Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G3.	34
Figura 8. Imagem fotográfica ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G3.	34
Figura 9. Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G4.	35
Figura 10. Imagens fotográficas ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G4	35
Figura 11. Imagem fotográfica de córnea de coelho do G1 10 dias após a realização de ceratectomia penetrante e aplicação de n-butil 2-cianoacrilato.	45

Figura 12.	Fotomicrografias da córnea de coelho do G2, 15 dias após a cirurgia.	47
Figura 13.	Fotomicrografia de córnea de coelho do G3, 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico.	48
Figura 14.	Fotomicrografias do estroma lesado das córneas de coelhos, 15 dias após a realização do procedimento cirúrgico.	50
Figura 15.	Fotomicrografias do estroma lesado das córneas de coelhos, 21 dias após a realização do procedimento cirúrgico.	50
Figura 16.	Fotomicrografias do estroma lesado das córneas de coelhos, 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico.	51
Figura 17.	Fotomicrografias da área lesada de córnea de coelho do G2, 21 dias após a realização do procedimento cirúrgico.	52

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
Tabela 1.	Médias observadas para o tempo de operação, em minutos, em relação aos grupos de coelhos.	40
Tabela 2.	Médias observadas para os dias de permanência da sutura no G4 em relação aos subgrupos.	41
Tabela 3.	Medianas de dias em que foram observados fotofobia e blefarospasmo em coelhos após o tratamento cirúrgico instituído aos respectivos grupos em relação aos subgrupos.	41
Tabela 4.	Medianas de dias em que foi observada a positividade ao teste do tingimento pela fluoresceína em coelhos após o tratamento cirúrgico instituído aos respectivos grupos em relação aos subgrupos.	43
Tabela 5.	Medianas de dias em que foi observado o edema de córnea em coelhos após o tratamento cirúrgico instituído aos respectivos grupos.	43
Tabela 6.	Medianas de dias em que foi observado edema de córnea em coelhos após o tratamento cirúrgico instituído aos respectivos grupos em relação aos subgrupos.	44
Tabela 7.	Medianas de dias em que foi observada a opacidade da cápsula anterior da lente de coelhos após o tratamento cirúrgico instituído aos respectivos grupos.	45
Tabela 8.	Medianas de dias em que foi observada a opacidade da cápsula anterior da lente de coelhos após o tratamento cirúrgico instituído aos respectivos grupos em relação aos subgrupos.	46
Tabela 9.	Número de animais por grupo que, histologicamente, demonstrou epitelização da córnea presente e incompleta em cada período de observação.	45

Tabela 10.	Número de animais que apresentou células inflamatórias no estroma da área lesada ou perilesional, em cada grupo.	49
Tabela 11.	Médias e desvio padrão do número de fibroblastos, quantificados pela histomorfometria, presente no estroma lesado de cada grupo.	53
Tabela 12.	Médias e desvio padrão do número de fibroblastos, quantificados pela histomorfometria, presente no estroma lesado de cada grupo em relação aos subgrupos.	54
Tabela 13.	Médias e desvio padrão da espessura, em micrômetros, do estroma e do epitélio corneal lesados de cada grupo, mensurados pela histomorfometria.	55
Tabela 14.	Médias e desvio padrão da espessura, em micrômetros, do epitélio corneal lesado e normal de cada grupo, mensurados pela histomorfometria.	56
Tabela 15.	Médias e desvio padrão da espessura do epitélio corneal lesado, em micrômetros, mensurados pela histomorfometria, em relação aos subgrupos.	57
Tabela 16.	Médias e desvio padrão da espessura do estroma corneal lesado, em micrômetros, mensurados pela histomorfometria, em relação aos subgrupos.	58

## RESUMO

PONTES, Kelly Cristine de Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2010. **Membrana amniótica xenógena, associada ou não ao n-butil 2-cianoacrilato, no tratamento de lesão corneal perfurada. Estudo experimental em coelhos.** Orientadora: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-orientadores: Brunna Patrícia Almeida da Fonseca, José Luiz Laus, Paulo Renato dos Santos Costa e Ricardo Junqueira Del Carlo.

As pesquisas envolvendo o uso de adesivos cirúrgicos na terapia de lesões penetrantes na córnea são amplas e demonstram sua eficiência na manutenção da integridade ocular e a reação inflamatória causada pelo seu uso. Os vários estudos envolvendo a membrana amniótica denotam suas propriedades favoráveis à epitelização e à sua ação anti-inflamatória. Diante das observações, compararam-se técnicas cirúrgicas e os efeitos do n-butil 2-cianoacrilato e da membrana amniótica bovina, conservada em glicerina 99% em temperatura ambiente, visando propor técnica para reparação de lesões de córneas perfuradas. Para tanto, foram feitas ceratectomias penetrantes nas córneas de 60 coelhos distribuídos em quatro grupos de número igual. O grupo 1 foi tratado com aplicação de n-butil 2-cianoacrilato sobre a lesão; o grupo 2 com aplicação da membrana amniótica sob a córnea lesada e de n-butil 2-cianoacrilato sobre a lesão; o grupo 3 recebeu o mesmo tratamento instituído ao grupo 2, adicionando-se recobrimento com bandagem de membrana amniótica suturada ao limbo e, o grupo 4 foi tratado por ceratoplastia com membrana amniótica e recobrimento com bandagem constituída de membrana idêntica, suturada ao limbo. Foi feita avaliação oftálmica diariamente para verificar os parâmetros relacionados à condição corneal, câmara anterior e lente, além da epitelização da córnea e do tempo de permanência do adesivo. Histopatologia e histomorfometria foram feitas aos 2, 7, 15, 21 e 30 dias após a realização da cirurgia avaliando-se o grau de epitelização da córnea, a presença de leucócitos, edema, vasos, fibroblastos, além das espessuras do epitélio e do estroma. Foram observados fotofobia e blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival e quemose com atenuamento aos sete dias da cirurgia. Houve a formação de sinéquia anterior em dois animais do G1. Edema de córnea estava presente na área perilesional, em todos os grupos. Opacidade do cristalino foi visibilizada no G1, G2 e G3. A membrana no G2 e G3 atuou como barreira ao extravasamento do humor aquoso mantendo a superfície seca para a aplicação do adesivo, impediu o seu contato com as

estruturas intraoculares e, associada ao adesivo, acelerou a reparação da lesão. A técnica cirúrgica utilizando a membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato foi de mais fácil execução e mais eficiente na reparação de lesões de córneas perfuradas do que as técnicas utilizando somente o adesivo ou somente a membrana amniótica suturada à córnea. Assim, a associação da membrana com o adesivo pode ser indicada neste tipo de lesão.

## ABSTRACT

PONTES, Kelly Cristine de Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2010.

**Xenogeneic amniotic membrane associated or not to N-butyl 2-cyanoacrylate in the treatment of corneal perforations. Experimental study in rabbits.**

Advisor: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-advisors: Brunna Patrícia Almeida da Fonseca, José Luiz Laus, Paulo Renato dos Santos Costa and Ricardo Junqueira Del Carlo.

Researchs on surgical adhesives for the treatment of corneal perforations are many and show its effectiveness on maintaining ocular integrity and restraining inflammatory reaction. They show the adhesive`s properties favoring epithelization and its anti-inflammatory action. Thus, we compared the surgical techniques and the effects of N-butyl 2-cyanoacrylate and the bovine amniotic membrane (previously preserved in 99% glycerin under room temperature), aiming to offer technique for the repair of corneal perforations. For such, perforating keratectomies were made on the corneas of 60 rabbits equally divided in 4 groups. Group 1 (G1) was treated using N-butyl 2-cyanoacrylate applied on the lesions; group 2 (G2) received the amniotic membrane over the lesions and then the N-butyl 2-cyanoacrylate; in group 3 (G3), the same procedure as in group 2 was made, with additional coating with a amniotic membrane as a patch sutured to the corneal limbus; while group 4 (G4) was treated with keratoplasty with amniotic membrane covered by the same membrane patch, sutured to the corneal limbus. Daily ophthalmic examinations were made to verify parameters related to corneal, anterior chamber and lens condition, as well as corneal epithelization and the time during which the adhesive remained in place. Histopathology and histomorphometry were made at 2, 7, 15, 21 and 30 days post-operation (PO) for: the degree of corneal epithelization, leukocytes and fibroblasts presence, vessels presence, edema, and thickness of the epithelium and the stroma. Photophobia, blefarospasm, ocular discharge, conjunctival hyperemia and chemosis were observed, decreasing at 7 days PO. Anterior synechia occurred in 2 animals in G1. Corneal edema occurred in the perilesional area in all groups. Lens opacity was observed in G1, G2, and G3. In G2 and G3, the membrane acted as a barrier to the aqueous humour, keeping a dry surface to the application of the adhesive as well as preventing its contact with the intraocular structures and, when associated to the adhesive, it favored the repair process. The surgical technique associating the amniotic membrane to the N-butyl 2-cyanoacrylate

was the easiest procedure to be implemented and more effective on the repair of perforated corneas in comparison to both the ones using only the adhesive or the membrane. Therefore, the association of the membrane to the adhesive can be indicated in the treatment of 2mm corneal perforations.

## INTRODUÇÃO

A perfuração da córnea é uma emergência ocular que, dentre outros fatores, pode ser induzida por infecção e traumas físicos ou químicos. As consequências podem ser a formação de sinéquias, glaucoma, catarata e endoftalmite. Preconiza-se o fechamento rápido da lesão, a fim de se evitar o desenvolvimento de complicações. Os métodos de tratamento para as lesões envolvendo a córnea, em toda a sua espessura, são os *flaps* conjuntivais, os enxertos, a ceratoplastia penetrante, a utilização de lentes de contato e de adesivos, sendo que cada um deles apresenta vantagens e desvantagens (Su e Lin, 2000).

A sutura direta de perfurações na córnea com menos de 3 mm de diâmetro é recomendada, mas não é tão vantajosa como os enxertos, pelo astigmatismo que produzem (Wilkie e Whittaker, 1997).

Os adesivos sintéticos surgiram como alternativa de tratamento e vários estudos foram realizados com o cianoacrilato (Ollivier et al., 2001). As indicações para a sua utilização em oftalmologia incluem as úlceras de córnea penetrantes menores do que 1,5mm de diâmetro, as descemetoceltes, as úlceras estromais profundas e as úlceras indolentes (Kern, 1990; Zigelbaum et al., 1999). O adesivo protege a córnea, possui propriedades antimicrobianas e promove uma barreira contra microrganismos (Whitley, 1991). São utilizados em oftalmologia com o objetivo de manter a integridade ocular, isolando o conteúdo intraocular do meio extraocular, prevenindo assim, o desenvolvimento de endoftalmite e de outras complicações como a catarata e o glaucoma (Felberg et al., 2003). Todavia, os derivados do cianoacrilato podem induzir à reação inflamatória, vascularização corneal, reação do tipo corpo estranho e necrose tecidual (Refojo et al., 1971)

Membranas biológicas vêm sendo estudadas na cirurgia oftálmica reconstrutiva. Já foram pesquisados implantes de membranas autógenas, alógenas e xenógenas, na tentativa de se reconstruírem superfícies oculares após traumas, com resultados satisfatórios. Dentre as diversas membranas, a amniótica tem proporcionado excelentes resultados (Cremonini et al., 2007; Kim et al., 2009).

O epitélio da membrana amniótica possui funções especializadas, dentre as quais se destacam efeito antiadesivo, propriedades bacteriostáticas, proteção da lesão, redução da dor, efeito na epitelização e nenhuma antigenicidade (Azuara-Blanco et al., 1999).

Em humanos, Su e Lin (2000) relataram um caso onde foram utilizados o cianoacrilato e a membrana amniótica na reparação de lesão de córnea penetrante causada por álcali. A membrana amniótica foi posicionada sob a perfuração da córnea, prevenindo a aplicação direta do cianoacrilato na íris ou no cristalino, funcionando como uma barreira contra o extravasamento do humor aquoso, mantendo a face da úlcera seca para a posterior aplicação do cianoacrilato e desempenhando o papel de ponte para a migração de células epiteliais sobre a ferida.

Este trabalho foi desenvolvido baseando-se nos conceitos estabelecidos de que o adesivo é eficiente em perfurações da córnea podendo causar reação inflamatória e de que a membrana amniótica, em camada única, não é eficiente neste tipo de lesão, mas que possui ação anti-inflamatória e atua na epitelização. Diante destas observações, imaginou-se que a associação da membrana amniótica com o n-butil 2-cianoacrilato poderia atuar na reparação de lesões perfuradas da córnea.

Utilizando-se a clínica e a histologia convencional, além da histomorfometria, objetivaram-se com o desenvolvimento deste trabalho, compararem-se os efeitos do n-butil 2-cianoacrilato, da membrana amniótica bovina conservada em glicerina 99% em temperatura ambiente e, do n-butil 2-cianoacrilato associado à membrana amniótica bovina conservada nas mesmas condições, na reparação de lesões penetrantes experimentais da córnea de coelhos.

Neste contexto, objetivou-se com a avaliação clínico-oftalmológica, comparar entre os grupos a ocorrência ou não da fotofobia, do blefarospasmo, da secreção ocular, da hiperemia conjuntival, da quemose, da pigmentação, vascularização e edema na córnea, além da formação de sinéquias, opacidade na cápsula anterior da lente e da positividade ao teste do tingimento pela fluoresceína. Os objetivos foram ainda, compararem o tempo de permanência do adesivo e o tempo necessário para a realização de cada procedimento cirúrgico, caracterizando o seu grau de dificuldade.

Os objetivos ao utilizarem-se a histopatologia e a histomorfometria foram compararem-se entre os grupos os momentos de início e de conclusão do processo de epitelização, a incorporação da membrana amniótica à córnea, os tipos celulares e de

colágenos encontrados no estroma e, ainda, verificarem-se as espessuras do epitélio e do estroma.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Córnea – Morfologia e Fisiologia**

O bulbo do olho 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 do olho. 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. Fornece um microambiente favorável para abrigar tais células, beneficiando 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 bulbo do olho nos cães e um quarto nos coelhos, sendo que o seu raio de curvatura é maior do que o do restante do bulbo (Startup, 1984; Samuelson, 1991). 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 Dietrich, 2007), 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 morfológicos 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 intraoculares 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 do filme lacrimal, 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, a córnea dos animais 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; Gelatt, 2003; Slatter e Dietrich, 2007). Alguns autores consideram o filme lacrimal como uma quinta camada (Maggs, 2008). 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).

O epitélio corneal é composto por células pavimentosas estratificadas simples, não queratinizadas, fixadas à sua membrana basal (Startup, 1984; Slatter e Dietrich, 2007) 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 (Maggs, 2008). As células basais migram gradualmente para a camada mais superficial da córnea e, passadas 1 ou 2 semanas, elas são descamadas do epitélio. As células epiteliais diferenciadas, situadas na camada mais superficial, formam uma junção firme e sólida que funciona como uma barreira (Imanishi et al., 2000).

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 da córnea (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 glicosaminoglicanos e proteoglicanos que são sintetizados pelos ceratócitos. Os ceratócitos são células fixas que contribuem para a formação e manutenção das lamelas. Diferem, em sua forma, dos fibroblastos da pele, por serem poligonais e possuírem prolongamentos citoplasmáticos que mantêm as células unidas. Entre as lamelas são ocasionalmente encontrados linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Samuelson, 1991; Meek e Boote, 2004; Slatter e Dietrich, 2007; Maggs, 2008). Nos ceratócitos, foram encontrados heterodímeros que atuam como receptores de colágeno do tipo I e de fibronectina (Fini, 1999).

Quatorze tipos de colágenos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XII, XIII, XIV, XVII e XVIII) foram descritos em córneas de vertebrados. O colágeno tipo I é o mais abundante no estroma e corresponde a 75% do total. O tipo V e o VI também estão presentes nesta camada da córnea nas proporções de 2% e 17%, respectivamente. O colágeno do tipo III é encontrado em pequenas proporções no estroma normal, mas durante a reparação de lesões, na presença de inflamação e enfermidades oculares graves, sua concentração é aumentada (Michelacci, 2003).

Cintron et al. (1988) demonstraram que o colágeno tipo III é sintetizado pelas células endoteliais de córneas de fetos e coelhos neonatos. Afirmaram ainda, que este colágeno é sintetizado pelas células endoteliais e depositado na membrana de Descemet em desenvolvimento e na porção posterior do tecido neoformado durante o processo de reparação. Os resultados do mesmo trabalho sugeriram que os colágenos do tipo I, V e VI são sintetizados por fibroblastos derivados do estroma com mínima contribuição das células endoteliais.

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 aumente

com a sua idade (Samuelson, 1991; Slatter e Dietrich, 2007; Maggs, 2008). Segundo Startup (1984), esta membrana seria incapaz de se regenerar, mas Maggs (2008) afirma que em pequenas lesões penetrantes da córnea, as células endoteliais produzem uma nova membrana de Descemet.

O endotélio, ou epitélio posterior, é composto por uma camada simples de células pavimentosas 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; Stevens e Lowe, 1995; Slatter e Dietrich, 2007; Maggs, 2008). As células endoteliais impedem a opacificação da córnea através da regulação da sua hidratação por bombeamento de fluido do estroma corneal (Stevens e Lowe, 1995; Joyce, 2003). A sua capacidade regenerativa pode variar com a idade e a espécie animal (Samuelson, 1991). As células endoteliais da córnea, após a formação de camada única, param de se proliferar. Análise por eletromicrografia de transmissão sugere que a proliferação cessa após o contato entre as células. Sua reparação acontece principalmente por ampliação do tamanho celular e por migração, embora uma pequena proliferação por mitose possa ocorrer. Assim, a perda excessiva de células endoteliais, sem replicação para restaurar a densidade celular, pode fazer com que o endotélio não atue de maneira eficaz como barreira contra a entrada de fluido no estroma, levando à perda da acuidade visual (Joyce, 2003). O número de células endoteliais diminui com a idade e, na ocorrência de trauma corneal, o endotélio continua a perder células em uma velocidade mais rápida do que o normal, resultando em disfunção endotelial, anos após a ocorrência do trauma (Joyce, 2003).

O filme lacrimal está presente sobre a córnea e a conjuntiva. Ele é constituído por três camadas diferentes. A camada superficial externa, composta por fosfolípidios, 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; Maggs, 2008). 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). A inervação da córnea desempenha papel importante na transmissão sensorial, assim como na manutenção da viabilidade das células epiteliais. Os distúrbios do epitélio acontecem frequentemente nos casos de paralisia do ramo do nervo trigêmeo, o que caracteriza a ceratite parálitica (Imanishi et al., 2000).

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; Maggs, 2008). Alguns fatores podem interferir no estado de hidratação da córnea. A integridade do epitélio e do endotélio corneal 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 colágeno pelo seu estiramento (Gum, 1991; Maggs, 2008).

### **Fibras Colágenas**

Os colágenos são as maiores proteínas que constituem a matriz extracelular. O sistema colágeno é formado por muitos tipos de colágenos distintos geneticamente que ocorrem em diferentes tecidos conjuntivos (Michelacci, 2003). As fibras colágenas são flexíveis e possuem grande força tênsil. Ao microscópio óptico, tais fibras têm a aparência típica de estruturas ondeadas de largura variável e comprimento indeterminado. Pela microscopia eletrônica, observa-se que a fibra colágena é constituída por um feixe de subunidades finas e filamentosas, as fibrilas de colágenos, que possuem diâmetro relativamente uniforme. Entretanto, as fibrilas de colágeno, em diferentes localizações e estágios de desenvolvimento, apresentam diferenças de

tamanho. Em tecidos em desenvolvimento ou imaturos são delgadas, enquanto em tecido conjuntivo denso modelado são espessas (Ross et al., 1993).

A molécula de colágeno é constituída por três cadeias polipeptídicas, chamadas cadeias alfa, produzidas pelo retículo endoplasmático rugoso e dispostas em uma tríplice hélice. Essas cadeias não são todas idênticas e, de acordo com suas diferenças, são descritos vários tipos diferentes de colágeno (Ross et al., 1993; Michelacci, 2003).

O colágeno mais abundante no estroma é o tipo I e, juntamente com o colágeno tipo III, é o de maior interesse neste estudo. O tipo I possui as moléculas organizadas em duas cadeias alfa 1 (I) e uma cadeia alfa 2 (II) e propicia resistência à tensão, força e estiramento. O colágeno tipo III possui as moléculas organizadas em três cadeias idênticas, alfa 1 (III) e propicia sustentação e atuam como barreira de filtração (Ross et al., 1993; Michelacci, 2003).

As técnicas histoquímicas, em especial o método do *Picrus Sirius Red* sob luz polarizada, têm contribuído para a compreensão da fisiologia e dos processos patológicos relacionados ao sistema colágeno. Este método permite a identificação de alguns tipos de colágenos em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (Montes, 1996).

Os colágenos de tipo I e III apresentam interferências de cores e intensidades de birrefringências desiguais na mesma secção tecidual, porque diferentes colágenos intersticiais apresentam padrões variados de agregação física. O tipo I forma fibras espessas e apresenta intensa birrefringência que vai da cor amarela a vermelha. Em contrapartida, o colágeno tipo III forma fibras finas apresentando fraca birrefringência que, sob luz polarizada, é visível em cor verde (Montes, 1996).

### **Causas de Úlceras de Córnea e Processo de Reparação**

As úlceras de córnea podem ter como causa traumas físicos ou químicos, agentes infecciosos, aumento na pressão intra-ocular e, raramente, alterações metabólicas (Slatter e Dietrich, 2007), destacando-se a deficiência de vitamina A que afeta filhotes mal nutridos (Startup, 1984). Também são citadas as alterações imunomediadas e as ceratopatias senis como causas de úlceras de córnea (Whitley, 1991). Dentre os traumas físicos, podem-se citar os agentes externos, as anormalidades palpebrais, ciliares e

lacrimais (Slatter e Dietrich, 2007). A deficiência ou lesão no ramo oftálmico do nervo trigêmeo reduz a sensibilidade da córnea e resulta em degeneração epitelial, causando as úlceras neurotróficas (Startup, 1984).

A córnea intacta é muito resistente a infecções, mas uma quebra na barreira epitelial permite a entrada de microrganismos podendo predispô-la à ulceração. Muitas bactérias têm sido isoladas de córneas ulceradas, incluindo *Streptococcus haemolytic*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas spp.*, *Moraxella*, *Proteus*, *Micrococcus* e *Echerichia coli*. Dentre os fungos isolados estão a *Cândida* e o *Aspergillus*. O vírus da hepatite canina invade a córnea através do humor aquoso causando úlcera corneal (Slatter e Dietrich, 2007) e o da cinomose pode levar a ulceração na córnea por causar ceratoconjuntivite seca com infecção bacteriana secundária (Startup, 1984).

A reparação de lesões na córnea varia com a sua profundidade. Ela pode ocorrer pelo deslizamento, ou migração, das células epiteliais para cobrir a área lesada, e por mitose, no sentido de reconstituir o número de células epiteliais normais (Wilcock, 2008).

O tipo de lesão modula o processo de reparação. Quando o tecido for simplesmente removido ou perdido, como ocorre no caso de um arranhão ou raspado, inicia-se um processo de reparação simples. Contudo, se a lesão for mais complicada, como nos casos de queimaduras por álcalis ou nos infecciosos, o processo envolve interações mais complexas em que elementos adicionais são envolvidos e eventos suplementares são necessários. Outros fatores que afetam a reparação são a extensão e a profundidade da lesão (Dayhaw-Barker, 1995a).

Um trauma na córnea resulta em uma cascata de processos que levam à sua reparação e recuperação da acuidade visual. Para tanto, é necessária a integração da proliferação celular, migração, diferenciação, apoptose e comunicação intercelular. A combinação dos fatores solúveis presentes na córnea e no filme lacrimal, torna-se importante na regulação destes processos, cuja ocorrência acontece simultaneamente (Klenkler e Sheardown, 2004).

No processo de reparação da córnea estão envolvidas proteínas da matriz mesenquimal, proteoglicanos, fatores solúveis, enzimas proteolíticas e alguns tipos celulares (Dayhaw-Barker, 1995a).

As principais proteínas da matriz são: a fibronectina, cujo papel principal está na adesão celular durante sua migração; a tenascina, que possui função semelhante a da fibronectina, mas está presente principalmente durante a reparação tecidual e em processos malignos; a laminina, que é parte integral da maioria das membranas basais e promove a aderência das células à membrana basal, interferindo no movimento, na diferenciação e no crescimento celular; e as integrinas, que servem como receptores para vários componentes extracelulares, dentre eles a fibronectina, a laminina e diferentes tipos de colágenos (Dayhaw-Barker, 1995a).

O dermatan e o queratan sulfato são os principais proteoglicanos presentes na córnea (Michelacci, 2003). Sua importância está na natureza hidrofílica, que mantém certo nível de hidratação tecidual e, na manutenção do espaçamento e orientação das fibras de colágeno (Dayhaw-Barker, 1995a).

Como a córnea está em contato íntimo com o filme lacrimal e com o humor aquoso, os vários tipos de fatores solúveis neles presentes desempenham papéis importantes na modificação celular e na reparação de lesões envolvendo a córnea (Imanishi et al., 2000).

Os fatores solúveis são proteínas que afetam o crescimento e a locomoção celular via receptores celulares. Vários grupos desses fatores solúveis que afetam a córnea já foram identificados. São eles as defensinas, o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento dos ceratinócitos (KGF), o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), a família do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), os neuropeptídeos, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a família do fator transformador de crescimento (TGF), que é dividida em duas subfamílias: o TGF- $\alpha$  e o TGF- $\beta$  e o fator de crescimento derivado do retinoblastoma (Dayhaw-Barker, 1995a; Dayhaw-Barker, 1995b; Fini, 1999; Imanishi et al., 2000).

As defensinas são originadas pelas células inflamatórias e possuem efeito antimicrobiano, além de atuar com ação sinérgica junto a outros fatores solúveis no estímulo do crescimento celular.

O fator de crescimento epidermal (EGF) é produzido pelas células epiteliais da córnea e, principalmente, pela glândula lacrimal. Atua na proliferação de células epiteliais e endoteliais (Imanishi et al., 2000) e induz à migração das células epiteliais.

Existem receptores de alta e baixa afinidade por este fator nas células endoteliais e epiteliais, entretanto, nos ceratócitos, apenas os receptores de baixa afinidade pelo EGF estão presentes. Estes achados explicam os efeitos da taxa de crescimento promovida pelo EGF nas células epiteliais, endoteliais e nos ceratócitos. O EGF inibe a diferenciação terminal das células epiteliais da córnea e aumenta sua proliferação de uma forma dependente de sua concentração (Imanishi et al., 2000).

O fator de crescimento ceratinócito (KGF) possui atividade mitogênica restrita às células epiteliais. Por ser considerado um estimulador parácrino para o crescimento de células epiteliais da córnea, a aplicação tópica do KGF pode ser eficiente na regeneração epitelial e efetivo no tratamento de úlceras de córnea com perda do estroma. Sugere-se que o KGF é produzido pelos ceratócitos e que atua nas células epiteliais pela ligação aos seus receptores (Imanishi et al., 2000). A expressão do KGF e do seu receptor é alta nos fibroblastos e nas células epiteliais do limbo comparando-se com o centro da córnea, o que sugere que este fator solúvel modula preferencialmente a função das células tronco (Li e Tseng, 1997).

O fator de crescimento hepatócito (HGF), produzido em sua forma inativa por fibroblastos, é ativado por lesão, estímulo inflamatório ou proteases da cascata de coagulação. Seus receptores de alta afinidade estão situados principalmente nas células epiteliais da córnea. Quando ligado aos seus receptores, o HGF atua na proliferação, na motilidade e na mudança da forma das células epiteliais, endoteliais e melanocíticas (Grierson et al., 2000). Ao contrário do KGF, os receptores do HGF são encontrados em maior número na região central da córnea do que na região do limbo (Li e Tseng, 1997).

O fator de crescimento fibroblástico (FGF), que pode ser ácido (aFGF) ou básico (bFGF), é mitogênico para as células epiteliais, endoteliais e estromais. O aFGF tem sido detectado na membrana de Descemet e no endotélio da córnea, mas em menor quantidade no epitélio. Ele não foi encontrado no estroma. Em contrapartida, o bFGF e seus receptores podem ser encontrados nos três tipos celulares da córnea e no humor aquoso (Wilson et al., 1994).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e seus receptores são encontrados no epitélio e estroma da córnea e, na malha trabecular. Sua atuação consiste no estímulo da atividade mitótica e na diferenciação celular (Fini, 1999; Klenkler e Sheardown, 2004).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) promove a reparação de lesões na córnea por aumentar o crescimento e a migração celular. Ele provoca um estímulo para a migração de células epiteliais, na presença de fibronectina, e para a migração de fibroblastos e ceratócitos. Também demonstrou efeito quimiotático para as células endoteliais provocando a sua migração. Receptores do PDGF foram encontrados nas células endoteliais e em fibroblastos (Imanishi et al., 2000).

O Fator de crescimento transformador beta (TGF-  $\beta$ ) é secretado por quase todas as células providas de núcleo. Está dividido em TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2 e TGF-  $\beta$ 3. O TGF-  $\beta$ 2 é amplamente difundido em todos os tipos celulares da córnea. Isto indica que ele desempenha um papel importante neste tecido. A forma inativa secretada do TGF-  $\beta$ 2 é ativada por algumas proteases, como a família da catepsina, durante o processo de reparação de lesões na córnea e reações inflamatórias causadas por vários tipos de infecções ou outras anormalidades oculares superficiais. Os TGF-  $\beta$ s, principalmente o TGF-  $\beta$ 2, atuam na regulação da proliferação celular corneal, inibindo a proliferação das células epiteliais de uma maneira dose dependente (Imanishi et al., 2000). Além disso, acredita-se que o TGF-  $\beta$  inibe a proliferação celular endotelial e de leucócitos, e estimula a proliferação de fibroblastos do estroma e da pele (Song et al., 2002).

Em estudo realizado por Stramer et al. (2003) foi demonstrado que a deposição de tecido fibroso durante a reparação de lesão na córnea está relacionada com a perda da membrana basal epitelial induzindo à exposição do estroma ao TGF- $\beta$ 2. No mesmo estudo, sugere-se que o efeito de mínima opacidade corneal ao se utilizar a membrana amniótica como tratamento de úlceras de córnea, se deve ao fato de sua atuação como membrana basal impedindo a exposição do estroma ao TGF- $\beta$ 2.

As enzimas proteolíticas estão envolvidas na reestruturação tecidual. Especificamente para a córnea, existem dois grupos principais: o da proteinase serina, incluindo a plasmina e seus componentes relatados, e o das enzimas que requerem cofator metal, que correspondem à colagenase e à metaloproteinase da matriz. A primeira é responsável pela clivagem de proteínas da matriz, como a fibronectina e a laminina, e pode influenciar na migração celular. As colagenases e as metaloproteinases da matriz degradam e desnaturam o colágeno. Estas enzimas são importantes para a remodelação do colágeno, na organização da sua arquitetura original, mantendo a transparência da córnea (Dayhaw-Barker, 1995a).

Várias citocinas inflamatórias estão envolvidas no processo de reparação de lesões da córnea. Elas e seus receptores estão presentes nas células e, quase todas são produzidas pelas células inflamatórias (linfócitos, monócitos/macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, basófilos/mastócitos e eosinófilos). Estas citocinas regulam o crescimento celular da córnea e induzem à sua migração. Especificamente, a interleucina (IL)-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF) aumentam a migração de células epiteliais pelo estímulo da atividade quimiotática induzida pela fibronectina. Entretanto, estas citocinas, por si só, não possuem ação quimiocinética ou quimiotática (Imanishi et al., 2000).

Os receptores para a IL-1 são encontrados nos ceratócitos e fibroblastos. A IL-1 não é liberada do epitélio para o estroma em quantidade significativa nas córneas intactas. Ela é liberada das células epiteliais apicais que estão passando por morte programada, que faz parte do mecanismo de maturação normal e descamação destas células. A IL-1 pode estar presente em concentrações elevadas no filme lacrimal nas condições associadas às lesões da superfície ocular como a ceratoconjuntivite seca. Entretanto, a IL-1 presente no filme lacrimal não passa para o estroma anterior na ausência de lesão ou morte das células epiteliais. Isto acontece somente nos casos em que o estroma está exposto e, neste caso, a IL-1 liga-se aos seus receptores presentes nos ceratócitos e modulam as funções destas células. Tem sido demonstrado que a IL-1 modula a apoptose dos ceratócitos e dos fibroblastos presentes na córnea (Wilson et al., 2001).

Quando acontece uma lesão na córnea, são transmitidos sinais para as células tronco situadas na região do limbo. Estes sinais, transmitidos por mecanismos ainda não conhecidos, são responsáveis pelo início da proliferação e diferenciação das células tronco. Na ausência de enfermidades que impeçam este mecanismo, são providenciadas células em quantidade suficiente para completar o processo de reparação da área lesada (Imanishi et al., 2000).

Os tecidos contribuem significativamente para a sua própria reparação. As células epiteliais estão extremamente envolvidas na reconstituição de qualquer lesão que as comprometa, os ceratócitos estromais transformam-se em fibroblastos e são a chave para a reorganização das características do estroma e, as células endoteliais desempenham o papel principal em seu restabelecimento (Dayhaw-Barker, 1995a). Além dos tipos celulares envolvidos na reconstituição da córnea lesada, o filme lacrimal

desempenha um papel importante como veículo na distribuição de muitas substâncias reparadoras (Dayhaw-Barker, 1995a).

A migração celular ocorre quase imediatamente após a lesão epitelial. Fibrina, fibrinogênio e fibronectina são secretados do epitélio adjacente para a face desnuda (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 em um tempo de 4 a 7 dias o epitélio estará completamente regenerado (Spreull, 1966; Kern, 1990). O processo de migração celular e mitose podem estar influenciados pelo sistema nervoso simpático, por hormônios, fatores solúveis 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). Kato et al. (2000) constataram, através de técnicas de imunohistoquímica, que para a reparação da membrana basal foram necessárias mais do que 4 semanas.

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 sob ela. Um coágulo de fibrina é depositado no defeito e há a formação de edema em sua volta (Kern, 1990). Em poucas horas após o acometimento, neutrófilos chegam ao local 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).

Os ceratócitos das margens da ferida sofrem um processo de diferenciação em fibroblastos, aumentam em número por divisão e iniciam o processo de migração para a

área onde houve a perda de ceratócitos (Dayhaw-Barker, 1995b). O processo de diferenciação dos ceratócitos é, na verdade, a ativação destas células, situadas na área adjacente à lesão. A primeira mudança detectada é um aumento no tamanho dos ceratócitos e de seus nucléolos, organelas responsáveis pela síntese de ribossomos. Ocorre também, um aumento no número de nucléolos, vesículas e fagossomos. Estas mudanças acontecem nas primeiras 6 horas após a lesão. Dentro de 24 horas os ceratócitos ativados migram para a zona acelular e no segundo dia alcançam o centro da lesão. A morfologia destas células sugere uma transição entre fibroblasto e ceratócito, com formato fusiforme, múltiplos nucléolos e ausência de grânulos citoplasmáticos (Fini, 1999).

Concomitantemente com a deposição de fibronectina na lesão, ocorre a formação de seus receptores pela interferência dos fibroblastos (Fini, 1999). O processo de secreção de fibrilas de colágeno, realizado pelos ceratócitos diferenciados em fibroblastos, é iniciado e perdura por semanas. As fibrilas de colágeno são orientadas aleatoriamente e, finalizada a reparação, é feito um esforço para que elas e os proteoglicanos (glicosaminoglicanos) retornem à sua arquitetura original. Este processo é efetivado por enzimas, especificamente as metaloproteinases da matriz (Dayhaw-Barker, 1995b), sintetizadas pelos fibroblastos (Fini, 1999). O novo colágeno secretado é remodelado e torna-se mais compacto, mas não consegue atingir a organização uniforme de antes. Essa desorganização resulta em opacidade corneal permanente (Spreull, 1966; Kern, 1990; Wilcock, 1993). A composição alterada da matriz extracelular sintetizada pelos fibroblastos, assim como a sua disposição desorganizada, provavelmente contribuem para a opacidade do tecido reparado (Fini, 1999).

A perfuração da membrana de Descemet resulta em 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 iniciam a migração para cobrir o defeito criado. Esse processo é lento e pode ser completado somente em 6 semanas (Befanis et al., 1981; Kern, 1990; Wilcock, 1993). Durante a migração, a área citoplasmática ao redor do núcleo sofre um aumento, mudando o espaço entre os núcleos celulares (Dayhaw-Barker, 1995b). Após o recobrimento da área pela migração celular, as células são multiplicadas por mitose. A habilidade mitótica do endotélio varia segundo as espécies, sendo que nos gatos, primatas e no homem é limitada e nos cães e coelhos é bem desenvolvida (Befanis et al., 1981; Dayhaw-Barker, 1995b; Slatter e Dietrich, 2007). As novas células recobrindo a área

lesada começam a retomar seu formato original, entretanto algumas permanecem como “células gigantes” (Dayhaw-Barker, 1995b).

Spreull (1966) acreditava que a membrana de Descemet era incapaz de sofrer regeneração. Posteriormente, foi confirmado que em pequenas lesões de 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 de lesões extensas, o endotélio pode ser incapaz de recobrir o defeito originando uma área de edema persistente (Wilcock, 1993; Slatter e Dietrich, 2007; Maggs, 2008). Embora a membrana de Descemet possa ser restabelecida, o processo é lento, podendo ser concluído somente após 3 meses, sendo que a espessura da nova membrana é menor do que a normal, indicando que a força tênsil não é a mesma do que a do tecido original (Kato et al., 2000).

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 corneais (Startup, 1984).

A dor associada à úlcera 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 à gravidade da lesão (Kern, 1990).

As úlceras de córnea tornam-se complicadas quando o mecanismo de reparação normal é inibido ou desequilibrado, o agente causal não é eliminado ou quando a lesão torna-se contaminada. Nos casos em que o equilíbrio entre a regeneração e a destruição no processo de reparação não existir, desenvolve-se uma destruição progressiva do estroma (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).

Nos cães, a melanose do epitélio e do estroma superficial da córnea pode se desenvolver quando há a reparação de úlceras de córnea superficiais ou profundas. A vascularização geralmente acompanha ou precede a melanose (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, mas não desaparecerem completamente, podendo ser visibilizados através de lâmpada de fenda (Slatter e Dietrich, 2007; Maggs, 2008).

### **Membrana Amniótica**

As membranas fetais, ou extraembrionárias, conferem proteção e transferem nutrientes maternos para o feto, eliminam produtos fetais e sintetizam enzimas e hormônios. Existem quatro membranas: o córion, a membrana alantóide, a membrana amniótica e o saco vitelínico. Todas são eliminadas no momento do parto (Roberts, 1979).

O córion é a camada externa que entra em contato com as células maternas. A membrana amniótica, camada mais interna, está em contato íntimo com o feto, separada dele apenas pelo líquido amniótico (Dua e Azuara-Blanco, 1999).

A membrana amniótica, ou âmnion, é 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). Sua formação se dá entre o 13º e 16º dia da concepção nos bovinos, ovinos, equinos, suínos, caninos e felinos (Roberts, 1979).

Na espécie humana a espessura da membrana amniótica 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 epiteliais 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 (Dua e Azuara-Blanco, 1999).

A utilização da membrana amniótica em cirurgia oftálmica humana foi reportada pela primeira vez por Roth em 1940, que a aplicou na reparação de defeitos conjuntivais (Park et al., 2008). Mesmo com os resultados satisfatórios alcançados com sua utilização, a membrana amniótica voltou a ser estudada e utilizada somente em 1995, por Kim e Tseng na reconstrução de córneas de coelhos após a remoção completa do epitélio. Desde então, a membrana amniótica tem sido indicada para diversas doenças oculares, destacando-se as queimaduras químicas e térmicas, a síndrome de Stevens-Johnson, a ceratopatia bolhosa, o penfigóide cicatricial, as úlceras neurotróficas, as reconstruções conjuntivais e corneais após ressecção de tumores e em cirurgias de glaucoma para recobrir válvulas implantadas (Dua et al., 2004).

Na Medicina Veterinária a membrana amniótica foi aplicada em ceratectomias penetrantes (Barros et al., 1998), simbléfaro, ressecção de tumores esclerais e corneais (Barros et al., 2005), úlceras superficiais não complicadas (Pontes et al., 2008; Kim et al., 2009), deficiência de células límbicas (Cremonini et al., 2007), queimaduras químicas (Sampaio et al., 2006) e sequestro corneal felino (Pontes et al., 2010).

Lee e Tseng (1997) teorizaram que a membrana basal espessa e a matriz estromal avascular da membrana amniótica são essenciais para o sucesso do transplante. Não verificaram efeitos adversos, como rejeição ao transplante, nos pacientes que receberam a membrana amniótica preservada, pois apenas substrato sem células viáveis foi transplantado. Ainda afirmaram que a utilização da membrana amniótica preservada em perfurações da córnea não foi efetiva e que ela deve ser empregada apenas em úlceras estromais profundas.

A membrana amniótica atua como membrana basal que suporta o crescimento do epitélio e da membrana basal corneal e facilita a migração das células epiteliais. A membrana basal da membrana amniótica possui colágeno tipo IV, laminina-1, laminina-5 e fibronectina, que desempenham papel importante na adesão das células epiteliais da córnea, promovem diferenciação e previnem a apoptose epitelial. O estroma da membrana amniótica possui vários fatores solúveis, proteínas antiangiogênicas e anti-inflamatórias e, inibidores naturais para várias proteases. Estes fatores propiciam um microambiente livre de inflamação e desempenham funções importantes na comunicação entre o epitélio do limbo e o estroma (Grueterich et al., 2003). Endo et al. (2004) demonstraram, através da imunohistoquímica, que a membrana basal da membrana amniótica e da córnea possui colágeno do tipo IV. Por isso, afirmaram que a membrana amniótica atua como um excelente substrato para o crescimento de células epiteliais da córnea.

Park e Tseng (2000) estudaram a ceratectomia fotorefrativa transepitelial na córnea de coelhos e chegaram à 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.

Shimmura et al. (2001) afirmaram que os linfócitos infiltrados no estroma da membrana amniótica sofrem apoptose, constatada após a remoção da membrana. Afirmaram ainda, que não é possível saber se a membrana amniótica exerce apoptose nos linfócitos ou se eles passam pelo processo fisiológico de apoptose quando no interior da membrana. Os mesmos autores constataram que a membrana amniótica sequestra células inflamatórias, funcionando como uma barreira física que protege a superfície ocular destas células.

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 solúveis, 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 e promovendo a epitelização. Entretanto, foi sugerido que fossem feitas novas pesquisas no intuito de demonstrar os efeitos da preservação da membrana amniótica na viabilidade destes fatores solúveis (Shimmura et al., 2001).

Kubo et al. (2001) constataram 50% de viabilidade celular epitelial em membrana amniótica preservada em DMSO a -80°C por dois meses. Estas células também foram capazes de crescer em meio de cultura e apresentaram imunogenicidade quando transplantadas em locais não privilegiados imunologicamente. No mesmo estudo, quando a membrana amniótica preservada foi implantada no meio intracorneal, não houve reação imune, já que a córnea é considerada um tecido imunologicamente privilegiado por não possuir vasos sanguíneos e linfáticos. Para se constatar a imunogenicidade privilegiada da membrana amniótica criopreservada, os autores implantaram pele criopreservada abaixo da cápsula renal, tecido não privilegiado imunologicamente, e verificaram que houve maior invasão de células do hospedeiro neste tecido em comparação com o mesmo procedimento utilizando-se a membrana amniótica criopreservada.

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

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.

Em geral, os tecidos imunoprivilegiados como a córnea, os testículos e o útero expressam ligantes e, a apoptose dos linfócitos do hospedeiro pode ser induzida pela sua ligação a estes ligantes. Pela imunohistoquímica já foi constatada a presença de ligantes Fas nas células epiteliais e mesenquimais do estroma amniótico. A presença de ligantes Fas nas células mesenquimais pode prevenir a infiltração linfocitária no estroma amniótico (Kubo et al., 2001). Li et al. (2005) também encontraram ligantes Fas em células epiteliais amnióticas humanas cultivadas *in vitro* e afirmaram que a sua presença previne a inflamação por induzir a apoptose de células Fas-positivas após o transplante com membrana amniótica.

Kubo et al. (2001) afirmaram que a membrana amniótica criopreservada funcionou como uma barreira, impedindo a infiltração de células do hospedeiro quando transplantada sob a cápsula renal.

Também foi demonstrado que células epiteliais amnióticas humanas cultivadas *in vitro* secretam fatores imunossupressivos que inibem a resposta imune inata e adaptativa. Estes fatores inibem a migração de neutrófilos e macrófagos também *in vitro* (Li et al., 2005).

Estimulados pelo relato de um caso, onde uma paciente foi submetida a três transplantes com membrana amniótica e apresentou rejeição, Wang et al. (2006) estudaram a imunogenicidade de transplante alógeno de membrana amniótica a fresco e constataram que ela não é um tecido completamente imunoprivilegiado, mas que possui uma imunogenicidade parcial quando transplantada em olho normal de rato e que pode induzir à rejeição em pacientes pré-sensibilizados. Os mesmos autores afirmam que a membrana amniótica não pode ser considerada não imunogênica apenas pelo fato de secretar fatores anti-inflamatórios.

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 anti-inflamatórias da membrana amniótica diminuem o estímulo à angiogênese e, conseqüentemente, à vascularização corneal.

A angiogênese no olho é controlada por dois sistemas que se equilibram: o formado pelos estimulantes angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que promove a proliferação de células endoteliais; e o formado por inibidores angiogênicos, como o fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF), que inibe a proliferação das mesmas células. A ação antiangiogênica da membrana amniótica deve-se ao fato de que o PEDF está presente em sua membrana basal e, em menor quantidade, na matriz estromal (Shao et al., 2004).

### **Adesivos em Cirurgia**

O adesivo tecidual pode ser amplamente definido como qualquer substância com características que permitem sua polimerização. Deve manter os tecidos unidos ou servir como uma barreira contra extravasamentos (Reece et al., 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). Refojo et al. (1968) complementaram que os requisitos de um adesivo para o fechamento de úlceras e perfurações na córnea são a facilidade na sua aplicação, a rápida polimerização, a mínima toxicidade e a sua permanência no local por vários dias.

Os adesivos sintéticos surgiram como uma alternativa viável e vários estudos foram realizados envolvendo sua utilização na substituição da sutura de pele (Quinn et al., 1997), em tecido conjuntivo (Lerner e Binur, 1990) e em cirurgias ortopédicas (Borges et al., 1993).

Os adesivos teciduais podem ser utilizados para promover a hemostasia e o fechamento de tecidos, prevenindo o extravasamento de substâncias como ar e fluidos linfáticos, além de atuar como fornecedor local de substâncias exógenas, como medicações, fatores solúveis e linhagens celulares (Reece et al., 2001)

Segundo Webster et al. (1968), os adesivos cirúrgicos não eram usados em oftalmologia por serem de difícil aplicação, apresentarem falhas na adesão e induzirem a toxicidade local. Entretanto, ao reportar a utilização de n-heptil cianoacrilato para o fechamento de perfurações da córnea em humanos, os autores consideraram que o grau de toxicidade local e a reação inflamatória estariam associados à quantidade de adesivo aplicada e ao tipo de monômero empregado.

Os adesivos teciduais são utilizados em oftalmologia com o objetivo de manter a integridade ocular, isolando o conteúdo intraocular do meio extraocular, prevenindo assim, o desenvolvimento de endoftalmite e outras complicações como a catarata, o glaucoma, etc. Uma segunda intervenção pode ser realizada oportunamente objetivando-se o restabelecimento da capacidade funcional, embora, em alguns casos, apenas a aplicação do adesivo pode ser suficiente para atingir esta finalidade, dispensando procedimentos adicionais (Felberg et al., 2003).

Os adesivos de cianoacrilato são solidificados por um mecanismo de polimerização aniônica que se inicia pelo seu contato com água ou com uma base fraca presente na superfície de adesão. Os efeitos tóxicos dos polímeros sintéticos nos tecidos estão relacionados à sua degradação em produtos como o formaldeído e o ácido

fórmico. Quanto menor o número de radicais presentes no adesivo (metil e etil), mais rápido ele se degrada. Também será maior a concentração de produtos de sua degradação e a toxicidade para o tecido. Os adesivos com radicais maiores (butil, heptil, octil e isobutil) são polimerizados rapidamente e degradados de forma lenta, o que culmina com a formação de pequena quantidade de produtos de degradação, assim são pouco tóxicos para o tecido (Refojo et al., 1971).

Pani et al. (1968) estudaram a degradação do n-butil cianoacrilato durante 154 dias e observaram que foi mínima em comparação com a do metil-2 cianoacrilato. Os estudos histotóxicos demonstraram que a reação tecidual foi menos intensa com a utilização do butil do que com o metil. Assim, os autores confirmaram a hipótese de que um polímero de cadeia longa é degradado mais lentamente do que um de cadeia curta, contribuindo para uma menor toxicidade tecidual.

Em contrapartida, a presença de fragmentos do polímero não degradado impede, mecanicamente, a união das margens da lesão e contribui para o surgimento de efeitos adversos relacionados à presença de um material estranho no tecido (Lamborn et al., 1970).

Os produtos tóxicos provenientes da degradação dos derivados do cianoacrilato podem induzir à reação inflamatória, vascularização corneal, reação do tipo corpo estranho e necrose tecidual (Refojo et al., 1971)

Deve-se considerar que, embora um polímero de cadeia longa seja muito menos tóxico do que um de cadeia curta, ele ainda apresenta toxicidade. No entanto, a toxicidade residual dos polímeros de cadeia longa não é suficiente para restringir completamente o seu uso (Refojo et al., 1971).

Segundo Refojo et al. (1971), algumas vezes é difícil diferenciar se a irritação ocular é devido ao efeito traumático do adesivo contra os tecidos adjacentes ou se é secundária a ação tóxica originada da atividade química do adesivo. Aronson et al. (1970) estudaram a toxicidade de diferentes cianoacrilatos aplicados em córneas desprovidas de epitélio e injetados no meio intraestromal. Neste último, o adesivo não entraria em contato com tecidos adjacentes, assim não causaria efeitos traumáticos. Todavia, os resultados de seu estudo demonstraram maior reação inflamatória nas córneas que receberam o adesivo intraestromal e naquelas que o receberam em maior quantidade. Neste mesmo estudo, os autores compararam a reação inflamatória

provocada pela utilização de octil, decil e isobutil cianoacrilato e concluíram que todos induzem ao mesmo grau de reação inflamatória, independente do tamanho da cadeia do polímero.

Sani e Refojo (1972) afirmaram que a resposta inflamatória, após a utilização de cianoacrilato em córneas, pode ser causada pelo trauma mecânico, mas que este não é um fator único desencadeante desta reação. Ressaltam ainda que, a quantidade de adesivo aplicada está diretamente relacionada ao grau de reação tecidual. Os mesmos autores atribuíram a toxicidade dos adesivos a uma ou várias substâncias, como aos monômeros, aos monômeros impuros (inclusive aqueles inibidores da polimerização frequentemente presentes nos adesivos para prolongar sua validade), aos polímeros e aos produtos de sua degradação. Os monômeros solidificam rapidamente em contato com o tecido, porém algum monômero pode permanecer sem reagir e se difundir gradualmente para os tecidos adjacentes.

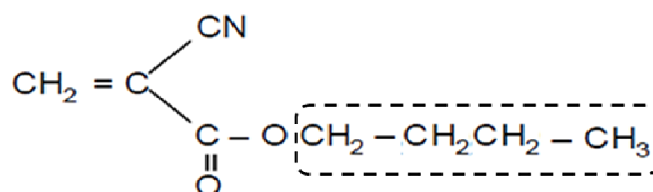
Um estudo avaliou a tolerância da córnea de coelhos à aplicação do n-butil-éster cianoacrilato em bolsa corneal intralamelar e em superfície de defeitos estromais. O adesivo aplicado em ambos os locais induziram apenas a uma resposta inflamatória branda, que não interferiu com o processo de reparação (Ollivier et al., 2001).

Muitos fatores influenciam a resistência e o tempo da adesão entre o adesivo e o tecido. São eles o tipo e a pureza do adesivo, a técnica de aplicação, o tipo de união (adesão entre biomaterial e tecido, ou tecido e tecido), a natureza e estado da superfície de adesão e o metabolismo do tecido (Refojo et al., 1971).

A força de tensão dos derivados de n-butil cianoacrilato (por exemplo o n-butil-2-cianoacrilato, Histoacryl®) é maior do que a dos derivados de cadeia longa (por exemplo o octil cianoacrilato, Dermabond®) (Vote e Elder, 2000). O n-butil-2-cianoacrilato, ou embucrilato, é um éster do ácido cianoacrílico com quatro carbonos em sua cadeia lateral (Fig. 1). Sua fórmula molecular é  $C_8H_{11}NO_2$ . Para um fácil reconhecimento da camada que foi aplicada, o Histoacryl® é de cor azul com pigmento violeta número 2. Está indicado para o encerramento de feridas recentes e regulares e na terapia de esclerose de varizes esofágicas e varizes fundas (B/ Braun Shering Expertise – USA).

As indicações para a utilização de adesivos sintéticos em oftalmologia são: o tratamento de perfurações e lacerações do bulbo, sejam elas traumáticas, infecciosas ou

degenerativas; a aplicação como substitutos para suturas em cirurgias oculares e no manejo de complicações pós-operatórias; e na união entre material aloplástico (lentes de contato, implantes de silicone, etc.) e tecidos (Refojo et al., 1971; Kern, 1990). Watté et al. (2004) indicam a aplicação de n-butil-2-cianoacrilato em úlceras superficiais, déficits estromais de causas variadas e pequenas descemetoceloses. O adesivo protege a córnea, possui propriedades antimicrobianas e promove uma barreira contra microrganismos (Whitley, 1991). Porém, causa desconforto devido ao atrito com a conjuntiva palpebral, pois sua superfície é rugosa, necessitando do uso de lente de contato com finalidade terapêutica (Felberg et al., 2003). A córnea deve ser debridada e seca antes da aplicação de pequena quantidade do cianoacrilato, com o animal sob sedação ou anestesia geral (Erdey et al., 1991; Wilkie e Whittaker, 1997).



**Figura 1.** Fórmula estrutural química do n-butil-2-cianoacrilato (Histoacryl®) destacando (retângulo) cadeia lateral contendo quatro carbonos.

Em um relato de três casos em humanos, foi comprovada a ação bacteriostática do butil cianoacrilato contra bactérias gram-positivas. Uma ligação dupla da molécula ligando-se ao grupo amino e/ou ao hidroxil presente na bactéria, seria responsável por sua ação bacteriostática. O mesmo adesivo não demonstrou atividade contra bactérias gram-negativas. Os autores atribuíram sua ineficiência à cápsula de lipopolissacarídeos envolvendo os microorganismos gram-negativos, que atuou como uma barreira contra a entrada do adesivo (Eiferman e Snyder, 1983).

A presença física do adesivo atua ainda como barreira contra a invasão do estroma por leucócitos polimorfonucleares provenientes do filme lacrimal. Desse modo, a ativação dos leucócitos fica impedida, assim como a liberação de enzimas destruidoras de tecidos que provocam a destruição do estroma (dissolução) (Prause, 1983).

O adesivo pode permanecer no local em que foi aplicado por um período que varia entre 5 dias e 5 semanas ou mais. Ele parece estimular a reparação epitelial, que acontece abaixo dele. Como consequência, o adesivo é deslocado ao se completar a reparação. Se o deslocamento acontece precocemente, uma reaplicação do adesivo pode ser feita sem complicações (Refojo et al.; 1971; Silver, 1976; Wilkie e Whittaker, 1997).

Os requisitos para o sucesso da aplicação de um adesivo são o debridamento do tecido inviável, a obtenção da superfície seca, a aplicação de mínima quantidade de adesivo, a não aderência de tecidos adjacentes e a utilização de instrumental adequado (Refojo et al., 1971).

Segundo Sharma et al. (2003), as perfurações da córnea com 2 a 3 mm de diâmetro são relativamente mais difíceis de tratar com o cianoacrilato, sendo necessárias a interposição de tecido escleral e a aplicação de hialuronato de sódio na câmara anterior. Hirst e De Juan (1982) também consideraram o uso de viscoelástico em perfurações corneais maiores do que 1 mm de diâmetro.

Foi avaliada a utilização de isotutil cianoacrilato no tratamento de 22 córneas com úlceras penetrantes de 3 mm ou menos de diâmetro. A reparação da úlcera com a aplicação única do adesivo ocorreu em 40,9% dos olhos tratados; 31,8% das córneas tiveram como terapia complementar a ceratoplastia penetrante e em 27,3% das úlceras, foi necessária mais de uma aplicação. Os autores concluíram que o isobutil cianoacrilato é efetivo para o tratamento de perfurações em córneas, pois aproximadamente metade das perfurações, com 3 mm ou menos, foi reparada (Setlik et al., 2005).

A introdução acidental do adesivo na câmara anterior está associada à inflamação prolongada, vascularização corneal, desenvolvimento de catarata (Wessels e McNeill, 1989), polimerização do endotélio corneal, além da formação de sinéquias anterior e posterior (Markowitz et al., 1995).

Leahey et al. (1993) descreveram a experiência clínica em 44 pacientes humanos cujas córneas foram tratadas com n-butil cianoacrilato. Quando a câmara anterior estava rasa ou a perfuração ultrapassava 2 mm de diâmetro, os autores utilizaram ar ou viscoelástico para restabelecer o bulbo e dar suporte na aplicação do adesivo. Entretanto, a injeção de ar dentro da câmara anterior é o estágio mais complicado da

cirurgia, especialmente nos casos onde há perfuração central de tamanho considerável (Mizuno e Hayasaka, 1982).

Em estudo recente, compararam-se os efeitos bacteriostáticos, a citotoxicidade e a habilidade em fechar incisões corneais entre o n-butil-2-cianoacrilato, o metoxipropil cianoacrilato e o adesivo de fibrina. Os adesivos sintéticos demonstraram ação bacteriostática contra microorganismos gram-positivos, enquanto o biológico não demonstrou efeito contra qualquer tipo de bactéria (gram-positiva ou gram-negativa). O metoxipropil foi o mais tóxico para a córnea, seguido pelo n-butil-2-cianoacrilato. Em contrapartida, o adesivo de fibrina provocou mínima toxicidade para o mesmo tecido. Este último, não foi eficaz para o fechamento de incisões da córnea, contrariamente aos adesivos sintéticos, que foram eficazes e demonstraram maior resistência à pressão intraocular elevada. Os autores sugeriram que as diferentes propriedades dos adesivos devem ser consideradas na escolha para utilização no procedimento cirúrgico (Chen et al., 2007).

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sob o protocolo de número 30/2008. Seguiram-se os critérios bioéticos preconizados pela *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985*, de acordo com o código de Nüremberg (Goldim, 1995).

Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à avaliação oftálmica, constituída pelo teste lacrimal de Schirmer 1<sup>1</sup>, oftalmoscopia monocular direta<sup>2</sup> e pelo teste de tingimento pela fluoresceína<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> Teste de Schirmer - Ophthalmos Indústria Farmacêutica - São Paulo - Brasil.

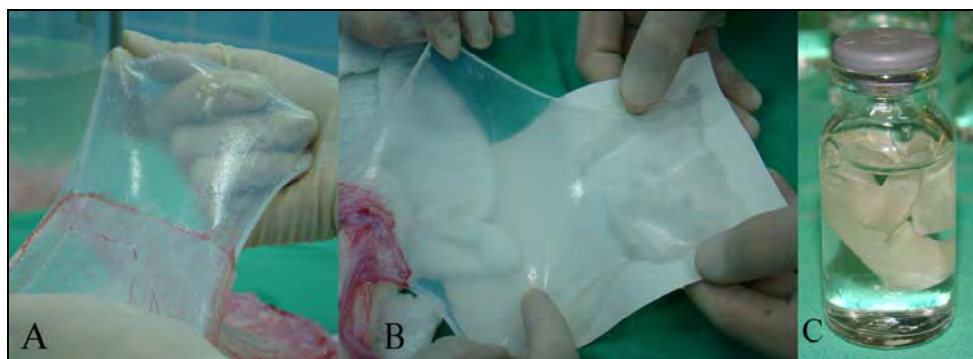
<sup>2</sup> Oftalmoscópio Coaxial Welch Allyn 3.5v - New York - USA.

<sup>3</sup> Fluoresceína Strips - Ophthalmos Indústria Farmacêutica - São Paulo - Brasil.

## Obtenção e Preparo da Membrana Amniótica

Uma fêmea bovina sadia, gestante e com feto a termo, proveniente do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa foi encaminhada para realização de cesariana eletiva no Centro Cirúrgico de Grandes Animais da mesma instituição. O animal possuía todo o protocolo de vacinação em dia e foi submetido a exames de rotina antes da realização da operação.

A membrana amniótica foi preparada segundo as orientações de Kim e Tseng (1995), tendo sido coletada, de forma asséptica, juntamente com o córion. Ela foi lavada em solução fisiológica estéril a 0,9%<sup>4</sup> em temperatura ambiente, imersa em 1 litro de solução tampão fosfato estéril, contendo 1000UI/mL de penicilina G, 20 mcg/mL de estreptomicina e 2,5 mcg/mL de anfotericina B<sup>5</sup>, separada manualmente do córion, estendida sobre papel de nitrocelulose com sua face epitelial voltada para cima, e cortada no tamanho de 3cm<sup>2</sup> e de 0,5cm<sup>2</sup>. Posteriormente, foram imersos um fragmento de 3cm<sup>2</sup> e dois de 0,5cm<sup>2</sup> da membrana em frasco de vidro estéril contendo glicerina 99%<sup>6</sup> (Fig. 2) em quantidade suficiente para cobri-las, estocadas em temperatura ambiente (Barros et al., 1998; Pontes et al., 2008) por um período mínimo de 30 dias e avaliadas microbiologicamente antes de sua utilização.



**Figura 2.** Imagens fotográficas ilustrando o preparo da membrana amniótica bovina. A – Membrana amniótica sendo separada manualmente do córion; B – Membrana amniótica sendo estendida sobre papel de nitrocelulose com sua face epitelial voltada para cima; C - Membrana amniótica imersa em frasco contendo glicerina 99%. Fotos da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

<sup>4</sup> Solução de Cloreto de Sódio 0,9% - JP Indústria Farmacêutica Ltda - São Paulo - Brasil

<sup>5</sup> Ophthalmos Indústria Farmacêutica - São Paulo - Brasil

<sup>6</sup> Glicerina, P.A. - Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda - Rio de Janeiro - Brasil.

## **Avaliação Microbiológica da Membrana Amniótica**

A finalidade da avaliação microbiológica das membranas foi para constatar a presença ou ausência de fungos ou bactérias no material antes de sua utilização nos procedimentos cirúrgicos. Para isso, os fragmentos de 0,5cm<sup>2</sup> das membranas foram coletados assepticamente, utilizando material autoclavado e, em câmara de fluxo laminar. Foram 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 e, as em ágar Sabouraud a 25°C durante 5 a 10 dias e a 37°C por 48 horas.

Na avaliação microbiológica das membranas, não foram detectados fungos ou bactérias, o que permitiu sua utilização nos procedimentos.

## **Grupos Experimentais**

Foram utilizados 60 coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas, hígdas, com peso variando entre 2,5 e 3,5 kg, obtidos no Setor de Cunicultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de número igual e mantidos em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Veterinária da UFV recebendo água, feno e ração específica para coelhos, sendo que foram submetidos à período de adaptação de 100 dias antes da realização dos procedimentos. Os grupos foram identificados como grupo 1 (G1), grupo 2 (G2), grupo 3 (G3) e grupo 4 (G4).

Os 15 espécimes selecionados para o G1, G2, G3 e G4 foram novamente divididos de forma aleatória em 5 subgrupos constituídos por 3 animais, sendo que, para cada subgrupo, foi determinado um período para a enucleação dos olhos operados. Durante este tempo, os animais foram avaliados diariamente e, finalizado o período de avaliação de cada subgrupo, os animais que o constituíam foram excluídos da pesquisa. Os tempos para a coleta do material foram estabelecidos em:

- A) Subgrupo 1 (T1): após 2 dias de realização do procedimento;
- B) Subgrupo 2 (T2): após 7 dias de realização do procedimento;
- C) Subgrupo 3 (T3): após 15 dias de realização do procedimento;

- D) Subgrupo 4 (T4): após 21 dias de realização do procedimento;
- E) Subgrupo 5 (T5): após 30 dias de realização do procedimento.

### **Técnica Anestésica e Cirúrgica**

As operações foram levadas a efeito no centro cirúrgico de pequenos animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais não foram submetidos a jejum hídrico ou alimentar, seguindo-se orientações da literatura (Flecknell et al., 2007). Avaliados a frequência cardíaca, o tempo de preenchimento capilar, o grau de hidratação e a coloração das mucosas, os animais foram submetidos à indução anestésica com associação de cloridrato de ketamina<sup>7</sup> (25 mg/kg) e midazolam<sup>8</sup> (3 mg/kg) em mesma seringa, administrada por via intramuscular (Martin e Kirsipuu, 2006). Para a manutenção utilizou-se anestesia inalatória com isoflurano<sup>9</sup> diluído em 100% de oxigênio, fornecido com máscara facial em circuito semiaberto. Visando a fornecer fluidoterapia transoperatória com solução de cloreto de sódio a 0,9%<sup>1</sup>, a veia marginal da orelha esquerda foi canulada com catéter 24G e a velocidade média de fornecimento foi de 10ml/kg/hora (Martin e Kirsipuu, 2006). Durante os procedimentos cirúrgicos, instilou-se lidocaína 1%, sem vasoconstritor e sem preservativos<sup>2</sup> (Eggeling et al., 2000) nas córneas, em intervalos de 10 minutos.

Estando o paciente em decúbito lateral esquerdo, com a córnea posicionada paralelamente à mesa, procedeu-se a tricotomia e a antissepsia da região periocular direita com solução de iodopovidona a 10%. Em seguida, realizou-se a proteção do campo operatório e a antissepsia da córnea, da conjuntiva palpebral e bulbar com solução de iodopovidona a 0,5%<sup>2</sup>, e posterior lavagem com solução fisiológica estéril a 0,9%<sup>1</sup>. A imobilização do bulbo do olho foi efetuada empregando-se duas suturas de apoio, com fio de náilon 3-0 encastado<sup>10</sup> da fábrica, nas posições 6 e 12 horas equivalentes de um relógio, transpassando a conjuntiva bulbar, a 3 mm do limbo. Para a

---

<sup>7</sup> Vetanarcol® - Solução estéril de cloridrato de ketamina 5% - König S.A. - São Paulo - Brasil

<sup>8</sup> Dormium® - União Química Farmacêutica Nacional S/A - São Paulo - Brasil.

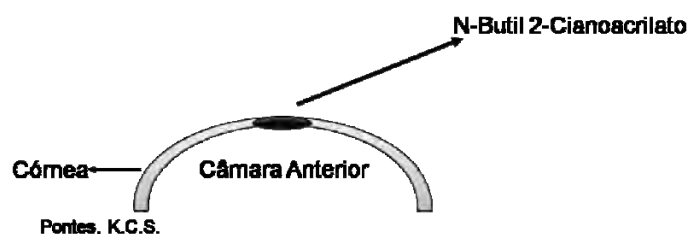
<sup>9</sup> Isoforine® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. - São Paulo - Brasil.

<sup>10</sup> Fio de náilon 3-0 monofilamentar preto - Classe II - Shalon Fios Cirúrgicos Ltda - Goiânia - Brasil.

blefarostase, foi utilizado espéculo ocular de Barraquer. As operações foram efetuadas com auxílio de microscópio cirúrgico<sup>11</sup>.

No olho direito de cada animal foi feita a ceratectomia penetrante de 2,0 mm de diâmetro, na região central da córnea, utilizando-se *punch* para biópsia descartável<sup>12</sup> de 2,0 mm.

Nos animais do G1 a córnea foi seca com esponja oftálmica<sup>13</sup> para posterior aplicação de n-butil 2-cianoacrilato<sup>14</sup> sobre a lesão (Fig. 3 e 4). A aplicação do adesivo foi feita cuidadosamente, utilizando-se seringa de 1 ml e agulha de 26G, em quantidade mínima necessária para o preenchimento da lesão, em sua extensão e profundidade. Após a aplicação, foi aguardado um período de 60 segundos para irrigar a córnea com solução salina balanceada<sup>15</sup>.



**Figura 3.** Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G1. Ceratectomia penetrante com aplicação de n-butil 2-cianoacrilato sobre a lesão. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

As córneas dos animais do G2 foram submetidas a mesma técnica de ceratectomia penetrante para o G1. Com um *punch* para biópsia descartável<sup>12</sup> de 4 mm de diâmetro, foi cortado um fragmento da membrana amniótica. Este fragmento foi hidratado por 10 minutos em solução salina balanceada estéril<sup>15</sup> e posicionado, com sua face epitelial voltada para cima, sob a córnea, dentro da câmara anterior. A membrana foi introduzida na câmara anterior, através da ceratectomia, com auxílio de espátula e

<sup>11</sup> DF-Vasconcelos, modelo MCT, linha: MC-M2222 - São Paulo - Brasil.

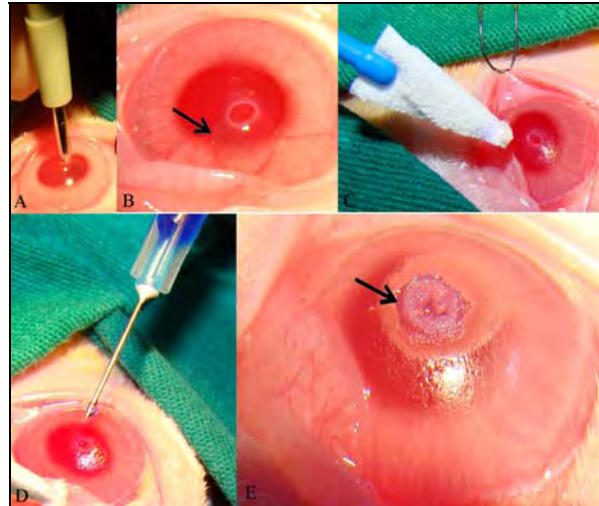
<sup>12</sup> Punch para biópsia - Kolplast Ci Ltda - São Paulo - Brasil.

<sup>13</sup> Merocel®Eye Spears - Medtronic Solan - EUA.

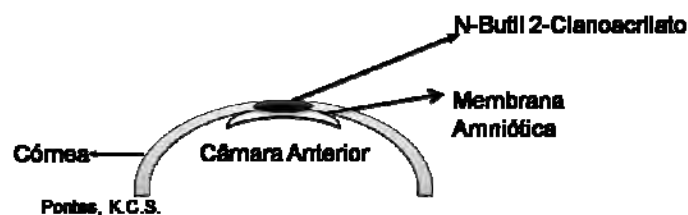
<sup>14</sup> Histoacryl® Blue Topical Skin Adhesive - B/Braun Sharing Expertise - USA.

<sup>15</sup> Solução Salina Balanceada Estéril - Ophthalmos® Indústria Farmacêutica - São Paulo - Brasil.

pinça de íris<sup>16</sup>. Em seguida, a córnea e a porção da membrana amniótica exposta através do defeito corneal foram secas cuidadosamente com esponja oftálmica<sup>13</sup> e aplicou-se o n-butil 2-cianoacrilato<sup>14</sup> (Fig. 5 e 6). A aplicação foi feita como a descrita para o G1, e a córnea foi irrigada com solução salina balanceada estéril<sup>15</sup>.

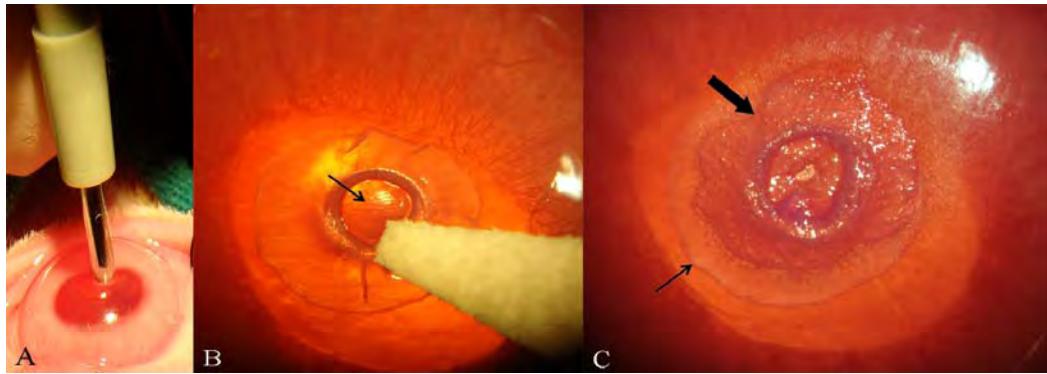


**Figura 4.** Imagens fotográficas ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G1. A – Ceratectomia penetrante com *punch* descartável; B – Extravasamento do humor aquoso (seta); C - Secagem da córnea com esponja oftálmica; D – Aplicação do n-butil 2-cianoacrilato e E – Aspecto final do procedimento. A seta demonstra o limite do adesivo sobre a lesão. Fotos da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.



**Figura 5.** Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G2. Ceratectomia penetrante, posicionamento da membrana amniótica xenóloga preservada sob a córnea e aplicação de n-butil 2-cianoacrilato sobre a lesão e a porção da membrana amniótica exposta. UFV, Viçosa, Brasil, 2009.

<sup>16</sup> Petrovich Instrumental Cirúrgico - São Paulo - Brasil



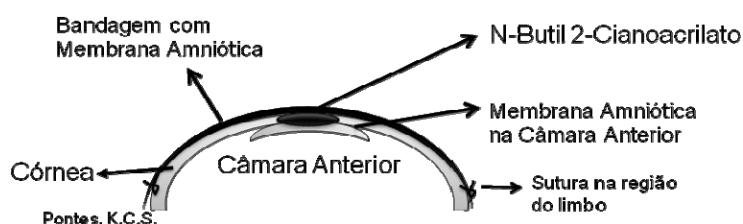
**Figura 6.** Imagens fotográficas ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G2. A – Ceratectomia penetrante com *punch* descartável; B – Secagem da córnea com esponja oftalmológica e visibilização da membrana sob a lesão e sua exposição através dela (seta); e C – Aspecto final do procedimento. Seta larga: limite do n-butil 2-cianoacrilato sobre a lesão, seta fina: limite da membrana na câmara anterior. Fotos da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

As córneas dos animais do G3 foram submetidas ao mesmo procedimento descrito para as córneas dos animais do G2, mas receberam bandagem de membrana amniótica bovina, preservada em glicerina 99%<sup>3</sup> em temperatura ambiente. A membrana foi previamente hidratada em solução salina balanceada estéril<sup>15</sup> por 10 minutos, cortada em tamanho compatível com a córnea e fixada ao limbo com sutura em pontos simples separados, utilizando-se fio de náilon monofilamentado 9-0<sup>17</sup> encastado da fábrica (Fig. 7 e 8).

As córneas dos animais do G4 sofreram ceratectomia como descrito para os outros grupos. Um fragmento de membrana amniótica bovina, conservada em glicerina 99%<sup>3</sup> em temperatura ambiente e previamente hidratada por 10 minutos, foi cortado em tamanho compatível com a lesão, posicionado sobre o defeito corneal com a sua face epitelial voltada para cima e suturado com pontos simples separados utilizando fio de náilon 9-0<sup>17</sup>, encastado da fábrica, nas bordas da lesão. A sutura transfixou o implante, mas não totalmente a córnea receptora. Os pontos foram aplicados primeiramente nos quadrantes superior, inferior e laterais da lesão, seguindo-se a aplicação dos demais A

<sup>17</sup> Micro Nylon® Preto Monofilamentar Oftálmico, agulha 2x 3/8 circ. espl 0,65 cm - Microsuture Ind. Com. Imp. Exp. Rep. Mat. Cir. Ltda - São Paulo - Brasil.

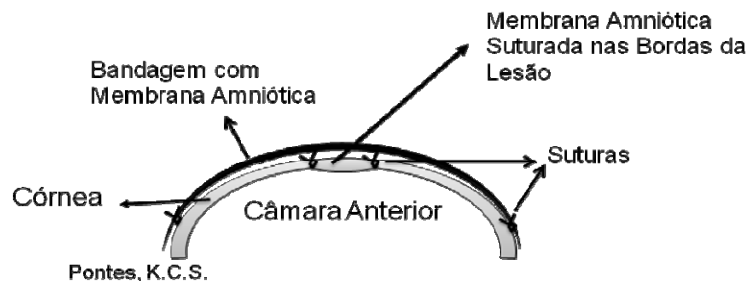
córnea foi seca com esponja oftálmica, para a verificação de eventuais pontos de vazamento. Posteriormente, aplicou-se bandagem com membrana, como descrito para o G3 (Fig. 9 e 10). Em seguida, as suturas de apoio para imobilização do bulbo do olho e o espéculo ocular foram removidos, como o foram nos demais grupos.



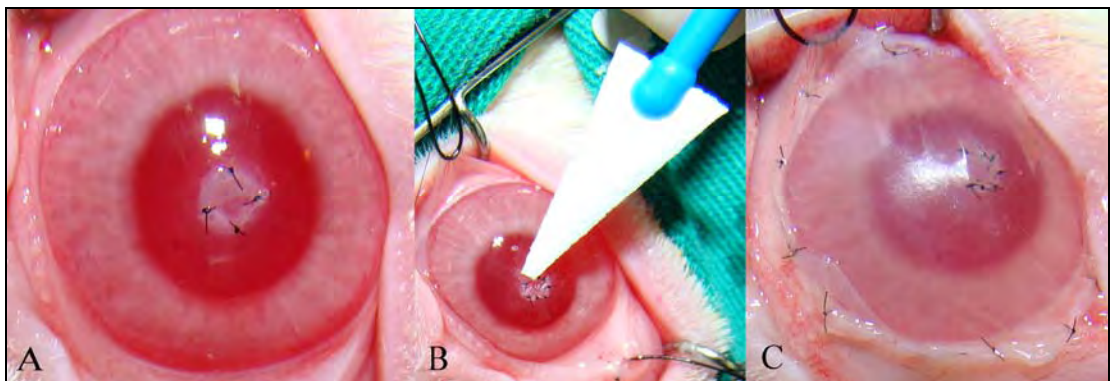
**Figura 7.** Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G3. Ceratectomia penetrante, posicionamento da membrana amniótica bovina preservada sob a córnea, aplicação de n-butil 2-cianoacrilato sobre a lesão e bandagem com membrana amniótica suturada ao limbo. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.



**Figura 8.** Imagem fotográfica ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G3. Aspecto final do procedimento. Seta preta fina: membrana na câmara anterior; seta branca: n - butil 2-cianoacrilato sobre a lesão; seta preta larga: sutura da membrana na região do limbo. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.



**Figura 9.** Desenho esquemático de procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G4. Ceratectomia penetrante, sutura da membrana amniótica bovina nas bordas da lesão com pontos simples separados e bandagem com o mesmo tipo de membrana suturada ao limbo. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.



**Figura 10.** Imagens fotográficas ilustrando o procedimento cirúrgico realizado nas córneas dos coelhos do G4. A - Aplicação da sutura para fixação da membrana primeiramente nos quatro pontos cardeais do defeito; B – Secagem da lesão com esponja oftalmológica para verificar vazamento do humor aquoso; C – Aspecto final do procedimento demonstrando bandagem fixada na região do limbo. Fotos da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

Imediatamente à finalização do procedimento cirúrgico, os animais receberam analgesia com sulfato de morfina<sup>18</sup> (1 mg/kg/SC) (Martin e Kirsipuu, 2006) e uma gota de colírio a base de neomicina 0,175%, polimixina B 10.000 UI/mL e bacitracina 0,025%<sup>2</sup> no olho operado. Foram oxigenados em máscara facial por cinco minutos, receberam colar do tipo elizabetano e foram transferidos para sala aquecida, onde permaneceram até a sua recuperação. O colar do tipo elizabetano foi mantido até a

<sup>18</sup> Dimorf® Sulfato de Morfina - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda - São Paulo - Brasil.

epitelização da lesão corneal, evidenciada pela negatividade do teste do tingimento pela fluoresceína.

No pós-operatório, o olho operado foi limpo com gaze estéril e solução de cloreto de sódio a 0,9%<sup>1</sup> estéril uma vez ao dia e aplicou-se colírio a base de neomicina 0,175%, polimixina B 10.000UI/mL e bacitracina 400UI<sup>2</sup> (1 gota a cada 4 horas, por 10 dias, durante o período diurno). Empregou-se, ainda, sulfato de morfina<sup>18</sup> (1mg/kg/SC, a cada 12 horas) por 2 dias.

O tempo decorrido desde o início da operação (suturas para a imobilização do bulbo do olho) até a sua conclusão foi anotado para a comparação entre os grupos.

A sutura aplicada diretamente à córnea dos animais do G4 foi removida quando a lesão mostrava-se epitelizada. Os pontos aplicados no limbo esclerocorneal, para o posicionamento da membrana amniótica como bandagem nos grupos 3 e 4, não foram removidos. Eles se soltaram espontaneamente, juntamente com os remanescentes da membrana.

## **Protocolo de Avaliação**

### ***Avaliação Clínico-oftalmológica***

O exame clínico foi realizado diariamente antes de se instilar qualquer colírio para que os parâmetros observados não sofressem alterações.

Avaliaram-se fotofobia e blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival e quemose, além dos parâmetros relacionados à condição corneal (pigmentação, edema e vascularização), câmara anterior (sinéquias, hifema, hipópio e fibrina) e cápsula anterior da lente (opacidade), classificados como presente ou ausente. Empregou-se o teste do tingimento pela fluoresceína<sup>6</sup>, classificado como positivo ou negativo, 48 horas após a cirurgia. O teste foi repetido diariamente até que o resultado apresentasse negatividade. Considerou-se, ainda, o tempo de permanência do n-butil 2-cianoacrilato nas córneas.

### ***Avaliação Histopatológica***

Para a colheita das córneas, que se deu aos 2, 7, 15, 21 e 30 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à eutanásia. Para tanto, foram sedados com acepromazina<sup>19</sup> (0,1 mg/kg/IV) e após quinze minutos receberam tiopental sódico<sup>20</sup> pela mesma via em dose suficiente para provocar parada respiratória e cardíaca. Só então foram aplicados 5 ml cloreto de potássio<sup>21</sup> por via intravenosa.

Os olhos operados foram enucleados e fixados em solução fixadora de Bouin. Decorridas 20 horas, as peças foram imersas em álcool a 70%, seccionadas longitudinalmente de maneira a se privilegiar a córnea, desidratadas e diafanizadas, incluídas em parafina, seccionadas em espessura de 4µm, em micrótomo rotativo manual, e coradas pela Hematoxilina-Eosina (H.E.) ou pelo *Picrus Sirius*<sup>22</sup>.

Histologia e histomorfometria foram conduzidas em microscopia de luz, avaliando-se o grau de epitelização da córnea, a presença de leucócitos, edema, vasos, fibroblastos, além das espessuras do epitélio e do estroma. A epitelização da córnea foi classificada como ausente e presente e, quando presente, incompleta ou completa; os leucócitos, o edema e os vasos neoformados foram classificados como presente ou ausente e, os fibroblastos e as espessuras do epitélio e do estroma o foram de acordo com os resultados da histomorfometria (Aherne e Dunnill, 1982).

As fibras colágenas presentes no estroma foram diferenciadas, seguindo orientações da literatura (Montes, 1996), como sendo do tipo I, ao apresentarem coloração amarela a vermelha sob luz polarizada e, do tipo III, quando menos birrefringentes, de cor verde, também sob luz polarizada. Os tipos de fibras colágenas presentes no estroma lesado de cada animal foram avaliados e quantificados, pela microscopia com luz polarizada, objetivando-se comparar os grupos.

---

<sup>19</sup> Acepran® - Univet S/A Indústria Veterinária - São Paulo - Brasil.

<sup>20</sup> Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda - São Paulo - Brasil.

<sup>21</sup> Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda - Ceará - Brasil.

<sup>22</sup> Picrosíruius - Hematoxilina - EasyPath® - Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda - São Paulo - Brasil.

### ***Avaliação Histomorfométrica***

Após a preparação das lâminas histológicas, foram obtidas fotomicrografias dos cortes histológicos de todos os animais nos períodos pré-determinados. Para a coloração por H.E., as fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz<sup>23</sup> em aumentos de 40x e 400x. Para a coloração pelo método do *Picrus Sirius*, as fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz polarizada<sup>24</sup> em aumento de 200x.

Foram fotografadas três regiões normais e três regiões lesadas de cada área (estroma e epitélio) e de cada animal. Assim, foram obtidas seis fotografias do estroma normal (3 fotografias em aumento de 40x e 3 fotografias em aumento de 400x), seis do estroma lesado (3 fotografias em aumento de 40x e 3 fotografias em aumento de 400x), três do epitélio normal (40x) e, por fim, três do epitélio lesado (40x).

As fotomicrografias foram avaliadas utilizando-se o software Image Pro Plus versão 4.5. Quantificaram-se os tipos celulares presentes no estroma, normal e lesado, e mensuraram-se as espessuras do estroma e do epitélio, normal e lesado, de cada animal nos períodos de observação pré-estabelecidos. Quando o estroma e/ ou o epitélio eram ausentes, foi atribuído valor igual a zero para fins estatísticos.

Para a quantificação dos tipos celulares presentes no estroma, foi desenhada 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. Tal gradícula foi posicionada sobre cada uma das três fotomicrografias, em aumento de 400x, do estroma normal e do estroma lesado. Foram realizadas contagens de todos os tipos celulares superpostos pelos pontos de intersecção da gradícula. Assim, cada tipo celular foi quantificado em 3 diferentes cortes histológicos da área normal e em 3 da área lesada, totalizando 300 pontos de intersecção no estroma normal e 300 no estroma lesado de cada animal e de cada grupo.

De cada lâmina histológica também foram realizadas medidas em  $\mu\text{m}$ . Para isto, cada fotomicrografia, em aumento de 40x, do estroma e do epitélio normal e lesado, foi

---

<sup>23</sup> Olympus® America Inc. - CX 31 - Color Camera for light microscopy SC 20

<sup>24</sup> Olympus® America Inc. - BX 50 - Color Camera Q Color 3

submetida à dez mensurações em regiões diferentes. Dessa forma, foram obtidas trinta mensurações do estroma lesado e trinta do estroma normal, além de trinta mensurações do epitélio lesado e trinta do epitélio normal de cada animal e de cada grupo.

### ***Avaliação à Estatística***

As variáveis foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran). Os dados que atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey em níveis de 5% de probabilidade. Aqueles que não atenderam às premissas de Normalidade e Homocedasticidade foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis complementados pelo teste de Dunn, em níveis de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. Para a espessura do epitélio lesado comparado ao normal foi empregado o teste t a 5% de probabilidade. A estatística foi executada entre os grupos sem associação com o período de observação e, em seguida, entre os grupos em cada período de observação. Todos os testes foram realizados empregando-se software GraphPad InStat Versão 3.0.

## **RESULTADOS**

### ***Avaliação Clínico-oftalmológica***

#### *Tempo de operação*

O tempo de operação, calculado em minutos, foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, exceto entre os grupos 1 e 2 (Tab. 1).

#### *Tempo de permanência do n-butil 2-cianoacrilato nas córneas*

O n-butil 2-cianoacrilato permaneceu aderido à lesão na córnea dos animais por períodos variados, mínimo de 7 e máximo de 26 dias, e não existiram diferenças pela análise de variância (ANOVA) ( $p > 0,05$ ) entre os grupos e subgrupos que o receberam.

As médias de permanência foram de 21,31 dias para o G1, de 21,39 dias para o G2 e de 20,41 dias para o G3.

**Tabela 1.** Médias observadas para o tempo de operação, em minutos, necessário para a realização de ceratectomia penetrante e tratamentos com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), relativamente aos grupos de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Média do tempo de operação (minutos)	
Grupo 1	28,95c ± 9,46
Grupo 2	24,00c ± 6,09
Grupo 3	42,85b ± 6,56
Grupo 4	73,07a ± 14,91

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

#### *Tempo de permanência da sutura no G4*

A média do tempo em que os animais do G4 permaneceram com a sutura na córnea foi de 24,90 dias. As médias, em dias, para o tempo de permanência da sutura nas córneas dos animais do G4, em relação a cada subgrupo, estão representadas na tabela 2.

#### *Fotofobia e blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival e quemose*

Os resultados das variáveis fotofobia e blefarospasmo foram iguais, razão pela qual estão representadas em conjunto. As medianas para a presença destes parâmetros foram de 13,99 dias no G1 e no G2, 21,42 dias no G3 e 30,00 dias no G4. Não foram notadas diferenças (p>0,01) entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Entretanto,

encontrou-se diferença no período de observação T5, correspondente a 30 dias, ( $p < 0,05$ ) pelo teste Dunn (Tab. 3).

**Tabela 2.** Médias observadas para os dias de permanência da sutura aplicada para fixação das membranas nas lesões das córneas dos coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas do G4, após a realização de ceratectomia penetrante, em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Subgrupos	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
Médias (dias)	2,00	7,00	15,00	16,33	13,29

T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; n= tamanho da amostra.

**Tabela 3.** Medianas de dias em que foram observados fotofobia e blefarospasmo em coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas, após realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
G1	2,00a	4,20a	6,42a	8,99a	0,99a
G2	2,00a	5,99a	4,99a	5,99a	1,99ab
G3	2,00a	4,99a	10,71a	9,99a	3,99ab
G4	2,00a	7,00a	15,00a	7,99a	12,00b

T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; G1= Grupo 1; G2= Grupo 2; G3= Grupo 3; G4= Grupo 4; n= tamanho da amostra em cada grupo. Medianas seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn.

A secreção ocular foi predominantemente do tipo mucosa e seromucosa em todos os animais e com maior intensidade nos primeiros sete dias da cirurgia. As medianas para os dias em que foi notada a presença da secreção foram de 13,99 dias para o G1, 14,28 dias para o G2, 17,14 dias para o G3 e 30,00 dias para o G4. Não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os subgrupos pelo teste Kruskal-Wallis.

As medianas para os dias em que a hiperemia conjuntival foi presente foram de 18,00 dias no G1, 21,42 dias no G2 e no G3 e 30,00 dias no G4. Para a quemose, a mediana foi de 1,99 dias em todos os grupos. Nessas variáveis, não foram observadas diferenças ( $p>0,01$ ) entre os grupos e subgrupos, ao teste de Kruskal-Wallis.

#### *Teste do tingimento pela fluoresceína*

As medianas, em dias, quanto ao teste do tingimento pela fluoresceína foram de 30,00 dias no G1 e no G4, de 22,85 dias no G2 e de 21,99 dias no G3. Embora sem diferença estatística ( $p>0,01$ ) entre os tratamentos pelo teste Kruskal-Wallis, durante todos os momentos, relativamente ao teste do tingimento pela fluoresceína, notou-se que aos 15 e 30 dias, um maior número de córneas estavam epitelizadas nos grupos 2 e 3 comparando-se aos grupos 1 e 4 (Tab. 4).

#### *Pigmentação, vascularização e edema corneal*

A pigmentação e a vascularização não foram observadas nas córneas operadas de nenhum grupo durante o período experimental.

A bandagem com membrana amniótica dificultou e, algumas vezes, impossibilitou a avaliação da córnea. O edema corneal, quando detectado apenas após a queda da bandagem, foi considerado presente no período precedente. Tal parâmetro foi visibilizado unicamente na área perilesional e houve diferenças ( $p<0,05$ ) entre os grupos pelo teste Dunn (Tab. 5). A diferença também foi significativa ( $p<0,05$ ) no T5, quando se avaliaram os períodos de observação, isoladamente, pelo teste Dunn (Tab. 6).

**Tabela 4.** Medianas de dias em que foi observada a positividade ao teste do tingimento pela fluoresceína em coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas, após realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
G1	2,00a	7,00a	15,00a	10,99a	15,99a
G2	2,00a	7,00a	10,99a	14,99a	9,99a
G3	2,00a	7,00a	10,99a	13,99a	10,99a
G4	2,00a	7,00a	15,00a	13,99a	16,99a

T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; G1= Grupo 1; G2= Grupo 2; G3= Grupo 3; G4= Grupo 4; n= tamanho da amostra em cada grupo. Medianas seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 5.** Medianas de dias em que foi observado o edema de córnea em coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas, após realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4). UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Grupos	G1 (n=15)	G2 (n=15)	G3 (n=15)	G4 (n=15)
Medianas (dias)	21,42ab	12,85b	17,14b	30,00a

G1= Grupo 1; G2= Grupo 2; G3= Grupo 3; G4= Grupo 4; n= tamanho da amostra. Medianas seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn.

**Tabela 6.** Medianas de dias em que foi observado edema de córnea em coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas, após realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
Grupo 1	2,00a	7,00a	12,00a	8,99a	15,99ab
Grupo 2	2,00a	2,99a	7,99a	7,99a	7,99a
Grupo 3	2,00a	5,60a	15,00a	6,99a	9,00ab
Grupo 4	2,00a	7,00a	15,00a	18,99a	24,99b

T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; G1= Grupo 1; G2= Grupo 2; G3= Grupo 3; G4= Grupo 4; n= tamanho da amostra em cada grupo. Medianas seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn.

#### *Sinéquias, opacidade na cápsula anterior da lente*

A sinéquia, não divergiu entre os grupos ( $p>0,01$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis. Houve sinéquia anterior em dois animais do G1. Em um deles, localizada na posição de 1 hora, ela se desfez no 4º dia da cirurgia. No outro, ela foi visibilizada na posição 9 horas e persistiu por todo o período de observação.

A opacidade da cápsula anterior da lente apresentou-se de maneira focal (Fig. 11) e com diferença estatística ( $p<0,05$ ) pelo teste de Dunn entre os grupos e subgrupos (Tab. 7 e 8).

#### Achados à Histopatologia

##### *Epitélio*

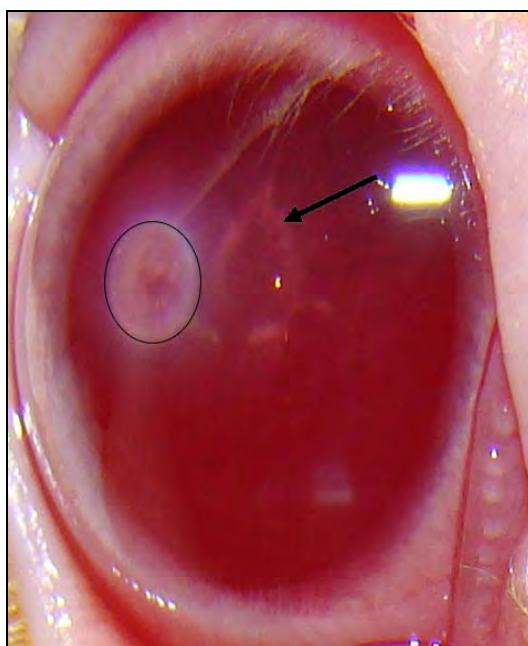
Em todos os grupos, a epitelização foi evidenciada somente a partir dos 15 dias de observação. Neste período, no G1, a epitelização mostrava-se incompleta nos três

animais, no G2 em um e no G4 em dois animais. No G3 a epitelização mostrou-se completa nos três animais (Tab. 9).

**Tabela 7.** Medianas de dias em que foi observada a opacidade da cápsula anterior da lente de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas, após realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4). UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Grupos	G1 (n=15)	G2 (n=15)	G3 (n=15)	G4 (n=15)
Medianas (dias)	30,00a	30,00a	0,00ab	0,00b

G1= Grupo 1; G2= Grupo 2; G3= Grupo 3; G4= Grupo 4; n= tamanho da amostra. Medianas seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn.



**Figura 11.** Imagem fotográfica de córnea de coelho do G1 10 dias após a realização de ceratectomia penetrante e aplicação de n-butil 2-cianoacrilato. Área no interior do círculo: opacidade de córnea. Seta: opacidade na cápsula anterior da lente. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

Aos 21 dias de observação, um animal do G1 ainda apresentou epitelização incompleta. Neste mesmo período, todos os animais dos outros grupos estavam com a epitelização completada (Tab. 9).

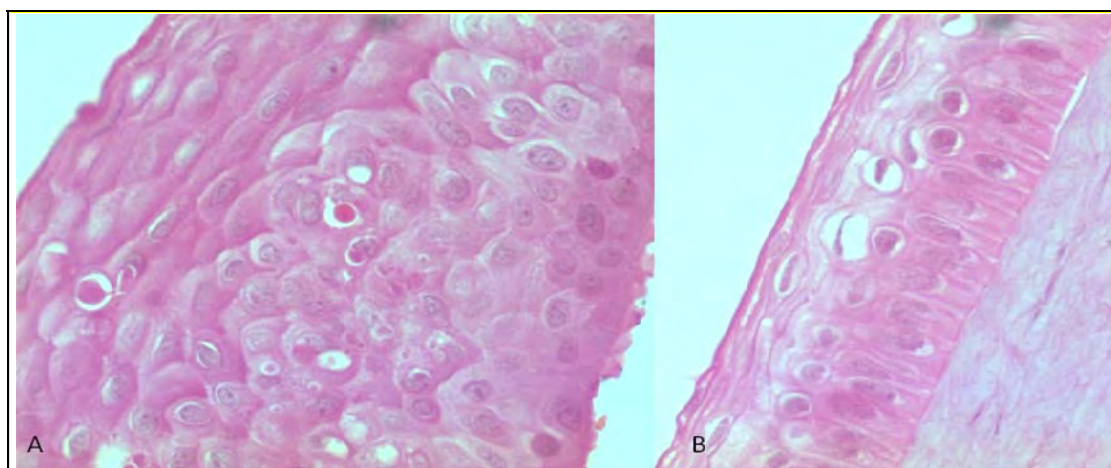
**Tabela 8.** Medianas de dias em que foi observada a opacidade da cápsula anterior da lente de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas, após realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
Grupo 1	2,00a	7,00a	15,00a	21,00a	30,00a
Grupo 2	0,00b	7,00a	15,00a	21,00a	30,00a
Grupo 3	0,00b	0,00a	4,99a	21,00a	0,00a
Grupo 4	0,00b	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; G1= Grupo 1; G2= Grupo 2; G3= Grupo 3; G4= Grupo 4; n= tamanho da amostra em cada grupo. Medianas seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn.

Aos 30 dias da cirurgia, um animal do G1 também apresentou a epitelização incompleta, enquanto nos outros grupos a epitelização estava completa em todos os animais (Tab. 9).

Aos quinze dias da cirurgia, o epitélio apresentou-se hiperplásico com as células epiteliais hipertróficas em dois animais do grupo 2 (Fig. 12) e em mais dois animais do grupo 3. Aos 21 dias o epitélio mostrou-se hiperplásico em todos os animais. Aos 30 dias o epitélio estava nas mesmas condições descritas em dois animais do G1 e do G2 e em todos os animais do G3 e do G4.



**Figura 12.** Fotomicrografias da córnea de coelho do G2, 15 dias após a cirurgia. A – Epitélio de área lesada reestruturado e hiperplásico com células basais hipertróficas; B – Epitélio de aspecto normal de área não lesada. H.E. 400x. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

**Tabela 9.** Número de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, adultas que, histologicamente, demonstrou epitelização da córnea presente (P) e incompleta (I) após a realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

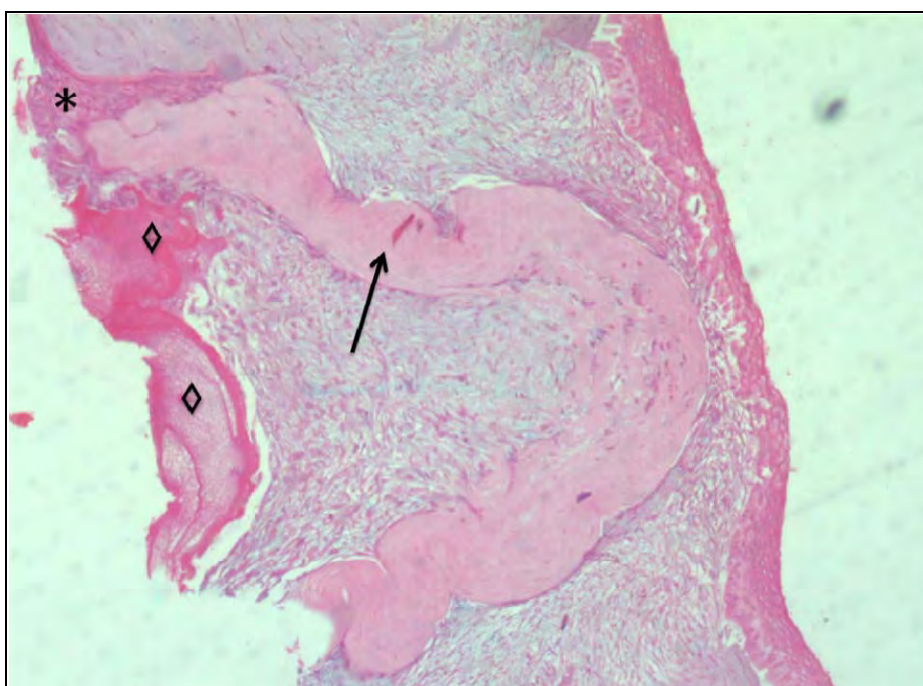
Subgrupos	T1 (n= 3)		T2 (n=3)		T3 (n= 3)		T4 (n= 3)		T5 (n= 3)	
	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I
G1	0	-	0	-	3	3	3	1	3	1
G2	0	-	0	-	3	1	3	0	3	0
G3	0	-	0	-	3	0	3	0	3	0
G4	0	-	0	-	3	2	3	0	3	0

T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias, G1= Grupo 1; G2= Grupo 2; G3= Grupo 3; G4= Grupo 4; n= tamanho da amostra de cada grupo; P= Presente; I= Incompleta; (-) = Não visibilizada.

A adesão da membrana basal do epitélio ao estroma foi notada em 3 animais do G1, em 5 animais do G2 e do G3 e, em 1 animal do G4. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

#### *Membrana amniótica*

A membrana amniótica aplicada no meio intracameral, no G2 e no G3, pôde ser visibilizada em 13 animais de cada grupo. Ela foi incorporada às córneas receptoras, mas ainda pôde ser observada aos 30 dias da cirurgia (Fig. 13). No G4, a membrana amniótica suturada diretamente à córnea foi visibilizada em 9 animais, onde permaneceu no local por um período máximo de 15 dias. Nos outros animais, supõe-se que tenham se desintegrado na câmara anterior (no G2 e G3), que tenham se desprendido da córnea (no G4) ou, ainda, que foram integradas às córneas receptoras.



**Figura 13.** Fotomicrografia de córnea de coelho do G3, 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico. Nota-se a membrana amniótica incorporada ao estroma (seta). (◇) Acúmulo de exudato na câmara anterior; (\*) Migração das células endoteliais. H.E. 40x. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

### *Estroma*

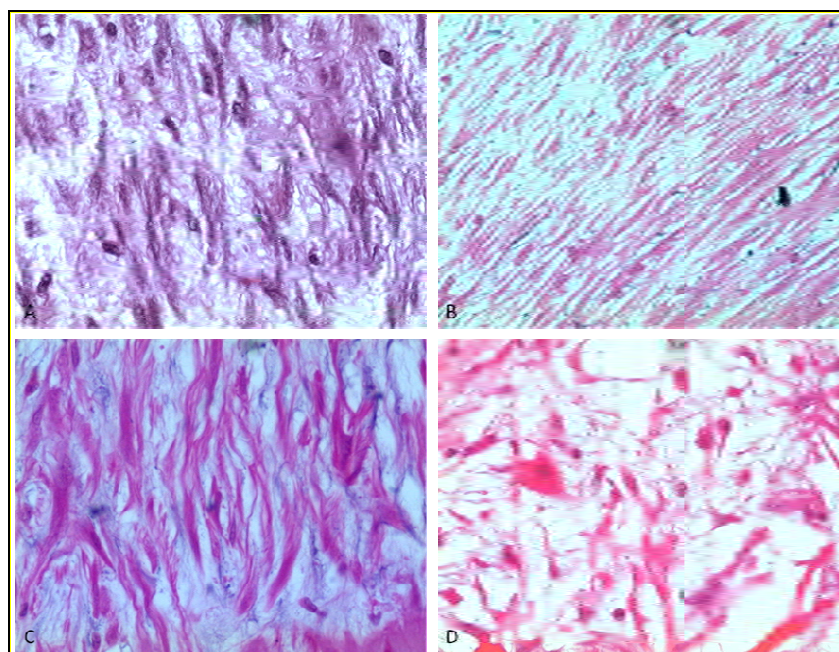
No período pós-operatório notou-se a presença de células inflamatórias no estroma lesado e perilesional das córneas, em todos os grupos, com diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre eles pelo teste de Dunn (Tab. 10).

**Tabela 10.** Número de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, que apresentou, histologicamente, células inflamatórias no estroma da área lesada ou perilesional das córneas, em cada grupo. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

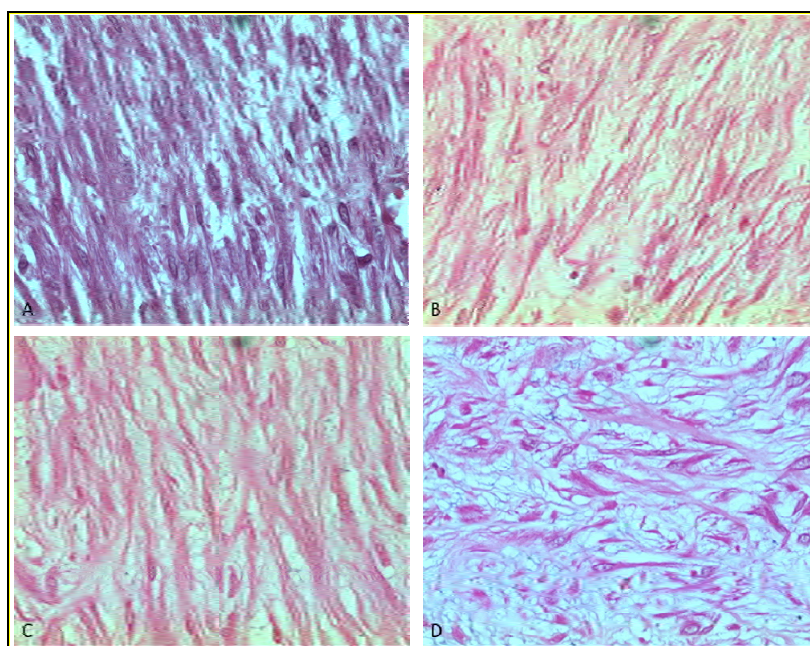
Grupos	Número de animais
G1 (n=15)	4ab
G2 (n= 15)	2b
G3 (n= 15)	2b
G4 (n= 15)	10a

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; G4 = Grupo 4. n = tamanho da amostra. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de probabilidade

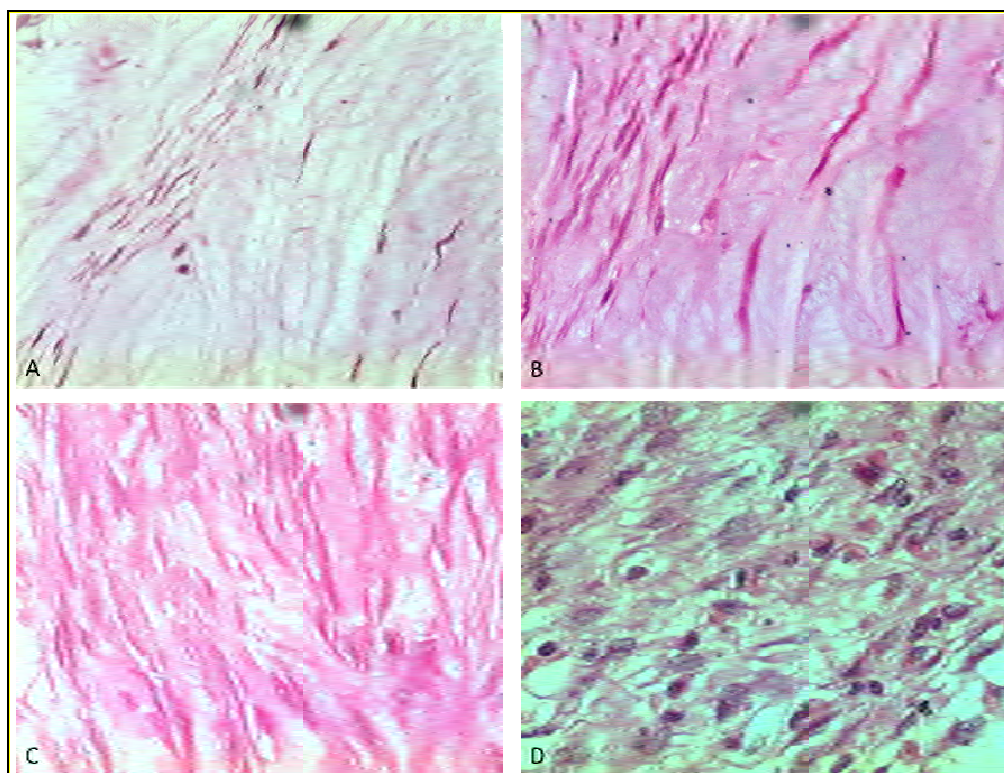
O estroma na área da lesão, aos 15 dias da cirurgia, mostrou-se permeado por diversos fibroblastos em todos os grupos e com as fibras de colágeno em organização no G1, G2 e G3. No G4 as fibras colágenas estavam desorganizadas e dispostas frouxamente (Fig. 14). Aos 21 dias, as córneas tinham o estroma permeado por vários fibroblastos e as fibras de colágeno em organização em todos os grupos (Fig. 15). Aos 30 dias, o estroma estava relativamente organizado e com alguns fibroblastos no G1, G2 e G3. No G4 as fibras colágenas ainda estavam em organização e existiam vários fibroblastos (Fig. 16).



**Figura 14.** Fotomicrografias do estroma lesado das córneas de coelhos, 15 dias após a realização do procedimento cirúrgico. A – Estroma de córnea do G1; B – Estroma de córnea do G2; C – Estroma de córnea do G3; D – Estroma de córnea do G4. A, B e C apresentam diversos fibroblastos e as fibras de colágeno em organização. Em D notam-se vários fibroblastos e as fibras de colágeno desorganizadas e dispostas frouxamente. H.E. 400x. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

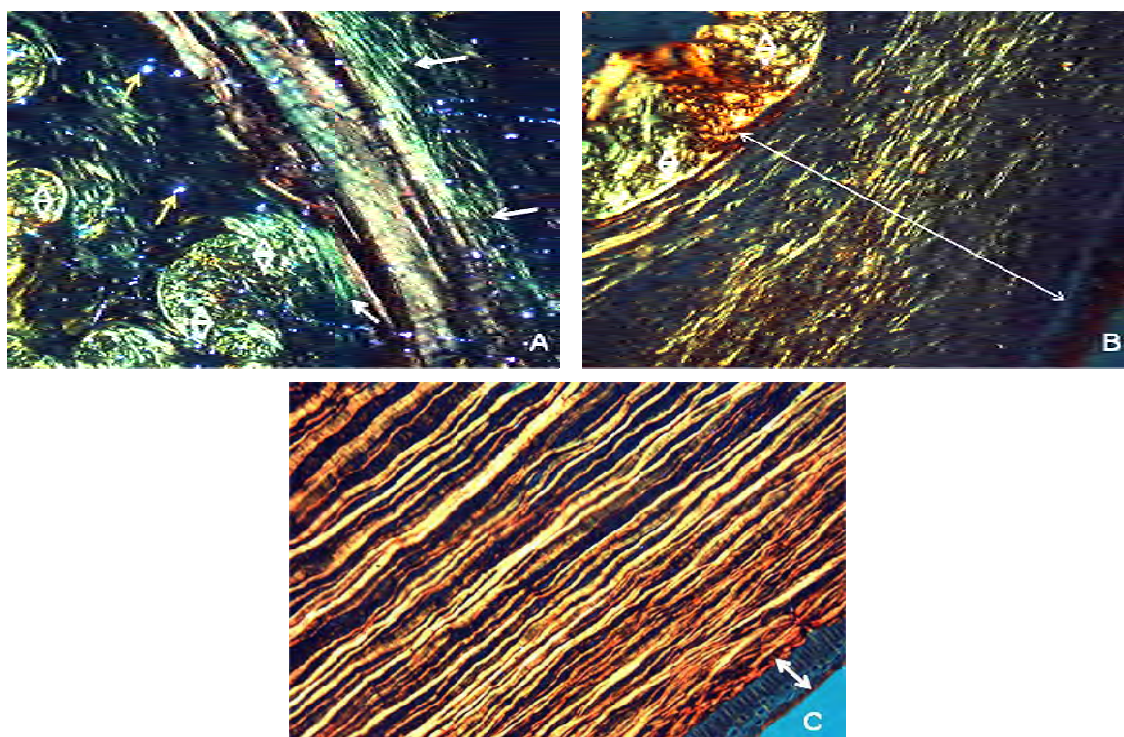


**Figura 15.** Fotomicrografias do estroma lesado das córneas de coelhos, 21 dias após a realização do procedimento cirúrgico. A – Estroma de córnea do G1; B – Estroma de córnea do G2; C – Estroma de córnea do G3; D – Estroma de córnea do G4. A, B, C e D apresentam diversos fibroblastos e as fibras de colágeno em organização. H.E. 400x. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.



**Figura 16.** Fotomicrografias do estroma lesado das córneas de coelhos, 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico. A – Estroma de córnea do G1; B – Estroma de córnea do G2; C – Estroma de córnea do G3; D – Estroma de córnea do G4. A, B, C apresentam alguns fibroblastos e o estroma relativamente organizado, enquanto D ainda demonstra vários fibroblastos ativados e fibras colágenas em organização. H.E. 400x. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

Aos 15 e 21 dias da cirurgia, houve predominância de fibras colágenas do tipo III em todos os grupos, caracterizadas por fibras mais delgadas, menos birrefringentes, visibilizadas na cor verde. Aos 30 dias, a quantidade de colágeno tipo III foi equivalente a do tipo I, principal componente da arquitetura normal do estroma, também em todos os grupos (Fig. 17).



**Figura 17.** Fotomicrografias de córnea de coelhos do G2. A – Estroma lesado 21 dias após a cirurgia. Nota-se a predominância de colágeno do tipo III, apresentado em verde (setas brancas). B – Estroma lesado 30 dias após a cirurgia (seta). Nota-se equivalência na quantidade de colágeno do tipo I e III. C – Estroma normal. Na porção não evidenciada pela polarização localiza-se o epitélio da córnea (seta). Nota-se predominância de colágeno do tipo I, mais birrefringente, apresentado em vermelho e amarelo. Setas laranja: artefatos; (◊) membrana amniótica intracamerar. *Sirius Red*. 200x. Foto da autora. UFV, Viçosa, Brasil, 2010.

#### Achados à Histomorfometria

##### *Fibroblastos*

Entre os grupos não houve diferença ( $p > 0,05$ ) pelo teste ANOVA para o número de fibroblastos presentes no estroma, quantificados pela histomorfometria (Tab. 11 e 12).

**Tabela 11.** Médias e desvio padrão do número de fibroblastos, quantificado pela histomorfometria, presente no estroma corneal lesado de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, após ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4). UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Grupos	Número de Fibroblastos
G1 (n=15)	19,40a ± 15,21
G2 (n= 15)	17,17a ± 12,38
G3 (n= 15)	16,02a ± 15,36
G4 (n= 15)	22,08a ± 13,70

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; G4 = Grupo 4. n = tamanho da amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste ANOVA a 5% de probabilidade.

### *Epitélio e estroma*

A espessura do epitélio lesado e do estroma lesado entre os grupos não apresentou diferenças ( $p > 0,05$ ) pelo teste ANOVA (Tab. 13). Diferença também não foi verificada ( $p > 0,05$ ) entre o epitélio lesado e normal de cada grupo pelo teste t (Tab. 14).

Aos 15 dias da operação, houve diferença ( $p < 0,05$ ) para a espessura do epitélio lesado entre os grupos pelo teste Tukey. Nos outros períodos de observação não houve diferença (Tab. 15). Também não houve significância ( $p > 0,05$ ) para as diferenças observadas na espessura do estroma entre os grupos relacionados aos subgrupos pelo teste ANOVA (Tab. 16).

**Tabela 12.** Médias e desvio padrão do número de fibroblastos, quantificado pela histomorfometria, presente no estroma corneal lesado de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, após a realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Número de Fibroblastos					
Grupos	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
G1	0,00a	5,88 ± 4,54a	31,00 ± 2,33a	28,33 ± 9,70a	31,77 ± 6,54a
G2	0,00a	10,88 ± 10,00a	31,33 ± 1,20a	26,00 ± 11,09a	17,66 ± 6,00a
G3	0,00a	0,00a	34,22 ± 4,59a	24,33 ± 1,45a	21,55 ± 5,64a
G4	0,00a	17,44 ± 15,43a	32,11 ± 5,71a	29,44 ± 5,87a	31,44 ± 7,01a

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; G4 = Grupo 4; T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; n= tamanho da amostra em cada grupo. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste ANOVA a 5% de probabilidade.

**Tabela 13.** Médias e desvio padrão da espessura, mensurados em micrômetros pela histomorfometria, do estroma e do epitélio corneal lesados de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, após ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4). UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Grupos	Espessuras em $\mu\text{m}$	
	Epitélio Lesado	Estroma Lesado
G1 (n= 15)	38,69a $\pm$ 41,42	413,17a $\pm$ 363,05
G2 (n= 15)	43,75a $\pm$ 36,56	265,16a $\pm$ 224,21
G3 (n=15)	47,82a $\pm$ 42,39	314,95a $\pm$ 291,90
G4 (n=15)	47,21a $\pm$ 43,71	319,78a $\pm$ 271,48

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; G4 = Grupo 4; n= tamanho da amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste ANOVA

**Tabela 14.** Médias e desvio padrão, mensurados em micrômetros pela histomorfometria, da espessura do epitélio lesado e normal de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, após ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4). UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Grupos	Espessuras do epitélio em $\mu\text{m}$	
	Epitélio Lesado	Epitélio Normal
G1 (n= 15)	38,69a $\pm$ 41,42	45,40a $\pm$ 6,72
G2 (n= 15)	43,75a $\pm$ 36,56	48,65a $\pm$ 4,69
G3 (n=15)	47,82a $\pm$ 42,39	41,54a $\pm$ 6,03
G4 (n=15)	47,21a $\pm$ 43,71	50,29a $\pm$ 5,25

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; G4 = Grupo 4; n= tamanho da amostra. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t

**Tabela 15.** Médias e desvio padrão da espessura do epitélio corneal lesado, mensurados pela histomorfometria em micrômetros, de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, após a realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Espessura do epitélio corneal em $\mu\text{m}$					
Subgrupos	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
G1	0,00a	0,00a	53,65d $\pm$ 10,32	84,10a $\pm$ 29,49	55,68a $\pm$ 51,76
G2	0,00a	21,19a $\pm$ 36,70	88,60a $\pm$ 24,00	49,53a $\pm$ 14,67	59,41a $\pm$ 12,10
G3	0,00a	0,00a	74,10b $\pm$ 8,28	87,87a $\pm$ 27,16	77,13a $\pm$ 13,50
G4	0,00a	0,00a	55,12c $\pm$ 4,25	84,94a $\pm$ 14,56	96,02a $\pm$ 25,61

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; G4 = Grupo 4; T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; n= tamanho da amostra em cada grupo. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

**Tabela 16.** Médias e desvio padrão da espessura do estroma corneal lesado, mensurados pela histomorfometria em micrômetros, de coelhos da raça Nova Zelândia branca, fêmeas, após a realização de ceratectomia penetrante e tratamento com n-butil 2-cianoacrilato (G1), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato (G2), membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato e recobrimento com bandagem (G3) e, membrana amniótica suturada à lesão e recobrimento com bandagem (G4), em relação aos subgrupos. UFV, Viçosa, Brasil, 2010

Espessura do estroma corneal em $\mu\text{m}$					
Subgrupos	T1 (n=15)	T2 (n=12)	T3 (n=9)	T4 (n=6)	T5 (n=3)
G1	0,00a	0,00a	681,59a $\pm$ 160,94	835,56a $\pm$ 52,67	628,69a $\pm$ 100,50
G2	0,00a	87,53a $\pm$ 151,61	412,77a $\pm$ 148,97	346,92a $\pm$ 165,56	478,59a $\pm$ 124,45
G3	0,00a	0,00a	588,18a $\pm$ 140,19	439,66a $\pm$ 249,62	546,92a $\pm$ 29,32
G4	0,00a	165,95a $\pm$ 204,65	375,82a $\pm$ 157,60	519,42a $\pm$ 338,54	537,71a $\pm$ 99,72

G1 = Grupo 1; G2 = Grupo 2; G3 = Grupo 3; G4 = Grupo 4; T1= 2 dias; T2= 7 dias; T3= 15 dias; T4= 21 dias; T5= 30 dias; n= tamanho da amostra em cada grupo. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste ANOVA a 5% de probabilidade

## DISCUSSÃO

No presente trabalho, optou-se pela espécie bovina como a doadora da membrana amniótica, devido sua maior espessura e resistência em comparação com a de cães e, ainda, devido sua maior disponibilidade quando comparada à da espécie equina. A glicerina, na concentração utilizada, mostrou-se eficiente como meio de conservação da membrana amniótica bovina em temperatura ambiente, foi de fácil aquisição, manipulação e acondicionamento, corroborando com os resultados da literatura (Pigossi, 1967; Pontes et al., 2008; Pontes et al., 2010).

O n-butil 2-cianoacrilato foi aprovado para utilização clínica no início de 1996 (Ínal et al., 2006). Além desse fato importante, ele foi utilizado na presente pesquisa porque, segundo a literatura, os derivados de n-butil cianoacrilato apresentam maior resistência à tensão do que os derivados cuja cadeia é maior (Vote e Elder, 2000) e, ainda, porque proporcionou menor toxicidade e maior resistência à pressão intraocular, em estudo recente (Chen et al., 2007).

Estabelecer a média e a diferença do tempo para a realização das operações entre os grupos, permitiu concluir que a técnica empregada no G2 foi a mais simples de ser executada. No procedimento do G1, aparentemente de mais fácil realização do que o do G2, houve extravasamento constante do humor aquoso dificultando a secagem da superfície para posterior aplicação do adesivo. No procedimento do G2, assim como no do G3, a secagem da superfície foi obtida com maior facilidade porque a membrana amniótica, aplicada dentro da câmara anterior, provocou a diminuição do extravasamento do humor aquoso. A bandagem aplicada no G3 e no G4 e, ainda, a sutura aplicada à córnea do G4 para a fixação da membrana amniótica, prolongou o tempo para a realização da operação nestes grupos tornando sua execução mais trabalhosa.

A membrana amniótica, aplicada dentro da câmara anterior, ou como bandagem, não interferiu no tempo de permanência do adesivo nas córneas. Ele foi o bastante para que a reparação da córnea se desse não tendo sido necessária a sua reaplicação em quaisquer dos pacientes. Em contrapartida, Fogle et al. (1980) sugeriram que o adesivo deveria permanecer aderido no local por no mínimo 4 semanas.

O reaparecimento ou agravamento da fotofobia e do blefarospasmo deveu-se ao trauma mecânico causado pela remoção da sutura das córneas do G4. Tal acontecimento foi verificado entre os 22 e 30 dias da cirurgia, mesmo período em que foi feita a remoção dos pontos aplicados à córnea.

A bandagem com membrana amniótica, suturada na região do limbo, não acrescentou vantagens, prolongou o tempo de cirurgia dos grupos que a receberam, impediu o exame da córnea e da câmara anterior no período em que esteve presente e não diminuiu o desconforto ocular. Optou-se pela fixação da bandagem ao limbo e não na região do fórnix conjuntival dada a facilidade de execução. Admite-se que, se a região de fixação fosse o fórnix conjuntival o desconforto seria reduzido, entretanto o tempo de cirurgia poderia ser mais prolongado e, ainda assim, o exame da córnea e da câmara anterior não poderia ser realizado.

Nesta pesquisa, o fato da fotofobia, do blefarospasmo, da secreção ocular, da hiperemia conjuntival e da quemose se manifestarem e demonstrarem evidências de atenuamento aos sete dias da cirurgia, tendendo à normalidade com o decorrer do período de observação, pode ser atribuído à diminuição temporal da inflamação e à adaptação dos animais à nova condição. Estes resultados corroboraram com os da literatura (Ollivier et al., 2001).

A quemose, observada em todos os grupos, pode ser atribuída à irritação mecânica da conjuntiva causada pela manipulação cirúrgica e pela aplicação dos pontos de arrimo para promover imobilização do bulbo ocular, observado em estudo anterior (Pontes et al., 2008). Também, a presença de hiperemia conjuntival, por período maior que o notado para a quemose, pode ser imputada pela irregularidade da superfície do adesivo e pela sutura aplicada às córneas que a receberam.

Neste estudo, a ausência de vascularização em todas as córneas permite admitir que o n-butil 2-cianoacrilato induziu pouca toxicidade à córnea. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Ollivier et al. (2001) quando aplicaram o mesmo adesivo na superfície da córnea, mas contrariam os resultados de Aronson et al. (1970) que verificaram a formação vascular na córnea ao aplicarem o octil-cianoacrilato em sua superfície. A literatura é clara quando afirma que a toxicidade do adesivo é menor quando este possui cadeia mais longa (Pani et al., 1968; Refojo et al., 1971). Por isso, seria errado inferir que o octil-cianoacrilato possui maior toxicidade do que o n-butil 2-cianoacrilato baseando-se apenas em resultados da literatura envolvendo estes dois

adesivos isoladamente. Também não se pode afirmar que a ausência de vasos na córnea ocorreu como resultado da ação antiangiogênica da membrana amniótica, pois no G1, que não a recebeu como tratamento, também não foi notada a gênese de vasos. A ausência da vascularização justifica a não observação de pigmentação na córnea, pois de acordo com Kern (1990), a vascularização precede a deposição de pigmento na córnea.

O edema de córnea é um parâmetro importante para se constatar a integridade do epitélio e do endotélio corneal. A ausência de uma destas duas camadas celulares permite a entrada de água no estroma resultando em edema corneal (Slatter e Dietrich, 2007). Os grupos 2 e 3, de acordo com os resultados para o edema de córnea (Tab. 5 e 6), foram os que responderam melhor com relação à reparação das camadas epiteliais e endoteliais da córnea. Os indicativos que reforçam este resultado são a completude da epitelização da córnea que aconteceu já aos 15 dias da cirurgia em alguns animais destes grupos (Tab. 9) e a adesão da membrana basal ao estroma em maior número de animais, também nos mesmos. A hiperplasia epitelial, verificada quando o epitélio já se encontra em processo de reorganização celular, também foi observada primeiramente no G2 (Tab. 16), indicando que este grupo estava em fase de reparação mais adiantada que os demais grupos. De acordo com a literatura, a hiperplasia epitelial resulta de uma tentativa de restaurar a conformação original da córnea, bem como de se restabelecer a regularidade de sua superfície (Netto et al., 2005).

Acredita-se que os resultados favoráveis para a reparação da lesão, verificados no G2 e no G3, sejam provenientes da atuação da membrana amniótica como ponte para a migração celular, evidenciada, histologicamente, pela sua presença até 30 dias decorridos da cirurgia em mais animais do G2 e G3 do que dos outros grupos. A atuação da membrana amniótica, como ponte para a migração celular, favorece a reparação epitelial e foi verificada em estudos anteriores (Prause, 1983; Wilcock, 2008). Supõe-se que o adesivo tenha atuado como barreira física contra a entrada de leucócitos, provenientes do filme lacrimal, no estroma, e que, quando em associação com a membrana amniótica, foram notados melhores resultados porque a membrana também atuou diminuindo a inflamação, porém sem eliminá-la. Os leucócitos fazem parte do processo de reparação e, acredita-se, que não devam ser completamente eliminados desse processo. De acordo com a literatura, sua presença é importante na remoção de componentes celulares provenientes de ceratócitos que sofreram apoptose e na produção de várias citocinas essenciais na resposta imune (Cassatella, 1995; Wilson et al., 2001; Wilcock, 2008).

A substituição de parte do colágeno do tipo III pelo tipo I aos 30 dias decorridos da cirurgia corrobora com os achados da literatura. O colágeno tipo III desempenha papel importante na contração e no fechamento da lesão nos processos de reparação, por isso ele está aumentado nas fases iniciais deste processo e, gradualmente, é substituído pelo colágeno tipo I, mais abundante na córnea normal (Kato et al., 2000; Michelacci, 2003).

Os animais do grupo 1 não tiveram as estruturas intraoculares protegidas pela membrana amniótica posicionada na câmara anterior, permitindo a penetração do adesivo, com a ocorrência de sinéquias e de opacidade na cápsula anterior da lente. A introdução acidental do adesivo na câmara anterior está associada, dentre outras complicações, à formação de sinéquias anterior e posterior (Markowitz et al., 1995).

Buscando-se uma alternativa para o uso do viscoelástico, foi empregada neste trabalho a membrana amniótica na face interna da lesão corneal que, além de atuar na epitelização, impediu o contato do adesivo com as estruturas intraoculares. A aplicação de viscoelástico na câmara anterior, por prevenir tais intercorrências, está indicada em perfurações que ultrapassam a 1 mm de diâmetro (Hirst e De Juan, 1982). Sua remoção é recomendada como medida preventiva ao glaucoma (Wilkie e Willis, 1999; Watts e Austin, 1999; Wilkie e Gemensky-Metzler, 2004), mas a manipulação dentro da câmara anterior, necessária para a remoção do viscoelástico, é responsável por perdas de células endoteliais (Rafuse e Nichols, 1992).

A opacidade na cápsula anterior da lente no G1 decorreu, admite-se do contato com o adesivo, que, durante a aplicação, penetrou a câmara anterior. No G2 e no G3 as manobras realizadas para o correto posicionamento da membrana dentro da câmara anterior podem ter lesado a cápsula da lente. A opacidade resultante, embora em apenas um ponto muito pequeno, foi considerada. Ela desapareceu em alguns animais durante o período de observação. A membrana amniótica, pelas observações, impediu o contato do adesivo com as estruturas intraoculares. Quando tal acontecimento se fez presente no G1, a opacidade da cápsula lenticular mostrou-se de maior importância (Fig. 17). No G4 a opacidade foi ausente em todos os animais. Nesse grupo, não foi utilizado adesivo nem realizado qualquer tipo de manipulação dentro da câmara anterior. No G3, foi observada a opacidade da lente apenas em alguns animais. Por isso, não houveram diferenças nas medianas entre ele e o G4 e entre ele e o G2.

## CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos, na maneira como esta pesquisa foi realizada, pode-se concluir que:

- A aplicação do adesivo, diretamente sobre a úlcera de córnea perfurada, sem a utilização da membrana amniótica na câmara anterior, não deve ser executada.
- A membrana amniótica em camada única, usada isoladamente, pode ser utilizada em córneas com lesões perfuradas de 2 mm de diâmetro.
- A técnica cirúrgica utilizando a membrana amniótica associada ao n-butil 2-cianoacrilato foi de mais fácil execução e mais eficiente na reparação de lesões de córneas com perfurações de 2mm de diâmetro do que as técnicas utilizando somente o adesivo ou somente a membrana amniótica suturada à lesão.
- A técnica empregada no grupo 2 demonstrou ser a melhor dentre as estudadas, pois foi a de mais fácil execução e a que, junto com o grupo 3, proporcionou eficiência na reparação das lesões.
- A associação da membrana amniótica com o adesivo é indicada neste tipo de lesão.

## BIBLIOGRAFIA

1. AHERNE, W.A.; DUNNILL, M.S. Point counting and the estimation of volume fraction. In: \_\_\_\_\_. **Morphometry**. Londres: Edward Arnold, 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. ARONSON, S.B.; McMASTER, P.R.B.; MOORE, T.E.; COON, M.A. Toxicity of the cyanoacrylates. **Archives of Ophthalmology**, v.84, p.342-349, 1970.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. BORGES, A.P.B.; POMPERMAYER, L.G.; REZENDE, C.M.F. et al. Aspectos histológicos da consolidação de fraturas de fêmur em cães com esquírola fixada pelo adesivo butil-2-cianoacrilato. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, n.4, p.375-383, 1993.

10. CASSATELLA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v.16, n.1, p.21-26, 1995.
11. CHEN, W.; LIN, C.; HSIEH, C.; TU, I.; CHEN, W.Y.W.; HU, F. Comparison of the bacteriostatic effects, corneal cytotoxicity, and the ability to seal corneal incisions among three different tissue adhesives. **Cornea**, v.26, n.10, p.1228-1234, 2007.
12. CINTRON, C.; HONG, B.; COVINGTON, H.I.; MACARAK, E.J. Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.29, n.5, p.767-775, 1988.
13. CREMONINI, D.N.; RANZANI, J.J.T.; MARQUES, M.E.A. et al. Transplante de membrana amniótica canina criopreservada para cicatrização de córnea com deficiência de células límbicas em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1462-1467, 2007.
14. DAYHAW-BARKER, P. Corneal wound healing: I. The players. **International Contact Lens Clinic**, v.22, p.105-109, 1995a.
15. DAYHAW-BARKER, P. Corneal wound healing: II. The process. **International Contact Lens Clinic**, v.22, p.110-116, 1995b.
16. DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.83, p.748-752, 1999.
17. DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey of Ophthalmology**, v.44, n.5, p.415-425, 2000.
18. 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.
19. 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.
20. EGGELING, P., PELYER, U.; HARTMANN, C.; RIECK, P.W. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.26, p.1403-1408, 2000.
21. EIFERMAN, R.A.; SNYDER, J.W. Antibacterial effect of cyanoacrylate glue. **Archives of Ophthalmology**, v.101, p.958-960, 1983.
22. ENDO, K.; NAKAMURA, T.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the

- $\alpha$ 5- chain of tipe IV collagen. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.45, n.6, p.1771-1774, 2004.
23. 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.
24. FELBERG, S.; LAKE, J.C.; LIMA, F.A.; ATIQUE, D.; NAUFAL, S.C.; DANTAS, P.E.C.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C. Adesivo de cianoacrilato no tratamento de afinamentos e perfurações corneais: técnica e resultados. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.345-349, 2003.
25. FINI, M.E. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing córnea. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.18, n.4, p.529-551, 1999.
26. FLECKNELL, P.A.; RICHARDSON, C.A.; POPOVIC, A. Laboratory animals. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. (Ed). **Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia**. 4 ed. USA: Blackwell Publishing, 2007. p.765-784.
27. FOGLE, J.A.; KENYON, K.R.; FOSTER, C.S. Tissue adhesive arrests stromal melting in the human cornea. **American Journal of Ophthalmology**, v.89, p.795-802, 1980.
28. 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.
29. GOLDIM, J.R. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28p.
30. GRIERSON, L.; HEATHCOTE, L.; HISCOTT, P.; HOGG, P.; BRIGGS, M.; HAGAN, S. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.19, p.779-802, 2000.
31. GRUETERICH, M.; ESPANA, E.M.; TSENG, S.C.G. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. **Survey of Ophthalmology**, v.48, n.6, p.631-646, 2003.
32. GUM, G.G. Physiology of the eye. In: Gelatt, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, Cap.2, p.124-161.
33. 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.
34. 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.
35. HIRST, L.W.; DE JUAN, E.J. Sodium hyaluronate and tissue adhesive in treating corneal perforations. **Ophthalmology**, v.89, p.1250-1253, 1982.
36. IMANISHI, J.; KAMIYAMA, K.; IGUCHI, I.; KITA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.19, n.1, p.113-129, 2000.
37. ÍNAL, S.; YILMAZ, N.; NISBET, C.; GÜVENÇ, T. Biochemical and histopathological findings of n-butyl-2-cyanoacrylate in oral surgery: na experimental stydy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.102, p.e14-e17, 2006.
38. JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. **Progress in Retinal and Eye Research**. v.22, p.359-389, 2003.
39. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Órgãos dos sentidos. In: \_\_\_\_\_. 7.ed. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, Cap.23, p.360-373.
40. KATO, T.; NAKAYASU, K.; KANAI, A. Corneal wound healing: immunohistological features of extracellular matrix following penetrating keratoplasty in rabbits. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.44, p.334-341, 2000.
41. KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v.20, n.3, p.643-666, 1990.
42. 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.
43. KIM, J.Y.; CHOI, Y.M.; JEONG, S.W. et al. Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BA™) on uncomplicated canine corneal erosion. **Veterinary Ophthalmology**, v.12, n.1, p.36-42, 2009.

44. KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. **Experimental Eye Research**, v.79, p.677-688, 2004.
45. KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R.; USUI, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.42, n.7, p.1539-1546, 2001.
46. LAMBORN, P.B.; SOLOWAY, H.B.; MATSUMOTO, T.; AABY, G.V. Comparison of tensile strength of wounds closed by sutures and cyanoacrylates. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, n.1, p.125-130, 1970.
47. 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.
48. LEAHEY, A.B.; GOTTSCH, J.D.; STARK, W.J. Clinical experience with n-butyl cyanoacrylate (Nexacryl) tissue adhesive. **Ophthalmology**, v.100, n.2, p.173-180, 1993.
49. LEE, S.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **American Journal of Ophthalmology**, v.123, n.3, p.123-303, 1997.
50. LERNER, R., BINUR, N. S. Current status of surgical adhesives. **Journal of Surgery Research**, v. 48, p. 165 - 81, 1990.
51. LI, D.; TSENG, S.C.G. Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v.172, p.361-372, 1997.
52. LI, H.; NIEDERKORN, J.Y.; NEELAM, S.; MAYHEW, E.; WORD, R.A.; McCULLEY, J.P.; ALIZADEB, H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.46, n.3, p.900-907, 2005.
53. MAGGS, D.J. Cornea and sclera. In: SLATTER, D. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008, Cap.10, p.175-202.

54. MARKOWITZ, G.D.; ORLIN, S.E.; FRAYER, W.C.; ANDREWS, A.P.; PRINCE, R.B. Corneal endothelial polymerization of histoacryl adhesive: a report of a new intraocular complication. **Ophthalmic Surgery**, v.26, p.256-258, 1995.
55. MARTIN, M.; KIRSIPUU, V. Rabbit anesthesia. Cornell University. Cornell Center for Animal Resources and Education. Standard Operating Procedures. CARE:103.01, 2006. Disponível em <http://www.research.cornell.edu/CARE/documents/SOPs/CARE103.pdf>. Acessado em 20 de Outubro de 2008.
56. 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.
57. MEEK, K.M.; BOOTE, C. The organization of collagen in the corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v.78, p.503-512, 2004.
58. MICHELACCI, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.1037-1046, 2003.
59. MIZUNO, K.; HAYASAKA, S. Penetrating keratoplasty with use of adhesives and sclera strip in acute corneal perforations. **Ophthalmic Surgery**, v.13, n.6, p.475-477, 1982.
60. MONTES, G.S. Structural biology of the fibers of collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v.20, p.15-27, 1996.
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. MORANDINI, W.; ORTIZ, V. Adesivos biológicos em cirurgia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.7, n.2, p.80-85, 1992.
63. NETTO, M.V.; AMBRÓSIO JR., R.; CHALITA, M.R.; KRUEGER, R.R.; WILSON, S.E. Resposta cicatricial corneana em diferentes modalidades de cirurgia refrativa. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.68, n.1, p.140-149, 2005.
64. 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.

65. PANI, K.C.; GLADIEUX, G.; BRANDES, G.; KULKARNI, R.K.; LEONARD, F. The degradation of n-butyl alpha cyanoacrylate tissue adhesive. II. **Surgery**, v.63, n.3, 0.481-489, 1968.
66. PARK, J.H.; JEOUNG, J.W.; WEE, W.R.; LEE, J.H.; KIM, M.K.; LEE, J.L. Clinical efficacy of amniotic membrane transplantation in the treatment of various ocular surface diseases. **Contact Lens and Anterior Eye**, v.31, n.2., p.73-80, 2008.
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. PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter**. 1967. 36f. Tese (Livre docência) Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo.
69. PONTES, K.C.S.; BORGES, A.P.B.; DUARTE, T.S. et al. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos – Aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1069-1074, 2008.
70. PONTES, K.C.S.; DUARTE, T.S.; MACHADO, D.P.D.; SEPÚLVEDA, R.V.; RAMOS, D.R.; BORGES, A.P. Membrana amniótica bovina, preservada em glicerina, no tratamento de úlcera de córnea em um cão e de sequestro corneal em dois felinos – Relato de casos. **Revista Clínica Veterinária**, n.85, p.88-96, 2010.
71. PRAUSE, J.U. Serum antiproteases and polymorphonuclear leucocyte neutral collagenolytic protease in the tear fluid of patients with corneal ulcers treated with n-butylcyano acrylate glue. **Acta Ophthalmologica**, v.61, p.283-291, 1983.
72. QUINN, J.; MAW, J.; RAMOTOR, K. et al. Octylcyanoacrilato tissue adhesive versus suture wound repair in a contaminated wound model. **Surgery**, v.122, n.1, p.69-72, 1997.
73. RAFUSE, P.E.; NICHOLS, B.D. Effects of Heaton vs Viscoat on endothelial cell count and morphology after phacoemulsification and posterior chamber

- lens implantation. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v.27, p.125-129, 1992.
74. REECE, T.B.; MAXEY, T.S.; KRON, I.L. A prospectus on tissue adhesives. **The American Journal of Surgery**, v. 182, p.40S-44S, 2001.
75. REFOJO, M.F.; DOHLMAN, C.H.; AHMAD, B.; CARROLL, J.M.; ALLEN, J.C. Evaluation of adhesives for corneal surgery. **Archives of Ophthalmology**, v.80, p.645-656, 1968.
76. REFOJO, M.F.; DOHLMAN, C.H.; KOLIOPOULOS, J. Adhesives in ophthalmology: a review. **Survey of Ophthalmology**, v.15, n.14, p.217-236, 1971.
77. ROBERTS, S.J. **Obstetrícia Veterinária y Patología de la Reproduccion** (Teriogenologia). Buenos Aires: Editora Hemisfério Sur, 1979. p.50-53.
78. ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. Tecido conjuntivo. In: \_\_\_\_\_. 2.ed. **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993, Cap.2., p.85-115.
79. SAMPAIO, R.L.; RANZANI, J.J.T.; RODRIGUES JÚNIOR, V. et al. Aspectos clínicos e imunológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.1077-1085, 2006.
80. SAMUELSON, D.A. Ophthalmic embryology and anatomy. In: GELATT, K.N. (Ed). **Veterinary ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, Cap.1, p.3-123.
81. SANI, B.P.; REFOJO, M.F.  $\beta^{14}\text{C}$ -Isobutyl 2-Cyanoacrylate Adhesive. **Archives of Ophthalmology**. v.87, p.216-221, 1972.
82. SETLIK, D.E.; SELDOMRIDGE, D.L.; ADELMAN, R.A.; SEMCHYSHYN, T.M.; AFSHARI, N.A. The effectiveness of isobutyl cyanoacrylate tissue adhesive for the treatment of corneal perforations. **American Journal of Ophthalmology**, v.140, n.5, p.920-921, 2005.
83. SHAO, C.; SIMA, J.; ZHANG, S.X.; JIN, J.; REINACH, P.; WANG, Z.; MA, J. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.45, n.6, p.1758-1762, 2004.

84. SHARMA, A.; KAUR, R.; KUMAR, S.; GUPTA, P.; PADAV, S.; PATNAIK, B.; GUPTA, A. Fibrin glue versus n-butyl-2-cyanoacrylate in corneal perforations. **Ophthalmology**, v.110, n.2, p.291-298, 2003.
85. SHIMMURA, M.D.; SHIMAZAKI, M.D.; OHASHI, Y.; TSUBOTA, K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. **Cornea**, v.20, n.4, p.408-413, 2001.
86. SILVER, I.A. Tissue adhesives. **Veterinary Record**, v.98, p.405-406, 1976.
87. SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 2007, Cap.91, p.1368-1396.
88. SONG, Q.H.; KLEPEIS, V.E.; NUGENT, M.A.; TRINKAUS-RANDALL, V. TGF- $\beta$ 1 regulates TGF- $\beta$ 1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. **Molecular Pathology**, v.55, p.164-176, 2002.
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. 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.
91. STARTUP, F.G. Corneal ulceration in dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.25, n.12, p.737-752, 1984.
92. STEVENS, A.; LOWE, J.S. Órgãos especiais dos sentidos. In: \_\_\_\_\_. **Histologia**. São Paulo: Manole, 1995, Cap.12, p.187-205.
93. STRAMER, B.M.; ZIESKE, J.D.; JUNG, J-C.; AUSTIN, J.S.; FINI, M.E. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. . **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.44, n.10, p.4237-4246, 2003.
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. VOTE, B.J.T.; ELDER, M.J. Cyanoacrylate glue for corneal perforations: a description of a surgical technique and a review of the literature. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.28, p.437-442, 2000.

96. WANG, M.; YOSHIDA, A.; KAWASHIMA, H.; ISHIZAKI, M.; TAKABASHI, H.; HORI, J. Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva and anterior chamber. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.47, n.4, p.1522-1532, 2006.
97. WATTÉ, C.M.; ELKS, R.; MOORE, D.L.; McLELLAN, G.J. Clinical experience with butyl-2-cyanoacrylate adhesive in the management of canine and feline corneal disease. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n.5, p.319-326, 2004.
98. WATTS, P.; AUSTIN, M. Retained viscoat and intraocular pressure after phacoemulsification. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.47, p.237-240, 1999.
99. WEBSTER, R.G.; SLANSKY, H.H.; REFOJO, M.F.; BORUCHOFF, A.; DOHLMAN, C.H. The use of adhesive for the closure of corneal perforations. **Archives of Ophthalmology**, v.80, p.705-709, 1968.
100. WESSELS, I.F.; McNEILL, J.I. Applicator for cyanoacrylate tissue adhesive. **Ophthalmic Surgery**, v.20, n.3, p.211-214, 1989.
101. WHITLEY, R.D. Canine cornea. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, Cap.9, p.357-356.
102. WILCOCK, B. General pathology of the eye. In: SLATTER, D. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008, Cap.4, p.62-80.
103. 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.
104. WILKIE, D.A.; GEMENSKY-METZLER, A.J. Agents for intraocular surgery. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v.34, p.801-823, 2004.
105. 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.
106. WILKIE, D.A.; WILLIS, A.M. Viscoelastic materials in veterinary ophthalmology. **Veterinary Ophthalmology**, v.2, p.147-153, 1999.

107. WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; MOHAN, R.R.; AMBRÓSIO JR, R.; HONG, J.W.; LEE, J.S. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.20, n.5, p.625-637, 2001.
108. WILSON, S.E.; SCHULTZ, G.S.; CHEGINI, N.; WENG, J.; HE, Y. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblastic growth factor, basic fibroblastic growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. **Experimental Eye Research**, v.59, p.63-72, 1994.
109. 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.
110. 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.
111. ZAGELBAUM, B.M.; SCHWARTZ, B.H.; NELSON, D.B. Accidental instillation of N-butyl cyanoacrylate into the anterior chamber. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.83, p.878-884, 1999.

## ANEXO

**Anexo 1.** Tempo de permanência, em dias e porcentagem, do n-butil 2-cianoacrilato na córnea, relativamente aos períodos estudados, de acordo com os tratamentos empregados nos coelhos do G1, G2 e G3. UFV – Viçosa, 2009

Período de observação	Tratamentos	Número de animais	Tempo de permanência (dias)	Tempo de permanência (%)
2	G1	3	2	100,00
	G2	3	2	100,00
	G3	3	2	100,00
7	G1	3	7	100,00
	G2	3	7	100,00
	G3	3	7	100,00
15	G1	2	7	46,66
		1	15	100,00
	G2	2	7	46,66
		1	15	100,00
	G3	1	5	33,33
		1	7	46,66
		1	10	66,66

Continua

**Anexo 1 - Continuação.** Tempo de permanência, em dias e porcentagem, do n-butil 2-cianoacrilato na córnea, relativamente aos períodos estudados, de acordo com os tratamentos empregados nos coelhos do G1, G2 e G3. UFV – Viçosa, 2009

Período de observação	Tratamentos	Número de animais	Tempo de permanência (dias)	Tempo de permanência (%)
21	G1	1	7	33,33
		2	9	42,85
	G2	1	12	57,14
		2	15	71,42
	G3	1	10	47,61
		2	14	66,66
30	G1	1	9	30,00
		1	11	36,66
		1	26	86,66
	G2	1	5	16,66
		1	7	23,33
		1	11	36,66
	G3	1	8	26,66
		1	9	30,00
		1	11	36,66

Nota: G1 – Grupo 1; G2 – Grupo 2; G3 – Grupo 3.