

Aspectos clínicos do enxerto conjuntival 360° e do implante da membrana amniótica criopreservada no tratamento de úlceras de córnea em cães

Clinical aspects of the 360° conjunctival graft and amniotic membrane cryopreserved transplantation in corneal ulcers in dogs

Gabriel Thadeu Nogueira Martins Ferreira^{1*}; Talita Floering Brêda Souza¹; Silmara Sanae Sakamoto¹; Tereza Cristina Cardoso Silva²; Alexandre Lima Andrade²

Resumo

Avaliar a aplicação clínica do implante da membrana amniótica canina criopreservada em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e DMSO₄ (dimetilsulfóxido) na proporção 1:1 e do enxerto conjuntival 360° no tratamento de úlceras de córnea profundas. Um total de dez cães de diferentes raças, machos e fêmeas, com idades de quatro meses a quatro anos, com ulceração corneal profunda e evolução clínica diferente foram alocados em dois grupos: G1= enxerto conjuntival 360° fórnice-baseado (n=5) e G2= implante de membrana amniótica, suturada na borda da úlcera com sua face epitelial voltada para cima, associada ao recobrimento com a terceira pálpebra (n=5). Foram realizadas análises comparativas entre grupos em relação aos parâmetros clínicos: complicações, blefarospasmo, secreção ocular, vascularização corneal, defeito epitelial e opacificação corneal em seis momentos (primeiro atendimento de emergência, cirurgia e três, sete, 15, 30 dias pós-operatórios). Na ausência de defeito epitelial foi avaliada a qualidade da cicatriz. Utilizou-se escala subjetiva de escore para se qualificarem os sinais oftálmicos. No G1, não se observou aderência do enxerto conjuntival 360° na úlcera (n=2), deiscência da sutura do enxerto (n=2), sinéquia anterior (n=2) e intensa quemose (n=1). No G2, não foram observadas estas complicações. Não houve diferença estatística entre grupos para outros parâmetros oftálmicos, porém houve diferença entre momentos inicial e final no mesmo grupo (secreção ocular, vascularização e defeito epitelial). A cicatriz corneal apresentou-se densa e desorganizada no G1. De acordo com os resultados clínicos, o implante da membrana amniótica criopreservada provou ser mais eficaz no tratamento de úlceras de córnea profunda em comparação ao enxerto conjuntival 360° por, provavelmente, promover melhor suporte trófico para epitelização, associado ao efeito antiinflamatório importante para o resultado fenotípico final.

Palavras-chave: Córnea, úlcera da córnea, âmnio, transplante de tecidos, transplante homólogo, cães

Abstract

To evaluate the clinical application of implant of the canine cryopreserved amniotic membrane (DMEM plus DMSO 1:1) and 360° conjunctival flap in the treatment of progressive corneal ulceration. 10 dogs of the different breeds, males and females, aging four months to four years old with deep corneal ulceration and different clinical progression were divided in two groups: G1=360° conjunctival graft (n=5) and G2=implant of amniotic membrane, sutured at the edge of the ulcer with epithelial side facing up, associated with the third eyelid flap (n=5). The comparative analysis between groups was:

¹ Discente(s) do curso de pós-graduação, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba, SP. E-mail: gabrieltnferreira@hotmail.com; talita_fbs@yahoo.com.br, sil.sanae@ig.com.br

² Profs. Adjuntos, UNESP, Araçatuba, SP. E-mail: tcardoso@fmva.unesp.br; landrade@fmva.unesp.br

* Autor para correspondência

complications, blepharospasm, ocular secretion, corneal vascularization, epithelial defect and corneal opacification in six moments (first emergency care, surgery and 3, 7, 15 and 30 days of postoperative). Without epithelial defect was evaluated quality of the scar. It was used score scale for subjective to qualify of the ocular signs. In G1, it was observed the non-adherence of the conjunctival graft to the ulcer (n=2), dehiscence of the suture (n=2), anterior synechia (n=2) and intense chemosis (n=1). In G2, it was not observed these complications. It was not significant difference between the groups to others ocular parameters, but it was different among the start and end moments of the same groups (ocular secretion, corneal vascularization, epithelial defect). The corneal opacity was more intense in G1. According to the clinical results, the cryopreserved amniotic membrane implant proved to be as effective in the corneal ulceration in comparison to the 360° conjunctival flap, because probably, the membrane promoted a trophic support for epithelialization, anti-inflammatory effect associated with important to the end result phenotype.

Key words: Cornea, corneal ulcer, amnion, tissue transplantation, transplantation, homologous, dogs

Introdução

A ceratite ulcerativa é uma das afecções oftálmicas mais comuns em cães. A localização externa e exposta da córnea a torna muito sujeita a traumas (GELATT, 2003; SLATTER, 2005). Geralmente, úlceras de córnea superficiais cicatrizam rapidamente, sem complicações. A reparação deste tipo de lesão envolve respostas epiteliais de migração, promovendo mínima cicatriz (MILLER, 2001; PONTES et al., 2011). Entretanto, úlceras profundas acometendo o estroma requerem respostas celulares complexas (proliferação, diferenciação, migração, apoptose e comunicação intercelulares) (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; PONTES et al., 2011). Nesses casos, o processo cicatricial pode promover perda da transparência local e déficit visual. Além disso, sem a manutenção do ambiente biológico propício para a cicatrização, as úlceras tendem a evoluir progredindo para camadas mais profundas até a perfuração de córnea podendo levar ao prolapso de íris, à endoftalmite e ao *Pthisis bulbi* (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Assim, a classificação clínica mais importante das úlceras de córnea leva em consideração a profundidade do tecido atingido, sendo caracterizada por: ulceração superficial, ulceração superficial persistente, ulceração profunda, ulceração profunda progressiva e descemetocele (MILLER, 2001). As condutas terapêuticas são indicadas de acordo com a apresentação clínica da lesão, podendo ser clínicas (úlceras superficiais), cirúrgicas ou

associadas (principalmente em úlceras profundas, na descemetocele e nas perfuradas) (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

A córnea é o componente refrativo mais poderoso dos olhos dos animais domésticos. Sua transparência é resultante da ausência de vasos e de células sanguíneas, ausência de pigmentos, epitélio com superfície não queratinizada, superfície óptica lisa, conferida pelo filme lacrimal, organização em malha das fibrilas de colágeno de diâmetro e espaço uniformes que eliminam a dispersão da luz por interferência destrutiva e controle do conteúdo aquoso (SLATTER; DIETRICH, 2007). O tratamento ideal além de promover a reparação do tecido, deve favorecer ambiente propício para que tais particularidades sejam minimamente alteradas, devolvendo à córnea transparência.

Dentre os tratamentos cirúrgicos tradicionais, os enxertos conjuntivais são usados com frequência. Eles são realizados com o objetivo de se reparar a córnea e prevenir a sua progressão. Paralelamente a superfície corneal no curso da reparação tecidual, retardando a degeneração do estroma (MILLER, 2001; HOLLINGSWORTH, 2003). Além disso, o suprimento vascular fornecido é benéfico, principalmente quando processos infecciosos estão envolvidos (HOLLINGSWORTH, 2003). O procedimento, entretanto, não promove o retorno funcional da córnea no local da úlcera, em que há perda da transparência (HOLLINGSWORTH, 2003; SLATTER; DIETRICH, 2007).

Estudos foram conduzidos empregando-se membranas biológicas alternativamente às enxertias tradicionais em casos de úlceras profundas e persistentes. Destaca-se o emprego das membranas amnióticas por conferir, além da proteção mecânica, fatores de crescimento (EGF, HGF, KGF), citocinas (IL-1ra, IL-4, IL-10), inibidores de proteases e estimuladores da epitelização (HAO et al., 2000; KOIZUMI et al., 2000; YAM et al., 2002; PENA et al., 2007; PONTES et al., 2011). A membrana amniótica pode, ainda, servir de membrana basal para o epitélio corneal atuando como substrato para o crescimento, o desenvolvimento, facilitando a migração e a manutenção das células germinativas, prevenindo a apoptose (YAM et al., 2002; ESPANA et al., 2003; JANG et al., 2006; SANGWAN et al., 2003; PONTES, et al., 2011). Outras características conferidas à membrana amniótica são a ação antiangiogênica e anti-inflamatória, importantes na restauração do fenótipo corneal, minimizando a opacidade cicatricial (HAO et al., 2000; SHIMMURA et al., 2001; ANDRADE et al., 2009; MELLER et al., 2011, PONTES et al., 2011).

Estudos clínicos quanto ao emprego da membrana amniótica em casos de úlcera de córnea profunda não experimental e com intuito de avaliarem resultados clínicos principalmente em relação ao retorno do fenótipo corneal têm sido pouco publicados. Com o presente trabalho objetivou-se avaliar casos clínicos que receberam implante com membrana amniótica em úlceras de córnea profunda, comparativamente à técnica de enxerto conjuntival 360°.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados dez cães entre machos e fêmeas, de diferentes raças, pesos e idades, alocados em dois grupos experimentais, compostos por cinco indivíduos. Os pacientes atendidos no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” (FMVA – UNESP Araçatuba) com queixas oftálmicas de ceratite ulcerativa. Os critérios de inclusão no

estudo compreenderam cães com ulcerações graves e/ou complicadas, profundas, unilaterais, com teste do corante de fluoresceína positivo, teste da lágrima de Schirmer tipo 1 dentro dos valores de referência para a espécie e em que se obteve consentimento prévio do proprietário para participarem do estudo.

Todos os cães foram submetidos ao exame físico geral, exames complementares (sorologia para leishmaniose, hemograma completo, contagem total de plaquetas, eletrocardiograma, bioquímicos renal e hepático) para exclusão de doenças concomitantes, conforme as avaliações pré-anestésicas e cirúrgicas locais. Foi realizado um exame oftalmológico que avaliou a superfície externa do bulbo e anexos, o teste lacrimal de Schirmer tipo 1 e o teste com fluoresceína, com auxílio de uma lâmpada de fenda (KOWA, modelo SL-15). Na ausência de risco de perfuração corneal, a pressão ocular foi mensurada por tonômetro de aplanção (Tonopen®).

Grupos experimentais

Foram constituídos dois grupos experimentais, levando-se em consideração o tipo de tratamento cirúrgico empregado: grupo I: tratados com enxerto conjuntival 360° por 15 dias; grupo II: com colocação de implante da membrana amniótica canina criopreservada suturada na borda da úlcera com a face epitelial voltada para cima associada ao recobrimento com terceira pálpebra por sete dias.

Obtenção e preservação da membrana amniótica canina

As membranas amnióticas foram obtidas, de forma asséptica, a partir de placentas de uma cadela submetida ao parto cesariana. A preparação pré-parto consistiu de exame físico geral, exame obstétrico e exames complementares (hemograma, sorologia para leishmaniose, ultrassonografia abdominal). Durante a cesariana, após a retirada do neonato, procedeu-se a abertura asséptica do saco amniótico, duplo pinçamento e ligadura do cordão

umbilical. Os neonatos foram entregues para equipe de reanimação, sendo posteriormente, realizada a separação da membrana amniótica do córion e acondicionamento da mesma em compressas umedecidas com solução estéril de NaCl 0,9% para transporte até a capela de fluxo laminar. Na capela, a membrana foi lavada por duas vezes com solução de NaCl 0,9% sendo a última contendo penicilina (1000UI/ml), estreptomicina (20mcg/ml) e anfotericina B (2,5mcg/ml), permanecendo cinco minutos em imersão. Em seguida, a membrana amniótica foi esticada em papel de nitrocelulose estéril com a face epitelial voltada para cima. A membrana aderida foi cortada em fragmentos de 3,0 por 3,0 cm, colocados em tubos falcon estéreis contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) e DMSO₄ (dimetilsulfóxido) na proporção 1:1 e congelados a -80°C até o seu uso. O intervalo mínimo entre o preparo e o uso das membranas amnióticas criopreservadas foi de 15 dias.

Tratamento clínico

Independente do grupo, todos os cães receberam o mesmo protocolo de tratamento clínico a partir do primeiro atendimento. Foram prescritos colírios de antibiótico (tobramicina) a cada quatro horas, suscedâneo lacrimal (hipromelose) a cada seis horas, anti-inflamatório não-esteroidal (cetorolaco de trometamina) a cada seis horas, durante 15 dias e cicloplégico (atropina 0,5%) a cada 12 horas por cinco dias. No pós-operatório ocorreu a

administração de cloridrato de tramadol (4,0 mg/kg por via oral a cada oito horas durante cinco dias) e meloxicam (0,15 mg/kg por via subcutânea no pós-operatório imediato) com vistas a promover analgesia pós-operatória. Como forma de prevenção à automutilação, todos os animais utilizaram colares do tipo “Elizabetano” desde primeiro atendimento.

Avaliação clínica

Os pacientes passaram por exames físico e oftálmico completos com auxílio de uma lâmpada de fenda (KOWA, modelo SL-15) e com o preenchimento de ficha específica modificada segundo Andrade et al. (2009) (tabela 1). As úlceras foram classificadas de acordo com a profundidade e tempo de evolução em: profunda, profunda crônica e descemetocel. Para fins descritivos as causas foram registradas e quando requerido tratamento cirúrgico corrigidas conjuntamente ao tratamento da úlcera. Todas as complicações pós-operatórias, como deiscência da sutura, não aderência do enxerto, sinéquia anterior e quemose intensa, foram também descritas na ficha oftálmica nos momentos de avaliação. Caso a cicatrização das úlceras não ocorresse ao final do período de avaliação devido a complicações, como o desenvolvimento de úlcera em Melting ou o insucesso do tratamento proposto, o procedimento adotado seria: ceratotomia em grade e recobrimento com terceira pálpebra, aliado ao tratamento clínico empregando-se antibiótico, lubrificante ocular e soro autólogo.

Tabela 1. Parâmetros oftalmológicos estudados e escores adotados para avaliação dos olhos de cães tratados de acordo com o grupo experimental modificado segundo Andrade et al. (2009).

Parâmetro Clínico	Escore
Blefarospasmo	(0): ausência (1): leve (2): moderado (3): intenso
Secreção Ocular	(0): ausência (1): + (2): ++ (3): +++
Quemose	(0): ausência (p): presença
Vascularização Corneal	(0): ausência (2): proliferação vascular até 2 mm do limbo (4): proliferação vascular até 4 mm do limbo (6): proliferação vascular até 6 mm do limbo (8): proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual)
Defeito Epitelial	(0): ausência – ausência de defeito epitelial (t): total – defeito epitelial de toda a córnea (p): parcial – defeito epitelial em parte da córnea (pu): puntiforme
Opacidade Corneal	(0): não há dificuldade de observar detalhes da íris (1): discreta – há borramento dos detalhes da íris (2): moderada – há dificuldade em definir detalhes da íris (3): severa – não é possível observar detalhes da íris
Qualidade da Cicatriz	(0): restituição do epitélio com características corneais preservadas (regular, transparente, avascular e defeito epitelial ausente) (1): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio mas com características corneais alteradas (irregular, opacidade cicatricial, vascularização remanescente) (2): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio pela deposição de tecido de granulação e fibrose local (tecido róseo/branco, denso, profundo, vascularizado) (3): reconstrução da superfície ocular mal sucedida com recorrência do defeito epitelial
Descemetocele	(0): ausência (p): presença
Perfuração Corneal	(0): ausência (p): presença

Fonte: Modificado segundo Andrade et al. (2009).

O primeiro momento de avaliação ocorreu na primeira consulta com queixa principal de ceratite ulcerativa (Mi – inicial). O procedimento cirúrgico executado dentro de um a três dias constituiu o M0, sendo os olhos avaliados antes do procedimento cirúrgico. As avaliações realizadas nos dias 3, 7, 15 e 30 de pós-operatório foram descritas como M3, M7, M15 e M30, respectivamente. Nos animais do Grupo II até o M7 os olhos apresentavam-se recobertos, sendo realizada a retirada do flap de terceira pálpebra neste momento. No Grupo I este período se estendeu até o M15 onde se realizava o recorte do recobrimento conjuntival 360°. Assim, para a análise comparativa dos parâmetros oftalmológicos como: vascularização corneal, defeito epitelial, opacidade corneal, descemetocelose e perfuração corneal foram somente realizadas nos momentos Mi, M0, M15 e M30. Os demais parâmetros como: blefarospasmo, secreção corneal e quemose foram avaliados em todos os momentos descritos. A cicatrização corneal foi avaliada por análise das fotografias das alterações corneais existentes (defeito epitelial, opacidade e vascularização corneal). Após a resolução da úlcera a qualidade da cicatriz deixada foi avaliada, onde esta normalmente ocorria no M15 e M30.

A seguir estão descritos os parâmetros oftalmológicos e escores adotados para as avaliações modificado segundo Andrade et al. (2009): **blefarospasmo**: (0): ausência; (1): leve; (2): moderado; (3): intenso; **secreção ocular**: (0): ausência; (1): leve; (2): moderado; (3): moderado; **quemose**: (0): ausência; (p): presença; **vascularização corneal**: (2): proliferação vascular até 2 mm do limbo; (4): proliferação vascular até 4 mm do limbo; (6): proliferação vascular até 6 mm do limbo; (8): proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual); **defeito epitelial** (realizado teste de fluoresceína com auxílio de lâmpada de fenda com filtro azul cobalto): (0): ausência de defeito epitelial; (1): puntiforme; (2): defeito epitelial em parte da córnea; (3): defeito epitelial de toda a córnea; **opacidade corneal**: (0): não há dificuldade de observar detalhes da íris; (1):

discreta – há borramento dos detalhes da íris; (2): moderada – há dificuldade em definir detalhes da íris; (3): severa – não é possível observar detalhes da íris; **qualidade da cicatriz**: (0): restituição do epitélio com características corneais preservadas (regular, transparente, avascular e defeito epitelial ausente); (1): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio mas com características corneais alteradas (irregular, opacidade cicatricial, vascularização remanescente); (2): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio pela deposição de tecido de granulação e fibrose local (tecido róseo/branco, denso, profundo, vascularizado); (3): reconstrução da superfície ocular mal sucedida com recorrência do defeito epitelial; **descemetocelose**: (0): ausência; (p): presença; **perfuração corneal**: (0): ausência; (p): presença.

Procedimentos cirúrgicos

Independente do grupo nos quais os animais foram incluídos, observaram-se os cuidados relativos ao jejum hídrico e alimentar. Os animais foram anestesiados seguindo os critérios da rotina do serviço de Anestesiologia do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” (FMVA – UNESP Araçatuba. Na maioria dos animais foi utilizado como medicação pré-anestésica o Cloridrato de Tramadol (4mg/Kg) e Acepromazina (0,05mg/Kg) por via intramuscular; seguida da indução anestésica intravenosa com Propofol (4mg/Kg, dose resposta) associado ao Midazolam (0,2mg/Kg), e foram mantidos sob anestesia geral inalatória com Isoflurano com vaporização inicial de 3V%, que variou ao longo do procedimento de acordo com o requerimento anestésico individual. Ato contínuo, foi realizado bloqueio peribulbar por dupla punção com Ropivacaína (0,3ml/kg). Caso o bloqueio não pudesse ser realizado a centralização do bulbo do olho foi obtido por bloqueador neuromuscular ou por plano anestésico profundo pela anestesia inalatória.

Recobrimento conjuntival 360°

Após preparação rotineira para a cirurgia oftálmica, segundo Slatter (2005), os animais do Grupo I foram submetidos ao recobrimento conjuntival fórnice-baseado de 360°, no olho com úlcera. A técnica cirúrgica consistiu na cantotomia para posterior colocação do blefarostato seguida de dissecação roma ao redor do limbo 360° (peritomia) estendendo-se por cinco a dez milímetros e aplicação de sutura “U” horizontal contínua utilizando mononylon 5-0. A sutura foi realizada no sentido vertical ao fechamento das pálpebras, seguida de cantorrafia. Após 15 dias, a sutura foi retirada e o recobrimento recortado 360° em sua base aderida à córnea.

Implante da membrana amniótica

Os pacientes foram submetidos à preparação rotineira para cirurgia oftálmica, segundo Slatter (2005). As cirurgias foram realizadas com auxílio de microscópio cirúrgico para magnificação (DF Vasconcellos). Após ser descongelada em temperatura ambiente e retirada do meio de criopreservação, a membrana amniótica foi hidratada em solução de cloreto de sódio 0,9% em cuba rim permanecendo por dez minutos. Posteriormente, a mesma foi recortada ainda sobre o papel de nitrocelulose de acordo com o tamanho do defeito corneal. Após cantotomia e desbridamento da úlcera, seguiu-se seu delicado posicionamento. O papel foi retirado e a face estromal da membrana esticada voltada sobre a superfície ocular, onde foi realizado um segundo recorte para adequar o tamanho da membrana ao leito da úlcera. Iniciava-se a sutura utilizando padrão simples contínuo não penetrante total com distância de 1,0mm entre pontos com mononylon 9-0, contemplando

a borda da úlcera e a membrana amniótica. Ao finalizar a sutura, realizou-se recobrimento com a terceira pálpebra, seguida de cantorrafia. O mesmo foi mantido por sete dias. A sutura da membrana amniótica foi retirada aos 15 dias de pós-operatório, sob anestesia geral.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas, teste de Friedman com pós-teste Dunn para comparar os momentos para cada grupo, e o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos em cada momento, para variáveis qualitativas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$), empregando-se o programa InStat3.

Resultados e Discussão

As raças dos dez animais incluídos foram shih tzu (6), poodles (2), boxer (1) e sharpei (1). Os animais atendidos tinham uma idade média de dois anos e seis meses (intervalo entre quatro meses e quatro anos). As úlceras foram causadas em cinco casos por trauma, quatro por distiquíase e um por entrópio.

A classificação clínica das úlceras quanto à profundidade no grupo I (enxerto conjuntival 360°) foram: quatro úlceras profundas, sendo uma crônica (úlceras persistentes evoluindo mesmo com o tratamento prévio para uma úlcera profunda) e uma descemetocel. No grupo II (membrana amniótica), um dos animais apresentava úlcera profunda e quatro deles apresentavam descemetocel (Tabela 2). O tempo médio de evolução das úlceras, até o primeiro atendimento, foi de oito dias (intervalo entre dois e 21 dias).

Tabela 2. Dados dos pacientes incluídos no estudo.

	Número paciente	Idade	Sexo	Raça	Causa de úlcera	Olho da cirurgia	Profundidade da úlcera
Grupo I							
	A1	3anos	M	Poodle	Traumática	Direito	Profunda
	A2	1 ano	F	Shih-tzu	Distiquíase	Esquerdo	Descemetocele
	A3	4 meses	F	Shih-tzu	Distiquíase	Direito	Profunda
	A4	4 meses	F	Shar-pei	Entrópico	Esquerdo	Profunda
	A5	6 anos	F	Boxer	Traumática	Esquerdo	Profunda Crônica
Grupo II							
	A1	6 meses	F	Shih-tzu	Distiquíase	Esquerdo	Descemetocele
	A2	3 anos	F	Shih-tzu	Traumática	Direito	Profunda
	A3	4 anos	M	Poodle	Traumática	Direito	Descemetocele
	A4	9 meses	F	Shih-tzu	Traumática	Direito	Descemetocele
	A5	4 anos	F	Shih-tzu	Distiquíase	Esquerdo	Descemetocele

Fonte: Elaboração dos autores.

Dentre as intercorrências do grupo I, dois apresentaram deiscência da sutura, sendo esta a complicação mais comumente observada, segundo Hollingsworth (2003). Em dois pacientes, foi observada a não aderência do enxerto, sendo um deles o mesmo que apresentou deiscência da sutura e o outro por uma provável úlcera em Melting, que fora observada após o recorte do enxerto. Dois animais apresentaram sinéquia anterior observada no momento do recorte do enxerto. Tais complicações exemplificam uma das principais desvantagens do enxerto conjuntival 360° que se refere ao impedimento da visualização da córnea e da evolução do processo cicatricial (HOLLINGSWORTH, 2003; SLATTER; DIETRICH, 2007). Um cão da raça shar pei com entrópico congênito (superior e inferior) apresentou quemose intensa 360° persistente até M30, podendo justificar tal intercorrência.

No grupo II tratado com membrana amniótica, um animal apresentou pequena área de deiscência da sutura observada no momento da retirada do recobrimento com a terceira pálpebra (M7). A membrana amniótica estava aderida ao leito da úlcera não comprometendo os resultados clínicos observados. Dois animais apresentavam sinéquia anterior observada no Mi, não sendo correlacionada ao tratamento cirúrgico adotado.

Em relação aos parâmetros clínicos avaliados por escores (tabela 1), nenhum animal apresentou perfuração corneal. Na avaliação do blefarospasmo, não foi observada diferença estatística entre grupos. Todos os animais apresentaram melhora com ausência deste sinal clínico ao final do período de avaliação. Assim, em ambos os grupos, na comparação entre momentos houve diferença estatística entre o Mi e o M30 ($p=0,0007$ e $p=0,0008$, respectivamente). Este resultado já era esperado, pois a cicatrização das úlceras corneais promove diminuição do estímulo das terminações nervosas do epitélio e estroma abolindo o reflexo de blefarospasmo (BRUNELLI et al., 2007; PONTES et al., 2008; ANDRADE et al., 2009).

Os tratamentos realizados promoveram diminuição na quantidade de secreção ocular observada em todos os animais. Esta diminuiu temporalmente até o final do período de avaliação clínica em ambos os grupos, não havendo diferença significativa. Porém, no grupo II houve diferença estatística entre os momentos MI e M30 ($p=0,018$), provavelmente evidenciada pelo fato de alguns animais incluídos apresentarem um escore inicial maior do que o que fora observado no grupo I e por propriedades bacteriostáticas adjetivadas à membrana amniótica (AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999).

Não houve diferença estatística entre grupos quanto à vascularização corneal. No grupo I foi observada diferença estatística entre os momentos iniciais (MI e M0) e os momentos finais (M15 e M30) ($p=0,0293$). Apesar de não ser detectada diferença estatística entre grupos, observou-se que tal evento clínico apresentou uma evolução distinta entre eles. No grupo I, a vascularização aumentou ao longo do tempo no sentido axial da córnea. Os recobrimentos conjuntivais vasculares (grupo I) permitem de maneira mais fácil a chegada de células sanguíneas. Dentre elas, as células inflamatórias e as plaquetas estão diretamente envolvidas no processo angiogênico. Estas células expressam citocinas e fatores de crescimento pró-inflamatórios (IL-1, TGF- β , PDGF e óxido nítrico) e promotores da vascularização corneal (TNF- α , VEGF: fator de crescimento vascular endotelial, FGF: fator de crescimento fibroblástico) (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; WICHAYACOOOP et al., 2009). Este achado é esperado e necessário em situações crônicas e graves. Nos processos cicatriciais da córnea, no entanto, ele deve ocorrer de maneira controlada para que não resulte em opacidade permanente (GODOY; GUERRA; BARROS, 2002).

No grupo II, a vascularização manteve-se, praticamente, inalterada. O escore inicial mais alto observado neste grupo reflete a gravidade da perda do estroma levando-se em conta a maior ocorrência de descemetocelose nos animais incluídos nesse grupo (SLATTER; DIETRICH, 2007). Mesmo assim, não foi observada piora na vascularização, corroborando os estudos experimentais anteriores em coelhos (MONTEIRO et al., 2000; ANDRADE et al., 2009), em cães (GODOY; GUERRA; BARROS, 2002; WICHAYACOOOP et al., 2009) e clínico humanos (PRABHASAWAT; TESAVIBUL; KOMOLSURADEJ, 2001; FAIRBANKS et al., 2003; MEALLET et al., 2003), onde observaram uma menor vascularização das córneas em que a membrana amniótica foi aplicada. Sua atuação no controle da vascularização é explicada pela

expressão de proteínas antiangiogênicas, como a trombospondina 1 e IL-1ra (HAO et al., 2000) e a restauração de um ambiente estromal sem inflamação (MONTEIRO et al., 2000; FAIRBANKS et al., 2003) por atrair e apreender células inflamatórias (SHIMMURA et al., 2001) e inibir fatores pró-inflamatórios (HAO et al., 2000; YAM et al., 2002; PENA et al., 2007).

Referente ao defeito epitelial, não houve diferença entre os grupos. A reparação epitelial no grupo II ocorreu em todos os animais no M15. No grupo I, somente um animal apresentou reparação epitelial neste momento, sendo três animais ocorrendo no M30 e um animal com defeito epitelial persistente com teste de fluoresceína positivo observado em lâmpada de fenda em filtro azul cobalto. Ao serem comparados os momentos iniciais (MI e M0) e o momentos finais (M15 e M30), foi observada diferença estatística ($p=0,0083$ e $0,0008$, respectivamente). Pela promoção do processo cicatricial pelos dois tratamentos, a reparação da úlcera era esperada.

A membrana amniótica aplicada em uma única camada não interferiu na velocidade de reparação corneal em comparação ao enxerto conjuntival 360°, como também descrito por Monteiro et al. (2000). Provavelmente, o número de animais avaliados não foi suficiente para determinar diferença estatística. Além disso, os momentos de avaliações podem ter influenciado nesses resultados, uma vez que exames diários poderiam detectar uma reparação epitelial anterior aos 30 dias, conforme descreveu Andrade et al. (2009). Porém, por não se tratar de um estudo experimental, tal periodicidade nas avaliações e um maior número de animais não foram possíveis porque foram empregados animais da rotina hospitalar. Estudos clínicos conduzidos no homem referem que a aplicação da membrana amniótica em multicamadas promove o restabelecimento do fenótipo corneal mais rápido em comparação à aplicação em camada única (PRABHASAWAT; TESAVIBUL; KOMOLSURADEJ, 2001; SEITZ et al., 2009). Ao refazer a espessura estromal,

a membrana amniótica fornece uma membrana basal saudável que sustenta o epitélio neoformado, servindo de substrato para adesão e migração epitelial (colágeno tipo IV, lamininas 1 e 5 e fibronectina) (AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999; SHIMMURA et al., 2001; FAIRBANKS et al., 2003). Facilita, ainda, a proliferação e diferenciação celulares, além de reduzir a apoptose das células epiteliais (MONTEIRO et al., 2000; MELLER; PIRES; TSENG, 2002; MEALLET et al., 2003; KIM et al., 2009). Ainda, a membrana permite a liberação de fatores de crescimento (EGF, bFGF, KGF) e inibidores de metaloproteinases 1, que aumentam a expressão de receptores de EGF nas células epiteliais (KOIZUMI et al., 2000; YAM et al., 2002). Quando aplicada em camada única, a membrana amniótica permite a ocorrência desses eventos celulares e moleculares que aumentam a velocidade de reparação. No entanto, a mesma é dependente do restabelecimento da espessura estromal normal, como observado neste estudo.

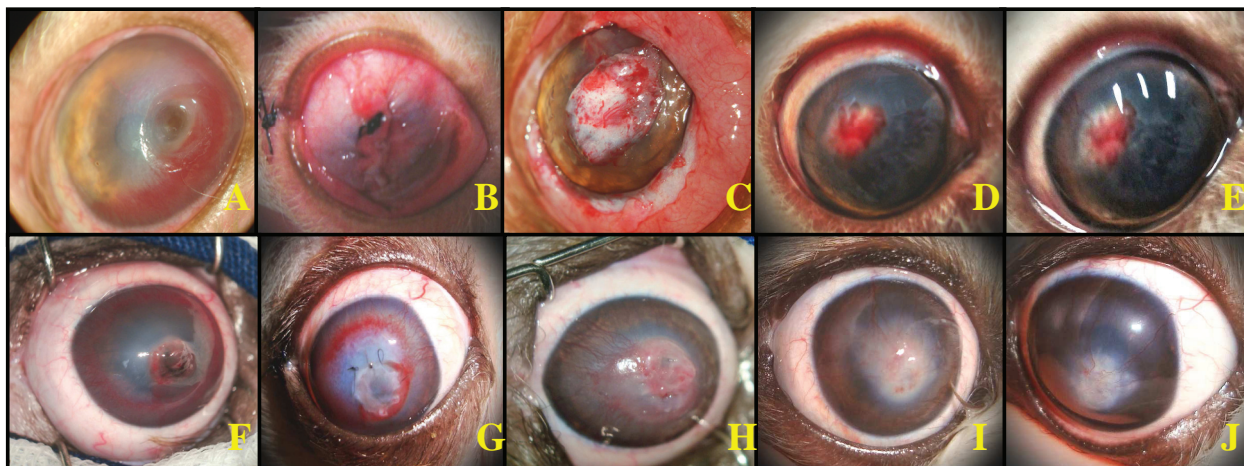
A área de opacidade corneal não apresentou diferença na comparação entre os grupos ou entre os momentos. Apesar disso, a qualidade da cicatriz no M30 apresentou diferença significativa entre grupos ($p= 0,0345$). No grupo II foi observada uma cicatriz menos intensa, mais organizada e apesar de opaca, visualmente mais semelhante ao tecido corneal normal em comparação ao grupo I (Figura 1). O enxerto conjuntival 360° (grupo I) promoveu uma cicatrização vascular levando à deposição de um tecido de granulação e posterior cicatriz fibrovascular exagerada, com ocorrência de leucoma cicatricial denso, irregular e vascularizado. O enxerto conjuntival deve ser visto como um procedimento de resgate, oferecendo uma pequena chance de retorno ao fenótipo corneal normal a longo prazo (HOLLINGSWORTH, 2003; PUMPHREY; PIZZIRANI; PIRIE, 2011). Ao fornecer e estimular um aporte vascular a cicatrização corneal passa a ter componentes da cicatrização fibrovascular.

Assim, além das citocinas e fatores de crescimento normalmente expressos, outras fontes promovem uma fibrose estromal excessiva. Dentre eles, o aumento do TGF- β e o PDGF liberados por plaquetas e células inflamatórias têm papel importante. Estes fatores promovem um ambiente favorável ao aumento na proporção de miofibroblastos no estroma corneal. (IMANISHI et al., 2000; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; REINACH; POKORNY, 2008; DAWSON, 2010). Essas células seriam as principais responsáveis pela deposição de uma matriz extracelular desorganizada, densa e por não permitirem uma remodelação completa do estroma levando a uma cicatriz corneal opacificada (ESPANA et al., 2003; REINACH; POKORNY, 2008; DAWSON, 2010).

As prováveis explicações para uma cicatriz corneal mais organizada no implante da membrana amniótica (grupo II) levam em consideração, além do controle da inflamação, a regulação da biodisponibilidade do TGF- β ao estroma diminuindo à diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (YAM et al., 2002; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; ANDRADE et al., 2009; KIM et al., 2009). A membrana amniótica assumiria assim, a função da membrana basal do epitélio, diminuindo as interações epitélio-estroma e células inflamatórias-estroma (DAWSON, 2010; DELMONTE; KIM, 2011).

Apesar do escore da vascularização corneal no grupo II ter se mantido alto, o processo de reparação não promoveu uma cicatriz fibrovascular como no grupo I. Provavelmente, a membrana amniótica minimizou os efeitos da vascularização estabelecida (DAWSON, 2010), modificando o ambiente estromal a favor de uma cicatrização fibrosa aceitável (HAO et al., 2000). Portanto, a membrana amniótica permitiu um restabelecimento de um tecido mais organizado e transparente, próximo à normalidade, quando comparada ao enxerto conjuntival.

Figura 1. Imagens fotográficas de olhos de cães. Imagens **A, B, C, D e E** pré-operatório (úlceras de córnea profunda) e 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 1 do grupo G1 (enxerto conjuntival 360°). Imagens **F, G, H, I e J** pré-operatório (descemetocele com sinéquia anterior) e 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 5 do grupo G2 (implante da membrana amniótica).



Fonte: Elaboração dos autores.

Conclusões

É possível inferir que a membrana amniótica favoreceu um ambiente corneal adequado que auxiliou no controle da vascularização, com restabelecimento da integridade da superfície da córnea de forma mais organizada e próxima do fenótipo fisiológico. Com base no que fora exposto, e nas condições aqui adotadas, a aplicação clínica do implante de membrana amniótica canina criopreservada em úlceras profundas promoveu reparação corneal com uma taxa de maior sucesso e com menos complicações ao emprego do enxerto conjuntival 360°.

Agradecimento

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Processo: 2010/02816-0).

Observações Éticas

O referido estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro

de Experimentação Animal – COBEA sob o protocolo 001897-2010.

Referências

- ANDRADE, A. L.; GOMES, J. A. P.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V.; CAMPOS, M. Aspectos clínicos e morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 127-142, 2009.
- AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *British Journal of Ophthalmology*, United Kingdom, v. 83, n. 4, p. 399-402, 1999.
- BRUNELLI, A. T. J.; VICENTE, F. A. M.; CHAHUD, F.; ORIÁ, A. P.; BOLZAN, A. A.; CAMPOS, C. F.; DORIA, F. A.; LAUS, J. L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1194-1204, 2007.
- DAWSON, D. G. Corneal scars. In: DARTT, D. A.; BEX, P.; D'AMORE, P.; DANA, R.; MCLOON, L. K.; NIEDERKORN, J. Y. *Ocular periphery and disorders*. United Kingdom: Elsevier, 2010. p. 499-515.
- DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract Refract Surgery*, United Kingdom, v. 37, n. 3, p. 588-598, 2011.

- ESPANA, E. M.; TI, S.-E.; GRUETERICH, M.; TOUHAMI, A.; TSENG, A. S. C. G. Corneal stromal changes following reconstruction by ex vivo expanded limbal epithelial cells in rabbits with total limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*, United Kingdom, v. 87, n. 12, p. 1509-1514, 2003.
- FAIRBANKS, D.; VIEIRA, L. A.; SANTOS, W. D.; ATTIE, G. C. G.; GOMES, J. A. P.; FREITAS, D. Membrana amniótica no tratamento dos afinamentos corneais e esclerais. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, Santa Maria, v. 66, p. 71-76, 2003.
- GELATT, K. N. *Manual de oftalmologia veterinária*. Barueri: Manole LTDA, 2003. 594 p.
- GODOY, C. A. L.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal equina como enxerto. Estudo experimental. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, Santa Maria, v. 65, p. 545-549, 2002.
- HAO, Y.; MA, D. H.-K.; HWANG, D. G.; KIM, W.-S.; ZHANG F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, United States of America, v. 19, n. 3, p. 348-352, 2000.
- HOLLINGSWORTH, S. R. Corneal surgical techniques. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, United States of America, v. 18, n. 3, p. 161-167, 2003.
- 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*, United Kingdom, v. 19, n. 1, p. 113-129, 2000.
- JANG, I.-K.; AHN, J.-I.; SHIN, J.-S.; KWON, Y.-S.; RYU, Y.-H.; LEE, J.-K.; PARK, J.-K.; SONG, K.-Y.; YANG, E.-K.; KIM, J.-C. Transplantation of reconstructed corneal layer composed of corneal epithelium and fibroblasts on a lyophilized amniotic membrane to severely alkali-burned cornea. *Journal Artificial Organs and Transplantation*, United States of America, v. 30, n. 6, p. 424-431, 2006.
- KIM, J. Y.; CHOI, Y. M.; JEONG, S. W.; WILLIAMS, D. L. Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BA™) on uncomplicated canine corneal erosion. *Veterinary Ophthalmology*, United States of America, v. 12, n. 1, p. 36-42, 2009.
- KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Experimental Eye Research*, United States of America, v. 79, n. 5, p. 677-688, 2004.
- KOIZUMI, N. J.; INATOMI, T. J.; SOTOZONO, C. J.; FULLWOOD, N. J.; QUANTOCK, A. J.; KINOSHITA, S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research*, United Kingdom, v. 20, n. 3, p. 173-177, 2000.
- MEALLET, M. A.; ESPANA, E. M.; GRUETERICH, M.; TI, S.; GOTO, E.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation with conjunctival limbal autograft for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*, United States of America, v. 110, n. 8, p. 1585-1592, 2003.
- MELLER, D.; PAUKLIN, M.; THOMASEN, H.; WESTEKEMPER, H.; STEUHL, K.-P. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Deutsches Ärzteblatt International*, Germany, v. 108, n. 14, p. 243-248, 2011.
- MELLER, D.; PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *British Journal Ophthalmology*, United Kingdom, v. 86, n. 6, p. 463-471, 2002.
- MILLER, W. W. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, United States of America, v. 16, n. 1, p. 51-57, 2001.
- MONTEIRO, E. C. L.; SCHELLINI, S. A.; MARQUES ALENCAR, M. E.; KAMEGASAWA, A.; PADOVANI, C. R. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, Santa Maria, v. 63, n. 1, p. 33-37, 2000.
- PENA, J. D. O.; MELO, G. B.; GOMES, J. A. P.; HAAPALAINEN, E. F.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N. C.; FILHO, A. A. S. L.; RIZZO, L. V. Análise ultraestrutural e de fatores de crescimento de diferentes métodos de preservação da membrana amniótica utilizada em cirurgia ocular. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, Santa Maria, v. 70, n. 5, p. 756-762, 2007.
- PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; DUARTE, T. S.; MORATO, G. L.; ZAVAN, V.; ELEOTÉRIO, R. B.; CARLO, E. C. Membrana Amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos – aspectos clínicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 60, n. 5, p. 1069-1074, 2008.
- PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B.; FAVARATO, L. S. C.; DUARTE, T. S. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2120-2127, 2011.

- PRABHASAWAT, P.; TESAVIBUL, N.; KOMOLSURADEJ, W. Single and multilayer antibiotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *British Journal Ophthalmology*, United Kingdom, v. 85, n. 12, p. 1455-1463, 2001.
- PUMPHREY, S. A.; PIZZIRANI, S.; PIRIE, C. G. 360-degree conjunctival grafting for management of diffuse keratomalacia in a dog. *Veterinary Ophthalmology*, United States of America, v. 14, n. 3, p. 209-213, 2011.
- REINACH, P. S.; POKORNY, K. S. The corneal epithelium: clinical relevance of cytokine-mediated responses to maintenance of corneal health. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, Santa Maria, v. 71, n. 6, p. 80-88, 2008.
- SANGWAN, V. S.; VEMUGANTI, G. K.; SINGH, S.; BALASUBRAMANIAN, D. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjunctival stem cell culture methods. *Bioscience Reports*, United States of America, v. 23, n. 4, p. 169-174, 2003.
- SEITZ, B.; DAS, S.; SAUER, R.; MENA, D. HOLFMAN-RUMMELT, C. Amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defects in eyes after penetrating keratoplasty. *Eye*, United Kingdom, v. 23, p. 840-848, 2009.
- SHIMMURA, S.; SHIMAZAKI, J.; OHASHI, Y.; TSUBOTA, K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Córnea*, United States of America, v. 20, n. 4, p. 408-413, 2001.
- SLATTER, D. *Fundamentos de oftalmologia veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca LTDA, 2005. 686 p.
- SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 3. ed. Barueri: Manole LTDA, 2007. v. 2, p. 1368-1396.
- WICHAYACOOP, T.; BRIKSAWAN, P.; TUNTIVANICH, P.; YIBCHOK-ANUN, S. Anti-inflammatory effects of topical supernatant from human amniotic membrane cell culture on canine deep corneal ulcer after human amniotic membrane transplantation. *Veterinary Ophthalmology*, United States of America, v. 12, n. 1, p. 28-35, 2009.
- YAM, H.-F.; PANG, C.-P. D.; FAN, D. S.-P.; FAN, B.-J.; YU, E. Y.-W.; LAM, D. S.-C. Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. *Cornea*, United States of America, v. 21, n. 1, p. 101-105, 2002.

