

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DO BANDVET® SOBRE A REPARAÇÃO CORNEAL EM
CÃES. ESTUDOS CLÍNICO, MORFOMÉTRICO, HISTOQUÍMICO E
IMUNOISTOQUÍMICO.**

Juan Pablo Duque Ortiz

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DO BANDVET® SOBRE A REPARAÇÃO CORNEAL EM
CÃES. ESTUDOS CLÍNICO, MORFOMÉTRICO, HISTOQUÍMICO E
IMUNOISTOQUÍMICO.**

Juan Pablo Duque Ortiz

Orientador Prof: José Luiz Laus

Defesa de Tese apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

PAPADIOS

FAMÍLIA

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. José Luiz Laus**, amigo e orientador, pelos ensinamentos e incentivo desmedido, pelo exemplo de sucesso com dignidade e ética.

Aos professores **Fábio Luiz da Cunha Brito**, **Valdomiro Junior** e o colega **Julio** pela fundamental participação neste projeto.

À professora **Ana Paula Sobral**, pela sua inestimável colaboração e seu incondicional apoio.

À professora **Márcia Rita Fernades**, pelo seu oportuno apoio e grande compreensão

À **direção, professores e funcionários da FCAV-UNESP/Câmpus de Jaboticabal**, pela oportunidade de estudar nesta conceituada instituição.

À **equipe de funcionários do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal**, pelo auxílio durante a realização do experimento.

À **Fundação Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) PEG-PG**, pela concessão da bolsa de estudo.

À **Schering Plough**, pela concessão de auxílio financeiro.

Ao **Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de odontologia de Pernambuco FOP**, pela cessão de instalações e equipamentos.

Aos animais, vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade, o nosso respeito e eterna gratidão.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ASBTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	16
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAS.....	31
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	31
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
3.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICO E CIRÚRGICO.....	32
3.5 PROTOCOLOS DE TRATAMENTO.....	35
3.6 PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO.....	35
3.6.1 Avaliação clínica	35
3.6.2 Microscopia de luz.....	35
3.6.2.1 Morfometria.....	36
3.6.2.1.1 <i>Contagem de leucócitos polimorfonucleares</i>	36
3.6.2.1.2 <i>Contagem de pontos de colágeno</i>	37
3.6.2.1.3 <i>Contagem de fibroblastos</i>	38
3.6.2.1.4 <i>Espessura do epitélio e estroma corneais</i>	38
3.6.3 Histoquímica.....	39
3.6.3.1 <i>Alcian Blue pH 1.0</i>	40
3.6.3.1 <i>Alcian Blue pH 2.5</i>	40
3.6.4 Avaliação cromática tridimensional.....	41
3.6.5 Imunoistoquímica.....	41

3.6.5.1 <i>Fibronectina</i>	41
3.6.5.2 <i>Tenascina</i>	43
3.6.6 Análise estatística	44
4 RESULTADOS	45
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	45
4.2 MORFOMETRIA.....	52
4.2.1 Contagem de leucócitos polimorfonucleares	52
4.2.2 Contagem de pontos de colágeno	52
4.2.3 Contagem de fibroblastos	53
4.2.4 Espessura do epitélio e estroma corneais	54
4.3 HISTOQUÍMICA.....	59
4.3.1 Marcação pelo Alcian <i>Blue</i> pH1.0	59
4.3.2 Marcação pelo Alcian <i>Blue</i> pH 2.5	60
4.4 AVALIAÇÃO CROMÁTICA TRIDIMENSIONAL	63
4.5 IMUNOISTOQUÍMICA.....	67
4.5.1 Fibronectina	67
4.5.2 Tenascina	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	80
7 REFERÊNCIAS	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Critérios para a caracterização de proteoglicanos pelos métodos histoquímicos Alcian <i>Blue</i> pH 1.0, Alcian <i>Blue</i> pH 2.5, ácido periódico de Schiff e Alcian <i>Blue</i> pH 1.0 e ácido periódico de Schiff e Alcian <i>Blue</i> pH 2.5. Jaboticabal - SP, 2009.....	40
Tabela 2-	Anticorpo policlonal primário, diluição, fabricante, recuperação antigênica, tempo de incubação e controle positivo empregados em córneas de cães adultos, sem raça definida machos ou fêmeas após ceratectomia superficial. Jaboticabal - SP, 2009.....	43
Tabela 3-	Número de células inflamatórias (neutrófilos) em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomia superficial nos diferentes momentos. Jaboticabal - SP, 2009.....	52
Tabela 4-	Número de pontos de colágeno em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomia superficial nos diferentes momentos. Jaboticabal - SP, 2009.....	53
Tabela 5-	Número de fibroblastos em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomia superficial nos diferentes momentos. Jaboticabal - SP, 2009.....	54
Tabela 6-	Valores médios das espessuras do epitélio e estroma corneais, nas regiões pré-lesão, de transição e central, de cães, adultos, sem raça definida machos ou fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomia superficial. Jaboticabal - SP, 2009.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Percentual dos cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas dos grupos BV e CO, que apresentaram sinais clínicos de blefarospasmo, congestão conjuntival, secreção ocular e edema e vascularização corneais, após ceratectomia superficial, com suas respectivas intensidades, aos 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	46,47
-----------	---	-------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagem fotográfica de olho de cão, adulto, sem raça definida, submetido a ceratectomia superficial, após delineamento da lesão lamelar (A). Consecução da ceratectomia superficial em hemisférios (B) Jaboticabal - SP, 2009.....	34
Figura 2-	Fotomicrografia da qual se demarca a colocação da grade com 70 campos geometricamente distribuídos aferição em programa ImageJ, em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial. Jaboticabal - SP, 2009....	37
Figura 3-	Imagem representando a aferição das medidas epiteliais (setas brancas) e estromais (setas azuis) realizadas empregando o programa ImageJ, em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos e fêmeas após ceratectomia superficial. Jaboticabal - SP, 2009.....	39
Figura 4-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	48
Figura 5-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, fêmea do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	48
Figura 6-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	49
Figura 7-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	49
Figura 8-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	50
Figura 9-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, fêmea do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	50
Figura 10-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	51

Figura 11-	Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, fêmea do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP, 2009.....	51
Figura 12-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 3 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.....	55
Figura 13-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 3 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.....	55
Figura 14-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 7 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.....	56
Figura 15-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 7 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.....	56
Figura 16-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 14 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.....	57
Figura 17-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 14 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.....	57
Figura 18-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 28 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.....	58
Figura 19-	Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 28 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.....	58
Figura 20-	Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, macho, do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório. Alcian <i>Blue</i> pH 1.0, 10X. Jaboticabal - SP, 2009.....	60

Figura 21-	Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, fêmea, do grupo BV após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório. Alcian <i>Blue</i> pH 1.0, 5X. Jaboticabal - SP, 2009.....	62
Figura 22-	Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, do grupo BV após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório.. Alcian <i>Blue</i> pH 2.5, 20X. Jaboticabal – SP, 2009.....	62
Figura 23-	Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, macho ou fêmea, do grupo BV após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório. Alcian <i>Blue</i> pH 2.5, 10X. Jaboticabal – SP, 2009.....	63
Figura 24-	Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, após ceratectomia superficial aos 3 dias de pós-operatório, renderizadas em 3D. Jaboticabal - SP, 2009.....	64
Figura 25-	Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, após ceratectomia superficial aos 7 dias de pós-operatório, renderizadas em 3D. Jaboticabal - SP, 2009.....	65
Figura 26-	Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 14 dias de pós-operatório, renderizadas em 3D. Jaboticabal - SP, 2009.....	66
Figura 27-	Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 28 dias de pós-operatório, renderizadas em 3D. Jaboticabal - SP, 2009.....	66
Figura 28-	Representação gráfica de área, quanto às alterações nas mensurações das áreas cromáticas do estroma corneal de cães adultos, sem raça definida machos e fêmeas após ceratectomia superficial após 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.....	67
Figura 29-	Representação gráfica de área, quanto às alterações nas mensurações das áreas cromáticas do estroma corneal de cães adultos, sem raça definida machos e fêmeas após ceratectomia superficial após 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.....	68
Figura 30-	Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório grupo CO. SABC 40X. Jaboticabal - SP, 2009.....	68
Figura 31-	Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório grupo BV. SABC 10X. Jaboticabal - SP, 2009.....	69

- Figura 32- Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório grupo CO. SABC 20X. Jaboticabal - SP, 2009..... 70
- Figura 33- Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório grupo BV. SABC 20X. Jaboticabal - SP, 2009..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS

®	Símbolo indicativo de marca registrada
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
3D	Tridimensional
AB	Alcian <i>Blue</i>
ACT	Avaliação cromática tridimensional de superfície
BV	Grupo BandVet®
cent	Central
CO	Grupo controle
S	Desvios padrão
EGF	Fator de crescimento epidermal
FNC	Fibronectina
GAGs	Glicosaminoglicanos
HE	Coloração pela hematoxilina e eosina
LAM	Laminina
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteases
ODC	Ornitina descarboxilase
TRIS	Tri-hidroxi-metil-aminometano
PAS	Ácido periódico reativo de Schiff
pré	Pré-lesão
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
P.V.P.I	Polivinilpirrolidona-iodo

RGD	Peptídeo sintético de cadeia curta
SABC	Complexo streptoavidina-biotina
TGFα	Fator transformador de crescimento alfa
TGFβ	Fator transformador de crescimento beta
TNC	Tenascina

EFEITOS DO BANDVET® SOBRE A REPARAÇÃO CORNEAL EM CÃES. ESTUDOS CLÍNICO, MORFOMÉTRICO, HISTOQUÍMICO E IMUNOISTOQUÍMICO.

RESUMO - Estudaram-se os efeitos do BandVet® na reparação corneal em cães após ceratectomia superficial. Utilizaram-se 16 cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, sendo oito tratados com o BandVet® (BV) e os demais, com cloreto de sódio a 0,9%, (CO) subdivididos em grupos para avaliação clínica diária durante os 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Foram atribuídos escores para a avaliação clínica quanto ao blefarospasmo, congestão conjuntival, vascularização, pigmentação e edema corneais. Encontraram-se blefarospasmo e fotofobia nos períodos iniciais de pós-operatório. Houve diferença significativa quanto à congestão conjuntival e secreção ocular aos sete dias de pós-operatório. A vascularização manteve-se constante desde os períodos iniciais, desaparecendo no período final, apenas no grupo tratado. O edema corneal esteve sempre presente em ambos os grupos, diferindo estatisticamente aos 14 dias de pós-operatório. Ao término dos períodos, os olhos ceratectomizados foram enucleados e as córneas submetidas a estudo morfométrico (contagem de células inflamatórias, contagem de pontos de colágeno, contagem de fibroblastos e mensuração da espessura do epitélio e estroma corneais), histoquímico (Alcian *Blue* pH 1.0 e Alcian *Blue* pH 2.5), de análise digital (avaliação cromática tridimensional de superfície) e imunoistoquímico (expressão da fibronectina e da tenascina). Relativamente à contagem das células inflamatórias, observou-se maior quantitativo nos animais do grupo BV, durante os quatro períodos avaliados. Relativamente aos pontos de colágeno, observou-se nas córneas dos animais do grupo BV, um maior número de pontos nos quatro períodos avaliados, havendo diferença estatística, comparativamente aos valores das áreas de transição, aos três dias de pós-operatório ($P=0,040$). Em referência à contagem de fibroblastos observou-se um número maior de células no grupo BV nos períodos 3, 14 e 28 dias. Aos sete dias, todavia, o grupo CO

mostrou maior celularidade. Identificou-se diferença estatisticamente significativa, quando comparadas as contagens na região de transição, aos três dias de pós-operatório. Relativamente à mensuração da espessura do epitélio corneal da região periférica, notou-se que aos 3, 7 e 14 dias, ela foi maior nos animais do grupo BV. Aos 28 dias, todavia, ela foi maior no grupo CO. Na região de transição, ela foi maior no grupo BV em todos os momentos. Na região central, foi maior no grupo CO em todos os períodos, à exceção do 14º dia. No que se refere à espessura do estroma corneal, nas regiões periférica e de transição, ela foi maior nos animais do grupo CO, em todos os momentos, exceto aos 3 dias, onde foi maior no grupo BV. Relativamente à região central, ela foi maior no grupo BV, em todos os momentos. No que concerne à marcação com Alcian *Blue* pH 1.0, esta foi mais intensa no grupo BV, no terceiro e no 14º dias. A marcação com Alcian *Blue* pH 2.5, foi mais intensa no grupo BV, no terceiro e no 24º dias, enquanto no sétimo e no 14º dias ela não divergiu. Relativamente à avaliação tridimensional de superfície houve maior homogeneidade nos animais do grupo BV, em todos os momentos. Relativamente à marcação por fibronectina do grupo BV, houve positividade discreta aos 7, 14 e 28 dias. No grupo CO, ela foi discreta aos 3 e 28 dias e intensa aos sete dias. À marcação com tenascina, observou-se positividade aos três dias, ela foi moderada nas córneas dos animais do grupo BV e intensa nas do grupo CO. Aos 28 dias, identificou-se marcação positiva fraca no grupo BV, no estroma corneal, em toda a extensão da lâmina. Conclui-se, que a utilização local na superfície ocular decorreu numa reparação corneal mais organizada.

Palavras-chave: cão, ceratectomia superficial, BandVet®, reparação corneal, morfometria, histoquímica, análise digital, imunoistoquímica

**EFFECTS OF BANDVET ON CORNEAL REPAIR OF DOGS. A
CLINICAL, MORPHOMETRICAL, HISTOCHEMISTRY
IMMUNEHISTOCHEMISTRY STUDY.**

ABSTRACT - The effects of Bandvet® on corneal repair was studied after superficial keratectomy. Sixteen adult cross-breed dogs were used, being eight treated with Bandvet® (BV) and eight with saline 0.9% (CO). Daily clinical evaluations were accomplished 3, 7, 14 and 28 days in the post-operative period. Blepharospasm, conjunctival congestion, ocular discharge, photophobia, vascularization, pigmentation, and corneal edema were assessed by means of clinical scores. Blepharospasm and photophobia were noted at early stages of the post-operative period. Conjunctival congestion and ocular discharge changed significantly at day 7 of the post-operative period. Vascularization advanced axially in a constant manner in the early post-operative periods, disappearing in the late stages, only in the treated group. Corneal edema was observed in all time points in both of groups, changing significantly at day 14 of the post-operative period. At the completion of the study, keratectomized eyes were enucleated and corneas submitted to morphometrical evaluation (inflammatory cell count, collagen patches count, fibroblast count, and corneal epithelium and stromal thickness measurement) histochemistry (Alcian *Blue* pH 1.0 and Alcian *Blue* pH 2.5), digital analysis (tridimensional chromatic evaluation of the surface), and immunohistochemistry (fibronectin and tenascin labeling). During the 4 time points evaluated, inflammatory cell count was increased in the BV group. An enhanced number of collagen patches were observed in the corneas of the animals of the BV group, in the four time points evaluated, being significant in comparison to values observed in the transitional areas ($P = 0.040$). A higher fibroblast count was noted in the BV group at days 3, 14, 28, and 28. At day 7, however, the CO group showed higher cellularity. The cell count in the transitional area changed significantly at the third day. The peripheral corneal thickness was higher at days 3, 7 and 14, in subjects of the BV group. At day 28, however, corneal

thickness was more exacerbated in the CO group. Such parameter was more exacerbated in the transitional region, in all time points evaluated in animals of the BV group. The axial region of dogs of the CO was thicker in all time points, except at fourteenth day. Stromal corneal thickness of the peripheral and transitional regions was more intense in subjects of CO, in all time points, except for the third day, being denser in the BV group. The axial region was denser in BV group in all time points evaluated. The Alcian *Blue* pH 1.0, labeling was more intense in animals of BV group at day 3 and 14. The Alcian Blue pH 2.5 labeling was more intense in the BV group at days 3 and 24, whereas such parameter did not change significantly at day 7 and 14. Higher homogeneity was observed in animals of BV group in regard to the tridimensional evaluation of the surface, in all time points evaluated. The fibronectin antibody showed slight positivity at days 7, 14, and 28. In the CO group fibronectin labeling showed weak positivity at days 3 and 28, and strength positivity at day 7. The tenascin antibody labeling was positive at day 3, being moderate in corneas of dogs of the BV group and intense in those of the CO group. At day 28, slight positivity was observed throughout the corneal stroma of dogs of the BV group. Our results showed that corneal repair in dogs treated with Bandvet[®] was more organized.

Key-words: dog, keratectomy, Bandvet[®], corneal repair, morphometry, histochemistry, digital analysis, immunohistochemistry

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA CÓRNEA

A córnea é uma estrutura transparente e avascular, que compõe a túnica fibrosa do olho. Tem como funções principais promover a refração da luz e a proteção das estruturas intra-oculares (WILKIE e WHITTAKER, 1997). Possui superfície regular, necessária à formação da imagem sobre a retina (WHITLEY, 1991).

A córnea do cão é composta por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (SHIVELY e EPLING, 1970). O filme lacrimal tem sido considerado, por muitos, como um quinto componente (SLATTER, 1990). A espessura da córnea difere entre raças e indivíduos, sendo mais delgada na região axial (SAMUELSON, 1991). No cão, ela pode variar de 409 a 784 micrômetros, medindo entre 12 e 16 mm no seu eixo vertical e entre 13 e 17 mm no horizontal (WILKIE e WHITTAKER, 1997).

O epitélio corneal é do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, não secretor, composto por cinco a sete camadas de células poliédricas aderidas à membrana basal por hemidesmossomos (KIRSHNER, 1990; POWER e NEVES, 1997; WILKIE e WHITTAKER, 1997). Encontram-se três tipos celulares: células basais, células em asa e células superficiais (POWER e NEVES, 1997). Com a divisão das células basais, células filhas são direcionadas à superfície, perdendo gradualmente as suas organelas (SLATTER, 1990).

Células tronco do limbo são responsáveis pela substituição e regeneração teciduais (AKPEK e FOSTER, 1999). São indispensáveis à manutenção da integridade da superfície corneal, promovendo sua renovação em condições normais e a re-epitelização em processos reparatórios (DUA e AZURA-BLANCO, 1999). BRUNELLI et

al. (2007), demonstraram que o transplante autólogo de limbo foi eficiente em possibilitar a melhoria da transparência corneal.

O estroma compõe, aproximadamente, 90% da espessura da córnea, sendo formado por uma matriz de proteoglicanos e por lamelas de fibras de colágeno dispostas paralelamente (POWER e NEVES, 1997). Elas permitem que 99% da luz que permeia a córnea não sofra dispersão (SAMUELSON, 1991). Fibrócitos, ceratócitos, substância fundamental e eventualmente, linfócitos, macrófagos e neutrófilos incluem-se entre os seus constituintes (SLATTER, 1990; SAMUELSON, 1991). Ruptura no arranjo regular das lamelas ou alterações quanto ao tipo de colágeno induzirão à opacificação da córnea (WILKIE e WHITTAKER, 1997).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio (SLATTER, 1990), sendo composta por duas camadas: uma anterior, a qual se desenvolve *in utero* e outra posterior, produzida pelas células endoteliais, no curso da vida, que aumentam continuamente a sua espessura. Colágeno do tipo IV, laminina e fibronectina são encontrados, o que evidencia funções de adesão entre a membrana e as células endoteliais, pela fibronectina (POWER e NEVES, 1997). A membrana de Descemet é provida de elasticidade (SAMUELSON, 1991) e atua como a última barreira à invasão de leucócitos, de vasos sanguíneos no estroma (WARING, 1984) e a perfurações (WILKIE e WHITTAKER, 1997), podendo manter-se intacta ou em condições de descemetocelose (POWER e NEVES, 1997).

O endotélio constitui-se na camada mais interna da córnea (WILKIE e WHITTAKER, 1997), atuando como barreira à passagem de humor aquoso e na deturgescência do estroma. Ele é composto por uma única camada de células achatadas e poligonais (geralmente hexagonais), dispostas uniformemente (POWER e NEVES, 1997; WILKIE e WHITTAKER, 1997). No cão, sua densidade celular é de, aproximadamente, 2.800 células/mm² (SLATTER, 1990). As células endoteliais são metabolicamente muito ativas, o que se justifica pela presença de inúmeras mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático expressivos (GIRARD, 1981; NAUMANN e SAUTTER, 1988; SAMUELSON, 1991; POWER e NEVES, 1997). A densidade e celularidade endoteliais diminuem com a idade, havendo aumento da área

celular média (RODRIGUES et al., 2000). Reconhece-se que o endotélio possui capacidade limitada de regeneração (WHITLEY e GILGER, 1999).

As necessidades metabólicas da córnea são supridas pelo humor aquoso, pelo filme lacrimal pré-corneal, por capilares do limbo e pelo ar atmosférico (YANOFF e FINE, 1982; SLATTER, 1990; GUM, 1991; SCHOENOU e PIPPI, 1993). A energia requerida para a consecução dos processos metabólicos é obtida por glicólise aeróbica (SLATTER, 1990).

A córnea é rica em nervos sensoriais, particularmente os nociceptores, indispensáveis à manutenção da sua integridade. A perda das relações neurais poderá suscitar edema e esfoliação celular (KANSKI, 1989). A inervação nociceptora origina-se dos nervos ciliares longos, derivados do ramo oftálmico do nervo trigêmeo (SAMUELSON, 1991). As fibras migram do anel nervoso perilímbico, espalhando-se radialmente para o centro da córnea, a partir das camadas anterior e média do estroma; ramificam-se em direção ao epitélio, onde formam o plexo subepitelial que inerva todas as camadas do epitélio. Tratam-se de nervos mielinizados, que perdem gradualmente a mielina quando se aproximam da porção axial da córnea (DICE; SEVERIN; LUMB, 1973; GUM, 1991). Fibras simpáticas adrenérgicas, originadas no gânglio cervical superior são, também, parte integrante da inervação corneal (POWER e NEVES, 1997).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA REPARAÇÃO CICATRICIAL CORNEAL

A natureza da injúria e a intensidade da inflamação decorrentes influenciarão na qualidade da reparação corneal. A reparação cicatricial na córnea envolve migração, mitose e diferenciação celulares. Tratam-se de eventos conduzidos pela ação combinada de mediadores inflamatórios e de fatores do crescimento gerados posteriormente à injúria. Apontam-se os de crescimento epidermal (EGF), o derivado de plaquetas (PDGF) e transformadores de crescimento α (TGF α) e β (TGF β) (PEIFFER Jr. et al., 1987).

O EGF é componente natural da lágrima. Entre as suas funções mais representativas, citam-se a participação no *turn-over* das células epiteliais, aumento da síntese do RNA e do DNA, ação sobre mitoses das células epiteliais e de fibroblastos estromais e estímulo à diferenciação celular (SCHULTZ et al., 1992).

O PDGF é liberado ou secretado por diferentes tipos celulares, como plaquetas, macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa e por células endoteliais vasculares. Ele atua aumentando a força de tensão na ferida e, de forma sinérgica, com outros fatores de crescimento, na reparação cicatricial (MURALI et al., 1990).

O TGF α age estimulando a cicatrização, estando presente na lágrima e no humor aquoso, onde atua sobre o epitélio e o endotélio após ter sido secretado por macrófagos, eosinófilos e por ceratócitos (BENNETT e SCHULTZ, 1993).

O TGF β estimula a produção de fibronectina (WOOST et al., 1985; OHJI et al., 1993), a síntese de colágeno (CENEDELLA e FLESCHER, 1990) e a proliferação de fibroblastos estromais (TRIPATHI et al., 1990; OHJI et al., 1993). Ele é sintetizado nas células epiteliais e em fibroblastos estromais (SCHULTZ et al., 1994).

O epitélio corneal tem grande capacidade para se regenerar (SLATTER, 1990). As lesões epiteliais evoluem à reparação em tempo rápido, graças ao deslizamento das células adjacentes à lesão e a mitoses. Células poligonais, que se encontram localizadas entre as células mais superficiais e as basais, migram em movimentos amebóides até encontrarem o defeito (POWER e NEVES, 1997). Lesões pequenas podem ser reparadas rapidamente nas primeiras 24 horas, pela simples migração celular (SAMUELSON, 1991).

Decorridas 24 horas da injúria no epitélio, mitoses celulares são iniciadas, estimuladas pelo EGF, assim como o seu deslizamento (CENEDELLA e FLESCHNER, 1990). Em decorrência do maior tempo requerido para a renovação da membrana basal, o epitélio neoformado pode ser facilmente removido nas primeiras semanas ou até em meses após a injúria primária (SWANK e HOSGOOD, 1996).

A reparação de lesões estromais inicia-se pela síntese e distribuição de colágeno, paralelamente à gênese de proteoglicanos, que resultam na remodelação tecidual progressiva e no restabelecimento da força tênsil (POWER e NEVES, 1997). Ceratócitos periféricos e leucócitos poliformonucleares proliferam-se e migram em

direção à lesão, nas primeiras 48 horas. Metaloproteases (MMPs) sintetizadas pelos ceratócitos participam ativamente. Destaca-se a degradação de fibras colágenas lesadas, que são substituídas por uma matriz de fibrina, enquanto restos celulares são removidos por macrófagos oriundos do filme lacrimal (OLLIVIER et al., 2003).

As MMPs são proteases endógenas pertencentes a uma família de enzimas dependentes de zinco e de cálcio, essenciais à manutenção de processos homeostáticos. Elas estão envolvidas na remodelação e na reparação, bem como na destruição de tecidos, inclusive os corneais (BROOKS e OLLIVIER, 2004). Elencam-se em quatro classes de enzimas: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromalisinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e as com especificidade para membranas celulares (MMP-14, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) (BROOKS e OLLIVIER, 2004). No curso da reparação corneal e de permeio à lágrima, elas desempenham grande atividade (STRUBBE et al., 2000; PINEDA-BOLIVAR et al., 2001; SMITH et al., 2001; DANIELS et al., 2003; OLLIVIER et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; MULHOLLAND et al., 2005; COUTURE et al., 2006), induzindo a efeitos diversos.

Estudos comprovaram que córneas de mamíferos aviltadas expressam metaloproteases em grande quantitativo, retardando a reparação cicatricial (FINI et al., 1996; OLLIVIER et al., 2003). Reportou-se maior atividade da MMP-1, em células epiteliais e da MMP-9 na remodelação do estroma corneal, após ceratectomias lamelares em coelhos (MULHOLLAND et al., 2005). Em cães e em eqüinos, a remodelação do estroma corneal é, com maior ênfase, realizada pela MMP-2, sintetizada por ceratócitos. Ela participa da remodelação fisiológica do estroma corneal, ativando-se na presença de moléculas de colágeno danificadas. A MMP-9 é produzida por células epiteliais e por neutrófilos (OLLIVIER et al., 2007).

Decorridas as primeiras 24 horas da lesão suscitante, vasos localizados na região perilímbica migram em direção ao estroma. A velocidade com que tal se processa é variável, estando em 1 mm por dia, aproximadamente. A angiogênese é, geralmente, estimulada pelos mesmos fatores que desencadeiam a gênese da fibrose, o que justifica a ocorrência de vascularização paralelamente à migração e ativação fibroblásticas locais e de ceratócitos estromais (PEIFFER Jr. et al., 1987).

Na fase final da reparação estromal ocorrem a reorganização das fibras colágenas e a diminuição no tamanho e na celularidade fibroblásticas, resultando em retorno à transparência da córnea (YANOFF e FINE, 1982; WHITLEY e GILGER, 1999).

1.3 CERATITES ULCERATIVAS

As ceratites ulcerativas destacam-se entre as oftalmopatias que mais acometem a espécie canina (STARTUP, 1984). Caracterizam-se pela perda da continuidade epitelial, com ou sem comprometimento estromal (PEIFFER Jr. e PETERSEN-JONES, 1997).

Dentre as causas, amontam-se os traumas, as anormalidades palpebrais, ciliares e do filme lacrimal (NELSON e McMILLAN, 1988; KERN, 1990; SLATTER, 1990), as infecções bacterianas, micóticas e virais e as deficiências nutricionais (STARTUP, 1984; HELPER, 1989). Outros fatores causais, menos comuns, relacionam-se ao estresse (NASISSE, 1985), algumas endocrinopatias, enfermidades degenerativas (SLATTER, 1990), corpos estranhos, eventos neurotróficos, em casos de paralisia do ramo oftálmico do nervo trigêmeo, ressecamento da córnea resultante da sua exposição contínua na paralisia do nervo facial e falência na adesão da membrana basal do epitélio (BROOKS, 2000).

Ampla miríade de sinais clínicos pode estar presente em casos de ulceração corneal. Entre eles elencam-se a dor, hiperemia conjuntival, enoftalmia, blefarospasmo, epífora, edema corneal perilesional e miose, em casos de uveíte reflexa (SLATTER, 1990; STADES et al., 1998), secreção mucoide ou mucopurulenta e vascularização (LAFORGE, 1989).

Eventos relacionados à proteção da superfície corneal incluem as barreiras anatômicas, a dispersão do filme lacrimal, em que permeiam agentes antimicrobianos (lisozima, β -lisina e lactoferrina), a ação mecânica das pálpebras e da flora conjuntival saprófita, a qual compete com agentes patógenos por nutrientes, além de secretar substâncias com propriedades antibióticas (EICHENBAUM et al., 1987; KERN, 1990).

Em decorrência do acesso limitado de anticorpos humorais e de leucócitos citotóxicos, a córnea é considerada como “sítio de privilégio imunogênico”. Descreve-se o processamento de antígenos da superfície ocular pela conjuntiva que, em conjunto com o trato uveal, representam os centros linfóides ativos do bulbo ocular (EICHENBAUM et al., 1987).

Classificam-se as ceratites ulcerativas em superficiais, estromais e em descemetocel, de consoante com a sua profundidade. Outrossim, são distribuídos em livres de complicações, progressivas e refratárias, segundo a sua evolução (WHITLEY e GILGER, 1999).

Procedimentos terapêuticos fundamentam-se no alívio dos sinais clínicos e na profilaxia de descemetocel ou perfurações. Dentre as condutas clínicas, congregam-se a terapia antimicrobiana, a cicloplégica, de lubrificação ocular, a causticação, medidas dietéticas e o emprego de soluções ou de pomadas hiperosmóticas, sendo controversa, por alguns, a eficácia de agentes anticolagenolíticos (STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; HELPER, 1989; KERN, 1990; SLATTER, 1990).

1.4 MATRIZ EXTRACELULAR

Tecidos não são constituídos apenas por células. Uma parte substancial do seu volume é representada pelo espaço extracelular, que, por sua vez, é preenchido por intrincada rede de carboidratos e proteínas secretados localmente, que ocupam os espaços, constituindo a matriz extracelular (MEC) (ALBERTS et al., 1997).

A MEC tem como funções, interligar as células com o meio externo, transmitindo-lhes forças externas e desempenhando papel importante na regulação das respostas das células aos estímulos. Não se conhece de forma certa como a MEC desempenha as suas funções, embora existam evidências de que atue sobre as células mediante mudanças na organização tridimensional do citoesqueleto e quanto à ativação do segundo mensageiro e a via da proteína quinase (LOCHTER e BISSEL, 1995).

Entre as macromoléculas que compõem a MEC, destacam-se as cadeias de polissacarídeos das classes dos glicosaminoglicanos (GAGs), normalmente ligados a proteínas, formando proteoglicanos, e as proteínas fibrosas dos tipos estruturais e adesivas. (GARTNER e HIATT, 2001). GAGs e proteoglicanos formam uma substância altamente hidratada, do tipo gel, onde as proteínas estão inseridas (CHIQUET-EHRISMANN, 1990). Ambos os componentes da MEC (GAGs e proteoglicanos) exercem papel importante na reparação corneal (NAKASAWKA; ISOMURA; SHIMOEDA. 1997).

Os proteoglicanos são moléculas de alto peso molecular, não flexíveis e não ramificadas que se dividem em dois grupos, as não sulfatadas (ácido hialurônico), que são macromoléculas grandes e que não formam ligações covalentes com moléculas de proteínas, e as sulfatadas (queratan sulfato, heparan sulfato, heparina, dermatan sulfato e os sulfatos de condroitina) (GARTNER e HIATT, 2001). Elas são encontradas no fluido sinovial, no humor vítreo, na parede das artérias, na medula, na cartilagem e na córnea. Constituem-se nos componentes majoritários da MEC, onde interagem com proteínas, colágeno, elastina, fibronectina e laminina (LEE et al., 1999) .

Estudos em córneas de bovinos (AXELSSON e HEINEGARD, 1975), primatas (HASSELL; NEWSOME; HASCALL. 1979), coelhos (GREGORY, 1982), aves (FUNDERBURGH; CATERSON; CONRAD. 1986) e de humanos (SORIANO; CAMPOS; MICHELACCI et al., 2000) indicaram que o dermatan sulfato, o queratan sulfato e o heparan sulfato são os proteoglicanos de maior expressão.

Pesquisas têm sugerido que, tanto o queratan sulfato (lumican) como o dermatan sulfato (decorin) interagem com bandas específicas do colágeno corneal. Isso permite supor que interações proteoglicano-colágeno atuam na fibrilogênese do colágeno (MICHELACCI, 2003), na organização da MEC e, como consequência, na transparência corneal (MIYAGAWA et al., 2001).

Estudos quanto à cicatrização de córneas mecanicamente lesionadas, demonstraram que ocorrem mudanças nos glicoaminoglicanos, assim como nas fibras de colágeno estromais, uma vez que o quantitativo de glicoaminoglicanos diminui significativamente. Dos glicoaminoglicanos sulfatados, apenas o sulfato de condroitina continua sendo produzido (ANSETH e LAURENT, 1962; DOHLMAN e PRAUS, 1968;

PRAUS e DOHLMAN, 1969). A diminuição das concentrações de queratan está relacionada às afecções que decorrem na perda da transparência corneal (ANSETH, 1961; ANSETH, 1972; SCOTT e HAIGH, 1988). Outrossim, a produção excessiva e acúmulo de glicosaminoglicanos produzidos por ceratócitos estromais estão relacionados a doenças degenerativas (FRIEDBERG et al., 1991; FUNDERBURGH et al., 1998).

Entre as funções das diversas moléculas presentes na MEC, elencam-se a capacidade de interagir com vários componentes, com especial afinidade pelos fatores do crescimento e os receptores celulares, por servir de suporte e de união às células e criar condições para a passagem dos nutrientes e de oxigênio a elas. Adjuntamente, conferem viscosidade, tenacidade e força de tensão à MEC (BEACHEY, 1981; MÜLLER et al., 2004).

Colágenos são as proteínas mais abundantes do reino animal, sendo as maiores constitutivas da MEC. O termo colágeno é utilizado para caracterizar proteínas com estrutura de peptídeos. Há vários tipos de colágenos geneticamente distintos, presentes em tecidos conjuntivos diferentes (VON DER MARK; VON DER MARK; GAY, 1976).

O colágeno do tipo I é o mais comum. Ele forma fibras grosseiras e está presente na pele, tendão, osso, dentina e estroma corneal (SEVERIN, 1991; WHITLEY, 1991; NAKASAWA et al., 1997) proporcionando resistência tênsil (LEE et al., 1999). O tipo II forma fibras delgadas e está presente, quase que exclusivamente, nas matrizes das cartilagens hialina e elástica e no estroma corneal (SEVERIN, 1991; WHITLEY, 1991). O colágeno do tipo III, frequentemente associado ao tipo I, é também denominado fibra reticular delgada. O colágeno do tipo IV não constitui fibras, estando presente na lâmina basal, em que forma uma rede de moléculas de pró-colágeno unidas, que constitui a base de sustentação da lâmina basal. O colágeno do tipo V existe em pequeno quantitativo e origina fibrilas muito delgadas, estando associado com o colágeno do tipo I, presente no tecido intersticial, à similitude do colágeno do tipo VI. O colágeno do tipo VII constitui pequenos agregados conhecidos como fibrilas de ancoragem, que dão sustentação à lâmina basal para os feixes subjacentes de fibras colágenas dos tipos I e II. O colágeno tipo XI é encontrado nas cartilagens hialina e elástica, juntamente com o tipo II (MONTES, 1996).

QIAN; BURROWS e CINTRON (1995) identificaram, nas córneas fetal e adulta de diferentes espécies animais, nove tipos característicos de colágenos. BROOKS e OLLIVIER (2004) descreveram os tipos I, III, IV, V, VI e VIII na membrana de Descemet, conjuntamente com laminina, fibronectina e heparan sulfato. Relativamente ao estroma, verificou-se ser composto, principalmente, pelos colágenos dos tipos I, V, VI e XII e por glicosaminoglicanos (CONNON e MEEK, 2004).

SAIKA et al. (1996) observaram que na fase inicial da cicatrização de lesões corneais por álcali, os ceratócitos produzem mais colágenos dos tipos III e V, e nas fases tardias, todavia, predomina o tipo I.

Estudo realizado por GODOY, GUERRA e BARROS et al. (2002), em córneas de cães, após ceratoplastia lamelar empregando membrana fetal equina como enxerto, evidenciaram que o depósito de colágeno do tipo I aumenta na fase tardia da cicatrização, que o tipo III aumenta, de forma discreta, nas fases iniciais da cicatrização e que o V tem sua concentração intensificada durante toda a reparação cicatricial.

Técnicas histoquímicas possibilitaram o melhor entendimento da biologia dos colágenos. O método do Picrossirius *red* (SWEAT, et al., 1964), por exemplo, permitiu identificarem-se os colágenos dos tipos I, II, e III, em cortes de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (MONTES, 1996). Importante assinalar que o uso da solução de Picrossirius *red*, associada à microscopia polarizada, oferece sensibilidade e especificidade para se localizarem fibras colágenas (RABAU e DAYAN, 1994).

RABAU e DAYAN (1994) sugeriram que as diferentes birrefringências observadas à polarização, após empregar o Picrossirius *red*, permitem avaliar fases do processo cicatricial. Quando esverdeado ou amarelo esverdeado caracteriza a reparação cicatricial em atividade, quanto às altamente birrefringentes de cor laranja ou vermelha, processo fibrótico inativo. RIBEIRO et al. (2004), realizaram quantificação computadorizada, através da soma das áreas coradas pelo Picrossirius *red*, após polarização. Referiam-se ao método, como factível para a avaliação quantitativa, relativamente à deposição de colágeno.

Proteínas do tipo adesivas têm, como principal propriedade, a capacidade de se ligarem a outros componentes da MEC, unindo-os os uns aos outros e às células,

amontam-se, neste grupo, a fibronectina (FNC), a tenascina (TNC) e a laminina (LAM), (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A fibronectina é uma proteína adesiva, que constitui um dos principais componentes da MEC. Sua forma solúvel se encontra livre no plasma, sendo produzida, em maior quantidade, nos hepatócitos. Células endoteliais e macrófagos podem contribuir para a sua produção (ALITALO et al., 1980; MOHRI, 1996). Outras formas, insolúveis e filamentosas, encontram-se presentes nos tecidos e são sintetizadas, principalmente, por fibroblastos e células endoteliais (MOHRI, 1996).

Dentre as funções da fibronectina, destacam-se a de intervir na remodelação dos tecidos durante a embriogênese e a de participar da reparação cicatricial de lesões vasculares, posteriormente à formação do coágulo de fibrina (MOSHER, 1984). Estudos *in vitro* e *in vivo* indicaram que ela exerce quimiotaxia sobre as células do epitélio corneal, induzindo a sua migração (NISHIDA et al., 1983a; GORDON e JOHNSON, 1991). Sua utilização, na forma de colírio, favorece a reparação de lesões epiteliais persistentes (NISHIDA et al., 1983b) e de úlceras corneais experimentais em coelhos, ensejadas pela remoção epitelial com vapor de iodo (NISHIDA et al., 1984). Tratam-se de estudos que permitiram caracterizar a importância da fibronectina na reparação cicatricial (BINDER et al., 1980).

A laminina é uma proteína filamentosa abundante na membrana basal (MB). Entre suas funções, amontam-se a de ser mediadora da célula ao substrato do tecido conjuntivo, a de exercer participação importante na diferenciação celular, no movimento e na forma das células e na manutenção do fenótipo tecidual (COLOGNATO e YURCHENKO, 2000) e na fixação da membrana basal aos hemidesmossomos (ROOS, 1984).

A molécula de tenascina constitui-se de um hexâmero, razão pela qual é também conhecida como “hexabrachion” (CHIQUET-EHRISHMANN, 1990). Como uma molécula da matriz extracelular, a TNC tem um papel estrutural e pode servir como moduladora da função celular, por interações com os seus receptores, que segundo ERICKSON e BOURDON (1989), são constituintes da família das integrinas e unem-se a peptídeos RGD da molécula de TNC. Para esses autores, a única molécula da matriz

extracelular claramente identificada, que se une à TNC, é o proteoglicano condroitin sulfato.

Com base em dados experimentais, várias funções têm sido propostas para a TNC (CHIQUET-EHRISMANN, 1990), incluindo inibição de contato célula-célula, de adesão e não espraiamento de células em cultura (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1988; SHRESTHA et al., 1996) e atividade antiadesiva que em conjunto com a atividade adesiva e de espraiamento da FNC, permite a movimentação celular e a manutenção da integridade do seu citoesqueleto, durante a migração (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1988; SAGE e BORNSTEIN, 1991; AUKHIL; SAHLBERG; THESLEFF, 1996).

Estudos sugeriram a expressão da TNC no estroma corneal de coelhos após ceratectomia (TERVO et al., 1989; TERVO et al., 1991) e, outrossim, no desenvolvimento, reparação, inflamação e cicatrização corneal (MASERUKA et al., 2000).

1.5 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS

O desenvolvimento de métodos para a coleta, processamento e análise de imagens tem permitido a obtenção de dados ainda inexplorados, graças à capacidade de se realçarem, diminuir e delimitarem características das imagens digitalizadas, por análise de tonalidades específicas de cor (ERLER e MARCHEVSKY, 1994; SYNOPSIS, 1996; PHILLIPS et al., 2001).

Com o advento de programas computacionais direcionados à análise de parâmetros microscópicos, tem se tornado frequente a utilização de tais métodos, seja para pesquisa ou para o diagnóstico (HAMILTON, 1997; BARBOSA-JÚNIOR, 2001). Entre as vantagens da mensuração digital de estruturas à histologia e à citopatologia citam-se a diminuição da variabilidade na quantificação de características celulares e teciduais, a promoção de uma escala numérica e reprodutível dos aspectos qualitativos, o aumento da sensibilidade na detecção de alterações mínimas, a avaliação dos efeitos

de diferentes métodos de processamento histológico de um material, coleta e preservação de dados (HAMILTON e ALLEN, 1995; TRUE, 1996).

Pela análise computadorizada de imagens, podem ser processadas medidas lineares, contagem de objetos, determinação de forma e cor, estereologia, além de mensurações mais complexas e multiparamétricas (BARTELS e THOMPSON, 1994; TRUE, 1996; OBERHOLZER et al., 1996). Avaliações histológicas conjugadas a métodos morfométricos computadorizados forneceram resultados mais reais e completos para os mais diversos tipos de alterações teciduais (FIGUERÊDO-SILVA et al., 1999).

1.6 *TRITICUM VULGARE*

Há muito que se buscam agentes facilitadores ou promotores da reparação tecidual. Extratos cartilagosos (PRUDDEN et al., 1970) e soluções de colágeno (SHOSHAN e FINKELSTEIN, 1970) e os N-acetil glicosaminos (PRUDDEN; MIGAL; HANSON, 1970) são reconhecidos por suas propriedades em acelerar a reparação de feridas. Nas células de mamíferos, sabe-se da presença de fatores específicos com propriedades cicatrizantes (TEN DIJKE e IWATA, 1989). Reconhecem-se as propriedades de extratos derivados de plantas, como o *Traumatina* (ZIMMERMAN e COLUDRON, 1979), extratos da *Centella asiática* (MORRISSET et al., 1987) e do *Gardeniae fructus* (fruto da *Gardênia jasminoides ellis*) (SAKURAGAWA et al., 1992).

O extrato aquoso do *Triticum vulgare* (trigo) obtido de plantas cultivadas sob condições controladas, oferece propriedades bioativas, incluindo o efeito mitogênico sobre fibroblastos, como fora observado em camundongos das linhagens BALB/c 3T3 e L929 (VIANO; MOSSO; NICOLA, 1985; FARINELLA et al., 1986; FAVIT et al., 1992). A atividade mitogênica é acompanhada pela estimulação da ornitina descarboxilase (ODC) e pelo aumento da hidrólise do inositol (FAVIT, 1992). A estimulação da ODC relaciona-se à ativação de EGF e de PDGF, que estimulam o metabolismo de lipídios e de ácidos graxos (CARPENTER e COHEN, 1990; GLASGOW e ELING, 1990;

PANDIELLA et al., 1990; ULLRICH e SCHLESSINGER, 1990; MELDOLESI e MAGNI, 1991).

VAN Den BERGHE et al. (1993) isolaram uma fração ativa do extrato aquoso do *Triticum vulgare*, contendo pequenas moléculas não protéicas capazes de estimular o crescimento de células endoteliais da veia umbilical de seres humanos, do endotélio aórtico de fetos bovinos e de células renais de filhotes de hamsters, porém, sem efeitos sobre células do epitélio pigmentar da retina ou sobre fibroblastos de indivíduos da espécie humana. FIORE et al. (1993) observaram efeito estimulante de várias frações do extrato aquoso de *Triticum vulgare* sobre a hidrólise do inositol e a atividade da ODC em fibroblastos de camundongos.

CAVALIERE et al. (1986) estudaram os efeitos do extrato de *Triticum vulgare*, administrado por via intraperitoneal, sobre a cicatrização de úlceras superficiais induzidas experimentalmente em córneas de coelhos. Os autores sugeriram que os eventos observados eram decorrentes, possivelmente, da ação de fatores de crescimento presentes no extrato, capazes de estimular células epiteliais corneais.

O produto BandVet^{®1} é um extrato aquoso do *Triticum vulgare*, que contém elementos bioestimulantes, notadamente quanto à estimulação da atividade fibroblástica, na reparação de feridas (MORALES citado por MATERA et al., 2002; DUQUE ORTIZ, 2004). MATERA et al. (2002) confirmaram os efeitos benéficos do produto sobre a cicatrização, por primeira e segunda intenções, de feridas cutâneas produzidas em coelhos.

DUQUE ORTIZ (2004) estudou os efeitos do BandVet[®], administrado sobre a superfície ocular, sobre a reparação corneal após ceratectomia superficial em cães. Os autores identificaram importantes benefícios quanto à qualidade da reparação cicatricial, caracterizados pela presença de um maior quantitativo de fibroblastos ativos e quanto à completa remodelação do colágeno estromal.

GALERA et al. (2008) notaram que o BandVet[®], a despeito de não se tratar de fármaco para uso oftálmico, pode ser empregado em córneas de felinos submetidos a ceratectomia superficial, com bons resultados.

¹ BandVet[®] - Schering Ploug – São Paulo – Brasil.

2 OBJETIVOS

Valendo-se da assertiva de que o extrato aquoso do *Triticum vulgare* (BandVet®) atua favorecendo a reparação de tecidos diversos, admitiu-se testá-lo, após estudo piloto, quanto aos seus efeitos locais sobre a reparação de córneas de cães, após ceratectomia superficial. Mediante avaliação clínica e estudo morfométrico, histoquímico, imunoistoquímico e posterior análise digital.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Selecionaram-se 16 cães hígidos, sem raça definida, machos e fêmeas, adultos, com peso aproximado de 10 kg, prévia e clinicamente avaliados. A cada um, foram aplicados, ainda, duas doses de vermífugo (praziquantel 175mg)² intercaladas de 21 dias, vacina³ e antiparasitário de uso tópico (fipronil 1%)⁴. Realizaram-se o teste lacrimal de Schirmer⁵, a biomicroscopia em lâmpada em fenda⁶, a oftalmoscopia binocular indireta⁷, a tonometria de aplanção⁸ e a prova da fluoresceína⁹. Posteriormente, os cães foram identificados e mantidos em canis individuais, com água potável e ração apropriada *ad libitum*.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Cuidados bioéticos obedeceram ao preconizado pela *Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO, National Institutes of Health Publications N° 85 - 23: Revised 1985* de consoante com o código de Nüremberg (GOLDIM, 1995) e as exigências da Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Câmpus de Jaboticabal.

² Drontal Plus - Bayer S. A. Saúde Animal - São Paulo - Brasil.

³ Vanguard® HTLP 5/CV-L - Pfizer - São Paulo - Brasil.

⁴ Topline - Merial Saúde Animal Ltda - São Paulo - Brasil.

⁵ Teste da Lágrima de Schirmer - Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos. São Paulo - Brasil.

⁶ Portable Slit Lamp SL-14- Kowa Company - California - USA.

⁷ Oftalmoscópio binocular indireto FOH-5, Eyetec - São Carlos- São Paulo - Brasil.

⁸ Tonômetro de aplanção (Tono-Pen) - Mentor Ophthalmics - USA.

⁹ Fluoresceína - Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos - São Paulo - Brasil.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos com oito animais cada, o grupo controle (CO) e grupo tratado (BV).

3.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICO E CIRÚRGICO

Concebeu-se empregar o olho esquerdo para as ceratectomias. Previamente às condutas operatórias, os cães foram privados de sólidos e de líquidos por 12 e 6 horas, respectivamente, após as quais foram anestesiados. Empregou-se o maleato de acepromazina¹⁰, na dose de 1mg/Kg de peso corpóreo, pela via intravenosa. Posteriormente, o thiopental sódico¹¹ na concentração de 2,5%, diluído em solução aquosa, na dose aproximada de 12,5mg/Kg, por via intravenosa e a manutenção com halotano¹² e oxigênio, em circuito semifechado, no 3º plano do 3º estágio de anestesia, segundo GUEDEL (1952).

Conicionados aos efeitos da anestesia geral, os pacientes foram submetidos à anti-sepsia do saco conjuntival, da córnea e da região periocular com solução aquosa tamponada de polivinilpirrolidona-iodo a 10% (P.V.P.I.)¹³, diluído em solução de cloreto de sódio a 0,9%, em concentração de 1/25. Após preparo rotineiro do campo operatório, realizaram-se a blefarostase mecânica e a fixação do bulbo do olho, com três pontos de sustentação esclerais.

Condutas relativas às manobras cirúrgicas sobre a córnea foram efetuadas empregando-se microscópio cirúrgico¹⁴, em aumento de seis vezes. Com trépano circular de dez milímetros de diâmetro e de 0,5mm de profundidade, aplicado na região central da córnea, delineou-se a lesão lamelar, compreendendo o epitélio e,

¹⁰ Acepran 1%® - Univet - São Paulo- Brasil.

¹¹ Thionembutal - Abott - São Paulo- Brasil.

¹² Halotano (Fluothane) - Zeneca farmacêutica do Brasil Ltda. - Itapira - São Paulo - Brasil.

¹³ Marcodine Tópico® - Cristália - Produtos Farmacêuticos Ltda. - Itapira São Paulo - Brasil.

¹⁴ Microscópio Cirúrgico MC - M 900 - D.F. Vasconcellos S.A. - São Paulo- Brasil.

aproximadamente, metade da espessura do estroma, para posterior ceratectomia superficial, que fora realizada com tesoura de ceratectomia (Figura 1). Durante as manobras, as córneas foram continuamente irrigadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

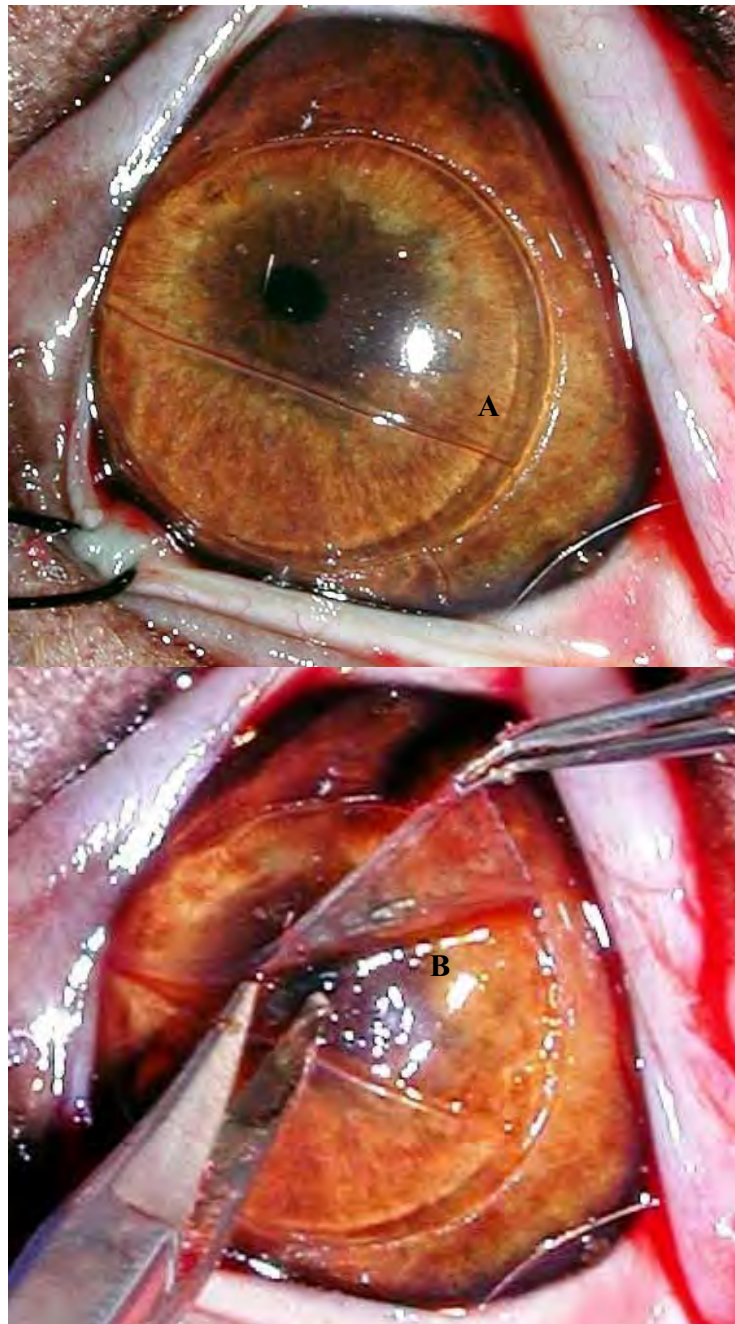


Figura 1. Imagem fotográfica de olho de cão, adulto, macho, sem raça definida, submetido à ceratectomia superficial, após delineamento da lesão lamelar (A). Notar execução da ceratectomia superficial em hemisférios (B).

3.5 PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

Nos animais do grupo BV, balizou-se o pós-operatório na aplicação tópica de creme à base do extrato aquoso de *Triticum vulgare* (BandVet®), a intervalos regulares de 8 horas, durante os sete primeiros dias, iniciando-se 4 horas após o procedimento cirúrgico. Nos cães do grupo CO, empregou-se solução de cloreto de sódio a 0,9%, seguindo-se os mesmos intervalos e pelo mesmo tempo. Em ambos os grupos, utilizou-se colírio de atropina a 1%¹⁵, a cada 12 horas, por sete dias e colar do tipo “elisabetano” durante todas as etapas do pós-operatório.

3.6 PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO

3.6.1 Avaliação clínica

Foram realizadas avaliações por 28 dias. Eventos intercorrentes, notadamente blefarospasmo, secreção ocular, blefarite, congestão e hiperemia conjuntivais, edema corneal, vascularização e pigmentação corneais foram avaliados. Os parâmetros anotados, para todas as variáveis, foram classificados de forma subjetiva qualiquantitativa em: (-) ausente; (+) discreto; (++) moderado; (+++) intenso.

3.6.2 Microscopia de luz

Dirigiram-se as atenções para a infiltração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares e quanto à presença de fibroblastos tendo em vista as observações de

¹⁵ Atropina 1%® - Allergan Frumtost. Produtos Farmacêuticos Ltda. - São Paulo – Brasil.

DUQUE ORTIZ (2004). Adotaram-se os períodos de 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório para tal. Nas datas, os animais foram submetidos à nova anestesia (vide item 3.3). Os bulbos oculares esquerdos foram removidos da sua órbita, por técnica de enucleação subconjuntival e submetidos à fixação em solução de formol tamponado a 10%. Em uma segunda etapa, eles foram reduzidos, incluídos em parafina e cortados sagitalmente a uma espessura de 5µm.

3.6.2.1 Morfometria

As lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE) e pelo Tricrômico de Masson e estudadas em microscópio de luz, nas objetivas de 10, 20 e 40X. Após análise, os cortes foram documentados em fotomicroscópio¹⁶, acoplado a uma câmera de vídeo de alta resolução¹⁷, para a digitalização das imagens.

3.6.2.1.1 *Contagem de leucócitos polimorfonucleares*

A quantificação de leucócitos polimorfonucleares foi realizada por contagem do número de células em cinco segmentos por lâmina, três na área central e dois na área de transição das ceratectomias. Para a contagem, utilizou-se uma grade contendo 70 campos distribuídos geometricamente (Figura 2), aplicada sobre o segmento a ser avaliado. Procedeu-se à contagem das células nos 70 campos com área de 246,5µm² cada. A seguir, calculou-se a média dos dados.

¹⁶ Eclipse Nikon E- 600. Nikon Instruments Inc. - Melville - USA.

¹⁷ AxionCam - Carl Zeiss do Brasil Ltda. - São Paulo - Brasil

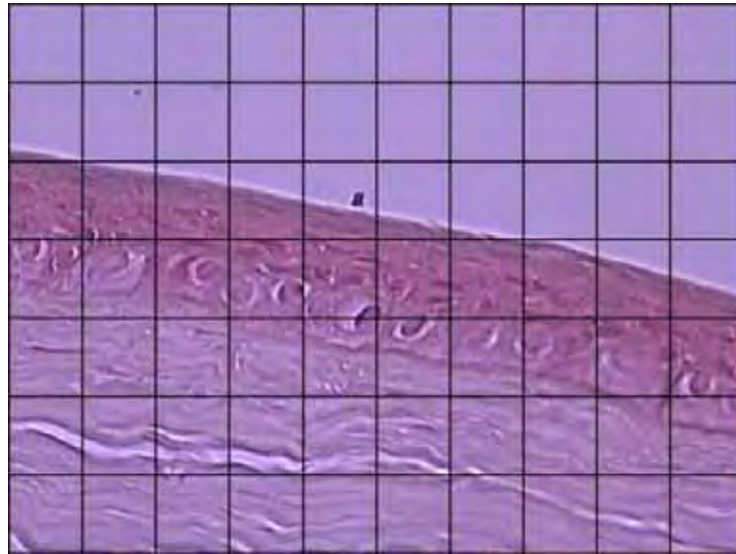


Figura 2. Fotomicrografia na qual se demarca a colocação da grade com 70 campos geometricamente distribuídos para aferição em programa ImageJ, em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial. Jaboticabal - SP, 2009.

3.6.2.1.2 Contagem de pontos de colágeno

O estudo do quantitativo dos pontos de colágeno foi realizado por contagem em cinco segmentos, por lâmina, sendo três na área central e dois na área de transição das ceratectomias. Empregou-se uma grade contendo 70 campos distribuídos geometricamente, aplicada sobre o segmento a ser avaliado. Procedeu-se à contagem das células nos 70 campos com área de $246,5\mu\text{m}^2$ cada. A seguir calculou-se a média dos dados.

3.6.2.1.3 **Contagem de fibroblastos**

Realizou-se a contagem de fibroblastos nas áreas central e de transição das ceratectomias. Lâminas anteriormente coradas pelo Tricrômico de Masson foram avaliadas, em microscópio de luz, com objetiva de 40X, adaptado a um sistema computarizado de análise de imagens. Foram fotografados cinco segmentos por lâmina, sendo três na região central e dois na região de transição. Empregou-se uma grade contendo 70 campos distribuídos geometricamente, aplicada sobre o segmento a ser avaliado. Procedeu-se à contagem das células nos 70 campos com área de $246,5\mu\text{m}^2$ cada. Após identificação e contagem dos fibroblastos, calculou-se a média. As contagens foram realizadas empregando-se o programa ImageJ¹⁸ na interface *Analyze Cell counter*.

3.6.2.1.4 **Espessura do epitélio e do estroma corneais**

Empregou-se o programa ImageJ. Para cada lâmina, foram feitas três leituras, uma na área central, uma na de transição ou intermediária e outra na região pré-lesão. Em cada leitura foram realizadas 15 medidas (Figura 3) e, a seguir, calculou-se a média.

¹⁸ ImageJ 1.40g. National Institutes of health. - Maryland - USA.

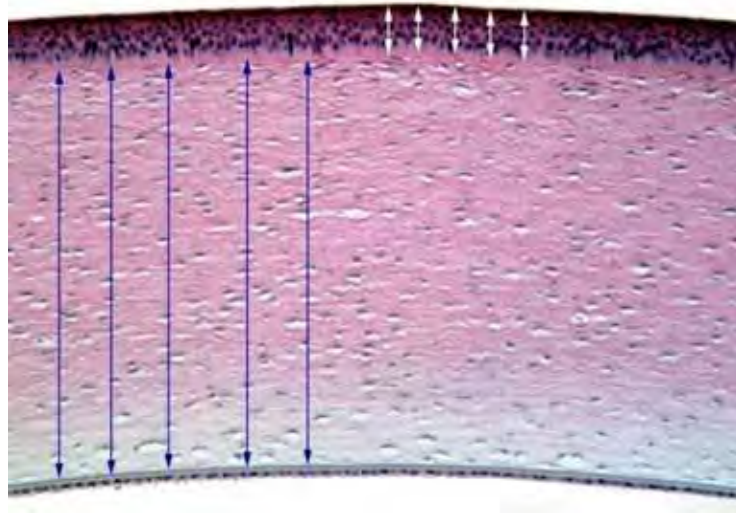


Figura 3. Fotomicrografia na qual se demarca o processo de aferição das medidas de espessura do epitélio (setas brancas) e do estroma (setas azuis) em programa ImageJ, em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial. Jaboticabal - SP, 2009.

3.6.3 Histoquímica

As análises descritivas levaram em consideração o padrão e a quantificação intensidade da expressão de polissacarídeos das classes das glicosaminoglicanos (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios para a caracterização de proteoglicanos pelos métodos histoquímicos Alcian *Blue* pH 1,0, Alcian *Blue* pH 2,5; ácido periódico de Schiff Alcian *Blue* pH 1,0 e ácido periódico de Schiff e Alcian *Blue* pH 2,5¹.

Substância	Método histoquímico ²			
	AB pH 1,0	AB pH 2,5	PAS-AB pH 1,0	PAS-AB pH 2,5
Glicogênio				X
Mucinas ácidas e neutras				
Mucinas ácidas		X		
Sulfomucinas	X	X	X	
Carboximucinas		X		
Sialomucinas		X		X
Proteoglicanos sulfatados			X	

¹ Segundo NOGUEIRA (1968) e COOK (1994).

² AB pH1,0 (Alcian *Blue* pH 1,0); AB pH 2,5 (Alcian *Blue* pH 2,5) ; PAS-AB pH1,0 (ácido periódico de Schiff e Alcian *Blue* pH 1,0); PAS-AB pH 2,5 (ácido periódico de Schiff e Alcian *Blue* pH 2,5).

3.6.3.1 Alcian *Blue* pH 1.0

Lâminas foram coradas Alcian *Blue* pH 1.0, e avaliadas à microscopia de luz nas objetivas de 10, 20 e 40X. As variáveis, foram classificados de forma subjetiva qualitativamente em: ausente; discreto; moderado; intenso.

3.6.3.2 Alcian *Blue* pH 2.5

Empregou-se o mesmo protocolo utilizado no item 3.5.3.2, com a diferença do pH da solução.

3.6.4 Avaliação cromática tridimensional (ACT).

Imagens de lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson, de ambos os grupos, nos quatro períodos avaliados (3, 7, 14 e 28 dias), e anteriormente digitalizadas, foram submetidas à análise digital em programa ImageJ na interface *Iterative 3D surface Plot* v2,22, com as seguintes configurações: *filled*, *spectrum LUT*, *grid size 512*, *smoothing 0.0*, *perspective 0.5*, *lighting 0.5*, *z-Ratio = xy-Ratio* (selecionado), *invert* (selecionado), *scale 1.6*, *z-Ratio 0.5*, *Max 69%*, *Min 0%*. A interface *Iterative 3D surface Plot* permite a formação da imagem em 3D, a partir das cores básicas componentes da imagem, possibilitando identificarem-se e quantificarem-se as áreas cromáticas e a sua homogeneidade.

Para a análise descritiva das imagens, levou-se em consideração a intensidade e o padrão das diferentes tonalidades de vermelho, verde e azul (dispostas pelo programa) em cada lâmina estudada, baseados na admissão de que todas as lâminas foram processadas de forma padronizada, e que, conseqüentemente, as alterações na homogeneidade e nas áreas cromática se deveram a alterações estruturais da córnea. A quantificação das diferentes áreas cromáticas foi realizada mediante *Measure the thresholded area*, do ImageJ.

3.6.5 Imunoistoquímica

3.6.5.1 Fibronectina

As amostras em parafina foram cortadas a 5µm de espessura e estendidas em lâminas de vidro, previamente preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano¹⁹.

¹⁹ 3-aminopropyltriethoxy-silano - Sigma, St. Louis - USA.

Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, o primeiro a 60°C, por 30 minutos, e o segundo à temperatura ambiente, por 20 minutos. A seguir, foram reidratados em concentrações descendentes de etanol, com três passagens em etanol absoluto e, posteriormente, a 95, 85 e 80%, durante cinco minutos cada. A seguir, procedeu-se à retirada do pigmento formólico, sendo as secções submetidas à solução de hidróxido de amônio a 10%, em etanol a 95%, durante 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e em duas passagens de água destilada. A seguir, foram submetidos e aos tratamentos para recuperação antigênica. Para os cortes que receberam o anticorpo primário, antifibronectina²⁰, previamente à incubação realizou-se a pepsinização em estufa. A etapa consistiu na imersão das amostras em uma solução composta de 1g de pepsina (pH 1,8), 10 ml de HCl 1N e 90 ml de água destilada, durante 10 minutos, em estufa a 60°C e por 20 minutos a 20°C. Em sequência, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena tecidual e os cortes incubados em solução de peróxido de hidrogênio a 6% + metanol (1:1, v/v), em duas trocas de cinco minutos.

Consignadas as etapas anteriores realizaram-se lavagens em solução tampão de TRIS²¹, pH 7,4. Posteriormente, procedeu-se à incubação das amostras com os anti-soros, por 60 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens em solução tampão de TRIS, a incubação dos cortes com anticorpo secundário biotinilado polivalente, cabra anti-coelho/camundongo, à temperatura ambiente, na diluição de 1/100 (Dakopatts), por 30 minutos. Efetuou-se a adição do complexo streptoavidina-biotina²², na diluição de 1/100 por 30 minutos. Anticorpos secundário e terciário foram diluídos em solução tampão de TRIS -HCl, pH 7,4. A imunomarcação específica foi visibilizada pela incubação com diaminobenzidina²³ contendo 0.03% de H₂O₂, por cinco minutos, lavadas duas vezes com água destilada. Finalizados, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, duas vezes em água destilada, e, em seguida, contracorados com Hematoxilina de Mayer, por 10 minutos. Após nova lavagem, seguiram-se a

²⁰ Polyclonal Rabbit Anti-Human Fibronectin, Dako, AIS, Glostrup - Denmark.

²¹ TRIS, pH 7,4 - Sigma, St. Louis - USA.

²² Streptoavidina-biotina - Dako, AIS, Glostrup, - Denmark.

²³ DAB - Sigma, St. Louis - USA.

desidratação, diafanização e montagem das lâminas em Permount²⁴. Os controles positivos foram usados segundo orientação do fabricante (Tabela 2).

A especificidade do anticorpo no tecido foi confirmada pela ausência de marcação nos controles negativos. Controles positivos e negativos confirmaram a sensibilidade do método.

3.6.5.2 Tenascina

O protocolo foi o mesmo realizado no item 3.5.5.1, com diferença no tempo e na temperatura da pepsinização (37° por 30min) e no tempo e temperatura de incubação (*over night*) (Tabela 2).

Tabela 2. Anticorpo policlonal primário, diluição, recuperação antigênica, tempo de incubação e controle positivo empregados em córneas de cães adultos, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial. Jaboticabal - SP, 2009

Anticorpo Policlonal primário	Diluição	Recuperação Antigênica	Tempo de Incubação	Controle positivo
Fibronectina	1:1200	Pepsina a 1% pH 1.8 em estufa por 10min a 60°C e 20min a 20°	1h a temperatura ambiente	Tecido conjuntivo
Tenascina	1:3000	Pepsina a 1% pH 1.8 em estufa a 37° por 30min.	<i>Over night</i> a 4°C	Tecido conjuntivo

²⁴ Permount - Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ - USA.

3.6.6 Análise estatística

Os eventos, foram analisados pelo teste t de Student, quando comparados dois grupos, teste de variância ANOVA (*Kruskal-Wallis Analysis of Variance*), quando comparados mais de dois grupos, e teste t de Mann-Whitney para se testarem duas amostras independentes de populações com médias iguais (estudo clínico). Em todos, considerou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Ao estudo clínico temporal, não foram observadas intercorrências sistêmicas, infecções locais ou outras manifestações que aventassem qualquer complicação. Os diferentes sinais clínicos, suas intensidades e percentual de animais acometidos encontram-se representados no Quadro 1.

Relativamente ao estudo estatístico, houve diferença significativa, relativamente à congestão conjuntival aos sete dias ($Z_{\text{cál}} 2,081 > Z_{\text{tab}} 0,675$), aos 14 dias em relação à opacidade corenana ($Z_{\text{cál}} 0,315 < Z_{\text{tab}} 0,675$) e no quesito secreção ocular aos sete dias ($Z_{\text{cál}} 1,601 > Z_{\text{tab}} 0,675$). Relativamente aos outros sinais, não foram encontradas diferenças.

As Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 apresentadas na sequência, ilustram os eventos clínicos que decorreram dos tratamentos impostos a cada subgrupo, notadamente os de maior significação.

QUADRO 1. Percentual dos cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas dos grupos BV e CO, que apresentaram sinais clínicos de blefarospasmo, congestão conjuntival, secreção ocular e edema e vascularização corneais, após ceratectomia superficial, com suas respectivas intensidades, aos 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Jaboticabal - SP., 2009.

GRUPOS E PERÍODOS	INTENSIDADE DO SINAL CLÍNICO			
	Ausente	Discreto	Moderado	Intenso
BLEFAROSPASMO				
BV 3d	50%	25%	25%	-
CO 3d	37,5%	12,5%	50%	-
BV 7d	83,33%	16,66%	-	-
CO 7d	50%	50%	-	-
BV 14d	100%	-	-	-
CO 14d	100%	-	-	-
BV 28d	100%	-	-	-
CO 28d	100%	-	-	-
CONGESTÃO CONJUNTIVAL				
BV 3d	12,5%	87,5%	-	-
CO 3d	12,5%	87,5%	-	-
BV 7d	100%	-	-	-
CO 7d	12,5%	87,5%	-	-
BV 14d	100%	-	-	-
CO 14d	100%	-	-	-
BV 28d	100%	-	-	-
CO 28d	100%	-	-	-
SECREÇÃO OCULAR				
BV 3d	12,5%	62,5%	25%	-
CO 3d	12,5%	25%	50%	12,5
BV 7d	100%	-	-	-
CO 7d	100%	-	-	-
BV 14d	83,33%	16,6%	-	-
CO 14d	33,33%	33,33%	16,66%	16,66%
BV 28d	100%	-	-	-
CO 28d	100	-	-	-
EDEMA CORNEAL				
BV 3d	12,5%	62,5%	25%	-
CO 3d	-	75%	25%	-
BV 7d	16,66%	83,33%	-	-
CO 7d	50%	16,66%	-	33,33%
BV 14d	75%	25%	-	-
CO 14d	50%	25%	25%	-
BV 28d	50%	50%	-	-
CO 28d	50%	50%	-	-

QUADRO 1. Percentual dos cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas dos grupos BV e CO, que apresentaram sinais clínicos de blefarospasmo, congestão conjuntival secreção ocular, de edema corneal, e vascularização corneal, após ceratectomia superficial, aos 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório. Jaboticabal – SP, 2009.

VASCULARIZAÇÃO CORNEAL				
BV 3d	75%	25%	-	-
CO 3d	37,5%	50%	12,5%	-
BV 7d	33,33%	50%	16,66%	-
CO 7d	33,33%	66,66%	-	-
BV 14d	50%	25%	25%	-
CO 14d	25%	25%	25%	25%
BV 28d	100%	-	-	-
CO 28d	50%	50%	-	-
PIGMENTAÇÃO CORNEAL				
BV 3d	100%	-	-	-
CO 3d	100%	-	-	-
BV 7d	100%	-	-	-
CO 7d	100%	-	-	-
BV 14d	100%	-	-	-
CO 14d	100%	-	-	-
BV 28d	100%	-	-	-
CO 28d	100%	-	-	-
BLEFARITE				
BV 3d	100%	-	-	-
CO 3d	100%	-	-	-
BV 7d	100%	-	-	-
CO 7d	100%	-	-	-
BV 14d	100%	-	-	-
CO 14d	100%	-	-	-
BV 28d	100%	-	-	-
CO 28d	100%	-	-	-

BV (grupo BandVet®); CO (grupo controle).

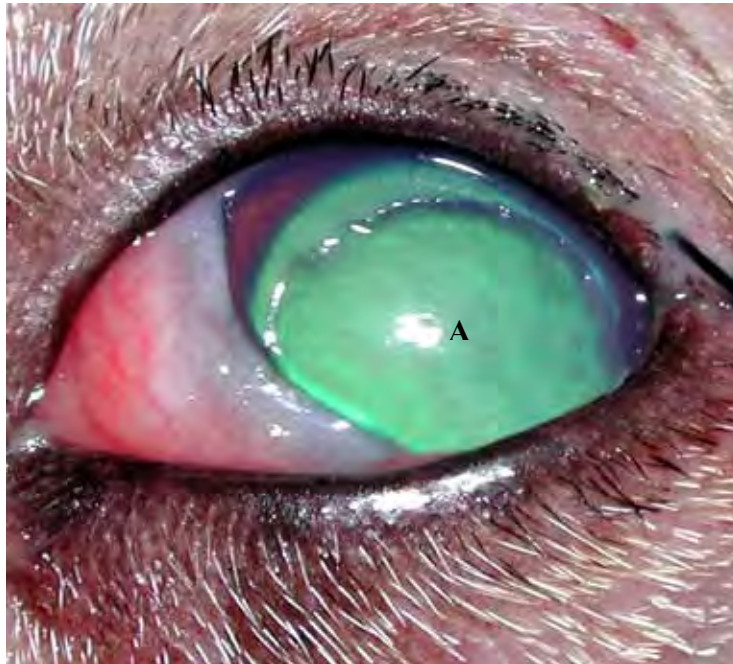


Figura 4. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório. Notar edema corneal discreto (A). Jaboticabal - SP, 2009.

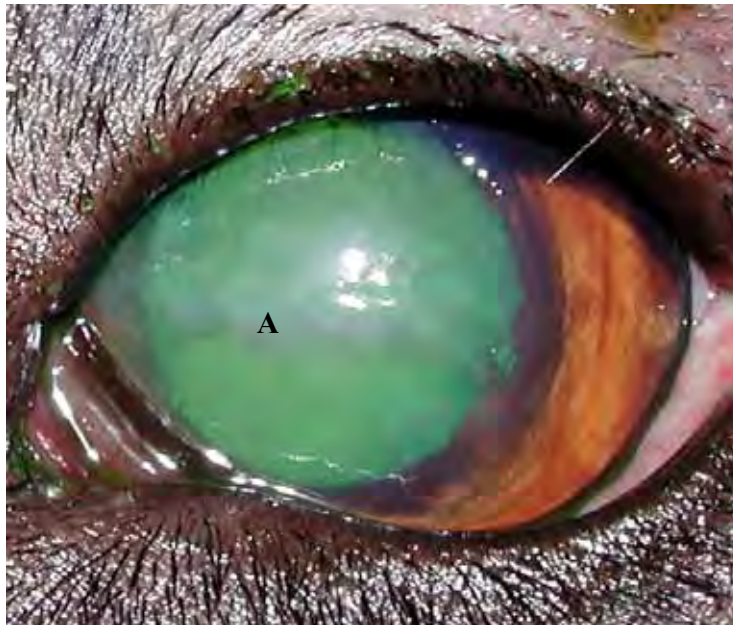


Figura 5. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, fêmea do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório. Notar edema corneal discreto (A). Jaboticabal - SP, 2009.

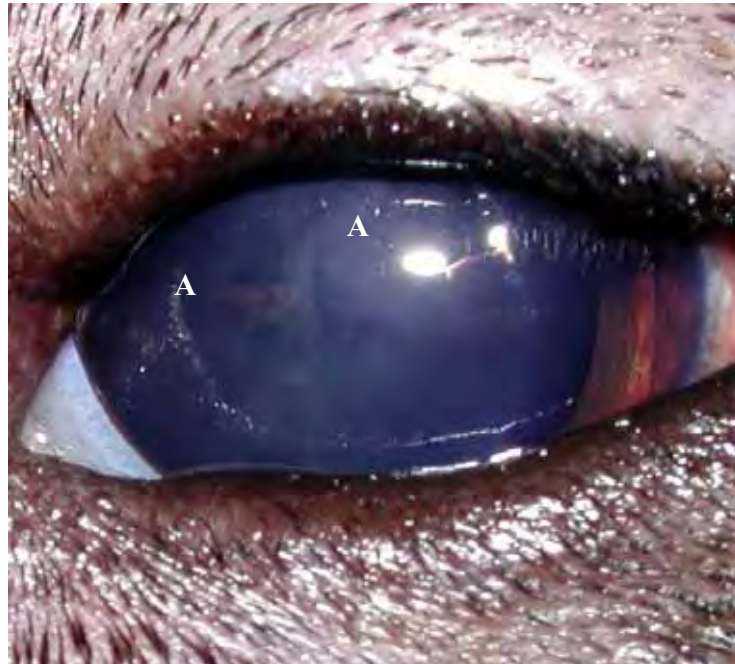


Figura 6. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório. Notar edema corneal discreto (A). Jaboticabal - SP, 2009.

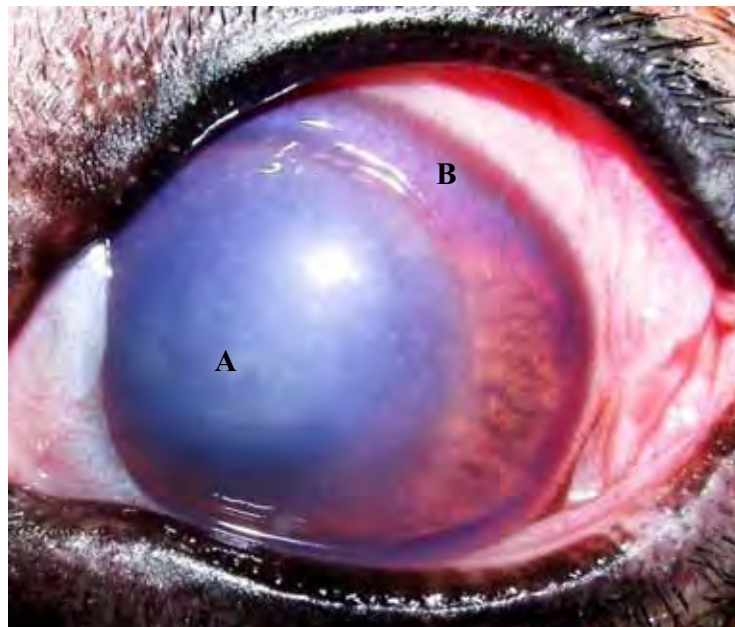


Figura 7. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório. Notar edema corneal intenso (A) e vascularização discreta (B). Jaboticabal - SP, 2009.



Figura 8. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório. Notar edema corneal discreto (A). Jaboticabal - SP, 2009.

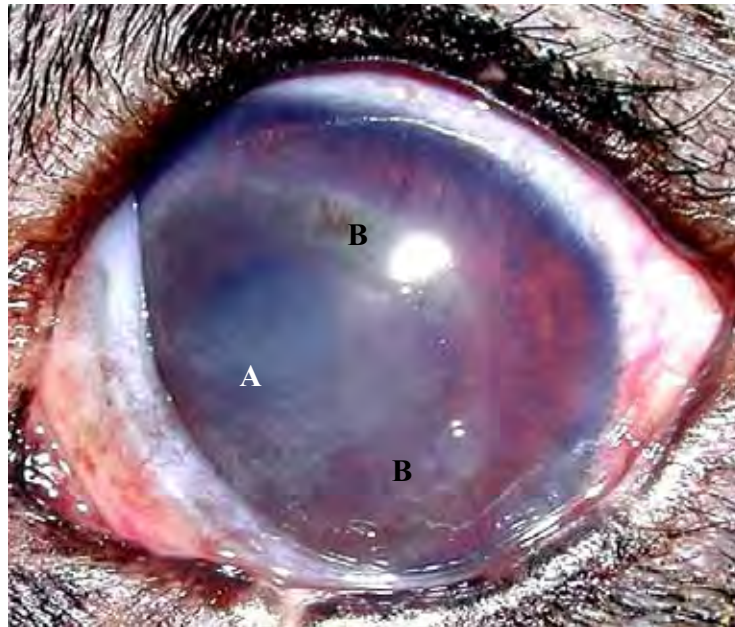


Figura 9. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, fêmea do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório. Notar edema corneal moderado (A) e vascularização moderada (B). Jaboticabal - SP, 2009.

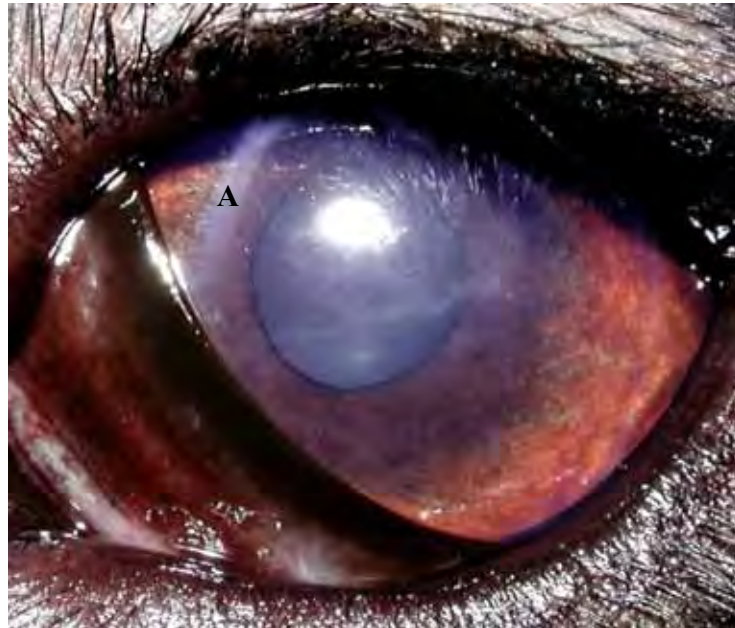


Figura 10. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, macho do grupo BV, após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório. Notar edema corneal discreto (A). Jaboticabal - SP, 2009.

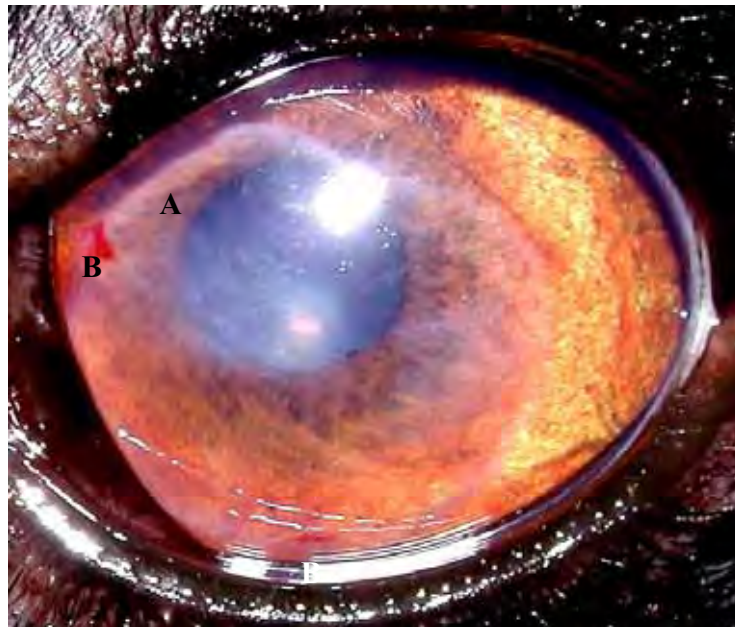


Figura 11. Imagem fotográfica do olho de cão adulto, sem raça definida, fêmea do grupo CO, após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório. Notar edema corneal discreto (A) e vascularização moderada (B). Jaboticabal - SP, 2009.

4.2 MORFOMETRIA

4.2.1 Contagem de leucócitos polimorfonucleares

Relativamente à contagem de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) (Tabela 3), observou-se maior quantitativo nos animais do grupo BV, durante os quatro momentos avaliados. Não houve diferença significativa, comparativamente à contagem total nas regiões central e de transição, entre os grupos.

Tabela 3. Números, médias e respectivos desvios padrão obtidos na contagem de neutrófilos em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos e fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomias superficiais, nos diferentes momentos. Jaboticabal - SP, 2009

Área	Tempos de avaliação															
	3 dias BV		3 dias CO		7 dias BV		7 dias CO		14 dias BV		14 dias CO		28 dias BV		28 dias CO	
Estroma cent 1	14	5	15	18	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	1	0
Estroma cent 2	22	48	15	19	6	0	0	0	15	6	0	2	3	0	0	0
Estroma cent 3	15	38	16	13	9	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0
Estroma trans 1	20	5	5	8	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1
Estroma trans 2	20	11	3	13	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
Total	91	107	54	71	15	0	0	1	51	6	0	2	6	0	1	1
Média	18,2	21,4	10,8	14,2	3	0	0	0,2	10,2	1,2	0	0,4	1,2	0	0,2	0,2
S	±3,4	±20,1	±6,2	±4,4	±4,2	±	±	±0,4	±10,8	±2,6	±	±0,8	±1,6	±	±0,4	±0,4

Estroma cent (estroma central); Estroma trans (estroma de transição); BV (grupo BandVet®); CO (grupo controle); S (desvio padrão); Média (média aritmética).

4.2.2 Contagem de pontos de colágeno

Relativamente aos pontos de colágeno (Tabela 4), observou-se nas córneas dos animais dos animais do grupo BV, um maior quantitativo de pontos nos quatro

momentos avaliados. Não houve diferença significativa entre os valores totais de ambos os grupos, mas ela esteve presente quando comparados os valores das áreas de transição, aos três dias de pós-operatório ($P=0,040$).

Tabela 4. Número, médias e desvios padrão de pontos de colágeno em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomias superficiais, nos diferentes momentos. Jaboticabal - SP, 2009

Área	Tempo de avaliação															
	3 dias BV		3 dias CO		7 dias BV		7 dias CO		14 dias BV		14 dias CO		28 dias BV		28 dias CO	
Estroma cent 1	53	51	53	65	66	67	50	65	61	62	40	66	66	68	63	56
Estroma cent 2	52	50	47	22	54	65	43	64	65	66	54	60	68	64	65	60
Estroma cent 3	53	55	54	32	60	62	38	65	70	68	70	59	66	64	67	55
Estroma trans 1	63	60	45	59	63	64	54	64	68	66	62	56	66	66	64	64
Estroma trans 2	64	55	45	52	61	57	62	66	65	68	64	65	66	64	65	65
Total	285	271	244	230	304	315	247	324	329	330	290	306	332	326	324	300
Média	57	54,2	48,8	46	60,8	63	49,4	64,8	65,8	66	58	61,2	66,4	65,2	64,8	66,4
S	±5,9	±3,9	±4,2	±18,2	±4,43	±3,8	±9,37	±0,83	±3,42	±2,44	±11,57	±4,2	±0,89	±1,78	±1,48	±4,52

Estroma cent (estroma central); Estroma trans (estroma de transição); BV (grupo BandVet®); CO (grupo controle); S (desvio padrão); Média (media aritmética).

4.2.3 Contagem de fibroblastos

Observou-se um número maior de células no grupo BV nos períodos 3, 14 e 28 dias. Aos sete dias, todavia, o grupo CO apresentou maior celularidade (Tabela 5). Identificou-se diferença ($P<0,001$), quando comparadas as contagens na região de transição, aos três dias de pós-operatório.

Tabela 5. Número de fibroblastos em córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomias superficiais nos diferentes momentos. Jaboticabal - SP, 2009

Área	Tempo de avaliação															
	3 dias BV		3 dias CO		7 dias BV		7 dias CO		14 dias BV		14 dias CO		28 dias BV		28 dias CO	
Estroma cent 1	3	5	2	1	20	2	4	3	3	4	8	9	14	7	3	2
Estroma cent 2	1	0	3	1	21	6	10	5	1	2	4	3	7	5	2	6
Estroma cent 3	1	0	1	2	16	5	10	7	0	11	2	0	10	3	4	6
Estroma trans 1	5	6	2	2	45	6	7	6	4	14	4	2	4	6	4	3
Estroma trans 2	5	7	3	2	0	4	9	10	1	5	2	5	5	5	4	6
Total	15	18	11	8	0	23	40	31	9	36	20	19	40	26	17	23
Média	3	3,6	2,2	1,6	20,4	4,6	8	6,2	1,8	7,2	4	3,8	8	5,2	3,4	4,6
S	±2	±3,3	±0,83	±0,5	±16,1	±1,6	±2,5	±2,5	±1,6	±5,0	±2,4	±3,4	±4,0	±1,4	±0,8	±1,94

Estroma cent (estroma central); Estroma trans (estroma de transição); BV (grupo BandVet®); CO (grupo controle); S (desvio padrão); Média (média aritmética).

4.2.4 Espessura do epitélio e estroma corneais

Relativamente à mensuração da espessura do epitélio corneal da região pré-lesão, notou-se que aos 3, 7 e 14 dias, ela foi maior nos animais do grupo BV. Aos 28 dias, todavia, foi maior no grupo CO. Na região de transição, ela foi maior no grupo BV em todos os momentos. Na região central, foi maior no grupo CO em todos os momentos, à exceção do 14º dia.

No que se refere à espessura do estroma corneal, nas regiões pré-lesão e de transição, ela foi maior nos animais do grupo CO em todos os momentos, exceto aos 3 dias, onde foi maior no grupo BV. Relativamente à região central, ela foi maior no grupo BV em todos os momentos. As Figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 ilustram os eventos observados.

Os valores médios das espessuras do epitélio e estroma corneais nas regiões pré-lesão, de transição e central dos animais do grupo BV e do CO encontram-se expressos em micrômetros na Tabela 6.

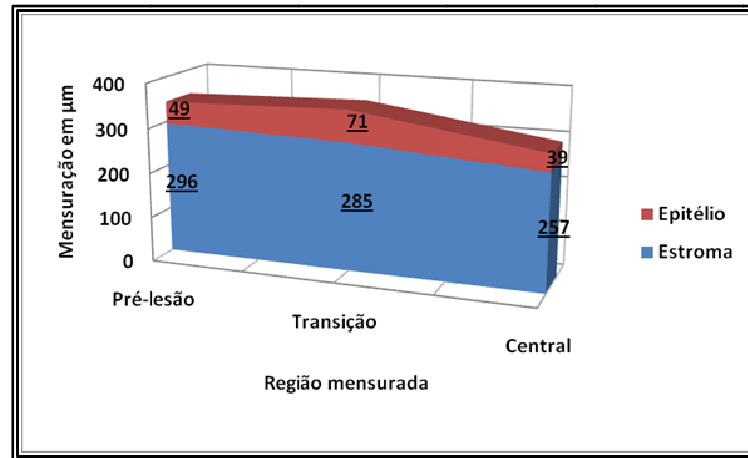


Figura 12. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.

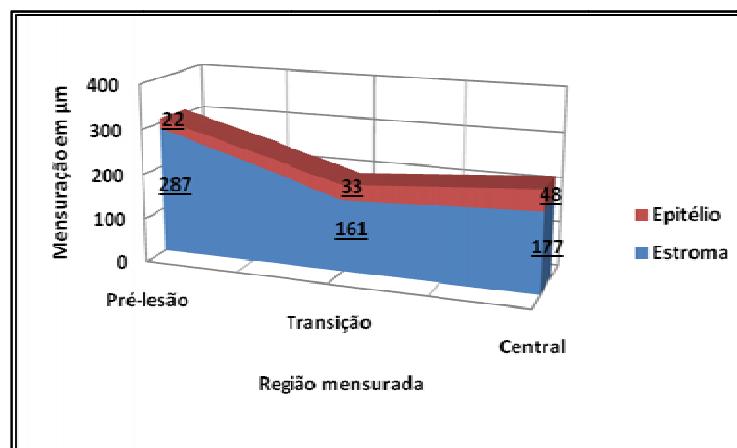


Figura 13. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.

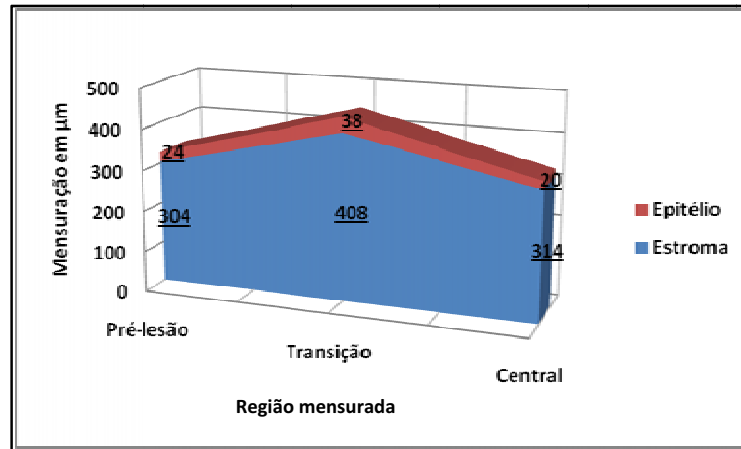


Figura 14. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.

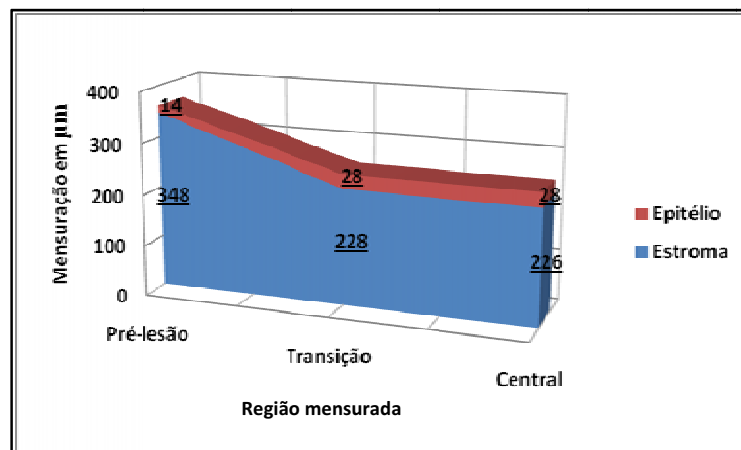


Figura 15. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.

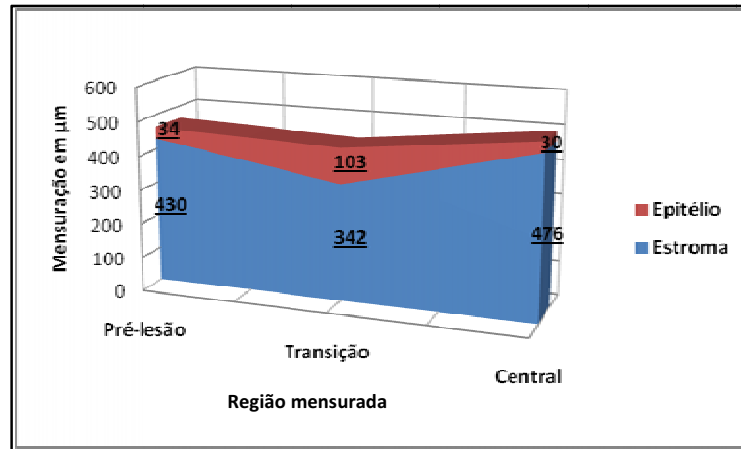


Figura 16. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.

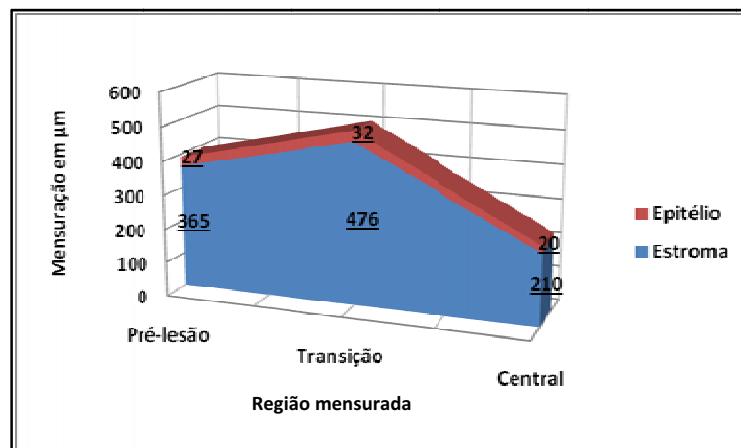


Figura 17. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.

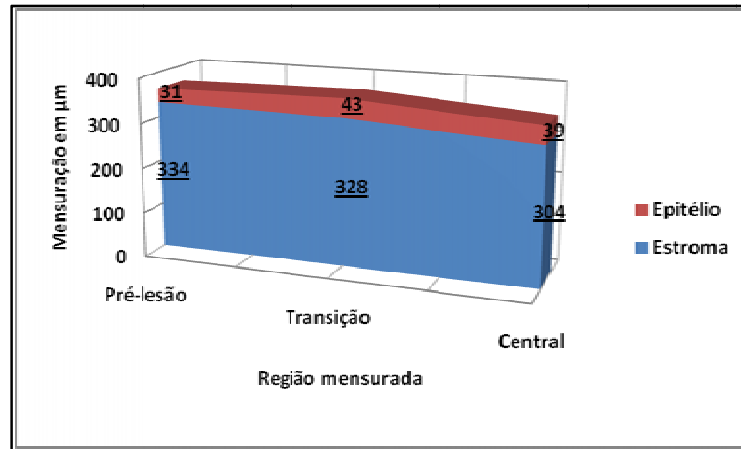


Figura 18. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório, no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.

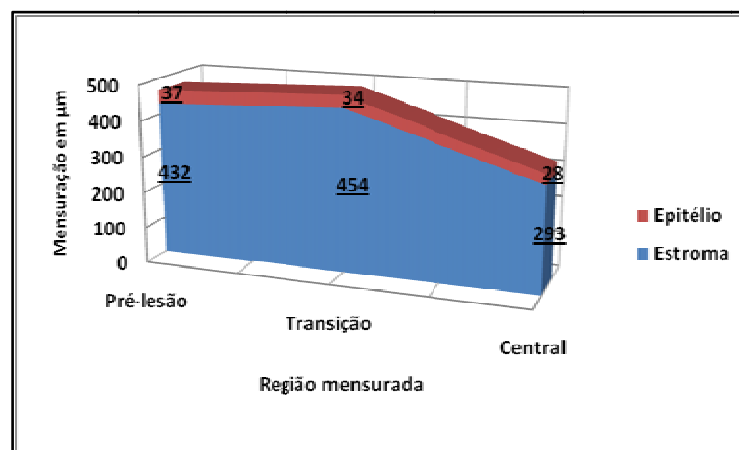


Figura 19. Representação gráfica de área, quanto às mensurações do epitélio e estroma corneais, de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório, no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.

Tabela 6. Valores médios das espessuras em μm , do epitélio e estroma corneais, nas regiões pré-lesão, de transição e central, de cães, adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, dos grupos BV e CO após ceratectomias superficiais. Jaboticabal - SP, 2009

Região	Tempo de avaliação							
	3 dias BV	3 dias CO	7 dias BV	7 dias CO	14 dias BV	14 dias CO	28 dias BV	28 dias CO
Epitélio pré	49	22	24	14	34	27	31	37
Epitélio trans	71	33	38	28	103	32	43	34
Epitélio cent	39	48	20	28	30	20	39	28
Estroma pré	296	287	304	349	430	365	334	432
Estroma trans	285	161	408	228	342	476	328	454
Estroma cent	257	177,93	314	226	386	210	304	293

Epitélio pré (epitélio pré-lesão); Epitélio trans (epitélio de transição); Epitélio cent (epitélio central); Estroma pré (estroma pré-lesão); Estroma trans (estroma de transição); Estroma cent (estroma central); BV (grupo BandVet®); CO grupo controle).

4.3 HISTOQUÍMICA

4.3.1 Marcação pelo Alcian *Blue* pH 1,0

As córneas dos animais do grupo BV, aos 3 dias, apresentaram marcação intensa sob as células pigmentares da região de transição esclerocorneal. A marcação ocorreu de moderada a intensa no estroma corneal, exceto na área adjacente ao epitélio hiperplásico. Nos animais do grupo CO, a marcação foi moderada na área de transição esclerocorneal (Figura 19). Em todo o estroma próximo ao epitélio posterior, ela variou de discreta a moderada. Onde havia hiperplasia, ela foi moderada e na região intermediária do estroma o foi discreta.

Aos 7 dias, a marcação nos animais do grupo BV foi discreta na região de transição esclerocorneal, moderada sob a membrana de Descemet e ausente no restante da córnea. Nos do grupo CO, ela foi discreta na região de transição esclerocorneal, intensa em uma pequena área adjacente ao estroma na região esclerocorneal, discreta no restante do estroma corneal, exceto nas proximidades do

epitélio posterior onde havia neovasos e células inflamatórias, nesta região não houve marcação.

As córneas do grupo BV, aos 14 dias, apresentaram marcação que variou de negativa a discreta na região de transição esclerocorneal e no estroma próximo à membrana de Descemet e negativa na região central, onde havia células inflamatórias (Figura 20). As córneas do grupo CO apresentaram marcação que variou de moderada a intensa na região de transição esclerocorneal, de discreta a moderada no estroma e ausente próximo ao epitélio posterior. Aos 28 dias, a marcação nas córneas do grupo BV foi discreta na região de transição esclerocorneal, variou de discreta a moderada no estroma próximo à membrana de Descemet e moderada no restante do estroma. No grupo CO, a marcação foi discreta na região de transição esclerocorneal, moderada no estroma próximo à membrana de Descemet e negativa no restante do estroma.

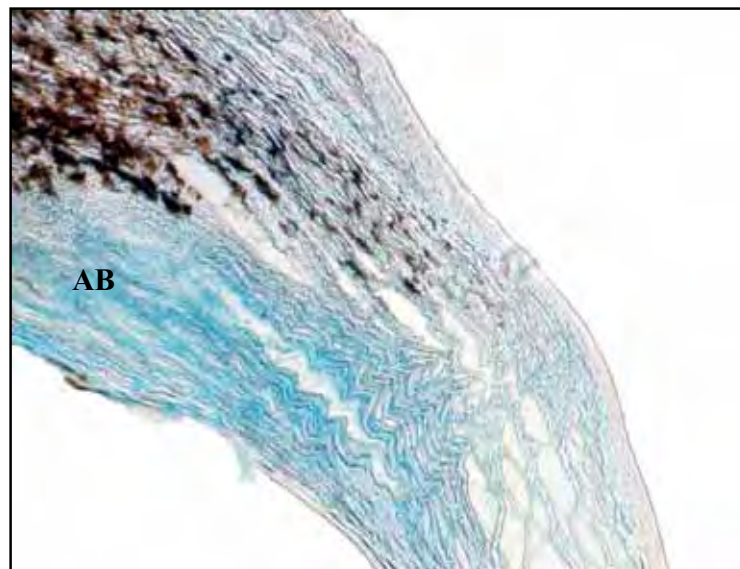


Figura 19. Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, macho, do grupo CO após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório. Notar marcação moderada na área de transição esclerocorneal (AB). Alcian *Blue* pH 1.0, 10X. Jaboticabal - SP, 2009.

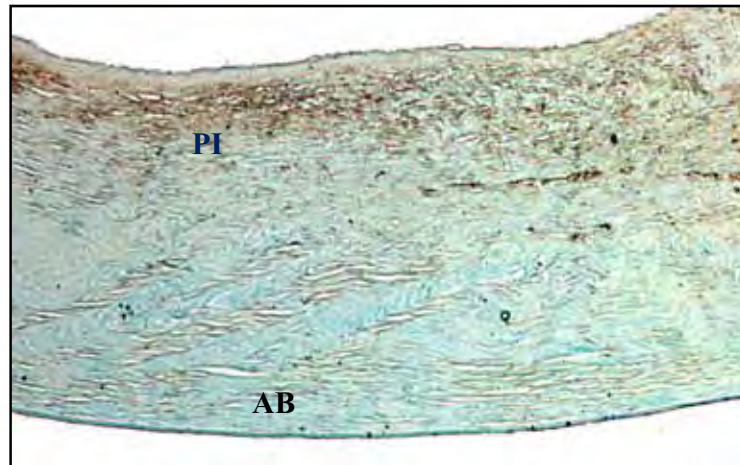


Figura 20. Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, fêmea, do grupo BV após ceratectomia superficial, aos 14 dias de pós-operatório. Notar marcação discreta no estroma posterior (AB) e negativa próxima ao epitélio onde existe processo inflamatório (PI). Alcian *Blue* pH 1.0, 5X. Jaboticabal - SP, 2009.

4.3.2. Marcação pelo Alcian *Blue* pH 2,5

Aos 3 dias de pós-operatório, verificou-se marcação intensa na região esclerocorneal dos animais de ambos os grupos. No grupo BV, observou-se marcação intensa na totalidade do estroma corneal (Figura 21). Nos animais do grupo CO, ela foi moderada.

Aos 7 dias de pós-operatório, no grupo BV, ela foi discreta na região esclerocorneal e sob a membrana de Descemet no primeiro terço da córnea (próximo à área de transição esclerocorneal). No grupo CO, no mesmo período, a marcação foi ausente na região esclerocorneal e variou de negativa a intensa no restante da córnea.

Verificou-se, aos 14 dias, que ela foi discreta na região esclerocorneal e, ao longo de todo o estroma, exceto na presença de células inflamatórias e neovasos. Já no grupo CO, a marcação foi discreta ao longo de todo o estroma corneal.

Aos 28 dias, os animais do grupo BV apresentaram marcação positiva intensa no primeiro terço da córnea sob a membrana de Descemet, discreta na região

esclerocorneal sob as células pigmentares e no primeiro terço de estroma. Foi ausente na região central (Figura 22). Os animais do grupo controle apresentaram marcação discreta na região esclerocorneal e no primeiro terço do estroma e não houve marcação na região central.

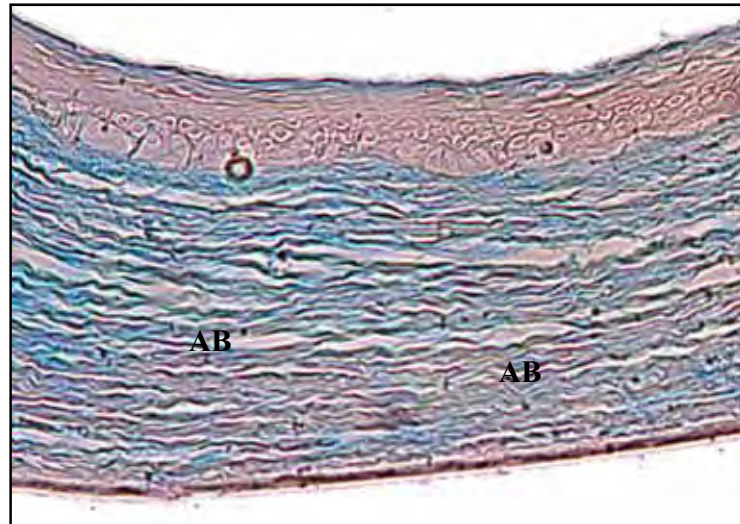


Figura 21. Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, macho, do grupo BV após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório. Notar marcação intensa em todo o estroma corneal (AB). Alcian *Blue* pH 2.5, 20X. Jaboticabal - SP, 2009.

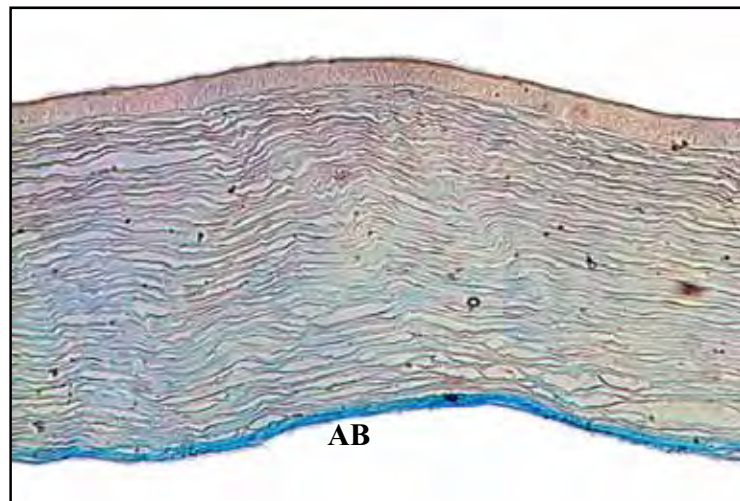


Figura 22. Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, macho ou fêmea, do grupo BV após ceratectomia superficial, aos 28 dias de pós-operatório. Notar marcação intensa sob a membrana de Descemet (AB). Alcian *Blue* pH 2.5, 10X. Jaboticabal - SP, 2009.

4.4. AVALIAÇÃO CROMÁTICA TRIDIMENSIONAL DE SUPERFÍCIE.

As médias dos valores das áreas cromáticas estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Médias dos valores (%) das áreas cromáticas predominantes nas lâminas das córneas de cães adultos, sem raça definida, machos e fêmeas após ceratectomia superficial, dos grupos BV e CO nos diferentes momentos coradas com Tricrômico de Masson. Avaliação cromática tridimensional de superfície. Jaboticabal - SP, 2009.

Cor	Tempo de avaliação							
	3 dias BV	3 dias CO	7 dias BV	7 dias CO	14 dias BV	14 dias CO	28 dias BV	28 dias CO
Vermelha	21,151	24,865	5,171	43,954	23,385	23,367	22,382	12,526
Verde	60,197	60,334	40,548	37,700	64,354	51,710	70,073	61,017
Azul	18,652	14,80	54,281	18,346	12,261	21,923	7,095	26,457

Aos três dias, no grupo BV, predominou o vermelho seguido do verde e azul. Observaram-se picos azul intenso e alguns roxos localizados no estroma anterior. No grupo CO, a cor dominante foi o verde, seguida do vermelho e do azul. Observou-se grande número de picos, a maioria roxos, localizados no estroma anterior. Notou-se pouca homogeneidade nas diferentes cores (Figura 23).

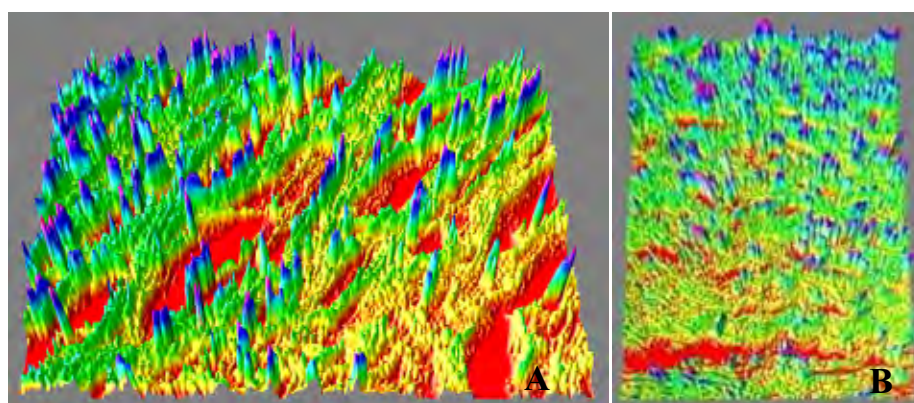


Figura 23. Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, após ceratectomia superficial aos 3 dias de pós-operatório, em 3D. Em A. Grupo BV, notar predominância da cor vermelha e os picos azuis e roxos. Em B. Notar predominância da cor verde e os inúmeros picos. Jaboticabal - SP, 2009.

Aos sete dias, no grupo BV, a cor predominante foi a vermelha seguida da verde e da azul. Foram observados alguns picos azuis e alguns roxos no estroma anterior. Notou-se homogeneidade na cor vermelha. No grupo CO, a cor predominante foi a azul seguida da verde e da vermelha. Notaram-se muitos picos roxos no estroma anterior e houve pouca homogeneidade das cores (Figura 24).

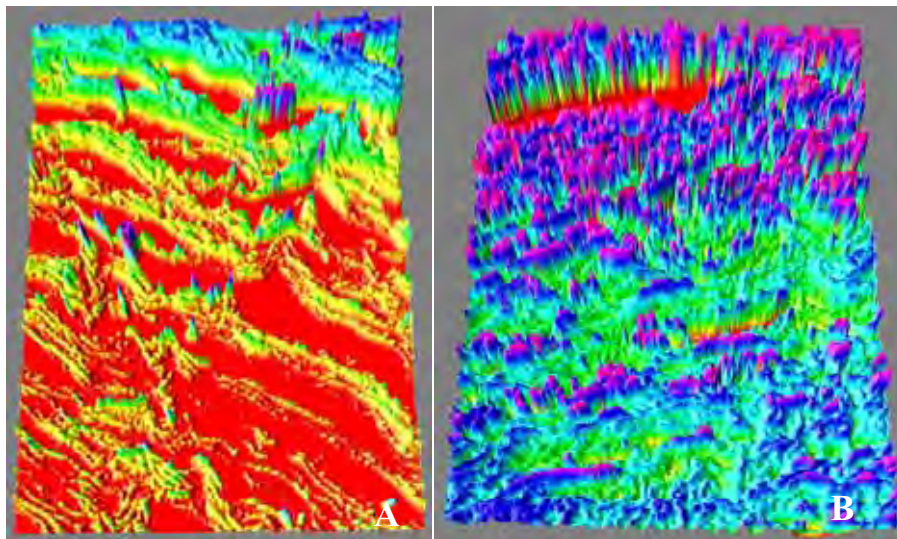


Figura 24. Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas, após ceratectomia superficial aos 7 dias de pós-operatório, em 3D. Em A, grupo BV, notar predominância da cor vermelha homogênea e alguns picos roxos. Em B, notar predominância da cor verde e os inúmeros picos roxos no estroma anterior. Jaboticabal - SP, 2009.

Observou-se, nas córneas do grupo BV, aos 14 dias, predominância da cor vermelha seguida da verde e da azul. Notaram-se alguns picos roxos localizados no estroma anterior. Houve homogeneidade na cor amarela, em maior parte da lâmina. No grupo CO, a cor predominante foi a verde seguida da vermelha e da azul. Notaram-se inúmeros picos roxos e azuis distribuídos por toda a lâmina. Houve homogeneidade na distribuição da cor vermelha (Figura 25).

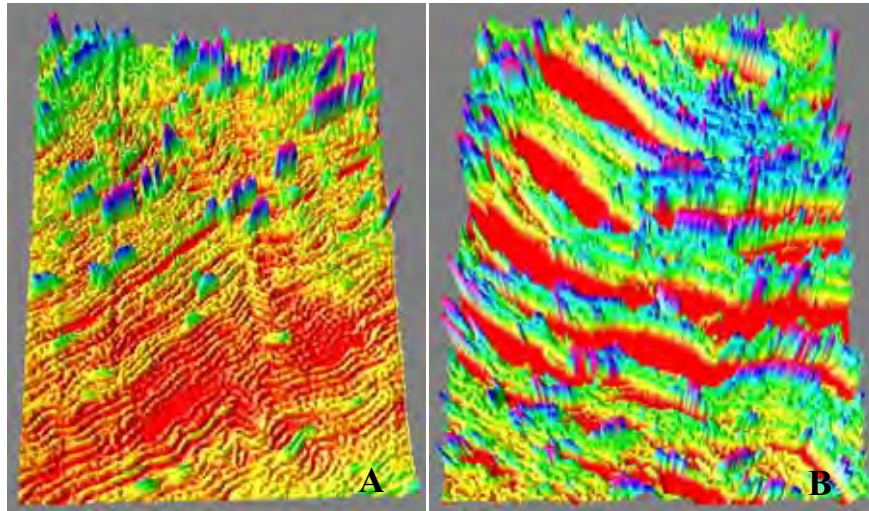


Figura 25. Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida, machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 14 dias de pós-operatório, em 3D. Em A, grupo BV, notar predominância da cor vermelha e a homogeneidade da cor amarela e alguns picos roxos. Em B, notar predominância da cor verde, a homogeneidade da cor vermelha e os muitos picos roxos localizados no estroma. Jaboticabal - SP, 2009.

Aos 28 dias, no grupo BV, a cor predominante foi a verde, seguida da vermelha e azul. Poucos picos azuis foram observados no estroma anterior. Notou-se homogeneidade na distribuição das cores verde claro e amarelo, na quase totalidade da lâmina. No grupo CO, a cor predominante foi a verde, seguida da azul e da vermelha. Alguns picos roxos foram identificados, distribuídos por toda a lâmina. Notou-se homogeneidade na cor verde (Figura 26).

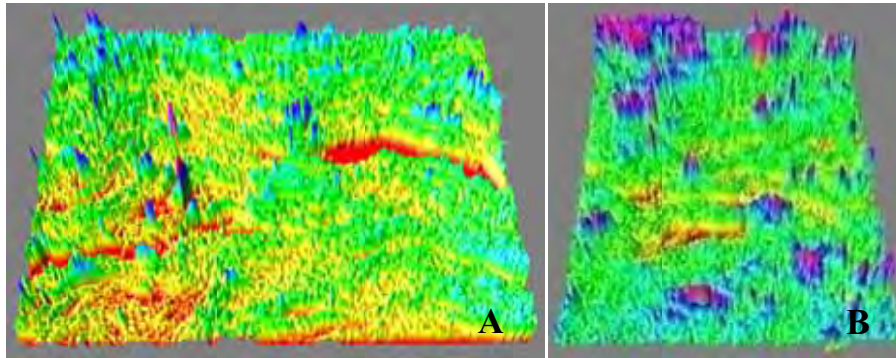


Figura 26. Imagens de córneas de cães adultos, sem raça definida machos ou fêmeas após ceratectomia superficial aos 28 dias de pós-operatório, em 3D. Em A, grupo BV, notar predominância da cor verde e a homogeneidade da cor das cores verde e amarela e poucos picos roxos. Em B, notar predominância e homogeneidade da cor verde, e os vários picos roxos localizados no estroma. Jaboticabal - SP, 2009.

A representação gráfica das alterações nas diferentes áreas cromáticas dos grupos BV e CO, nos quatro momentos, encontram-se representadas nas figuras 27 e 28.

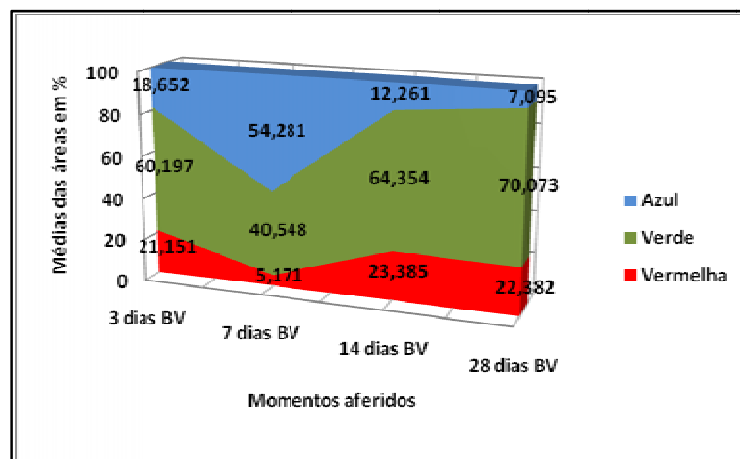


Figura 27. Representação gráfica de área, quanto as alterações nas mensurações das áreas cromáticas do estroma corneal de cães adultos, sem raça definida machos e fêmeas, após ceratectomia superficial aos 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório no grupo BV. Jaboticabal - SP, 2009.

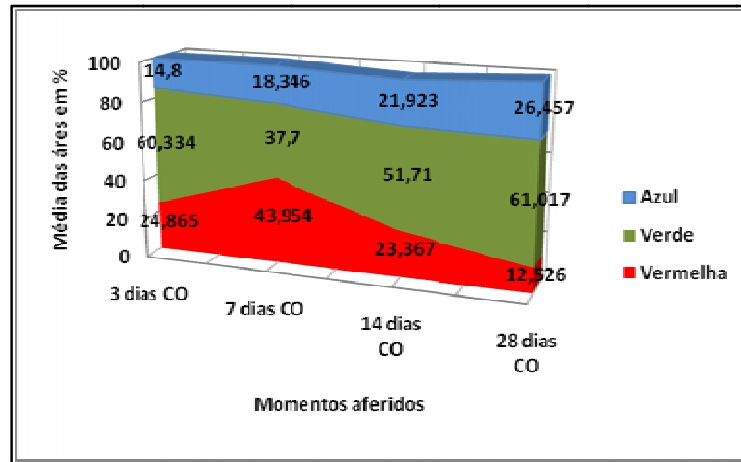


Figura 28. Representação gráfica de área, quanto as alterações nas mensurações das áreas cromáticas do estroma corneal de cães adultos, sem raça definida machos e fêmeas, após ceratectomia superficial aos 3, 7, 14 e 28 dias de pós-operatório no grupo CO. Jaboticabal - SP, 2009.

4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

4.5.1 Fibronectina

Encontrou-se um padrão de expressão fibrilar, permeando as fibras colágenas. Nas córneas do grupo BV, houve positividade aos 7, 14 e 28 dias, em intensidade discreta, marcando o estroma corneal em toda sua extensão (Figura 29). No grupo CO, ela foi positiva aos 3, 7 e 28 dias com intensidades que variaram de discreta, aos 3 e 28 dias, e, intensa aos 7 dias. Neste último, notou-se uma marcação maior na área estromal próxima ao epitélio hiperplásico na região central da córnea (Figura 30).

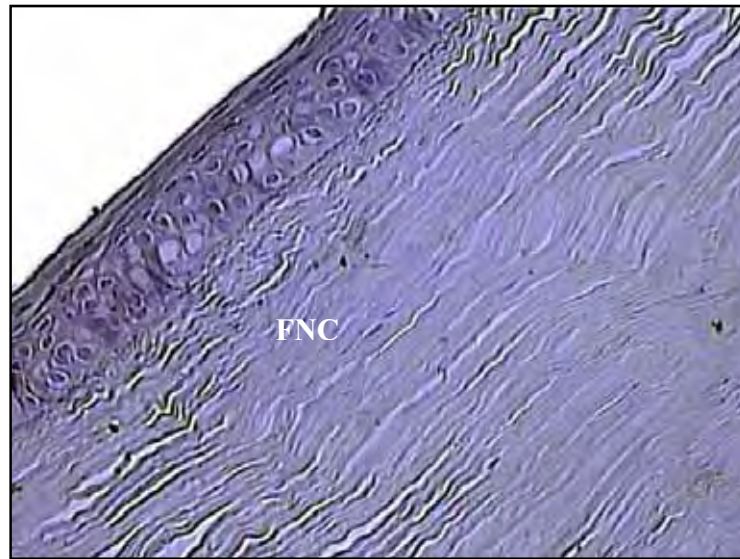


Figura 29. Fotomicrografia de córnea de cão adulto, sem raça definida, macho, após ceratectomia superficial, aos três dias de pós-operatório grupo BV. Notar a marcação discreta da fibronectina (FNC) permeando as fibras de colágeno. SABC 40X. Jaboticabal - SP, 2009.

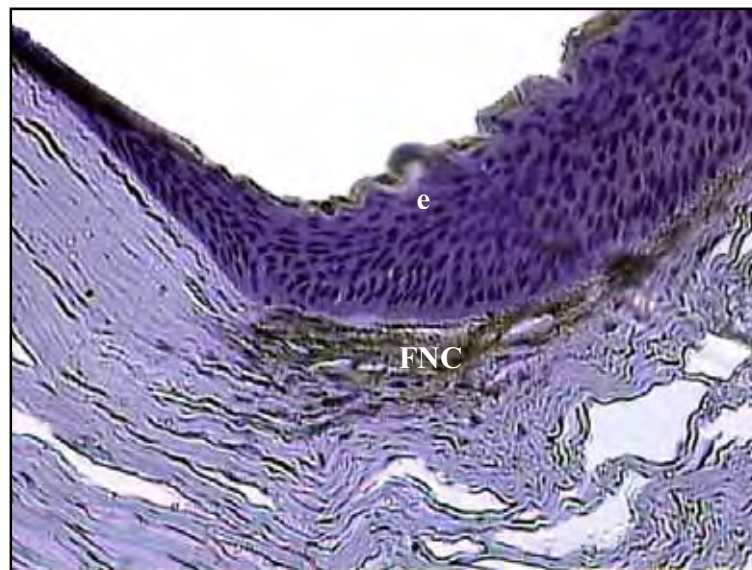


Figura 30. Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório, grupo CO. Notar intensa marcação pela fibronectina (FNC) na área do estroma próxima ao epitélio hiperplásico (e). SABC 40X. Jaboticabal - SP, 2009.

4.5.2 Tenascina

Observou-se marcação positiva aos três dias, considerada moderada nas córneas dos animais do grupo BV (Figura 31) e intensa nas do grupo CO (Figura 32). Em ambos, a marcação localizava-se em todo o estroma corneal. Aos 28 dias, identificou-se marcação positiva fraca no grupo BV, no estroma corneal, em toda a extensão da lâmina. Nos demais períodos, ela foi negativa (Figura 33).

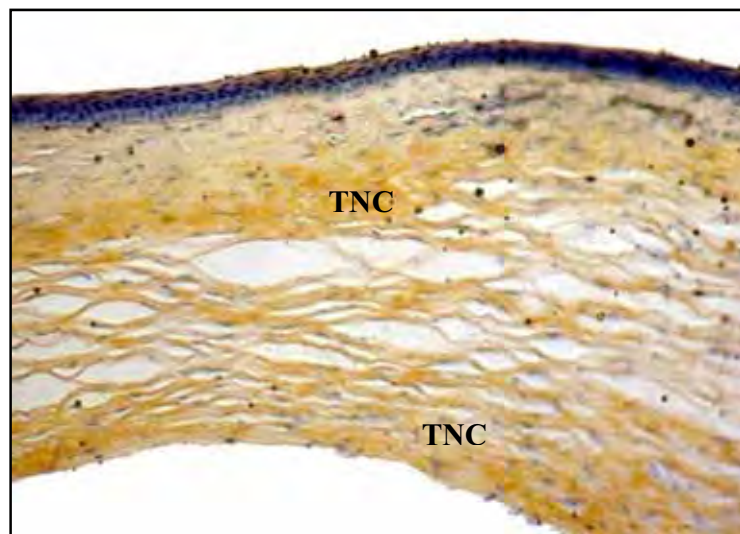


Figura 31. Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório, grupo BV. Notar marcação moderada pela tenascina (TNC) no estroma corneal. SABC 10X. Jaboticabal - SP, 2009.

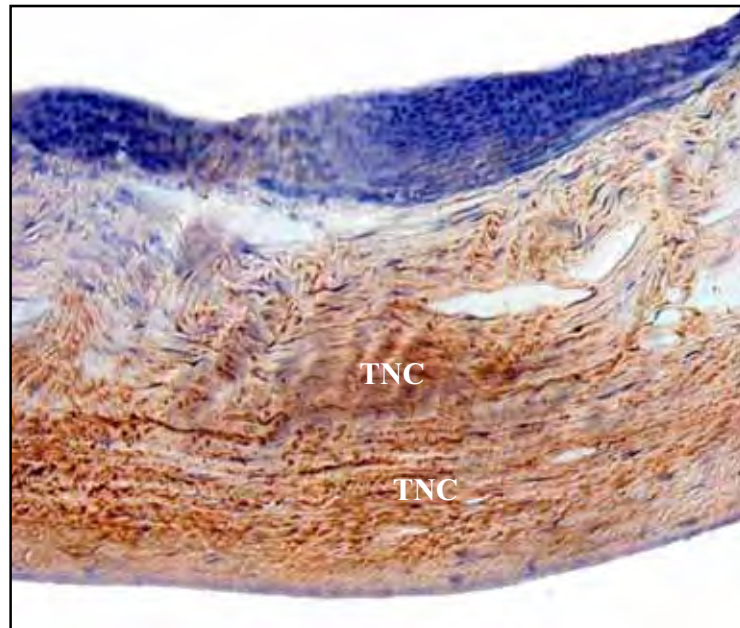


Figura 32. Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 3 dias de pós-operatório grupo, CO. Notar marcação intensa pela tenascina (TNC) no estroma corneal. SABC 20X. Jaboticabal - SP, 2009.

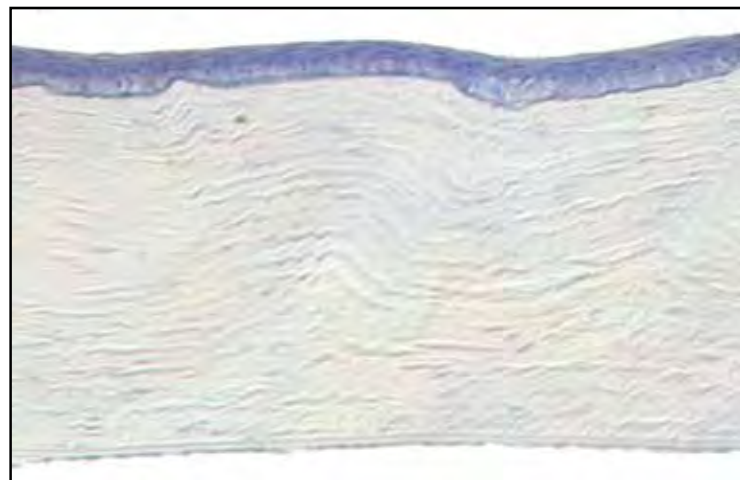


Figura 33. Fotomicrografia de córnea de cão, adulto, sem raça definida, fêmea, após ceratectomia superficial, aos 7 dias de pós-operatório grupo, BV. Notar marcação negativa pela tenascina (TNC). SABC 20X. Jaboticabal - SP, 2009.

5 DISCUSSÃO

Relativamente aos processos mórbidos que afetam a túnica fibrosa destacam-se as ceratites ulcerativas e demais manifestações relacionadas a lesões da córnea. As ceratites ulcerativas são as oftalmopatias que mais acometem a espécie canina (VAUGHAN e ASBURY, 1977; STARTUP, 1984). Sua importância prende-se ao fato de que mesmo as ulcerações superficiais exijam a necessidade de rápida intervenção, no intuito de se evitarem complicações severas com riscos à visão (BROOKS, 2000).

O que motivou que se estudassem os efeitos do BandVet[®] sobre córneas que passaram por ceratectomia superficial foi saber que o princípio ativo do produto, o extrato aquoso do *Triticum vulgare*, possui propriedades bioativas incluindo-se o seu efeito mitogênico sobre fibroblastos (VIANO et al., 1985; FARINELLA et al., 1986; FAVIT et al., 1992), a estimulação da ornitina descarboxilase e a ativação de fatores de crescimento epidermal, de fibroblastos e de derivados de plaquetas, (CARPENTER e COHEN, 1990; GLASGOW e ELING, 1990; PANDIELLA et al. 1990; ULLRICH e SCHLESSINGER, 1990; MELDOLESI e MAGNI, 1991), fatores que são benéficos à reparação cicatricial de feridas (MATERA et al., 2002).

Admitiram-se cães, como modelos de experimentação, dada a elevada frequência com que afecções corneais acometem esta espécie (VAUGHAN e ASBURY, 1977; STARTUP, 1984) paralelamente a suas inúmeras vantagens em comparação com outras espécies animais.

Em relação ao procedimento cirúrgico, padronizou-se empregar trépano de dez milímetros de diâmetro e 0,5mm de profundidade, aplicado sobre a região central da córnea e posterior ceratectomia superficial buscando-se mimetizar lesões espontâneas da córnea, vistas com frequência na rotina ambulatorial. Com a medida, obtiveram-se úlceras de dimensões muito próximas e necessárias a um estudo experimental dirigido.

Para a anestesia dos animais, empregaram-se técnicas clássicas. Utilizou-se halotano e oxigênio em circuito semifechado considerando-se a eficácia do procedimento (MASSONE, 1994). Para a centralização do bulbo do olho, aplicaram-se

três pontos de reparo ou sustentação na conjuntiva bulbar e episclera, simultaneamente.

No pós-operatório, decorridas quatro horas das intervenções, procedeu-se à instilação de colírio de sulfato de atropina a 1%, a intervalos regulares de 12 horas, durante sete dias, objetivando-se minimizar o desconforto decorrente do espasmo da musculatura ciliar e os riscos quanto à ocorrência de sinéquias (SLATTER, 1990).

Os períodos admitidos para as avaliações clínicas e à microscopia óptica foram concebidos buscando-se poder monitorar as fases clássicas da reparação cicatricial corneal, relativamente à tríade exsudação, proliferação e maturação (SLATTER, 1990).

Os eventos que decorreram de ulcerações corneais são sabidamente conhecidos e sua cinética é fruto da ação combinada de mediadores e de fatores de crescimento gerados posteriormente a injúria (PEIFFER Jr, et al., 1999). A fotofobia e o blefarospasmo, enquanto a uma das primeiras manifestações quando a superfície ocular é afetada, foram evidenciados em ambos os subgrupos, principalmente nos períodos iniciais, motivados pelo estímulo das terminações nervosas do epitélio e do estroma corneais (WARNIG, 1984), decorrente da ceratectomia superficial (SLATTER, 1990; STADES et al., 1998).

A congestão conjuntival foi evidenciada no pós-operatório imediato e nos períodos iniciais da avaliação em todos os animais. O evento, admite-se, decorre da aplicação dos pontos de reparo utilizados para a fixação do bulbo do olho e da manipulação per-operatória. Existiu diferença significativa nos subgrupos aos sete dias de pós-operatório, acreditamos que esta variação se deva à já mencionada atividade cicatrizante e moduladora da inflamação exercida pelo extrato aquoso de *Triticum vulgare* (BandVet®) (VALERIO et al., 1986).

No que concerne à secreção ocular, seu aumento foi decorrente do estímulo das células caliciformes (GONÇALVES, 1975) que se sabe é normal em procedimentos cirúrgicos sobre a túnica fibrosa do olho (STARTUP, 1984; SLATTER, 1990).

A aplicação tópica do extrato aquoso de *Triticum vulgare* (BandVet®) não interferiu na qualidade mas sim na quantidade da secreção ocular, relativamente a isto, detectaram-se diferenças significativas entre os subgrupos aos sete dias de pós-operatório. Percebeu-se que, o subgrupo tratado apresentou este evento de forma

diminuída em relação ao subgrupo não tratado. A atividade moduladora da inflamação do *Triticum vulgare* reportada por VALERIO et al. (1986), provavelmente seja a causante desta variação.

A neovascularização é a formação de vasos em estruturas inicialmente avasculares e na córnea, pode ocorrer por distúrbios inflamatórios, infecciosos, degenerativos ou traumáticos (JIN-HONG CHANG et al., 2001). Fatores angiogênicos são liberados pelas células inflamatórias e pelos próprios ceratócitos (FORRESTER et al., 2002). Vasos incidiram após os primeiros três dias da indução das úlceras, à semelhança do que fora descrito por SCHOEFL (1963) e PETRI et al. (1997) em estudos sobre a cinética do crescimento vascular corneal. PEIFFER Jr et al. (1999), relataram o aparecimento de vasos após dois a quatro dias da lesão corneal com comprometimento estromal em coelhos, segundo o mesmo modelo de lesão corneal utilizado neste estudo. HUGHES (1946) descreveu o aparecimento de vasos, após uma semana da injúria. Admite-se a liberação de fatores angiogênicos após o trauma, a razão primária para a ocorrência do evento (NAUMANN e SAUTTER, 1988; KOCH, 1992).

Identificou-se, nos períodos iniciais, a presença marcante de vasos nas córneas, mormente dos animais tratados. PERUCCIO (1983) reportou que vasos são uma manifestação própria do processo cicatricial do estroma corneal. Não obstante, PEIFFER et al. (1999) observaram cicatrização estromal ocorrendo de forma avascular.

NASISSE (1985) e KERN (1990) reconheceram, como fator angiogênico, a permanência da ação contundente da injúria, de consoante com o observado neste estudo, onde verificou-se, nos períodos finais da avaliação, uma diminuição gradativa da vascularização corneal, em ambos os subgrupos, mas, mais rápida e efetiva nos animais tratados com o extrato aquoso de *Triticum vulgare* (BandVet®). A precoce re-epitelização das córneas que receberam este produto teria causado a inibição do estímulo angiogênico e admite-se a regressão dos vasos já presentes (CHERRY e GARNER, 1976), de consoante com o que fora proposto por MADRI e PRATT (1998).

O edema corneal decorre da quebra das barreiras epitelial ou endotelial, que resulta na desorganização das fibras de colágeno e na seqüencial perda da

transparência (WARING, 1984; LAVACH, 1990). A relação do edema aos processos avulsivos da córnea e exposição do estroma tem sido foco de muitos estudos (SCHOENAU e PIPPI, 1993). A sua manifestação clínica se dá por uma perda gradual ou rápida da transparência da córnea, seguindo duas formas distintas. Quando do tipo epitelial, apresenta-se como finas vesículas e, quando estromal, a opacidade apresenta-se como uma névoa difusa (SPENCER, 1996), exatamente como fora observado neste estudo. Segundo PEIFFER Jr. et al. (1999), o edema quando secundário à injúria é limitado ao estroma perilesional, o que fora também observado neste estudo.

SPENCER (1996) informara que a opacificação corneal decorre além do edema, da presença de células inflamatórias, da vascularização, por vezes presente. A maior intensidade de opacificação deu-se aos 7 e 14 dias de pós-operatório, quando polimorfonucleares e vasos eram mais intensos.

Nesta pesquisa, observou-se a diminuição gradativa do edema corneal no decorrer dos diferentes períodos, de consoante com o descrito por BARROS et al. (1993), LAUS et al. (1994) e GARCIA et al. (1996). A redução foi mais evidente no grupo tratado com BandVet[®], provavelmente pela melhor organização das fibras colágenas estromais. O mesmo fora obtido por CAVALIERE et al. (1986), quando estudaram os efeitos do extrato de *Triticum vulgare* administrado por via intra-peritoneal, sobre a reparação de úlceras superficiais induzidas experimentalmente em coelhos.

A pigmentação corneal decorre da migração de melanócitos límbicos e perilímbicos e caracteriza lesões crônicas (WHITLEY, 1991). Neste estudo, não se encontraram córneas pigmentadas em qualquer dos grupos, porque as lesões não se cronificaram.

Pela microscopia óptica, observou-se re-epitelização das córneas em ambos os grupos, já aos sete dias de pós-operatório, evidenciando que o produto BandVet[®] não suscitou qualquer interferência negativa na migração centrípeta das células epiteliais adjacentes à lesão, habitualmente mobilizadas para a reparação de lesões epiteliais (PERUCCIO, 1983; NASISSE, 1985; SLATTER, 1990; POWER e NEVES, 1996).

Segundo RUCABADO e GIANNATTANASIO (1980) e CAVALIERE et al. (1986) o extrato de *Triticum vulgare* age positivamente sobre a re-epitelização.

A reparação cicatricial inicia-se pela infiltração de polimorfo e mononucleares os quais participam da fagocitose e organização tecidual. Células polimorfonucleares migram, primeiramente, através do filme lacrimal pré-corneal (KERN, 1990). Segundo SUNDERKOTTER et al. (1991b), a migração tem seu início decorridas três horas da injúria. Em contrapartida, SPENCER (1996) reportou-se ao início da migração celular decorridas somente 8 a 12 horas da injúria. Neste estudo, já nos períodos iniciais decorreu a migração de células polimorfonucleares para a lesão nos animais de ambos os grupos, porém com mais intensidade naqueles tratados com o BandVet®. Acredita-se que o evento tenha decorrido em parte da participação do fator transformador de crescimento β (TGF β) que atua estimulando a quimiotaxia de células inflamatórias (TRIPATHI et al., 1990; SCHULTZ et al., 1994) e que, reconhecidamente é estimulado pelo extrato de *Triticum vulgare*.

Segundo WHITTE e BARBUL (1997), a cronificação da fase inflamatória é deletéria para a reparação tecidual, uma vez que altera a deposição e organização do colágeno. A afirmação corrobora os dados colhidos neste estudo, em que à microscopia óptica, percebeu-se que nos animais tratados com BandVet®, o quantitativo de polimorfonucleares foi decrescente em cada um dos períodos avaliados.

Relativamente à contagem de fibroblastos, observou-se um maior quantitativo nas córneas dos animais do grupo BV aos 3, 14, 28 dias. Outrossim, houve um maior quantitativo de pontos de colágeno nas córneas do grupo BV, em todos os períodos avaliados. Acredita-se que tal tenha decorrido do estímulo mitogênico do *Triticum vulgare* sobre os fibroblastos, como fora descrito por FARINELLA et al. (1986). Da evolução natural dos eventos, aos 28 dias, o colágeno neoformado nas córneas do grupo BV encontrava-se, em sua grande parte, já remodelado enquanto no grupo controle havia, ainda, desorganização com vasos presentes.

Os efeitos benéficos do EGF sobre a reparação cicatricial corneal alicerçam-se no incremento da resposta fibroblástica (CARPENTER e COHEN, 1981), da estimulação de vasos (TANIGUCHI, 1991) e da síntese de fibronectina (OJHI et al., 1993). A efetividade do EGF ficou demonstrada em estudos sobre a reparação de

feridas corneais traumáticas (SCHULTZ, 1988; BEAUBIEN, 1994), em queimaduras causadas por álcali (REIM, et al., 1988; BRAZZELL, 1991), em erosões e em ceratites recorrentes (SINGH e FOSTER, 1989). No estudo ora conduzido, efeitos benéficos puderam ser confirmados já aos três dias de pós-operatório. Encontrou-se um maior quantitativo polimorfonucleares e de fibroblastos ativos no sítio da lesão. O contingente de fibroblastos manteve-se maior nas córneas dos animais que receberam o BandVet[®], na maioria dos períodos da avaliação.

O TGF β atua estimulando a quimiotaxia de células inflamatórias, a síntese da matriz extracelular *in vitro* (TRIPATHI et al., 1990; SCHULTZ et al., 1994), a gênese de fibronectina (WOOST et al., 1985; OHJI et al., 1993) e a síntese de colágeno, estímulo que, segundo CENDELLA e FLESCHNER (1990), é mais potente que aquele exercido pelo EGF. Adjunto, ele atua como modulador dos efeitos do EGF sobre o epitélio corneal (MISHIMA et al., 1992). Como já reportado, observou-se neste estudo um maior contingente de células inflamatórias nos períodos iniciais no grupo tratado com BandVet[®] e maior ativação fibroblástica.

No que concerne à espessura do estroma corneal, esta foi maior no grupo CO em todos os momentos nas áreas de pré-lesão e de transição. Relativamente à região central, ela foi maior nas córneas dos animais do grupo BV, em todos os períodos. O maior quantitativo de fibroblastos e pontos de colágeno identificados nesta área, acredita-se fora decorrente do estímulo mitogênico do *Triticum vulgare* sobre os fibroblastos, como fora mostrado por FARINELLA et al. (1986) e da ativação de EGF e de PDGF (CARPENTER e COHEN, 1990; GLASGOW e ELING, 1990; PANDIELLA et al., 1990; ULLRICH e SCHLESSINGER, 1990; MELDOLESI e MAGNI, 1991).

No que se refere à espessura do epitélio e do estroma corneais, ela foi maior no grupo BV nas áreas de pré-lesão e de transição na maioria dos momentos avaliados. Na área central, ela foi maior no grupo CO em todos os momentos, resultados que, admite-se sejam decorrentes do efeito modulador do TGF β estimulado pelo *Triticum vulgare*, sobre o epitélio corneal (MISHIMA et al., 1992) e da diminuição da proliferação de células epiteliais (SCHULTZ et al., 1994), outrossim, como mencionado anteriormente, não houve retardo na re-epitelização das lesões (DUQUE ORTIZ, 2004).

Relativamente à expressão de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, sabe-se que seu quantitativo diminui nas lesões corneais. Neste estudo, a marcação do Alcian *Blue* pH 1.0 e 2.5, deu-se em maior intensidade no grupo BV, no terceiro e 28º dias. Nestes mesmos períodos, o edema corneal foi menor, comparativamente ao grupo CO. Tais resultados somam-se aos de MIYAGAWA et al, (2001), que encontraram relação entre a presença dos GAGs e de proteoglicanos com a transparência corneal.

Observou-se, ausência da marcação do AB na presença de células inflamatórias, relação que explica o fato da marcação pelo AB ser de menor intensidade no grupo BV, onde houve um quantitativo maior de polimorfonucleares. Outrossim, no 28º dia, mesmo tendo um número maior de células inflamatórias nas córneas do grupo BV, observou-se maior intensidade na marcação pelo AB, acreditamos que este fato seja decorrente do maior quantitativo de fibroblastos e pontos de colágeno nessas córneas e de sua relação com os GAGs e proteoglicanos.

Relativamente à fibronectina, ela não é detectada na membrana basal em córneas normais, mais aparece sob as células epiteliais durante o processo cicatricial corneal (NISHIDA, et al., 1983; NISHIDA, et al., 1984). Neste estudo, houve positividade da marcação de FNC aos 7, 14, e 28 dias, em intensidade discreta, em toda a extensão do estroma das córneas do grupo BV. Já as córneas do grupo CO, ela foi positiva aos 3 e 28 dias, em intensidade discreta no estroma corneal e intensa aos sete dias, na área estromal próxima ao epitélio hiperplásico, na região da lesão corneal. Sabe-se que a FNC é produzida por fibroblastos estromais no curso da reparação tecidual e que a ativação destes decorre da participação de elementos como o fator de crescimento epidermal (EGF), e os fatores transformador de crescimento α e β (PEIFFER Jr. et al., 1990), que segundo VIANO et al. (1985), são estimulados pelo *Triticum vulgare*. A diminuição da expressão da fibronectina nas córneas tratadas induz a presumir que o BandVet® diminui sua síntese modulando a reparação cicatricial.

TERVO et al. (1991) descreveram a expressão da TNC no estroma corneal de coelhos após ceratectomia e MASERUKA (2000), no processo de reparação corneal. Neste estudo, observou-se expressão positiva da tenascina após as ceratectomias superficiais, que foi mais intensa nas córneas dos animais do grupo CO, aos três dias de pós-operatório. Admite-se, que sua menor expressão seja decorrente do trauma

produzido aos ceratócitos e maior quantitativo de células inflamatórias nas córneas no grupo BV neste período. Aos 7 e 14 dias, não houve marcação pela TNC em nenhum dos grupos, acreditamos que estes resultados decorram funções antagônicas e expressões inversamente proporcionais destas proteínas, já que a fibronectina encarrega-se da adesão celular da MEC (ALITALO et al., 1980; MOHRI, 1996) e a tenascina possui atividade antiadesiva (CHIQUET-EHRISMANN, 1990; SHRESTHA et al., 1996) e estes mesmos períodos foram os de maior expressão da fibronectina. Aos 28 dias a marcação foi positiva com intensidade leve, em todo o estroma corneal, somente nas córneas do grupo BV. Supomos que tal resultado deva-se ao aumento no quantitativo de fibroblastos e à diminuição da FNC nestas córneas, eventos decorrentes do efeito modulador do *Triticum vulgare* na reparação corneal.

Relativamente à avaliação cromática tridimensional de superfície, e já que o teste é inédito e de nossa autoria, não podemos discutir os resultados com outras pesquisas similares. Sem embargo, serão discutidos os resultados da ACTS com os dados obtidos neste trabalho.

Identificaram-se as alterações corneais no padrão cromático RGB (vermelho, verde e azul), onde as variações de vermelho caracterizavam as áreas de edema e ou o espaço entre as lamelas de colágeno, as de verde e suas variações, a presença de colágeno e as roxas e variações, a presença de celularidade. Para melhor identificar e quantificar essas variações foi realizado a conversão da imagem para o padrão 3D. O resultado foi uma figura tridimensional no padrão cromático RGB de fácil entendimento, rápida análise qualiquantitativa e dados factíveis de serem estudados estatisticamente.

Referentemente à área vermelha, esta foi menor nas córneas do grupo BV, aos 3 e 7 dias, já aos 14 e 28, dias foi menor no CO. Estes resultados expressam, nos primeiros dias, o edema decorrente da lesão e do processo inflamatório reparativo e, posteriormente, a reestruturação e organização das lamelas do colágeno estromal, processo que foi mais evidente no grupo BV. A organização destas áreas também mudou nos diferentes períodos avaliados, em ambos os grupos. Inicialmente apareceram como grandes zonas aleatoriamente distribuídas, já nos períodos finais tornaram-se zonas menores com formato similar, distribuídas de forma organizada. Esta alteração, acreditamos seja o resultado da mudança do edema corneal difuso

decorrente do trauma e do processo reparativo, para os espaços normais entre as lamelas do colágeno organizado após a reparação corneal. Esses dados são compatíveis com os achados clínicos e histológicos observados por DUQUE ORTIZ (2004), onde o edema foi diminuindo no decorrer dos distintos períodos e o processo de remodelação foi mais precoce nas córneas do grupo BV.

Relativamente à cor verde e suas variações, esta esteve presente em uma maior área nas córneas do grupo BV, em todos os períodos, dados compatíveis com a mensuração da espessura do estroma corneal realizado neste estudo. Destaca-se, neste aspecto, o aumento da homogeneidade destas áreas no decorrer dos períodos de avaliação, caracterizando um processo de reparação mais homogêneo e organizado aos 28 dias no grupo BV, como fora observado por DUQUE ORTIZ (2004). Outra observação importante são as variações da cor verde no decorrer dos períodos, a qual foi mais evidente nas córneas do grupo BV, acreditamos que tais resultados decorram do maior quantitativo de fibroblastos e colágeno neoformado observados nesta pesquisa, mediante o estudo morfométrico.

Identificou-se presença da cor azul e suas variações, com área maior ao terceiro e sétimo dias, no grupo BV. Nestes mesmos períodos, houve maior celularidade nas córneas do grupo BV. Sem embargo, embora a celularidade tenha sido maior nas córneas do grupo BV, aos 14 e 28 dias, a área azul foi inferior nestes períodos. Acreditamos que esta diferença nos resultados possa decorrer do método de análise, o qual afere as diferentes áreas como um todo e não individualmente.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a pesquisa, como fora concebida, permitem admitir que:

- A aplicação local corneal do extrato aquoso de *Triticum vulgare* (BandVet[®]) é factível no tratamento de ceratites ulcerativas;
- Obteve-se, com a utilização do extrato aquoso de *Triticum vulgare* (BandVet[®]), reparação corneal mais organizada;
- As propriedades estimulantes do extrato aquoso de *Triticum vulgare* (BandVet[®]) sobre os fibroblastos e na produção de colágeno, o tornam uma boa alternativa no tratamento de ceratites com comprometimento estromal.

7 REFERÊNCIAS

- AKPED, E. K; FOSTER, C. S. Limbal stem cells transplantation. **International Ophthalmology Clinics**, Philadelphia, v. 39, n. 1, p. 71-81, 1999.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**, 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ALITALO, K; HOVI, T; VAHERI, A. Fibronectin is produced by human macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 151, n. 3, p. 602-613, 1980.
- ANSETH, A. Glycosaminoglycans in corneal regeneration. **Experimental Eye Research**, London, v. 1, p. 122-128, 1961.
- ANSETH, A. Polysaccharide chemistry in corneal opacification. **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalem, v. 8, p. 1543-1544, 1972.
- ANSETH, A; LAURENT, T. C. Polysaccharides in normal and pathologic corneas. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Luis, v. 1, p. 195-201, 1962.
- AUKHIL, I; SAHLBERG, C; THESLEFF, I. Basal layer of epithelium expresses tenascin mRNA during healing of incisional skin wounds. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 105-112, 1996.
- AXELSSON, I; HEINEGARD, D. Fractionation of proteoglycans from bovine corneal stroma. **Biochemical Journal**, La Jolla, v. 145, p. 491-500, 1975.
- AXELSSON, I; HEINEGARD, D; BARBOSA-JÚNIOR, A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 3, p. 197-200, 2001.
- BARBOSA-JÚNIOR, A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. **Journal of Brazilian Pathology**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 3. p. 197-200, 2001.
- BARBUDO, G. R. Reparação de feridas cutâneas de roedores da espécie *Calomys callosus*, tratados com hidrocarboneto alifático: aspectos morfométricos, morfológicos e histológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. São Paulo, v. 38, n.2, p.62-65, 2001.
- BARROS, P. S. M; SAFATLE, A. M. V; ROGERIO, M. Xenologous pericardium as a keratoprosthesis in the dog. Animal experimental study. In ANNUAL MEETING

AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY OPHTHALMOLOGY, USA.
Proceedings... v. 24, p. 23, 1993.

BARTELS, P. H; THOMPSON, D. The video photometer. Marchevsky AM, **Bartels** PH (eds). In: **Image Analysis. A primer for pathologists**. Marchevsky AM e Bartels PH (Ed.) Raven Press Ltd. New York. p. 29-56, 1994.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesion-receptor interaction mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 143, p. 325-345, 1981.

BEAUBIEN, J. Mechanical properties of the rabbit cornea during wound healing after treatment with EGF. **Canadian Journal Ophthalmology**, Ottawa, v. 29, n. 2, p. 61-65, 1994.

BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic wound healing. **American Journal of Surgery**, Birmingham, v. 166, n. 1, p. 74-81, 1993.

BINDER, P. S. et al. Corneal anatomy and wound healing. In____ **Symposium on Medical and Surgical Diseases of the Cornea**, Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology. St. Louis, Mosby, p. 1-35, 1980.

BRAZZEL, R. K. Human recombinant EGF in experimental corneal wound healing. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Luis, v. 32, n. 2, p. 336-340, 1991.

BROOKS, D. E. Keeping the windshield clean: aggressive treatment of corneal disease in the dog an cat. In: North America Veterinary Conference – Small Animal, 2000, U.S.A. **Proceedings ...** Miami: International Society of Veterinary.

BROOKS, D. E.; OLLIVIER, F. J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, n. 3, p. 611-621, 2004.

BRUNELLI, A. T.J. et al. Excision of sclerocorneal limbus in dogs and resulting clinical events. Study of an experimental model. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 52-58, 2006.

CARPENTER. G; COHEN, S. Epidermal growth factors. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 265, p. 7709-7712, 1990.

CAVALIERE, S; SPAMPINATO, D; LAURIA, N. Accelerated recovery of corneal ulcers in rabbits treated with extract derived from *Triticum vulgare*. **Acta Therapeutica**, Bruxelles, v. 12, n. 2, p. 179-184, 1986.

CENEDELLA, R. J; FLESCNER, C. R. Kinetics of corneal epithelium turnover in vivo. Studies of lovastatin. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Luis, v. 31, n. 10, p. 1957-1962, 1990.

CHERRY, P. M. H; GARNER, A. Corneal neovascularization treated with argon laser. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 60, p. 464-472, 1976.

CHIQUET-EHRISMANN, R. et al. Tenascin interferes with fibronectin action. **Cell**, Cambridge, v. 53, n. 3, p. 383-390, 1988.

CHIQUET-EHRISMANN, R. What distinguishes tenascin from fibronectin? **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 4, n. 9, p. 2598-2604, 1990.

COLOGNATO, H; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Developmental Dynamics**, Hoboken, v. 218, n. 2, p. 213-234, 2000.

CONNOR, C. J.; MEEK, K. M. The structure and swelling of corneal scar tissue in penetrating full thickness wounds. **Cornea**, Hagerstown, v. 23, n. 2, p. 165-171, 2004.

COOK, H. C. CARBOHYDRATES. IN: BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. (Eds.) **Theory and practice of histological techniques**. 3.ed. New York: Churchill Livingstone, p. 177-213, 1994.

COTRAN, R.S.; KUMAR, R.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COUTURE, S. et al. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 157-164, 2006.

DANIELS, J. T; GEERLING, G; ALEXANDER, R. A. et al. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue. **Experimental Eye Research**, London, v. 77, n. 6, p. 653-664, 2003.

DICE, P. F; SEVERIN, G. A; LUMB, W. V.-Experimental autogenous and homologous corneal transplantation in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 9, p. 245-269, 1973.

DOHLMAN, C. H.; PRAUS, R. **The mucopolysaccharides in corneal wound healing. Biochemistry of the Eye**. Symposium, held in connection with the 20th International Congress of Ophthalmology, Tutzing Castle, August, p. 120-127, 1966.

DUA, H. S; AZUARA-BLANCO, A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 83, p. 414-419, 1999.

DUQUE ORTIZ, J. P. **Efeitos do Bandvet® sobre a reparação corneal após ceratectomia superficial em cães.** Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 68 p., 2004.

EICHENBAUM, J. D. et al. Immunology of the ocular surface. **The Compendium on Continuing Education**, v. 9, n. 11, p. 1101-1109, 1987.

ERICKSON, H. P; BOURDON, M. A. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. **Annual Review Cell of Biology**, Palo alto, v. 5, p. 71-92. 1989.

ERLER, B. S; MARCHEVSKY, A. M. Microphotometry in pathology. In: **Image Analysis. A Primer for Pathologists.** Marchevsky, A. M.; Bartels, P. H. Raven Press Ltda. New York, p. 181-206, 1994.

FARINELLA. Z. et al. Stimulation of cell division in mouse fibroblast line 3T3 by an extract derived from *Triticum vulgare*. **International Journal of Tissue Reactions**, Geneva, v. 8, n. 4, p. 337-342, 1986.

FAVIT. A. et al. An extract derived from *Triticum vulgare* stimulates inositol phospholipid hydrolysis in mouse fibroblasts. **Acta Therapeutica**, Bruxelles, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1992.

FIGUERÊDO-SILVA, J. et al. Esquistossomose mansônica experimental: Estudo morfométrico e experimental das células caliciformes intestinais. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 44, p. 21-25, 1999.

FINI, M. E. et al. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 149, n. 4, p. 1287-1302, 1996.

FORRESTER, J. V. et al. Biochemistry and cell biology. In: **The eye: basic sciences in practice.** 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 155-222, 2002.

IORE, L; SCAPAGNINI, U; RICCIO, R; CANONICO, P. Differential activities of "Triticum vulgare" extract and its fractions in mouse fibro- blasts. **Acta Therapeutica**, Bruxelles v. 19, p. 151, 1993.

FRIEDBERG, M. L. et al., Device drug delivery to the eye collagen shields, iontophoresis, and pumps. **Ophthalmology**, New York, v. 98, n. 5, p. 725-732, 1991.

FUNDERBURGH, J. L; CATERSON, B. E; CONRAD, G. W. Keratan sulfate proteoglycan during embryonic development of the chicken cornea. **Developmental Biology**, San Diego, v. 116, p. 267-277, 1986.

FUNDERBURGH, J. L. et al. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Luis, v. 39, n. 10, p. 1957-1964, 1998.

GALERA, P. D. et al. Utilization of the aqueous extract of *Triticum vulgare* (BandVet®) after superficial keratectomy in domestic cats afflicted with corneal sequestrum. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v. 9, n. 3, p. 714-720, 2008.

GARCIA, J. A. et al., Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 3, n. esp., p. 290-294, 1996.

GARTNER, L. P; HIATT, J. L. **Color atlas of histology**. 4. ed., Philadelphia: Lippincott, Williams e Wilkins, 2001.

GIRARD, L. J. Corneal surgery. In: _____. **Advanced techniques in ophthalmic microsurgery**. St. Louis: Mosby, v. 2, p. 2-26, 1981.

GLASGOW, W. C; ELING, T. E. Epidermal growth factors stimulates linoleic acid metabolism in BALB/c 3T3 fibroblasts. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 38, n. 4, p. 503-510, 1990.

GODOY, C; GUERRA, J. L; BARROS, P. S. Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal eqüina como enxerto: estudo experimental. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 65, n. 5, p. 545-549, 2002.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde e direito dos animais**. Porto Alegre: HCPA, p. 28, 1995.

GORDON, J; JOHNSON, P. J. and the Fibronectin Study Group: Discontinuation of Topical Ophthalmic Medications Promotes Healing of Nonhealing Corneal Defects. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Luis, v. 32, n. 4, p. 1071, 1991.

GREGORY, J. D; COSTER, L. E; DAMLE, S. P. Proteoglycans of rabbit corneal stroma. Isolation and partial characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 12, p. 6965-6970, 1982.

GUEDEL, A. E. **Inhalation anesthesia**. 2. ed. New York: Macmillian, 1952.

GUM, G. G. Phisiology of the eye. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. London: Lea e Febiger, p. 4-161, 1991.

HAMILTON, P. W; ALLEN, D. C. Morphometry in histopathology. **The Journal of Pathology**, London v. 175, n. 4, p. 369-379, 1995.

HAMILTON, P. W. Interactive computer-aided morphometry. In: **Quantitative clinical pathology**. Peter W. Hamilton e Derek C. Allen (Ed.), Blackwell-Science, USA, p. 342, 1997.

HASSELL, J. R; NEWSOME, D.A; HASCALL, V.C. Characterization and biosynthesis of proteoglycans of corneal stroma from Rhesus monkey. **Journal of Biological Chemistry**, London, v. 254, p.12346-12354, 1979.

HELPER, L. C. Diseases and Surgery of the cornea and sclera. In: _____. **Magrane's canine ophthalmology**. 4. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 102-49, 1989.

HUGHES Jr, W. F. Alkali burns of the rabbit eye. **Archives of Ophthalmology**, New York, v. 35, p.423 – 449, 1946.

JIN-HONG CHANG. et al. Corneal Vascularization. **Current Opinions in Ophthalmology**, Hagerstown, v. 12, p. 242- 249, 2001.

KERN, T. J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinic of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 643-666, 1990.

KIRSCHNER, S. E. Persistent corneal ulcers. What to do when ulcers won't heal. **Veterinary Clinic of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 627-642, 1990.

KOCH, A. E. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, Washington, v.258, p.1798-1801, 1992.

LAFORGE, H. Pathologie de la corneé chez le carnivores domestiques. **Recueil de Medecine Vétérinaire**, Paris Vigot Freres, v. 165, n. 3, p. 247-256, 1989.

LAUS, J. L. **Emprego da escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis* - Steidachner, 1859), conservada em glicerina, como sucedâneo de córneas no reparo de ceratectomias superficiais**: Estudo experimental em cães. (*Canis familiaris* - Linnaeus, 1758). Jaboticabal, 1994. 71p. Tese (Livro Docência em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

LAVACH, J. D. Cornea. In: **Large animal ophthalmology**. St. Louis; Mosby, p. 101-49, 1990.

LEE, M. A. et al. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A Longitudinal clinical and MRI study. **Brain**, Oxford, v. 122, n. 2, p. 191-197, 1999.

LOCHTER, A.; BISSEL, M. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 165-173, 1995.

MADRI, J. A; PRATT, B. M. Angiogenesis. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, 1998. P. 337-358. (Apostila)

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária. Farmacologia e técnicas**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 235, 1994.

MATERA, J. et al.-Ensaio de avaliação de eficácia e de exeqüibilidade do uso de creme ou gaze impregnada com *Triticum vulgare* em feridas cutâneas 1ª fase experimental. 2ª fase clínica. **Veterinary News**. São Paulo, n. 58, p. 8, 2002.

MASERUKA, H. et al. Developmental changes in patterns of expression of tenascin-C variants in the human cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Luis, v. 41, n. 13, p. 4101-4107, 2000.

MELDOLESI, J; MAGNI, M. Lipid metabolites and growth factor action. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 12, p.362-364, 1991.

MICHELACCI, Y. M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 8, p. 1037-1046, 2003.

MISHIMA, H; NAKAMURA, M; MURAKAMI, J. Transforming growth factor- β modulates effects of epidermal growth factor on corneal epithelial cells. **Current Eye Research**, London, v. 11, n. 7, p. 691-696, 1992.

MIYAGAWA et al. Surface ultrastructure of collagen fibrils and their association with proteoglycans in human cornea and sclera by atomic force microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. **Cornea**, New York, v. 20, n. 6, p. 651-656, 2001.

MOHRI, H. et al. Fibronectin and integrins interactions. **Journal of Investigative Medicine**, Thoro Fane, v. 44, n. 8, p. 429-441, 1996.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres on the collagenous and elastic system. **Cell Biology**, New York, v. 20, p 15-17, 1996.

MORISSET, R. et al. - Evaluation of the healing activity of hydrocotyle tincture in the treatments of wounds. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 1, n. 3, p. 117-121, 1987.

MOSHER, D. F. Physiology of fibronectin. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 35, p. 561-575, 1984.

MURALI, S. et al. Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. **Current Eye Research**, London, v. 13, n. 12, p. 857–862, 1990.

MULHOLLAND, B; TUFT, S. J; KHAW, P. T. Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing. **Eye**, London, v. 19, n. 5, p. 584-588, 2005.

MÜLLER, L. J. et al. A new three Dimensional model of organization of proteoglycans and collagen fibrils in human corneal stroma. **Experimental Eye Research**, London, v. 78, n. 3, p. 493-501, 2004.

NAKASAWA, K; ISOMURA, T; SHIMOEDA, S. Modification of proteoglycan synthesis by corneal stromal cells on co-culture with either epithelial or endothelial cells. **The Journal of Biochemistry**, Baltimore, v. 22, n. 4, p. 851-858, 1997.

NASISSE, M. P. Canine ulcerative keratitis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Yardley, v. 7, n. 9, p. 686-701, 1985.

NAUMMAN, G. O. H; SAUTTER, H. Surgical procedures on the cornea. In: BLODI, F. C; MACKENSEN, G; NEUBAUER, H. **Surgical ophthalmology**. Berlin: Springer-Verlag, p. 434-40, 1988.

NELSON, D. L; MILLAN, A. D. Doenças da córnea. In: KIRK, R. W. **Atualização terapêutica veterinária**. São Paulo: Manole, 1988. v. 1, p. 808-17.

NISHIDA, T. et al. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 97, p. 1653-1657, 1983 a.

NISHIDA, T. et al. Fibronectin: a new treatment for corneal trophic ulcer. **Archives of Ophthalmology**, New York, v. 101, n. 7, p. 1046-1048, 1983 b.

NISHIDA, T. Fibronectin enhances corneal epithelial wound healing of rabbits in vivo. **Archives of Ophthalmology**, New York, v.102, n. 3, p.455-456, 1984.

NOGUEIRA, J.C. **Estudo histológico, histoquímico e ultramicroscópico da glândulabulbo-uretral do gato (Felis domestica) adulto..** 82f. Tese (Doutorado em Histologia e Embriologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1968.

OBERHOLZER, M. et al. Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 105, n. 5, p. 333-355, 1996.

OHJI, M. et al. Corneal epithelial cell attachment with endogenous laminin and fibronectin. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, Saint Luis, v. 34, p. 2487-2492, 1993.

OLLIVIER, F. J. et al. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 64, n. 9, p. 1081-1087, 2003.

OLLIVIER, F. J. et al. Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 397-405, 2004.

OLLIVIER, F. J. Proteinases of the cornea and precocular tear film (Invited Review). **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 199-206, 2007.

PANDIELLA, A. et al. Transmembrane signaling at the epidermal growth factor receptor. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 10, n. 10, p. 411-414, 1990.

PEIFFER Jr. et al. Surgery of the canine and feline orbit, adnexa and globe. Part 6: Surgery of the cornea. **Companion Animal Practice**, v. 1, n. 7, p. 3-13, 1987.

PEIFFER Jr, R. L; PETERSEN-JONES, S. M. Ocular surface lesions as cause of pain. In: **Small animal ophthalmology**. A problem oriented approach. 2. ed. London: W. B. Saunders, p. 175-181, 1997.

PEIFFER Jr, R. L. et al. Fundamentals of veterinary ophthalmic pathology. In: **Gelatt, K. N. Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia; Lippincott Williams e Wilkins, p. 355-385, 1999.

PERUCCIO, C. Diagnosi e trattamento delle lesioni corneali. **Scienze Veterinarie**, S.I. : The Society, v. 4, p. 3-8, 1983.

PETRI, G. **Influência da aplicação tópica da proteína ligante de cálcio MRP-14 na evolução da neovascularização induzida na córnea de ratos** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 1997.

PHILLIPS, C. L. et al. Three-dimensional imaging of embryonic mouse kidney by two-photon microscopy. **American Journal Pathology**, v. 158, n. 1, p. 49-55, 2001.

PINEDA-BOLIVAR, F. GARCIA-SANCHEZ, G. A; FRANCO-BOURLAND, R. Evaluation of tear film metalloproteinases in normal dogs and in dogs with ulcerative keratitis (Abstract). **Proceedings of the International Society of Veterinary Ophthalmology**, p.13, 2001.

POWER, W. J.; NEVES, R. A. Anatomia e fisiologia da córnea. In: Belfort, Jr. R.; Kara-José, N. **Córnea - clínica cirúrgica**. São Paulo: Roca, 1997. p. 3-15.

PRAUS, R.; DOHLMAN, C. H. Changes in the biosynthesis of corneal glycosaminoglycans during wound healing. **Experimental Eye Research**, London, v. 8, p. 69-76, 1969.

PRUDDEN, J. F; MIGAL, P; HANSON, P.- The discovery of a potent pure chemical wound healing acceleration factor. **American Journal of Surgery**, Belle Mead, v. 119, n. 5, p. 560-564, 1970.

QIAN ZHAN, R; BURROWS, C; CINTRON. Localization of type XII collagen in normal and healing rabbit cornea by in situ hybridization. **Experimental Eye Research**, London, v. 60, n. 55, p. 551-561, 1995.

RABAU, M.Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 9, n. 3, p. 525-28, 1994.

REIM, M. et al. Effect of epidermal growth factor in severe experimental alkali burns. **Ophthalmic Research**, Basel, v. 20, p. 327-331, 1988.

RIBEIRO, F. A. Q. et al. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin C. **The Laryngoscope**, Philadelphia, v. 114, p. 148-152, 2004.

RODRIGUES, G. N. et al. Morfologia das células endoteliais de córneas de cães (*Canis familiaris* - LINNAEUS, 1758) em diferentes faixas etárias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 2000, Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. Niterói: Editora da Universidade Federal Fluminense, v. 7, p. 160, 2000.

ROOS, E. Cellular adhesion invasion and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 4, n. 738, p. 263-284, 1984.

RUCABADO, A; GIANNATTANASIO, D. Treatment of ulcer with an extract of wealth's germs. **Hospital**, v. 80, p. 20, 1980.

SAGE, E.H.; BORNSTEIN, P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 23, p. 14831-14834, 1991.

SAIKA S. et al. Collagen types in healing alkali-burned corneal stroma in rabbits. **Japanese Journal of Ophthalmology**, Tokyo, v. 40, n. 3, p. 303-309, 1996.

SAKURAGAWA, N. et al. -Stimulants from Gardeniae fructus for cultured endothelial cell proliferation. 1992. Zimmermann **Conference: Progress in Vascular Biology, Hemostasis and Thrombosis**. La Jolla. February 1992.

SAMUELSON, D.A. Ophthalmic embryology and anatomy. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia : Lea e Febiger, Chap. 1, p. 3-123, 1991.

SCHOENAU, L. S. F; PIPI, N. L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **Hora Veterinária**, v. 12, n. 72, p. 49-53, 1993.

SCHOEFL, G. I. Studies on inflammation. III. Growing capillaries: Their structure and permeability. **Virchow Archives of Pathology e Anatomy**, v. 337, p. 97-141, 1963.

SCHULTZ, G. et al. Effects of growth factors on corneal wound healing. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 70, n. 9, p. 60-66, 1992.

SCHULTZ, G; KHAW, P. T; OXFORD, K; MACAULEY, S; VAN SETTEN, G; CHEGINI, N. Growth factors and ocular wound healing. **Eye**, London, v. 8, n. 2, p. 184-187, 1994.

SCOTT, J. E.; HAIGH, M. Identification of specific binding sites for keratan sulphate proteoglycans and chondroitin-dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea by the use of cupromeronic blue in critical-electrolyte-concentration techniques. **Biochemical Journal**, London, v. 253, p. 607-610, 1988.

SEVERIN, G. A. Córnea. In: __. **Manual de oftalmologia veterinária**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, p. 113-142, 1991.

SHIVELY, J. N; EPLING, G. P. Fine structure of canine eye; cornea. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 31, n. 4, p.719-22, 1970.

SHOSHAN, S; FINKELSTEIN, S. Acceleration of wound healing induced by enriched collagen solutions. **Journal Surgery Research**, Begem, v. 10, n. 10, p.485-491, 1970.

SHRESTHA, P. et al. Tenascin: growth and adhesion modulation – extracellular matrix degrading function: an in vitro study. **European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology**, Oxford, v. 32B, n. 2, p. 106-113, 1996.

SINGH, G; FOSTER, C. S. Growth factors in treatment of non healing corneal ulcer and recurrent erosion. **Cornea**, New York, v. 8, n. 1, p. 45-53, 1989.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In: __. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, p. 257-303, 1990.

SMITH, V. A. et al. Tear film MMP accumulation and corneal disease. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 85, n. 2, p. 147-153, 2001.

SORIANO, E. S; CAMPOS, M. S; MICHELACCI, Y. M. Effect of epithelial debridement on glycosaminoglycan synthesis by human corneal explants. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 295, p. 41-62, 2000.

SPENCER, W. H. Cornea. In: **Ophthalmic pathology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, p. 157-333, 1996.

STADES, F. C. et al. **Ophthalmology for the veterinary practitioner**. Hannover: Schlütersche GmbH e Co. KG, p. 204, 1998.

STARTUP, F. C. Corneal ulceration in the dog. **Journal Small Animal Practice**, Oxford, v. 25, p. 737-52, 1984.

STRIETER, R. M. et al., Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. **American Journal Pathology**, Philadelphia, v. 141, n. 6, p. 1279-84, 1992.

STRUBLE, D. T. et al. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 3, n. 2-3, p. 111-119, 2000.

SUNDERKOTTER, C. et al. Macrophage-derived angiogenesis factors. **Pharmacological Therapy**, New York, v.51, p. 195-216, 1991b.

SWANK, A; HOSGOOD, G. Corneal wound healing and the role of growth factors. **Compendium on Continuing Education of Veterinary Practice**, Yardley, v. 18, n. 9, p. 1007– 1014, 1996.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Archives of Pathology**, Chicago, v. 78, p. 69-72, 1964.

SYNOPSIS, A. Image and sign process. **Yearbook of medical Informatics**. Hasman Ed., 1996.

TANIGUCHI, E. The effects of recombinant EGF in corneal angiogenesis. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 95, n. 8, p. 52-58, 1991.

TEN DIJKE, P; IWATA, K. K. Growth factors for wound healing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 7, p. 793-798, 1989.

TERVO, K. et al. Demonstration of tenascin-like immunoreactivity in rabbit corneal wounds. **Acta Ophthalmology**, Copenh, v. 67, n. 3, p. 347-350, 1989.

TERVO, K et al. Expression of tenascin and cellular fibronectin in the rabbit cornea after anterior keratectomy. **Investigative Ophthalmology e Visual Science**, Saint Luis, v. 32, n. 11, p. 2912-2918, 1991.

TRIPATHI, R.C. et al. Prospects for epidermal growth factor therapy in the management of corneal disorders. **Survey Ophthalmology**, New York, v. 34, n. 6, p. 457-462, 1990.

TRUE, L. D. Morphometry applications in anatomic pathology. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 450-467, 1996.

ULLRICH, A; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptor tyrosine kinase activity. **Cell**, Cambridge, v. 61, n. 2, p. 203-212, 1990.

VALERIO, C. et al. The anti-inflammatory activity of an extract derived from *Triticum vulgare*. **Acta Therapeutica**, Bruxelles, v. 12, n. 2, p. 171-177, 1986.

VAN DEN BERGHE, D. A. et al. Specific stimulation of human endothelial cells by *Triticum vulgare* extract and its biologically active fraction. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 7, n. 2, p. 172-178, 1993.

VIANO, I; MOSSO, G; NICOLA, G. Effect of *Triticum vulgare* extract on DNA synthesis of mammalian cells. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 51, n. 2, p. 91-93, 1985.

VON DER MARK, H; VON DER MARK, K; GAY, S. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. 1. Preparation of collagen type I and type II specific antibodies and their application to early stages of the chick embryo. **Developmental Biology**, San Diego, v. 48, n. 2, p. 237-249, 1976.

WARING, G. O. Corneal structure and pathophysiology. In: LEIBOWITZ, H. **Corneal disorders: clinical diagnosis and management**. Philadelphia; W.B. Saunders, p. 3-25, 1984.

WEBSTER, R. G. The use of adhesive for the closure of corneal perforations. **Archives of Ophthalmology**, New York, v. 80, n. 6, p. 705-709, 1968.

WENDLER, M. E. et al. Adesivos teciduais no tratamento da perfuração corneal. Estudo comparativo em cobaias. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 138-40, 1983.

WHITLEY, R. D. Canine cornea. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 307-356, 1991.

WHITLEY, R. D; GILGER, B. C. Diseases of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, p. 635-674. 1999.

WILKIE, D. A.; WHITTAKER, C. Surgery of the cornea. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 1067-1107, 1997.

WITTE, M. B; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **The American Journal of Surgery**, Belle Mead, v. 183, n. 4, p. 406-412, 2002.

WOOST, P. et al. Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. **Experimental Eye Research**, London, v. 40, n. 1, p. 47-60, 1985.

YANOFF, M.; FINE, B. S. **Ocular Pathology: A text and atlas**, 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, p. 934, 1982.

ZIMMERMAN, D. C; COLUDRON, C. A. Identification of traumatin, a wound hormone as 12-oxo-trans.10-dodecenoic acid. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 63, n. 3, p.536-541, 1979.