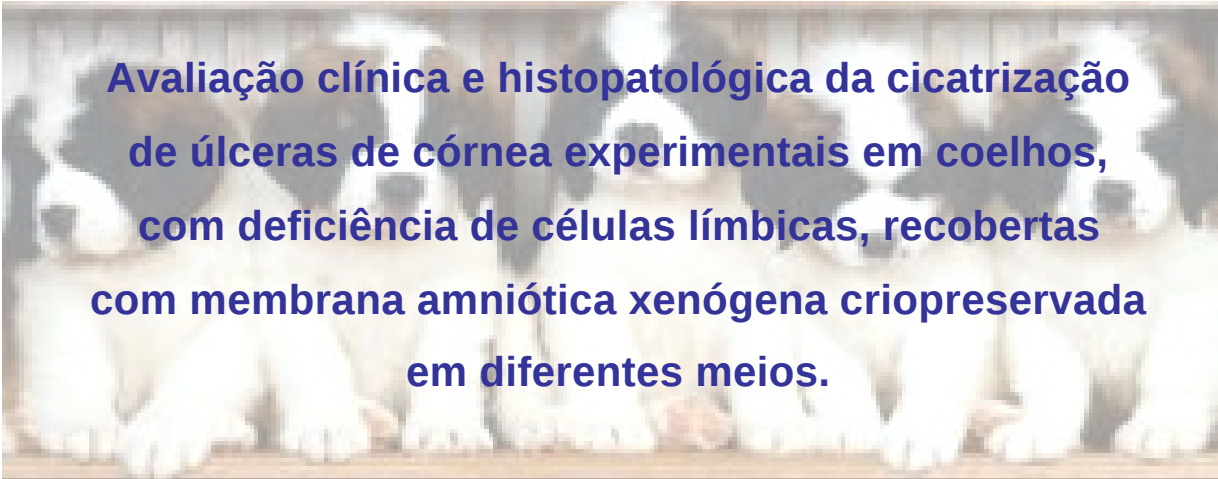


DANIELA NOGUEIRA CREMONINI



**Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização
de úlceras de córnea experimentais em coelhos,
com deficiência de células límbicas, recobertas
com membrana amniótica xenóloga criopreservada
em diferentes meios.**

Botucatu

2003

DANIELA NOGUEIRA CREMONINI

**Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização de
úlceras de córnea experimentais em coelhos, com
deficiência de células límbicas, recobertas com membrana
amniótica xenógena criopreservada em diferentes meios.**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Cirurgia, da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de Mestre.**

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani

Botucatu

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Cremonini, Daniela Nogueira.

Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização de úlceras de córnea experimentais em coelhos, com deficiência de células límbicas, recobertas com membrana amniótica xenógena criopreservada em diferentes meios / Daniela Nogueira Cremonini. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: José Joaquim Tilton Ranzani

Assunto CAPES: 40102149

1. Córnea - Cirurgia

CDD 636.089771

Palavras-chave: Coelho; Córnea; Criopreservação; Histopatologia; Membrana amniótica.

**À minha querida família, cada dia
maior, que, sem o apoio incondicional,
não teria chegado até aqui.**

**Em especial aos meus pais, pois sem
eles, meus sonhos não seriam realizados.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. J. Joaquim T. Ranzani, ou apenas Quim, meu querido orientador, por tudo que me ensinou, ajudou e acudiu, em todos os momentos que precisei.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa e Ensino do estado de São Paulo, pelo apoio imprescindível para a realização deste trabalho.

Às minhas irmãs de “coração”, Andréa, Luciana e Geórgia, que sempre me ajudaram em tudo e trouxeram alegria nos momentos mais difíceis.

À Prof^a. Cláudia Valéria S. Brandão, que me trouxe muitos ensinamentos na veterinária e principalmente na oftalmologia.

À Prof^a. Mariângela, da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na leitura das lâminas de histopatologia.

Ao Prof. Adalberto J. Crocci, pelo auxílio na avaliação estatística.

Ao Prof. Sony Dimas Bicudo, pelos exames ultrasonográficos das cadelas prenhes e por “desvendar” os momentos dos partos.

À Farmácia Oftalmológica Ophthalmos, em especial ao Sr. Acácio Alves de Souza Lima Filho, pela doação dos meios de conservação.

À Prof^a Fernanda Alvarenga, pelas orientações em criopreservação.

Aos meus amigos da “máfia” da oftalmologia, Tiago, Luciana, João e Felipe, que entendem o que é ter companheirismo no trabalho.

Aos meus amigos Tatiana (Xexênia), Gilberto (Gilberson), Ana Carolina (Xá), Juliany (Saracura), Evelyn (Cernelha), Cristiano (Baboo), Fábio (Badá), Fabiano (Lambi), Amanda, Fabiano (Ritchie), José Francisco (Biju), Ricardo (Abigail), Andrei (Maligno), Alexandre (Spit), José Luiz (Zumira), Álamo (Saci), Gisela (Jeba), Stella (Derrotada), Alexandre (Faiado), sempre companheiros nas horas boas e ruins, em todos estes anos de faculdade.

Ao amigo Renato Linhares Sampaio, pelas idéias e trocas de informação imprescindíveis neste trabalho.

Ao Marcelo Augusto Prado Cristófar, por me ajudar na impressão e apresentação deste trabalho.

Ao Sr. Luis, funcionário do HV, pelos cuidados com meus animais.

Aos amigos do Hospital Veterinário, que me apoiaram e ajudaram, direta ou indiretamente, a completar este caminho.

Às minhas meninas tão amadas, Melanie, Milla e Maia que, com seus gestos simples, sempre trouxeram muitas alegrias.

A Deus, por iluminar meu caminho nos momentos mais difíceis...

**“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”**

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA DA CÓRNEA E SUPERFÍCIE OCULAR	18
2.2	ETIOPATOGENIA DAS LESÕES CORNEANAS E DA SUPERFÍCIE OCULAR	21
2.3	CERATITES ULCERATIVAS	24
2.4	MÉTODOS DE REPARAÇÃO DA CÓRNEA	26
2.5	UTILIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA RECONSTRUÇÃO DA SUPERFÍCIE OCULAR	28
2.6	CAPTAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	31
3	OBJETIVO	33
4	MATERIAL E MÉTODO	35
4.1	ANIMAIS	36
4.2	MATERIAL UTILIZADO	37
4.2.1	Fármacos	37
4.2.2	Soluções de preservação	37
4.2.3	Outros	38
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
4.3.1	Grupos experimentais	39
4.3.2	Seqüência para obtenção e preparo da membrana amniótica	39
4.3.3	Preservação da membrana amniótica	40

4.3.4	Procedimento cirúrgico	41
4.3.5	Coleta e preparo do material para avaliação histopatológica	42
4.3.6	Aspectos éticos	43
4.4	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS	43
4.4.1	Clínica	43
4.4.2	Morfológica	44
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS	45
5.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA	46
5.1.1	Fotofobia e blefarospasmo	46
5.1.2	Secreção ocular	46
5.1.3	Hiperemia conjuntival	47
5.1.4	Opacidade	47
5.1.5	Neovascularização	48
5.1.6	Reepitelização corneana	48
5.1.7	Presença da membrana amniótica na superfície ocular	49
5.2	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	56
5.2.1	Presença da membrana amniótica	56
5.2.2	Epitélio corneano	56
5.2.3	Células caliciformes	57
5.2.4	Infiltrado inflamatório	57
5.2.5	Edema estromal	58
5.2.6	Neoformação vascular	58
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
6	DISCUSSÃO	80
6.1	Quanto à metodologia	81
6.2	Resultados clínicos	88
6.3	Resultados morfológicos	92
7	CONCLUSÕES	96
8	REFERÊNCIAS	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- % – porcentagem
- mm – milímetros
- TGF- β – fator transformador de crescimento β
- EGF – fator de crescimento epidermal
- HGF – fator de crescimento do hepatócito
- KGF – fator de crescimento do queratinócito
- b-FGF – fator de crescimento fibroblástico básico
- HLA – antígeno leucocitário humano
- DMSO – dimetil sulfóxido
- °C – graus Celsius
- Kg – kilograma
- HE – hematoxilina e eosina
- PAS – *periodic acid-Shiff*
- g – gramas
- cm – centímetros
- mg/Kg – miligramas por kilograma
- ml – mililitros
- ° – grau
- º – decimal
- et al. – et alli; e outros
- MA – membrana amniótica
- h – hora

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de fotofobia e blefarospasmo.....	50
Figura 2 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de secreção ocular.....	51
Figura 3 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de hiperemia conjuntival.....	52
Figura 4 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de opacidade corneana.....	53
Figura 5 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao tempo de reparação epitelial.....	54
Figura 6 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de permanência da membrana amniótica.....	55
Figura 7 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao número de camadas epiteliais.....	60
Figura 8 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore da espongiose nas células epiteliais.....	61
Figura 9 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore das células caliciformes presentes no epitélio corneano.....	62
Figura 10 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore do infiltrado inflamatório no estroma corneano.....	63
Figura 11 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore de edema estromal.....	65
Figura 12 -	Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore de neovascularização corneana.....	66
Figura 13 -	Imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 1 (controle), aos 7 dias. Nota-se neovascularização corneana superficial, opacidade moderada e úlcera central corada por fluoresceína.....	73

Figura 14 -	Imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana em meio próprio), aos 7 dias, apresentando neovascularização corneana profunda e intensa, opacidade moderada e pequena úlcera ao centro.....	73
Figura 15 -	Imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião), aos 3 dias. Observa-se que a membrana amniótica cobre toda a superfície corneana. Não se nota presença de neovasos.....	74
Figura 16 -	Imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana em meio próprio), aos 5 dias. Observa-se a presença da membrana semitransparente e de úlcera superficial, ambas coradas por fluoresceína.....	74
Figura 17 -	Imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião), aos 7 dias. Observa-se que a membrana, corada por fluoresceína cobre parcialmente a superfície corneana, esta apresenta neovascularização e opacidade moderada.....	75
Figura 18 -	Imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 1 (controle), aos 30 dias, apresentando neovascularização corneana; nota-se ausência de opacidade corneana.....	75
Figura 19 -	Fotomicrografia de córnea normal de coelho. Observa-se epitélio estratificado, não queratinizado, com células superficiais achatadas. Estroma com lamelas em arranjo organizado e ausência de leucócitos (HE, 400X).....	76
Figura 20 -	Fotomicrografia da região do limbo de córnea normal de coelho. Observa-se presença de epitélio estratificado, vasos, leucócitos e disposição irregular da camada estromal; o limbo está localizado na transição entre o epitélio corneano e o conjuntival (HE, 100X).....	76
Figura 21 -	Fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 1 (controle) aos 7 dias. Observa-se disposição da camada estromal anterior, com material amorfo e raros ceratócitos, referente a edema (HE, 100X).....	77

Figura 22 -	Fotomicrografia da córnea de coelho referente ao grupo 1 (controle) aos 7 dias. Nota-se camada epitelial irregular e estroma com edema e polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (seta); (HE, 400X).....	77
Figura 23 -	Fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana amniótica em meio próprio) aos 7 dias. Observa-se área de abrasão epitelial (seta vermelha) e intenso acúmulo de polimorfonucleares no estroma (HE, 100X).....	78
Figura 24 -	Fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião) aos 7 dias, com a membrana amniótica aderida à conjuntiva perilímbica e recobrindo a superfície da córnea. Nota-se presença de infiltrado inflamatório no estroma da córnea e da membrana (HE, 50X).....	78
Figura 25 -	Fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana em meio próprio) aos 15 dias. Observa-se presença de células caliciformes (setas) na camada epitelial, caracterizando deficiência límbica (PAS, 400X).....	79
Figura 26 -	Fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião) aos 30 dias. Observa-se presença de neovasos (seta) e células caliciformes (seta vermelha); (HE, 100X).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fotofobia/Blefarospasmo: tempo, em dias, da presença destes sinais clínicos em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.....	50
Tabela 2 -	Secreção ocular: tempo, em dias, da presença deste sinal clínico em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.	51
Tabela 3 -	Hiperemia conjuntival: tempo, em dias, da presença deste sinal clínico em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.....	52
Tabela 4 -	Opacidade corneana: tempo, em dias, da presença deste sinal clínico em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.....	53
Tabela 5 -	Reparação epitelial: tempo, em dias, deste processo em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.....	54
Tabela 6 -	Membrana amniótica: tempo, em dias, de presença na superfície ocular em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.....	55
Tabela 7 -	Número de camadas epiteliais presentes nos cortes histológicos observados por grupo em seus referentes momentos.....	60
Tabela 8 -	Escore de espongiose epitelial avaliado por grupo em seus referentes momentos.	61
Tabela 9 -	Escore de células caliciformes avaliado por grupo em seus referentes momentos.	62
Tabela 10 -	Escore de infiltrado inflamatório avaliado por grupo em seus referentes momentos.....	63
Tabela 11 -	Células inflamatórias predominantes nos cortes histológicos de cada grupo e referentes momentos.....	64
Tabela 12 -	Escore de edema estromal avaliado por grupo em seus referentes momentos.....	65
Tabela 13 -	Escore de neoformação vascular avaliado em cada grupo e em seus referentes momentos.....	66
Tabela 14 -	Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) do número de camadas epiteliais, segundo grupos e momentos.....	67
Tabela 15 -	Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores de espongiose, segundo grupos e momentos.....	68
Tabela 16 -	Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores das células caliciformes, segundo grupos e momentos.....	69
Tabela 17 -	Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores das células inflamatórias, segundo grupos e momentos.....	70
Tabela 18 -	Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores de edema estromal, segundo grupos e momentos.....	71
Tabela 19 -	Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores de neo-vascularização corneana, segundo grupos e momentos	72

CREMONINI, D.N. *Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização de úlceras de córnea experimentais em coelhos, com deficiência de células límbicas, recobertas com membrana amniótica xenógena criopreservada em diferentes meios*. 2003. 120p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

A superfície ocular normal é composta pelos epitélios da córnea, conjuntiva e limbo, cada qual com um distinto fenótipo celular; juntos, formam uma unidade funcional responsável pela manutenção da integridade desta superfície. O presente estudo visou avaliar as alterações relacionadas à deficiência das células precursoras do epitélio corneano, presentes no limbo, e o efeito do transplante de membrana amniótica, conservada em diferentes meios, sobre esta deficiência. A lesão foi induzida pelo contato do n-heptanol com a superfície da córnea e do limbo, associado à peritomia conjuntival em 360° em coelhos; em seguida, foi recoberta com membrana amniótica canina, suturada à episclera perilímbica, criopreservada em meio próprio para conservação ou em meio utilizado para conservação de embrião, ambos com glicerol a 50% e mantidos a -80°C, à exceção do grupo controle, não tratado com a membrana. Os animais foram submetidos à avaliação clínica diária e morfológica aos sete, 15 e 30 dias. Todos desenvolveram sinais de deficiência de células límbicas, denominada conjuntivalização, caracterizada pela presença de neovascularização, inflamação crônica e defeitos epiteliais recorrentes; ao exame histopatológico da córnea observou-se presença de neovasos, edema, leucócitos e células caliciformes. O transplante de membrana amniótica não foi eficiente para o tratamento da deficiência total de células germinativas límbicas, entretanto auxiliou o processo de cicatrização, sendo mais eficiente quando preservada em meio para conservação de embrião.

Palavras-chave: coelho; córnea; criopreservação; histopatologia; membrana amniótica.

ABSTRACT

A normal ocular surface is composed by corneal, conjunctival and limbal epithelia, each having distinct cellular phenotypes; together, they form a functional unit, which is responsible for maintaining the integrity of the ocular surface. The following research was conducted with the intent of evaluating changes related to limbal stem-cell deficiency, as well as analyzing the results that canine amniotic membrane transplant, which was preserved in different solutions, had over this deficiency. The ulcer was induced by putting n-heptanol in contact with the corneal and limbal surface, associated to 360° conjunctival peritomy in rabbits; the following step was to cover the surface with canine amniotic membrane, secured to perilimbal episclera, cryopreserved in its own solution or embryo solution, both with 50% glycerol and stored at -80°C, with the exception of the control group, which was not treated with membrane. The animals were examined daily and morphologically at seven, 15 and 30 days. All of them developed signs of limbal stem-cell deficiency, entitled conjunctivalization, due to the occurrence of neovascularization, chronic inflammation and recurrent epithelial defects; during corneal histopathology it was observed the occurrence of neovascularization, edema, leukocytes and goblet cells. The amniotic membrane transplant was not efficient in the treatment of limbal stem-cell deficiency, however it did help in the process of cicatrization, demonstrating to be more efficient when preserved in embryo solution.

Key words: rabbits; cornea; cryopreservation; histopathology; amniotic membrane.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A região anterior do olho está em constante contato com o ambiente externo, sendo assim mais susceptível a traumas e agressões. O olho possui mecanismos de defesa próprios e mantém uma homeostase com o restante do organismo, desta forma, o sistema nervoso e o vascular asseguram o metabolismo do órgão e as defesas auto-imunes, os tecidos perioculares e as estruturas ósseas auxiliam na proteção do bulbo ocular e o movimento de piscar induz sincronicamente a um estímulo reflexo do aparelho lacrimal, cujo filme lacrimal ajuda a diluir e eliminar substâncias estranhas, como toxinas e proteínas, além de equilibrar a flora microbiana local e nutrir a superfície epitelial da conjuntiva e córnea. Além disso, a camada de mucina presente nesta superfície age como uma barreira protetora à invasão de microorganismos e a mucosa ocular, rica em tecidos vascular e linfóide, compõe um importante mecanismo de defesa (LIMA et al., 1999).

Muitos agentes agressores, entretanto, podem afetar a córnea. Devido à sua estrutura relativamente simples, a resposta a qualquer insulto é limitada e muitas afecções podem causar opacificação e perda da visão (GELATT, 1999). Face à necessidade de manutenção da transparência, buscam-se métodos que corrijam a enfermidade, com mínima formação cicatricial. Dentre estes, a membrana amniótica tem apresentado resultados satisfatórios em diversos procedimentos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA CÓRNEA E SUPERFÍCIE OCULAR

A superfície ocular é composta pelos epitélios da córnea, limbo e conjuntiva. O revestimento do epitélio da córnea é contínuo com o epitélio conjuntival (conjuntiva bulbar). A transição entre a esclera e a córnea ocorre abruptamente na junção córneo-escleral, denominada limbo (BANKS, 1991). Os três epitélios apresentam características comuns, porém diferenciam-se tanto fenotipicamente quanto funcionalmente. São do tipo pavimentoso estratificado, não queratinizado e repousam sobre uma membrana basal composta basicamente de colágeno tipo IV e proteínas da matriz extracelular. Externamente encontram-se revestidos pelo filme lacrimal, apresentando uma íntima relação metabólica (GOMES et al., 2002).

A córnea é a única porção transparente da túnica fibrosa do bulbo ocular, sendo sua função mais importante a transmissão e a refração da luz (40 a 42 dioptrias), além de ser uma barreira física, impermeável e resistente entre as estruturas internas do olho e o meio ambiente; por ser avascular, sua nutrição e limpeza dependem do filme lacrimal e do humor aquoso. Várias diferenças estruturais da córnea são observadas entre os animais domésticos. A córnea dos animais noturnos

pode compreender cerca de 35% da superfície do bulbo, enquanto a dos animais domésticos varia de 17 a 30%. Sua espessura depende da espécie, variando entre 0,5 e 1 mm. É composta por quatro camadas: epitélio anterior, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Em cães e gatos o epitélio anterior consiste de uma camada de células colunares, aderidas à membrana basal, duas a três camadas de células poliédricas e duas a três camadas de células escamosas não queratinizadas; a camada de células basais está firmemente aderida, por hemidesmossomos, à membrana basal, composta por fibrilas de colágeno tipo IV, VI e VII, além de laminina, fibronectina e hialuronato. O estroma compõe 90% da espessura total da córnea e é formado por fibrilas de colágeno (tipo I, III, V, VI e XII), queratócitos e fibras nervosas amielínicas; sua matriz extracelular contém glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina 4 e 6, sulfato de dermatana, sulfato de queratana) que são essenciais para a manutenção da adequada hidratação da córnea. A membrana limitante caudal (membrana de Descemet) separa a camada estromal do endotélio, é acelular e composta por fibrilas de colágeno arranjadas de forma ordenada. A face posterior da córnea é revestida pelo endotélio, constituído por células pavimentosas que formam um revestimento celular estreitamente interdigitado, separando-a do humor aquoso presente na câmara anterior. Sua transparência deve-se à ausência de vasos sangüíneos e pigmentos, ao arranjo ordenado das fibrilas de colágeno, dispostas em lâminas paralelas, além do grau de hidratação da matriz

extracelular, mantida pelos glicosaminoglicanos, associado ao transporte ativo de água desenvolvido pelas células do epitélio e do endotélio, caracterizando um estado de relativa desidratação ou deturgescência (SLATTER, 1990; BANKS, 1991; GELATT, 1999).

O epitélio do limbo contém melanócitos, células de Langerhans e células precursoras do epitélio corneano, ou *stem cells* (GOMES et al., 2002).

A conjuntiva é uma membrana mucosa fina que se dobra nos fórnices superior e inferior, formando um espaço chamado saco conjuntival, que se abre na fissura palpebral; é subdividida em conjuntiva bulbar, fórnice, dobra semilunar e conjuntiva palpebral (LIMA, et al., 1999). A conjuntiva bulbar consiste de células epiteliais (6 a 9 camadas no homem), além de células caliciformes secretoras de mucina, linfócitos, melanócitos e células de Langerhans; está firmemente aderida ao limbo, onde seu epitélio é contínuo com o epitélio corneano, assim como a conjuntiva palpebral, contínua ao epitélio da pálpebra. O estroma conjuntival é formado por tecido conjuntivo frouxo e contém glândulas e folículos linfáticos (linfócitos, mastócitos, plasmócitos e neutrófilos) na camada superficial e, na camada fibrosa, vasos sangüíneos e nervos (GELATT, 1999; GOMES et al., 2002).

Recobrando a superfície ocular encontram-se as pálpebras e o filme lacrimal. As pálpebras protegem o bulbo do olho e mantêm a estabilidade do filme lacrimal; este provém um ambiente úmido para as

células epiteliais, lubrifica a superfície ocular, fornece nutrientes e oxigênio, carrega células inflamatórias, proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas, além de possuir uma série de substâncias que possuem propriedades antibacterianas inespecíficas, como lisozima, β -lisina e lactoferrina. Além disto, exerce função importante na manutenção do grau de hidratação da córnea, produzindo hipertonicidade durante sua evaporação (SLATTER, 1990; SCHOENAU & PIPPI, 1993; GOMES et al., 2002).

2.2 ETIOPATOGENIA DAS LESÕES CORNEANAS E DA SUPERFÍCIE OCULAR

Uma lesão da córnea recompõe-se por migração, mitose e adesão epitelial. As células epiteliais basais são o pivô do processo de mitose e o epitélio basal do limbo é o reservatório das células germinativas do epitélio da córnea (DUA et al., 1994; DUA & AZUARA-BLANCO, 2000b). Se a membrana basal não estiver danificada, as células epiteliais recobrem imediatamente a lesão aderindo-se ao estroma, porém, se houver dano à membrana basal, esta leva de cinco a sete dias para iniciar sua regeneração e a adesão epitelial se inicia apenas quando esta estiver restaurada (KERN, 1990). Defeitos corneanos que atinjam até um quarto do estroma são corrigidos por deslizamento das células epiteliais que circundam o defeito e por replicação das células

estromais. Inicialmente, a camada epitelial é mais fina que o normal, mas por divisão mitótica, esta retorna à espessura original. O epitélio corneano é completamente recomposto após duas semanas. A camada estromal responde inicialmente com a formação de edema e secreção de fibrina, fibrinogênio e fibronectina. Leucócitos polimorfonucleares migram para a lesão, carregados, principalmente, via lágrima, além dos vasos perilímbicos e do humor aquoso; mononucleares chegam após um período de 12 a 24 horas. Fibroblastos são formados a partir de ceratócitos e mononucleares, produzindo colágeno e glicosaminoglicanos. Quando a membrana de Descemet é acometida, esta é recomposta pelo endotélio em algumas semanas. Por volta de sete dias após a injúria, a celularidade corneana diminui e as células e fibrilas reordenam-se, aproximando do normal e formando uma fina cicatriz (GELATT, 1999).

O processo cicatricial corneano é normalmente avascular, porém, uma reparação com neovascularização pode ocorrer em lesões destrutivas, quando há grande perda tecidual ou presença de infecção. A área lesada é invadida por vasos sangüíneos originados a partir do limbo, transportando pigmentos, células inflamatórias e anticorpos; um tecido de granulação deposita-se, formando cicatriz mais densa que a reparação avascular. Após a cicatrização, os vasos sangüíneos colabam, mas não desaparecem, sendo chamados de vasos fantasmas (SLATTER, 1990).

Abrasões epiteliais corneanas estimulam resposta proliferativa da conjuntiva perilímbica, porém, em condições normais, o

epitélio límbico exerce estímulo inibitório à migração do epitélio conjuntival sobre a córnea. Quando um defeito epitelial envolve o limbo, a barreira é removida e o epitélio conjuntival invade a córnea, acompanhado de células caliciformes. Este processo, conhecido como conjuntivalização, é associado à epitelização irregular e formação de defeitos epiteliais recorrentes ou persistentes, neovascularização superficial e, eventualmente, calcificação. A gravidade da afecção é dependente da extensão da lesão das células germinativas (*stem-cell*). A deficiência parcial possui melhor prognóstico que a total, pois a córnea não consegue repovoar a superfície com epitélio normal, forçando a necessidade de transplante de limbo. As formas mais graves de doenças da superfície ocular são aquelas acompanhadas também de deficiência conjuntival. Ausência de mucina, fibrose subepitelial, simbléfaro, encurtamento do fundo de saco conjuntival e queratinização da superfície são manifestações que irão piorar o prognóstico e diminuir a taxa de sucesso da reconstrução cirúrgica. Esta destruição pode ser causada por injúrias químicas ou térmicas, cirurgias extensas, toxicidade dos antimetabólitos (5-fluorouracil), ceratites ulcerativas complicadas ou infecções bacterianas severas (GOMES et al., 2002).

As metaloproteinases, como collagenase e protease, liberadas via endógena, pelas células epiteliais anormais, ceratócitos e neutrófilos ou exógena, provenientes de bactérias como *Pseudomonas spp*, entre outras, podem ser um fator de continuidade da ulceração

corneana. Estas enzimas degradam componentes da matriz estromal (*melting*), impedindo um processo cicatricial normal, podendo evoluir para descemetocle ou perfuração. (BROWN & HOOK, 1971; KERN, 1990; GELATT, 1999).

2.3 CERATITES ULCERATIVAS

As ceratites ulcerativas, ou úlceras de córnea, enfermidades oculares muito comuns nos cães, são caracterizadas por processos erosivos superficiais ou profundos com perda de epitélio e exposição do estroma. Os agentes causais envolvidos com este tipo de ceratite são com frequência os traumas, defeitos palpebrais, alterações do sistema lacrimal, além de infecções por fungos, bactérias e vírus. Podem ser classificadas de diversas formas, entre elas, de acordo com a profundidade: superficial, estromal profunda ou descemetocle, ou ainda, como ceratite não complicada, refratária ou progressiva (GELATT, 1999). Os sinais mais evidentes são fotofobia, blefarospasmo, lacrimejamento, edema, pigmentação, secreção ocular e vascularização (SLATTER, 1990). As úlceras superficiais não complicadas cicatrizam rapidamente, com mínima formação de cicatriz. Entretanto, ceratites refratárias, sejam elas recorrentes ou persistentes, podem ser causadas por insultos exógenos como infecções e traumas ou agravadas quando associadas a doenças sistêmicas, causando prolongada inflamação da superfície

ocular, danos às células germinativas do limbo (*stem cells*) e à membrana basal e resultando em cicatriz corneana, neovascularização, pigmentação e redução da acuidade visual (LIMA et al., 1999; GOMES et al., 2002). Em cães, as ceratites refratárias ocorrem freqüentemente devido à distrofia do epitélio, caracterizada pela não aderência ao estroma, devido ao número reduzido de hemidesmosomos das células epiteliais basais e a uma membrana basal anormal. Outro fator importante é a deficiência dos componentes lacrimais, que alteram a qualidade ou quantidade do filme pré-corneano, levando a hipóxia, deposição de metabólitos tóxicos, desidratação e perda da lubrificação corneana (KERN, 1990; GELATT, 1999). Nas ceratites progressivas, as metaloproteinases produzidas pelos ceratócitos, células epiteliais e neutrófilos causam degradação da matriz estromal, com risco de perfuração corneana (BROWN & HOOK, 1971; SMITH et al., 1999). Em algumas destas enfermidades, além do acometimento corneano, pode existir envolvimento de conjuntiva e limbo, levando a reepitelização patológica que gera conjuntivalização, com queratinização, pigmentação e neovascularização, necrose corneana e até perfuração (KIM & TSENG, 1995a; TSENG et al., 1998).

Outra enfermidade a ser considerada são as queimaduras oculares, comuns em humanos (SPENCER, 1985), mas raras em cães (GELATT, 1999). Nas queimaduras da superfície ocular as células límbicas são freqüentemente destruídas, ocasionando defeitos epiteliais corneanos persistentes ou recorrentes, além de acentuado processo

inflamatório crônico com neovascularização e opacificação corneanas (SCHRAGE et al., 2000). Dano severo às células conjuntivais leva à deficiência de produção de muco pela destruição das células caliciformes além de persistente inflamação subconjuntival levando a um olho seco severo e fibrose (SHIMAZAKI et al., 1997).

2.4 MÉTODOS DE REPARAÇÃO DA CÓRNEA

Devido à diversidade de causas, os procedimentos terapêuticos seguem primordialmente a identificação e a eliminação da causa, tendo como objetivo a restauração e preservação da córnea. Entre os procedimentos clínicos adotados, encontram-se a terapia antibiótica, os analgésicos, os agentes lubrificantes, a atropina e as drogas antiproteases, como EDTA, antitoxina tetânica, acetilcisteína e heparina (ARFFA, 1991; NASISSE, 1996; GELATT, 1999; HAFFNER et al., 2003). O soro sangüíneo autógeno, alógeno ou xenógeno também é descrito como coadjuvante no tratamento de úlceras de córnea progressivas ou refratárias, pois, além de lubrificação, contém diversas substâncias como vitamina A, fatores de crescimento (EGF, TGF- β) e fibronectinas, que auxiliam a cicatrização e reduzem a ação das collagenases (TSUBOTA et al., 1999; CAMPOS, 2000). Há outros relatos, como o uso de agentes hiperosmóticos locais, aplicação de vitaminas A, C e E, beta-irradiação, fibronectinas, enzimas e gama-globulinas, além da cauterização química

no auxílio à reparação (STARTUP, 1984; HELPER, 1989; SLATTER, 1990). O Sulfato de Condroitina A (BERNADES & CORRALES, 1998¹; CREMONINI et al., 2001; RANZANI et al., 2001) e glicosaminoglicanos polissulfatados também foram relatados para tratamento de úlceras de córnea indolentes em cães (MILLER, 1996) e cavalos (WOUK et al., 1997), mostrando-se uma alternativa terapêutica eficaz no tratamento de úlceras persistentes refratárias aos tratamentos convencionais. Nos casos onde ocorre grande perda tecidual ou quando os procedimentos clínicos são insuficientes para a obtenção de adequada cicatrização, indica-se a intervenção cirúrgica para possibilitar uma reparação eficiente, evitando assim sua progressão até a perfuração, além de uma reação cicatricial satisfatória (KERN, 1990). Utiliza-se então de artifícios como debridamento do epitélio solto, ceratotomia puntata ou em grade, recobrimento com terceira pálpebra, enxerto de conjuntiva livre ou pediculado, tarsorrafia, lente de contato terapêutica, transposição corneoescleral, ceratoplastia ou a aplicação de membranas biológicas (HAKANSON & MERIDETH, 1987; KERN, 1990; MORALES, 1994; NASISSE, 1996; GELATT, 1999), além do uso de adesivos como n-butilcianoacrilato e fibrina (SAMPAIO, 1999). Dentre as membranas biológicas, há diversos relatos destas conservadas em glicerina, como pericárdio eqüino (BARROS et al., 1997), cápsula renal eqüina (ANDRADE, 1996), peritônio (GARCIA et al., 1996), túnica vaginal

¹ BERNADES, M.; CORRALES, C. Novedad terapéutica en queratitis seca y ulceras de cornea (Facultad de Ciencias Veterinarias – UNCBA) Comunicação Pessoal, 1998.

(GALERA, 1999) e membrana amniótica (KIM & TSENG, 1995a; KIM & TSENG, 1995b; BARROS et al., 1998).

2.5 UTILIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA RECONSTRUÇÃO DA SUPERFÍCIE OCULAR

A membrana amniótica é composta por uma camada de epitélio cúbico simples e uma membrana basal espessa, formada basicamente de colágeno tipo IV e laminina, além de uma matriz estromal avascular, composta por tecido conectivo frouxo e fibroblastos (WYNN & CORBETT, 1969; TRELFORD & TRELFORD-SAUDER, 1979; MARTINS, 1986; KIM & TSENG, 1995a; SHIMAZAKI et al., 1997; AZUARA-BLANCO et al., 1999; NEME, 2000).

Além da proteção mecânica, a membrana amniótica auxilia no processo de reparação, servindo como uma “membrana basal transplantada”, que age como substrato para a epitelização. Apresenta várias propriedades como efeito antiadesivo da mucosa conjuntival, proteção da ferida, adesão e migração das células epiteliais basais, redução de fibrose, prevenção da apoptose e restauração do fenótipo epitelial corneano (KIM & TSENG, 1995b; SHIMAZAKI et al., 1998). Possui ação antibacteriana (KJAERGAARD et al., 2001), antiinflamatória (SHIMMURA et al., 2001), inibidora de proteinases (KIM et al., 2000), além de diversos fatores de crescimento, como EGF, TGF- β , HGF, que

estimulam a epitelização (SAITO et al., 1998). Outra propriedade atribuída a ela é de não induzir a rejeição imunológica após o transplante, pelo fato de não expressar a maioria dos antígenos de histocompatibilidade HLA (ADINOLFI et al., 1982; SHIMAZAKI et al., 1998), causando mínima ou nenhuma resposta inflamatória (HOULIHAN et al., 1995).

Os primeiros relatos de utilização de membranas fetais (âmnion e córion) em oftalmologia foram descritos em 1940, por De Roth, para reparação de simbléfaro e defeitos conjuntivais e em 1947, por Sorsby et al., para tratamento de queimaduras químicas agudas. Durante um longo período não houve novos relatos da utilização deste método de reparação, entretanto, nos anos 90, vários trabalhos reintroduziram o uso de membrana em oftalmologia, para reconstrução da superfície ocular nos casos de doenças cicatriciais de córnea e conjuntiva. Dentre estes, Kim & Tseng (1995a; 1995b) avaliaram o transplante de membrana amniótica preservada para reconstrução de córneas severamente danificadas em coelhos. Desde então ela foi utilizada para inúmeras alterações da superfície ocular, como defeitos epiteliais persistentes (LEE & TSENG, 1997; SRIDHAR et al., 2001), queimaduras químicas e térmicas (SHIMAZAKI et al., 1997; AZUARA-BLANCO et al., 1999; SRIDHAR et al., 2000; GOMES et al., 2003), penfigóide cicatricial ocular e Síndrome de Stevens-Johnson (TSUBOTA et al., 1996; HONAVAR et al., 2000; BARABINO et al., 2003), úlceras corneanas profundas (KRUSE et al., 1999; HANADA et al., 2001; SOLOMON et al., 2002), úlceras

neurotróficas (CHEN et al., 2000), perfurações corneanas (DUCHESNE et al., 2001; PRABHASAWAT et al., 2001; SU et al., 2003), redução de opacidade corneana (WANG et al., 2001), afinamento estromal (PRABHASAWAT et al., 2001; FAIRBANKS et al., 2003), correção de simbléfaro (SHIMAZAKI et al., 1998), reconstrução conjuntival (GEORGIADIS & TERZIDOU, 2001; PARIDAENS et al., 2001; ESPANA et al., 2002) e correção de extravasamento de humor aquoso após cirurgia de glaucoma (BUDENZ et al., 2000).

Na medicina veterinária a membrana amniótica conservada em glicerina foi descrita para reparo de ceratoplastia experimental em cães (BARROS et al., 1998; SOUZA, 2003) e após ceratectomia para excisão de seqüestro corneano em felinos (KAVINSKI, 2002).

A membrana amniótica pode ser utilizada por diferentes técnicas, conforme a enfermidade. Em defeitos epiteliais persistentes, é suturada nas bordas da erosão, recobrando apenas a área acometida, mas em defeitos corneanos extensos ou após ceratectomia superficial para remoção de tecido fibrovascular, ela recobre toda a superfície corneana e é suturada na episclera perilímbica. Em cirurgias conjuntivais extensas, sutura-se nas bordas do defeito, evitando aderências do tecido subconjuntival e escleral (AZUARA-BLANCO et al., 1999; LETKO et al., 2001). Pode ainda ser utilizada em várias camadas, visando preencher úlceras profundas (HANADA et al., 2001). Em casos onde se detecta

deficiência parcial ou total de células límbicas, o transplante de membrana amniótica pode ser associado ao transplante de limbo, autólogo ou homólogo, para que se restaure a população de células germinativas (SHIMAZAKI et al., 1998; TSENG et al., 1998; DUA & AZUARA-BLANCO, 2000a; GOMES et al., 2002).

2.6 CAPTAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

A placenta é obtida durante cesariana a termo; imediatamente após a coleta, ela é lavada, inicialmente, com solução salina estéril, para remover coágulos de sangue e líquido fetal e, em seguida, com solução salina contendo antibióticos de amplo espectro. A membrana amniótica é separada do córion por dissecção romba, aderida ao papel de nitrocelulose estéril com a face epitelial (face fetal) para cima e cortada em quadrados que podem variar de 2 x 2 a 10 x 10mm. (TRELFOORD & TRELFOORD-SAUDER, 1979; KIM & TSENG, 1995b).

Quanto à preservação da membrana amniótica, tem-se descrito vários métodos, dentre eles, solução fisiológica para utilização a fresco (MEJÍA et al., 2000), glicerina 100% (KIM & TSENG, 1995a) e meios de criopreservação, como Eagle modificado de Dulbecco (LEE & TSENG, 1997), utilizado para transplante de córnea e DMSO 12% enriquecido (SHIMAKAZI et al., 1997), ambos congelados a - 80°C; deve

ser mantida por tempo mínimo de 15 dias e máximo de quatro meses e, antes de sua utilização, deve ser reidratada em solução salina.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Este experimento teve como objetivo avaliar, por análises clínica e histopatológica, a cicatrização corneana em coelhos, apresentando deficiência de células germinativas límbicas, induzida por n-heptanol, com transplante de membrana amniótica mantida em diferentes meios de preservação, sendo um para conservação de membrana amniótica (Ophthalmos®) e outro para conservação de embrião (Emcare®), ambos com glicerol a 50% e mantidos a - 80°C.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

A. Foram utilizados 63 coelhos hígidos, albinos, da raça Norfolk, grupo Botucatu, machos e fêmeas, com peso variando entre 2 e 3 Kg e idade entre 70 e 100 dias, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu - UNESP. Todos foram submetidos a exame oftalmológico individual para exclusão dos animais com alterações oculares, sendo então identificados e mantidos em gaiolas individuais, onde receberam ração e água *ad libitum*.

B. As placentas foram obtidas de quatro cadelas prenhes, fornecidas pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP, as quais foram submetidas a exame clínico e laboratorial, bem como provas sorológicas para Brucelose, Leptospirose e Toxoplasmose, a fim de excluir qualquer enfermidade que pudesse comprometer a viabilidade da placenta e evitar a transmissão de moléstias infecciosas para os animais que receberam os implantes de membrana amniótica.

4.2 MATERIAL UTILIZADO

4.2.1 Fármacos

- A. Colírios: proparacaína¹, ciprofloxacina², fluoresceína³.
- B. Anestésicos: acepromazina⁴, tiletamina/zolazepam⁵, thiopental sódico⁶.
- C. Álcool: n – heptanol⁷.
- D. Antibiótico: cefalotina sódica⁸.
- E. Outros: cloreto de potássio a 19,1%⁹.

4.2.2 Soluções de preservação

- A. Glicerol¹⁰.
- B. Solução para conservação de embrião¹¹.
- C. Meio para conservação de membrana amniótica¹².

1. Anestalcon - Alcon - Brasil
2. Biamotil - Allergan-Frumtost - Brasil
3. Fluoresceína - Allergan-Frumtost - Brasil
4. Acepran - Univet – Brasil
5. Telazol - Fort Dodge - USA
6. Thiopental - Cristália – Brasil

7. Merck - Alemanha
8. Cefalin - EMS - Brasil
9. Ariston - Brasil
10. Merck - Brasil
11. Emcare – Embryo Holding Solution – ICP - USA
12. Ophthalmos - Brasil

4.2.3 Outros

A. Haste de algodão¹³.

B. Papel filtro de nitrocelulose estéril com poros de 0,45 μm , 47mm de diâmetro¹⁴.

C. Fio náilon 9-0¹⁵.

D. Bisturi crescente angulado¹⁶.

E. Solução fisiológica estéril a 0,9%¹⁷.

F. Corantes: Hematoxilina e Eosina (HE)¹⁸; *Periodic Acid-Schiff* (PAS)¹⁸.

13. Cotonetes - Johnson & Johnson

14. Millipore - SP - Brasil

15. Cirumédica - Brasil

16. Alcon - Brasil

17. Halex Istar - Brasil

18. Merck - Brasil

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Grupos experimentais

Utilizou-se o olho direito para indução da lesão de 63 coelhos, divididos em três grupos, considerados G1, G2 e G3, sendo cada um deles composto por 21 animais, da seguinte forma:

G1: animais não tratados com a membrana amniótica (controle).

G2: animais tratados com a membrana amniótica preservada em meio próprio para conservação.

G3: animais tratados com a membrana amniótica preservada em meio para conservação de embrião.

Após avaliação diária, foram mortos sete animais de cada grupo, aos sete, 15 e 30 dias pós-cirúrgicos, denominados momentos **M1**, **M2** e **M3** respectivamente, para análise histopatológica do tecido corneano.

4.3.2 Seqüência para obtenção e preparo da membrana amniótica.

A. Captação da placenta, em centro cirúrgico, a partir de cesariana a termo.

B. Acondicionamento da placenta em recipiente estéril, após imediata remoção do feto, para lavagem com solução fisiológica 0,9% e retirada dos coágulos e líquidos fetais.

C. Lavagem da placenta com 1 litro de solução fisiológica 0,9%, contendo 1g de cefalotina sódica.

D. Separação entre âmnion e córion por descolamento.

E. Colocação do âmnion (membrana amniótica) com a face epitelial para cima sobre papel filtro de nitrocelulose estéril.

F. Recorte da membrana amniótica aderida ao papel em quadrados de 4 x 4 cm e colocação de cada fragmento em recipiente estéril contendo meio para preservação.

4.3.3 Preservação da membrana amniótica

A. Meio para Conservação de Membrana Amniótica (Ophthalmos®)

Após adesão da membrana em papel filtro de nitrocelulose, cada fragmento foi acondicionado em recipiente estéril com meio para preservação de membrana amniótica contendo glicerol a 50% e mantido a - 80° C.

B. Meio para Conservação de Embrião (Emcare®):

A membrana aderida em papel filtro de nitrocelulose foi acondicionada em frasco apropriado contendo a solução, previamente diluída com glicerol a 50% e mantida em freezer a - 80° C.

As membranas foram mantidas congeladas em freezer a - 80°C, por período mínimo de 15 dias e máximo de quatro meses.

4.3.4 Procedimento cirúrgico

Os animais foram tranqüilizados com 2 mg/kg de acepromazina, via intramuscular e, após 10 minutos, anestesiados com 10 mg/kg de tiletamina/zolazepam, via intravenosa. Procedeu-se à anti-sepsia da superfície ocular com solução de iodo povidine a 5%, diluído em solução fisiológica. A córnea foi anestesiada com colírio de proparacaína. Efetuou-se a abertura das pálpebras com blefarostato Barraquer e o posicionamento do bulbo ocular com pinças Halsted-mosquito sobre a conjuntiva bulbar e músculos reto superior e inferior, para visualização ao microscópico estereoscópico cirúrgico².

Utilizou-se haste de algodão embebida em solução de n-heptanol, sobre a córnea, 2 a 4 mm do limbo do olho direito, de forma centrípeta, mantendo contato do álcool com a córnea durante três minutos. A remoção do epitélio foi complementada por debridamento mecânico com bisturi crescente angulado e, em seguida, com haste de algodão seca. A superfície ocular foi imediatamente lavada com 60 ml de solução fisiológica a 0,9% estéril. Em seguida, procedeu-se à peritomia em 360° da conjuntiva límbica e bulbar até 4 mm do limbo, com pinça para conjuntiva e tesoura tipo Vannas. Com este método, promoveu-se a

² modelo SOM 62 Standard, Karl Kaps, Alemanha

remoção dos epitélios corneano e límbico e do tecido límbico subepitelial (PARENTE, 1999). Após prévia rehidratação da membrana amniótica em solução fisiológica, durante 15 minutos, esta foi posicionada sobre a córnea, com a face epitelial para cima, e suturada à conjuntiva e episclera perilímbicas, por meio de oito pontos simples separados com *nylon* 9-0, recobrimdo-se toda a superfície corneana, à exceção dos animais do grupo controle. Todos os animais foram mantidos com colar tipo elizabetano, evitando-se assim qualquer trauma ocular ou a remoção da membrana amniótica. Enquanto havia sinais de desepitelização corneana, instilou-se colírio de ciprofloxacina, duas vezes ao dia, para fins profiláticos.

4.3.5 Coleta e preparo do material para avaliação histopatológica

Ao final de cada período de observação, os animais foram novamente anestesiados, com o mesmo protocolo utilizado anteriormente e mortos com injeção de solução de cloreto de potássio, via intravenosa. Procedeu-se à remoção do bulbo ocular direito, o qual foi fixado em formalina a 10% durante 24 a 48 horas. Após este período, a córnea e o limbo foram isolados e mantidos em álcool a 70%, para inclusão em parafina. Realizaram-se cortes histológicos de 4 micras, corados pelos métodos de hematoxilina/eosina (HE) e *Periodic acid-Schiff* (PAS) com diástase (para remoção do glicogênio).

4.3.6 Aspectos éticos

Todos os critérios utilizados seguiram as normas para experimentação animal segundo a Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) e foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus Botucatu.

4.4 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

4.4.1 Clínica

Os animais foram avaliados diariamente até o final de cada período, com auxílio de iluminação artificial direta, para observação da evolução clínica dos sinais de fotofobia, blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival, opacidade, neovascularização e conjuntivalização corneana; estas alterações foram quantificadas de forma subjetiva em: 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – intenso (MUNGER, 2002). A membrana amniótica foi analisada em relação ao tempo de permanência sobre a superfície corneana e colírio de fluoresceína foi instilado diariamente até este teste apresentar-se negativo, para avaliação da presença da membrana e do tempo de reepitelização corneana.

4.4.2 Morfológica

Ao exame microscópico de luz foram avaliados parâmetros referentes ao número de camadas e maturidade das células epiteliais, espessura da membrana basal, edema, neoformação vascular, presença e tipo de infiltrado inflamatório (mono e polimorfonucleares), e presença de células calciformes no epitélio corneano. Esta avaliação seguiu as observações descritas por Spencer (1985) e Margo & Grossniklaus (1991). Avaliou-se também a presença ou não da membrana amniótica. Estes parâmetros morfológicos foram quantificados sob o mesmo padrão utilizado para os sinais clínicos, ou seja, 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – intenso. A análise dos cortes histológicos foi realizada sem o conhecimento do grupo a qual pertenciam.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada variável avaliada no experimento, foram utilizados testes não paramétricos (ZAR, 1996) visando a comparação de efeito nos momentos em cada grupo, pelo teste de Friedman e do efeito nos grupos em cada momento pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado, para todas as variáveis, foi de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

5.1.1 Fotofobia e blefarospasmo

Foram observados fotofobia e blefarospasmo moderados no grupo controle apenas no primeiro dia e leve no segundo dia do pós-operatório. Nos animais tratados, apresentaram-se intensos no primeiro dia e leves até o quarto dia. Apenas dois animais do G2 permaneceram com estes sintomas até o quinto dia. A avaliação do tempo de permanência destes sintomas em cada animal e a média entre estes, nos referentes grupos e momentos, está representada na Tabela 1 e na Figura 1, respectivamente.

5.1.2 Secreção ocular

Todos os animais produziram pequena quantidade de secreção ocular mucóide esbranquiçada até o quarto dia, sem alterações que sugerissem presença de infecção. Apenas um animal do G1 apresentou-a até o quarto dia, no G2, três apresentaram no M1, três no M2 e dois no M3, já no G3, este sinal permaneceu até este período em três animais no M1 e em um no M3. Os três grupos apresentaram secreção mucóide esbranquiçada moderada no primeiro dia e leve nos demais. A avaliação do tempo de permanência deste sintoma em cada

animal e a média entre estes, nos referentes grupos e momentos, está representada na Tabela 2 e na Figura 2, respectivamente.

5.1.3 Hiperemia conjuntival

Nos animais do grupo controle (G1), a conjuntiva apresentou-se hiperêmica durante três a quatro dias pós-operatórios, sendo que em apenas um se estendeu até o quinto dia. Houve maior intensidade nos dois primeiros dias, tornando-se moderada a leve nos demais. Nos animais dos grupos tratados (G2 e G3), este sinal clínico permaneceu presente até o sétimo dia, sendo intenso nos dois primeiros dias, moderado no terceiro e quarto e leve nos demais. A avaliação do tempo de permanência deste sintoma em cada animal e a média entre estes, nos referentes grupos e momentos, está representada na Tabela 3 e na Figura 3, respectivamente.

5.1.4 Opacidade

Devido à presença da membrana amniótica, a opacidade corneana de G2 e G3 pôde ser avaliada apenas após a eliminação da mesma. Tal evento esteve presente de forma intensa em todos os animais, regredindo a partir do oitavo dia ao 10º dia, estando praticamente ausente após o 15º dia. A intensidade e o tempo de permanência foram semelhantes entre G1 e G3, porém em G2, ambos se

estenderam por um período maior, conforme demonstrado na Tabela 4 e na Figura 4.

5.1.5 Neovascularização

A presença de neovasos foi observada, no grupo controle, a partir do quarto dia, progredindo em direção ao centro da córnea, mas sem atingi-lo, durante todo o seguimento. Nos grupos tratados, a visualização inicial foi prejudicada pela presença da membrana. A classificação dos vasos em escores não foi realizada devido ao seu tamanho reduzido e dificuldade de avaliação dos mesmos, impossibilitando sua correlação. Entretanto, pôde-se observar que dois animais do G2, referentes ao M1, apresentaram neovascularização mais intensa ao sexto dia, permanecendo até o dia da eutanásia. Notou-se também esta característica em um animal do G1 e um do G2, ambos pertencentes ao M3.

5.1.6 Reepitelização corneana

Verificou-se a presença de úlcera, pelo teste de fluoresceína, até o 10º dia no G1, 13º dia no G2 e oitavo dia no G3. A avaliação de cada animal está representada na Tabela 5 e a média de cada grupo, na Figura 5. A observação da lesão mostrou-se prejudicada nos primeiros dias dos grupos tratados devido à presença da membrana amniótica, porém, o teste foi realizado mesmo nestas condições, pois

auxiliou na avaliação desta. Sete animais referentes ao G1, cinco ao G2 e seis ao G3 desenvolveram defeitos epiteliais recorrentes, entre 15 e 30 dias.

5.1.7 Presença da membrana amniótica na superfície ocular

A membrana amniótica se mostrou parcialmente transparente nos primeiros dias, em ambos os grupos, tornando-se opaca por volta do quarto dia, quando começou a se desintegrar e desprender dos pontos perilímbicos. Esteve presente até no máximo 11 dias no G2 e nove dias no G3. O tempo de permanência em cada animal e a média de duração estão representados na Tabela 6 e na Figura 6, respectivamente.

Em relação aos pontos de sutura, a maioria sofreu deiscência a partir do 20º dia, sendo que os pontos restantes não provocaram reação inflamatória local na conjuntiva.

As alterações corneanas relacionadas a neovascularização, opacidade e erosão estão representadas nas Figuras 13 a 18. A membrana amniótica é observada nas Figuras 15 a 17.

Tabela 1 - Fotofobia/Blefarospasmo: tempo, em dias, da presença destes sinais clínicos em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> <u>Animais</u>	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	2	2	2	3	4	4	3	2	2
2	3	2	3	4	4	4	3	3	2
3	2	3	3	4	5	5	4	3	3
4	3	3	4	3	4	7	4	3	4
5	3	2	3	4	4	3	4	3	4
6	3	2	2	4	3	3	4	2	2
7	2	3	2	4	3	4	3	2	4
MÉDIAS	2,57	2,42	2,71	3,71	3,85	4,28	3,57	2,57	3

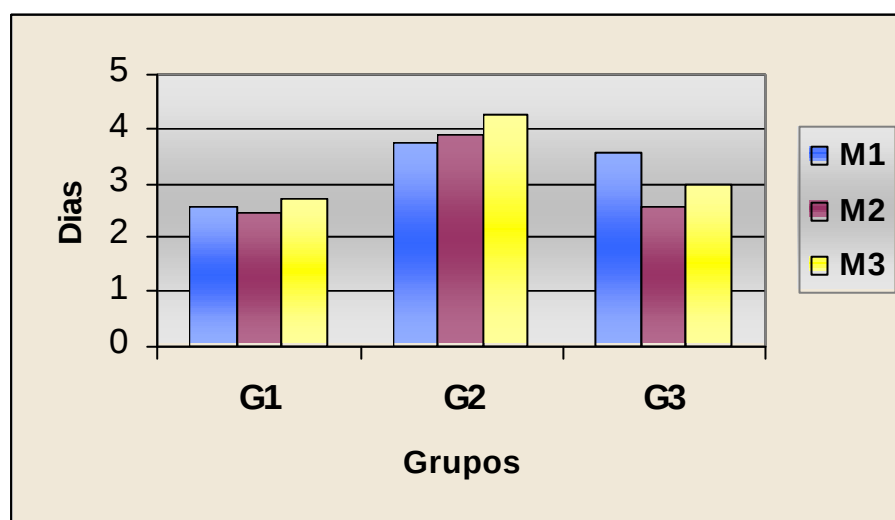


Figura 1 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de fotofobia e blefarospasmo.

Tabela 2 - Secreção ocular: tempo, em dias, da presença deste sinal clínico em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> <u>Animais</u>	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	2	2	3	4	4	4	2	2	2
2	2	2	3	4	4	4	3	2	2
3	3	3	2	3	4	2	4	2	3
4	3	3	2	4	3	2	4	2	2
5	3	3	3	3	3	2	4	2	3
6	2	3	3	3	3	3	3	3	4
7	4	3	2	3	3	3	3	3	2
MÉDIAS	2,71	2,71	2,57	3,42	3,42	2,85	3,28	2,28	2,57

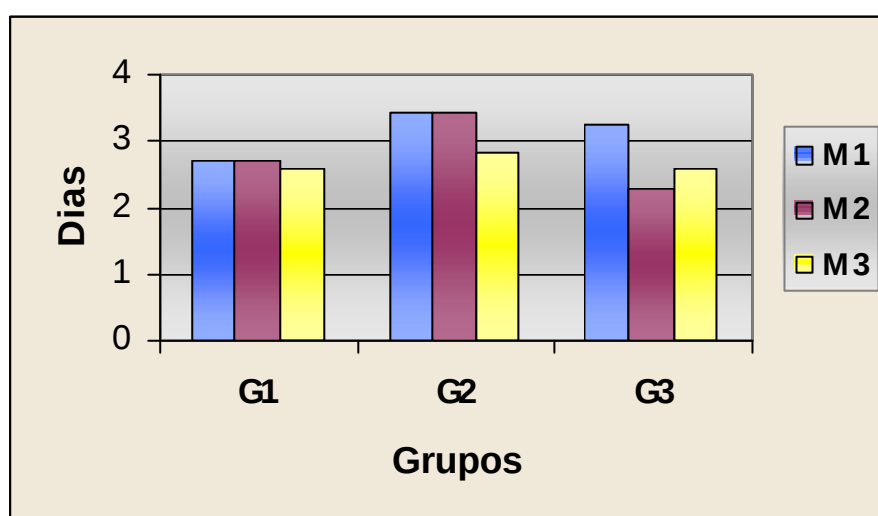


Figura 2 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de secreção ocular.

Tabela 3 - Hiperemia conjuntival: tempo, em dias, da presença deste sinal clínico em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> <u>Animais</u>	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	3	3	3	6	6	5	5	3	4
2	3	3	4	5	6	5	4	3	4
3	4	4	4	5	6	5	5	4	4
4	3	4	4	6	5	4	5	4	4
5	4	3	4	6	7	6	4	3	4
6	4	3	3	7	4	5	6	4	3
7	4	4	5	6	7	5	7	6	6
MÉDIAS	3,57	3,42	3,85	5,85	5,85	5	5,14	3,85	4,14

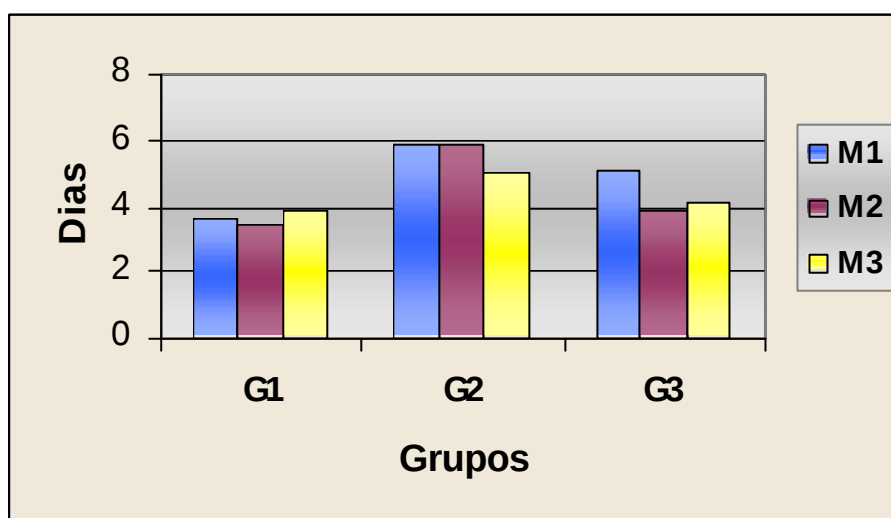


Figura 3 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de hiperemia conjuntival.

Tabela 4 - Opacidade corneana: tempo, em dias, da presença deste sinal clínico em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> <u>Animais</u>	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	7	8	12	7	13	11	7	9	7
2	7	8	9	7	15	12	7	9	7
3	7	8	9	7	13	11	7	11	8
4	7	8	9	7	10	12	7	8	8
5	7	10	9	7	12	13	7	9	8
6	7	8	10	7	12	13	7	8	9
7	7	10	7	7	10	14	7	8	10
MÉDIAS	7	8,57	9,28	7	12,14	12,28	7	8,85	8,14

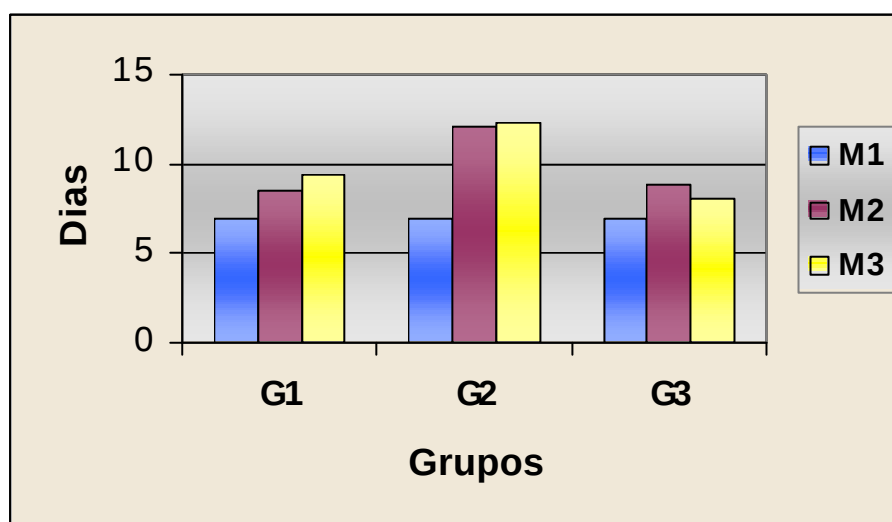


Figura 4 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de presença de opacidade corneana.

Tabela 5 - Reparação epitelial: tempo, em dias, deste processo em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> <u>Animais</u>	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	7	6	10	7	9	9	5	5	5
2	7	6	7	7	6	9	5	5	6
3	7	6	7	7	13	9	5	7	8
4	6	6	7	6	6	9	7	5	7
5	6	9	7	7	5	10	6	5	6
6	7	6	10	7	11	8	6	6	7
7	6	9	4	6	7	8	5	6	5
MÉDIAS	6,57	6,85	7,42	6,71	8,147	8,85	5,57	5,57	6,28

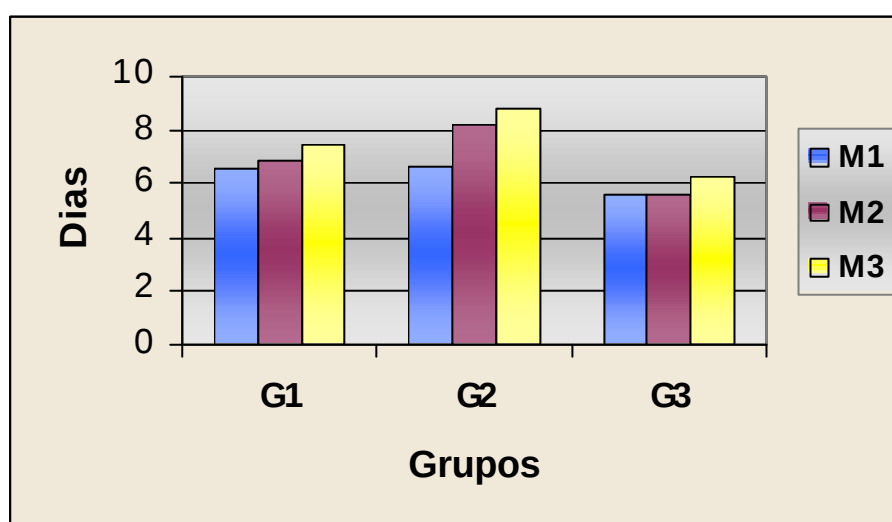


Figura 5 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao tempo de reparação epitelial.

Tabela 6 - Membrana amniótica: tempo, em dias, de sua presença na superfície ocular em cada animal e respectivas médias, nos momentos referentes a cada grupo.

Grupos	G2			G3		
Momentos Animais	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	7	5	4	5	4	3
2	6	8	5	5	5	4
3	7	7	8	4	6	4
4	7	4	6	5	5	4
5	7	4	6	6	7	5
6	7	6	9	5	4	5
7	6	4	11	7	4	9
MÉDIAS	6,71	5,42	7	5,28	5	4,85

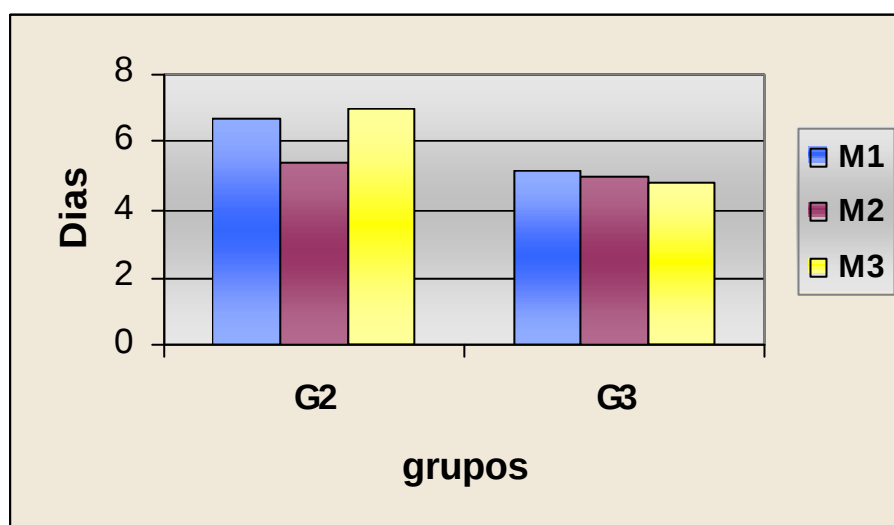


Figura 6 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente aos dias de permanência da membrana amniótica.

5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

As figuras 19 e 20 representam a córnea, conjuntiva e limbo normais em coelhos.

5.2.1 Presença da membrana amniótica

Nos cortes histológicos avaliados, a presença da membrana amniótica foi observada apenas em dois animais pertencentes ao M1 do G2 (Figura 24).

5.2.2 Epitélio corneano

Caracterizou-se como epitélio pavimentoso não queratinizado, cujas células possuíam morfologia alongada na camada basal, poliédrica na camada média e achatada na camada superficial. Nos cortes histológicos do M1, as células epiteliais predominantes eram poligonais altas, caracterizando um epitélio jovem. O número de camadas no centro da córnea variou entre 2 e 6 e na periferia, entre 3 e 7, ou seja, as células periféricas apresentaram-se em maior número de camadas que ao centro. Estas avaliações estão representadas na Tabela 7 e Figura 7, em análise individual e média, respectivamente. Espongiose (edema intraepitelial), caracterizada pela formação de pequenas áreas pálidas, detectadas mais facilmente nas camadas basais, foi observada de forma leve a moderada em M1 e ausente a moderada em M2 e M3. Comparativamente entre os grupos, G3 apresentou menos edema nos

três momentos em relação a G2 e em M1 em relação ao G1 (Quadro 8 e Figura 8). A figura 23 mostra um corte histológico de córnea apresentando abrasão epitelial em um animal do G2.

A membrana basal pôde ser avaliada pela coloração de *periodic acid-Schiff* (PAS) com diástase, para eliminação do glicogênio, sendo intensamente positiva a ela. Em nenhum corte foi observada alteração, em relação a espessamento.

5.2.3 Células caliciformes

Presença deste tipo celular no epitélio corneano foi detectada em um corte de G2 e dois cortes de G3, referentes ao M1. Nos momentos seguintes estas células foram observadas em todos os grupos, variando de leve a moderado, à exceção de 2 cortes de G2 em M2 e um corte de G3 em M2, conforme Tabela 9 e Figura 9. Os cortes referentes ao M3 apresentaram maior escore que M2, em todos os grupos. As Figuras 25 e 26 mostram a presença de células caliciformes na córnea de um animal do G2 aos 15 dias e de outro do G3 aos 30 dias.

5.2.4 Infiltrado inflamatório

Leucócitos mono e polimorfonucleares estiveram presentes em todos os momentos de cada grupo, porém em quantidades e tipos predominantes distintos em cada momento (Figuras 22 e 23). Apresentaram-se em intensa quantidade em M1, regredindo

gradativamente em M2 e M3. Entre os três grupos, G2 apresentou número de células superior a G1 e G3, em M1 e M3, visto que houve predomínio de quantia moderada em G1 e G3, e intensa em G2, referente a M1; em M3 apresentaram grau leve em G1 e G3 e moderado em G2 (Tabela 10). Em M2, entretanto, o escore médio foi o mesmo entre os três grupos (Figura 10). Quanto ao tipo celular, observou-se presença de neutrófilos, histiócitos (macrófagos), linfócitos, eosinófilos e plasmócitos, em todos os momentos. Houve predomínio de neutrófilos em M1, neutrófilos e eosinófilos em M2 e eosinófilos e histiócitos em M3, característica esta observada em todos os grupos (Tabela 11).

5.2.5 Edema estromal

Edema se caracterizou pelo espessamento da camada estromal, desarranjo das lamelas e pela redução da eosinofilia, resultantes do acúmulo de líquido dentro e entre as lamelas. Estas alterações foram observadas apenas nas porções anterior e média do estroma, sendo que a região inferior manteve padrão normal. Observa-se alteração relacionada a edema nas figuras 21 e 22. Em G1, edema foi observado em quantidade leve a moderada em M1, regredindo levemente em M2, mas retornando à intensidade inicial em M3. No G2, demonstrou-se de forma moderada a intensa em M1, regredindo para leve a moderado em M2 e M3. O mesmo pôde-se observar em G3, porém, apresentou apenas forma moderada em M1 (Tabela 12 e Figura 11).

5.2.6 Neoformação vascular

Formação de vasos foi observada na região superficial e média do estroma. No G1, assumiu padrão leve a moderado em M1, evoluindo para moderado a intenso em M2 e M3. Em G2 e G3, houve predomínio de padrão moderado a intenso em M1, reduzindo gradativamente para leve a moderado em M2 e M3, à exceção de dois cortes de G2, que apresentaram neovascularização intensa. Os valores individuais e as médias estão representados na Tabela 13 e na Figura 12 respectivamente. Os neovasos são observados na Figura 26.

Nenhuma alteração foi detectada em relação à camada estromal profunda, membrana de descemet e endotélio, em todos os grupos e momentos.

Tabela 7 - Número de camadas epiteliais presentes nos cortes histológicos observados por grupo em seus referentes momentos.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> <u>Animais</u>	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	5	4	4	6	4	4	4	3	5
2	5	4	3	3	5	5	4	4	4
3	4	4	8	4	3	5	5	5	3
4	4	5	4	4	4	4	3	4	4
5	3	4	4	5	5	5	3	4	3
6	6	5	4	3	4	4	4	4	5
7	4	4	4	3	3	6	7	3	3
MÉDIAS	4,42	4,28	4,42	4	4	4,71	4,28	3,85	3,85

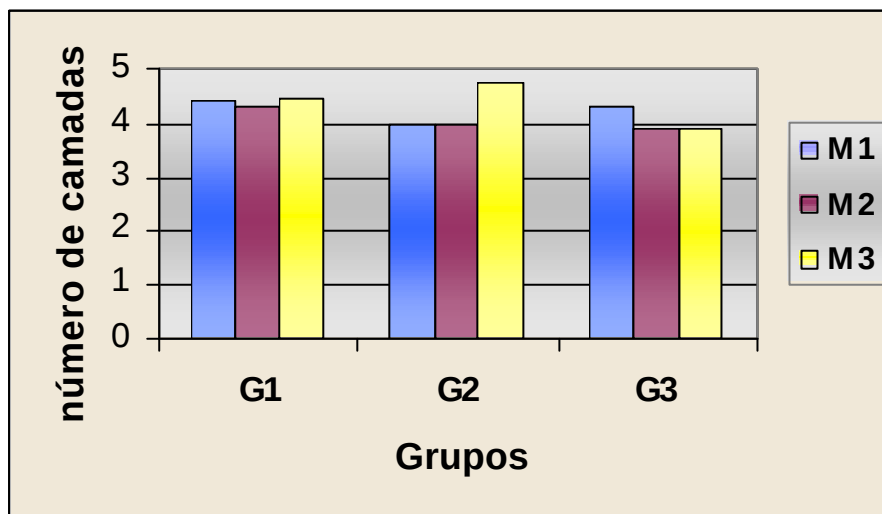


Figura 7 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao número de camadas epiteliais.

Tabela 8 - Escore de espongiose epitelial avaliado por grupo em seus referentes momentos.

Grupos	G1			G2			G3		
Momentos	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
Animais									
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2	1	1	0	2	2	2	1	1	1
3	2	1	2	1	2	1	0	1	1
4	2	0	1	1	1	1	1	1	1
5	2	1	1	1	0	1	0	0	1
6	1	0	1	1	1	1	1	0	1
7	1	1	1	2	0	1	1	1	1
MÉDIAS	1,42	0,71	1	1,28	1	1,14	0,71	0,57	1

Escore: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3- intenso.

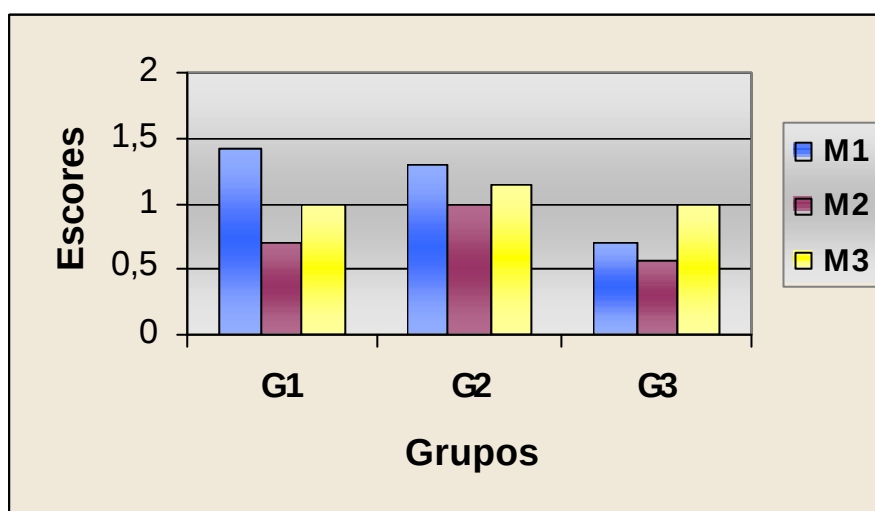


Figura 8 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore da espongiose presente nas células epiteliais.

Tabela 9 - Escore de células caliciformes avaliado por grupo em seus referentes momentos.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> Animais	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	0	1	0	0	1	2	1	2	2
2	0	2	2	0	1	2	0	2	3
3	0	1	2	0	1	2	0	2	2
4	0	1	1	0	1	2	0	0	2
5	0	1	3	0	2	2	0	3	1
6	0	0	3	1	0	3	1	1	2
7	0	0	2	0	0	2	0	2	3
MÉDIAS	0	0,85	1,85	0,14	0,85	2,14	0,28	1,71	2,14

Escore: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3- intenso.

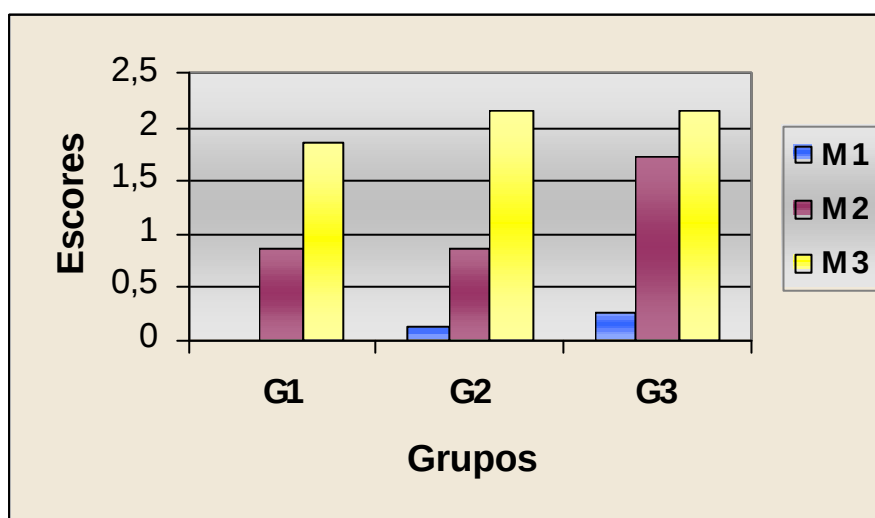


Figura 9 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore das células caliciformes presentes no epitélio corneano.

Tabela 10 - Escore de infiltrado inflamatório avaliado por grupo em seus referentes momentos.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> Animais	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	2	2	1	3	2	1	3	2	2
2	2	2	1	3	3	3	2	2	1
3	2	1	2	3	2	1	1	2	1
4	1	1	1	3	1	2	2	1	1
5	3	2	1	1	2	2	2	1	1
6	1	1	1	3	1	2	2	2	2
7	2	3	3	3	1	2	3	2	2
MÉDIAS	1,85	1,71	1,42	2,71	1,71	1,85	2,14	1,71	1,42

Escore: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3- intenso.

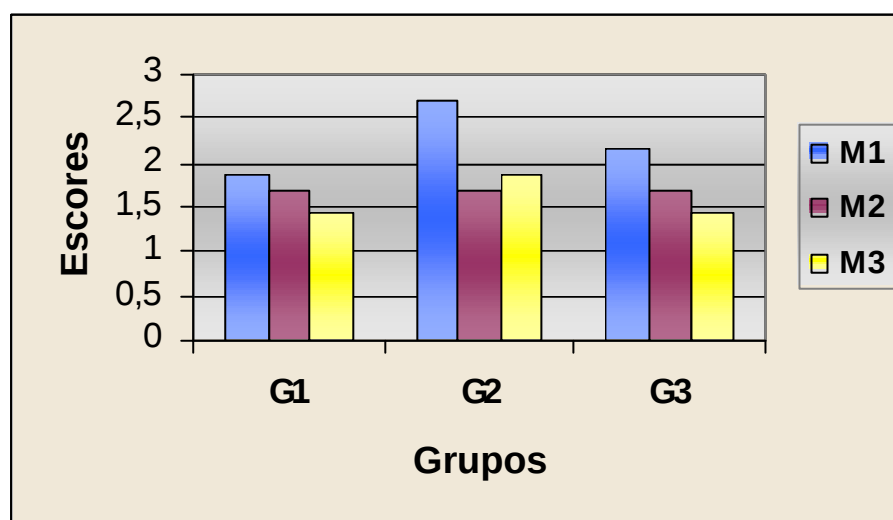


Figura 10 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore do infiltrado inflamatório no estroma corneano.

Tabela 11 - Células inflamatórias predominantes nos cortes histológicos de cada grupo e referentes momentos.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> Animais	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	N	E	E	N/E	E/L	E/N	N/L	N/E	E
2	N	N/E	E/L	N/H	N/E	E/H	N	E	E
3	N	N/E	E/N	N	E	E/N	N/E	N/E	E
4	E/N	E	E	N	E	E	N/E	E	E
5	N	N/H	E	N	N/L	E	N	E	E
6	N	E	E/H	N/H	E	E	N	E/L	E
7	N/E	N/E	E/H	N	E	E	N	E	E/N

Células: neutrófilos (N); eosinófilos (E); histiócitos (H); linfócitos (L).

Tabela 12 - Escore de edema estromal avaliado por grupo em seus referentes momentos.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> Animais	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	1	1	1	2	2	1	2	1	1
2	2	1	0	2	3	2	1	2	1
3	2	2	1	2	2	1	1	2	2
4	2	0	1	3	1	1	1	1	1
5	1	1	2	2	2	1	1	0	0
6	2	0	2	2	1	1	2	0	1
7	1	1	2	2	1	2	1	1	2
MÉDIAS	1,57	0,85	1,28	2,14	1,71	1,28	1,28	1	1,14

Escore: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3- intenso.

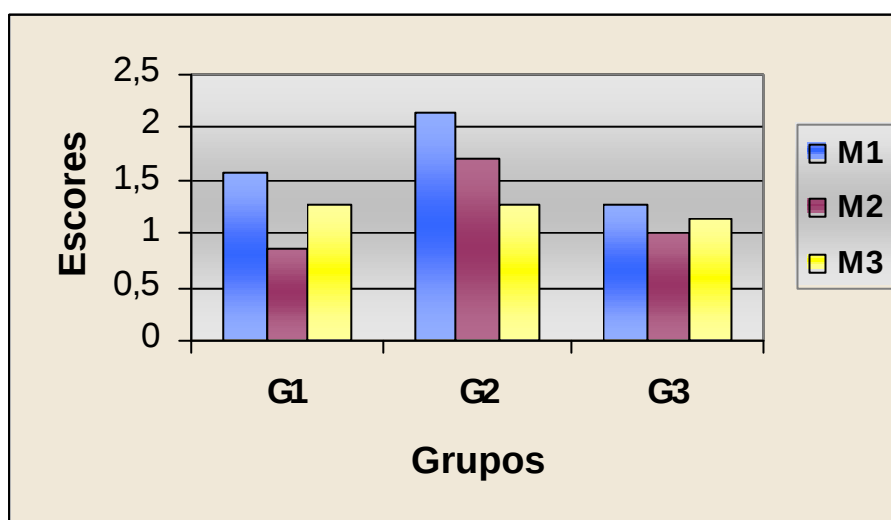


Figura 11 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore de edema estromal.

Tabela 13 - Escore de neoformação vascular avaliado em cada grupo e em seus referentes momentos.

Grupos	G1			G2			G3		
<u>Momentos</u> Animais	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	1	2	1	3	2	1	3	1	2
2	2	3	2	2	3	2	2	2	1
3	2	1	2	3	2	1	1	2	2
4	2	2	1	3	1	1	2	1	1
5	2	1	2	2	3	1	2	2	1
6	1	1	2	3	2	2	2	2	2
7	1	3	3	1	1	2	3	2	2
MÉDIAS	1,57	1,85	1,85	2,42	2	1,42	2,14	1,71	1,57

Escore: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3- intenso.

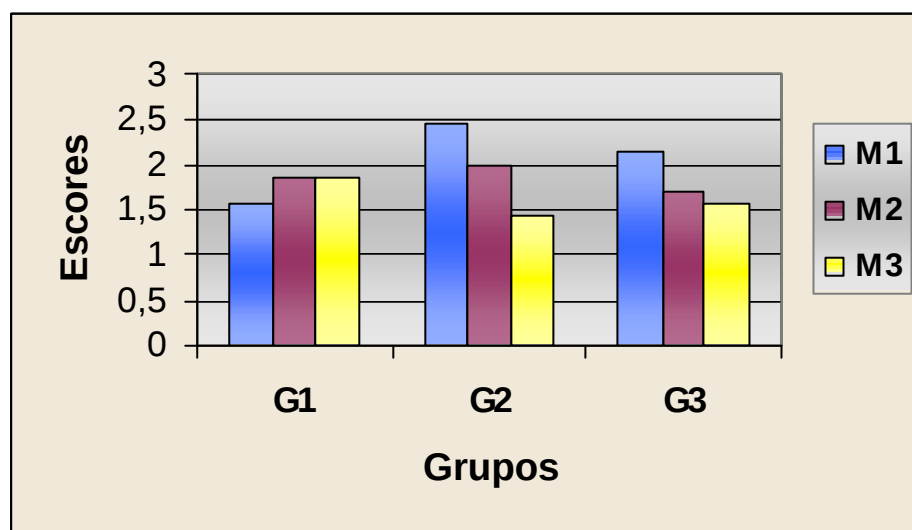


Figura 12 - Representação gráfica das médias dos momentos em cada grupo, referente ao escore de neovascularização corneana.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As Tabelas 14 a 19 representam as medianas e referentes percentis (P_{25} ; P_{75}) das variáveis analisadas. Letras maiúsculas comparam momentos para cada grupo. Letras minúsculas comparam grupos para cada momento. Letras iguais indicam diferenças não significativas ($P > 0,05$).

Tabela 14 - Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) do número de camadas epiteliais, segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	4,0 A a (4,0;5,0)	4,0 A a (4,0;4,7)	4,0 A a (4,0;4,0)
G2	4,0 A a (3,0;4,7)	4,0 A a (3,2;4,7)	5,0 A a (4,0;5,0)
G3	4,0 A a (3,2;4,7)	4,0 A a (3,2;4,0)	4,0 A a (3,0;4,7)

Não se verificou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre momentos ou entre grupos em relação ao número de camadas epiteliais.

Tabela 15 - Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores de espongiose, segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	1,0 A a (1,0;2,0)	1,0 A a (0,2;1,0)	1,0 A a (1,0;1,0)
G2	1,0 A ab (1,0;1,7)	1,0 A a (0,2;1,7)	1,0 A a (1,0;1,0)
G3	1,0 A b (0,2;1,0)	1,0 A a (0,0;1,0)	1,0 A a (1,0;1,0)

Não se verificou diferenças significativas ($P>0,05$) entre momentos para espongiose, porém, houve entre G1 e G3, em M1 ($P<0,05$), ou seja, G3, apresentando percentis menores (P_{25} e P_{75}), desenvolveu menor edema intracelular que G1.

Tabela 16 - Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores das células caliciformes, segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	0,0 A a (0,0;0,0)	1,0 B a (0,2;1,0)	2,0 B a (1,2;2,7)
G2	0,0 A a (0,0;0,0)	1,0 A a (0,2;1,0)	2,0 B a (2,0;2,0)
G3	0,0 A a (0,0;0,7)	2,0 B a (1,2;2,0)	2,0 B a (2,0;2,7)

Quanto às células caliciformes, houve diferença significativa ($P < 0,05$) de M1 em relação a M2 e M3, tanto em G1 como em G3. Também houve diferença, em G2, de M1 e M2 em relação a M3. Sendo assim, a quantidade de células caliciformes foi significativamente menor no M1 dos três grupos e no M2 do G2, pois apresentaram menores percentis (P_{25} e P_{75}), comparados aos demais momentos. Não houve diferença significativa entre grupos.

Tabela 17 - Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores das células inflamatórias, segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	2,0 A a (1,2;2,0)	2,0 A a (1,0;2,0)	1,0 A a (1,0;1,7)
G2	3,0 A b (3,0;3,0)	2,0 A a (1,0;2,0)	2,0 A a (1,2;2,0)
G3	2,0 A ab (2,0;2,7)	2,0 A a (1,2;2,0)	1,0 A a (1,0;2,0)

Em relação à intensidade de infiltrado inflamatório, não houve diferença significativa entre momentos. Entre grupos, houve diferença ($P < 0,05$) apenas no M1, entre G1 e G2, portanto, considerando-se que os percentis (P_{25} e P_{75}) foram maiores em G2, este apresentou maior quantidade de leucócitos que G1.

Tabela 18 - Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores de edema estromal, segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	2,0 A b (1,0;2,0)	1,0 A a (0,2;1,0)	1,0 A a (1,0;2,0)
G2	2,0 A a (2,0;2,0)	2,0 A a (1,0;2,0)	1,0 A a (1,0;1,7)
G3	1,0 A b (1,0;1,7)	1,0 A a (0,2;1,7)	1,0 A a (1,0;1,7)

Sobre a intensidade de edema estromal, houve diferença significativa, em M1, de G2 comparativamente a G1 e G3, mas não entre estes, ou seja, houve maior quantidade de edema em G2 comparado a G1 e G3, considerando-se percentis (P_{25} e P_{75}) e medianas menores nestes grupos. Não se verificou diferença ($P>0,05$) entre momentos e entre os grupos nos demais momentos.

Tabela 19 - Medianas e percentis (P_{25} ; P_{75}) dos escores de neovascularização corneana, segundo grupos e momentos.

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	2,0 A a (1,0;2,0)	2,0 A a (1,0;2,7)	2,0 A a (1,2;2,0)
G2	3,0 A a (2,0;3,0)	2,0 A a (1,2;2,7)	1,0 A a (1,0;2,0)
G3	2,0 A a (2,0;2,7)	2,0 A a (1,2;2,0)	2,0 A a (1,0;2,0)

Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre momentos ou entre grupos, quanto à intensidade de neovasos.



Figura 13 - imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 1 (controle), aos 7 dias, apresentando neovascularização corneana superficial, opacidade moderada e úlcera central, corada por fluoresceína.



Figura 14 - imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana em meio próprio), aos 7 dias, apresentando neovascularização corneana profunda e intensa, opacidade moderada e pequena úlcera ao centro.

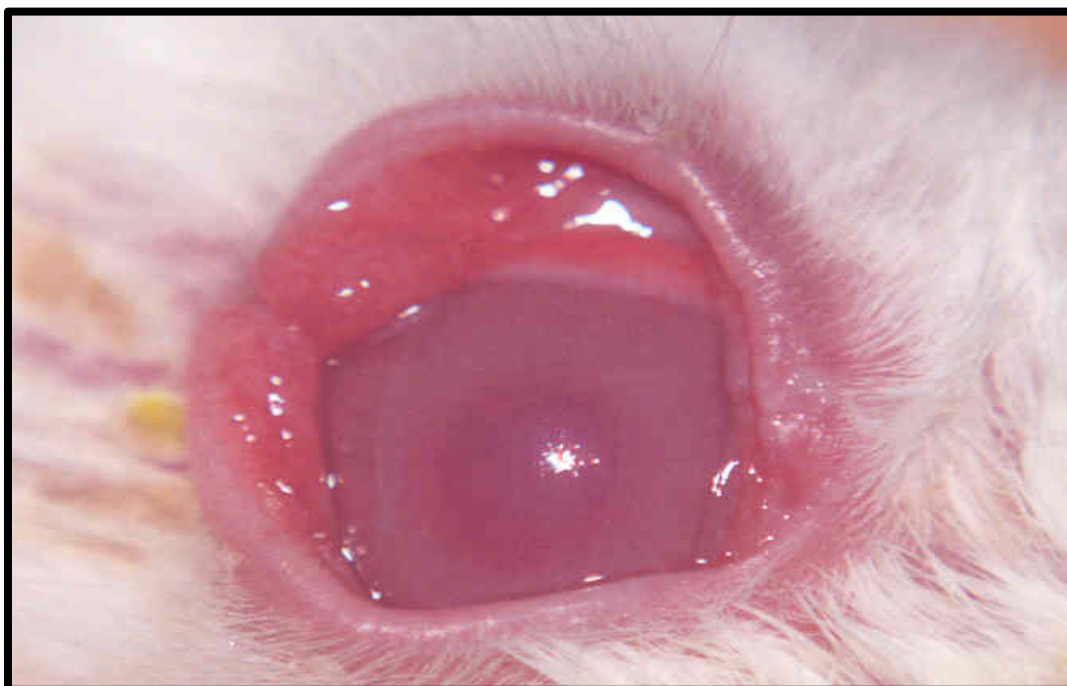


Figura 15 - imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião), aos 3 dias. Observa-se que a membrana amniótica cobre toda a superfície corneana. Não se nota presença de neovasos



Figura 16 - imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana em meio próprio), aos 5 dias. Observa-se a presença da membrana semitransparente e de úlcera superficial, ambas coradas por fluoresceína



Figura 17 - imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião), aos 7 dias , Observa-se que a membrana, corada por fluoresceína cobre parcialmente a superfície corneana, esta apresenta neovascularização e opacidade moderada.

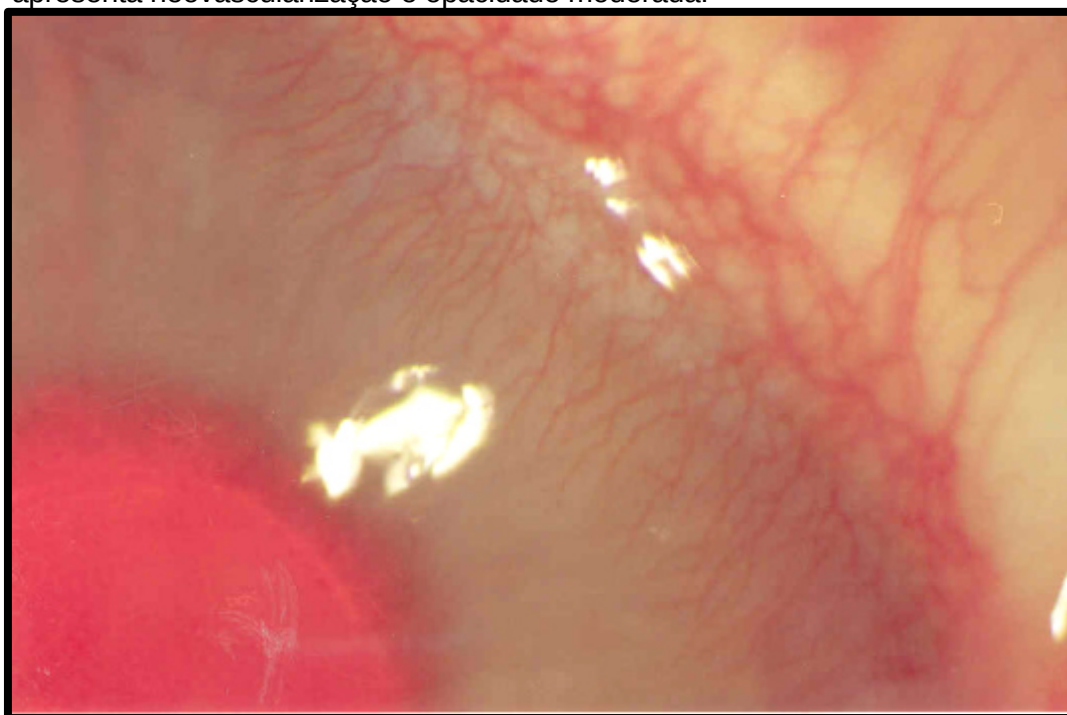


Figura 18 - imagem fotográfica da córnea direita de coelho referente ao grupo 1 (controle), aos 30 dias, apresentando neovascularização corneana. Nota-se ausência de opacidade corneana.

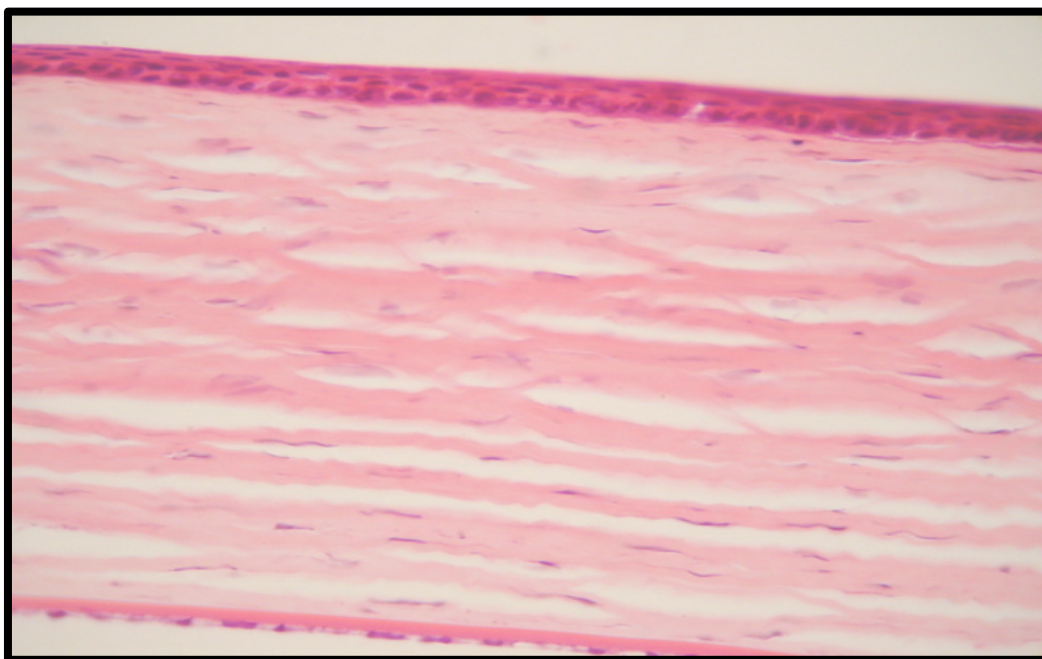


Figura 19 - fotomicrografia de córnea normal de coelho. Observa-se epitélio estratificado, não queratinizado, com células superficiais achatadas. Estroma com lamelas em arranjo organizado e ausência de leucócitos (HE, 400X).

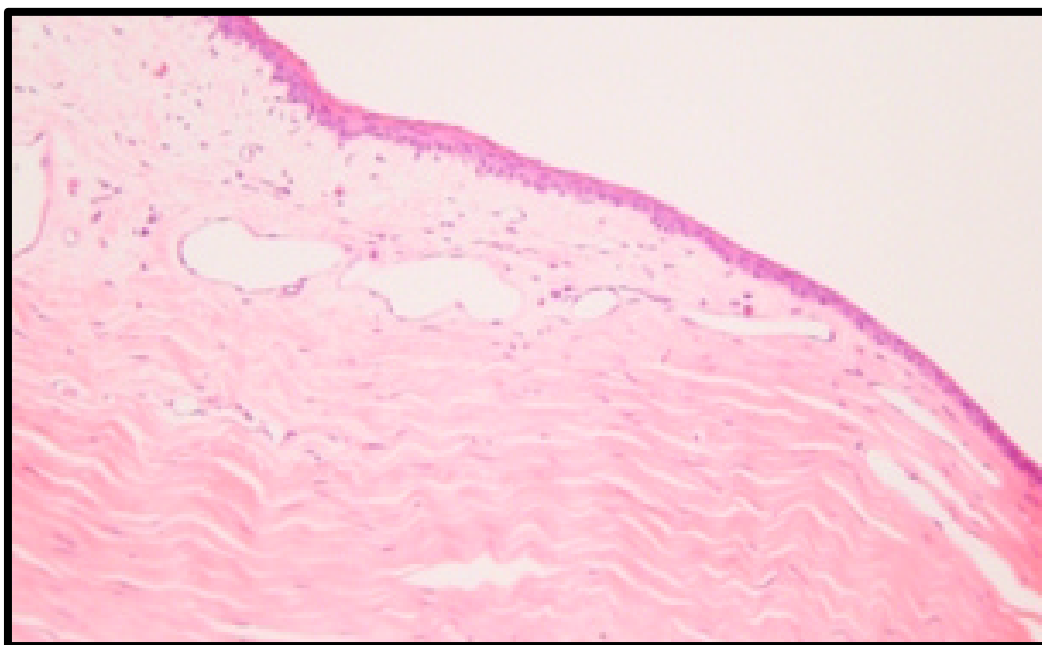


Figura 20 - fotomicrografia da região do limbo de córnea normal de coelho. Observa-se presença de epitélio estratificado, vasos, leucócitos e disposição irregular da camada estromal; o limbo está localizado na transição entre o epitélio corneano e o conjuntival (HE, 100X).

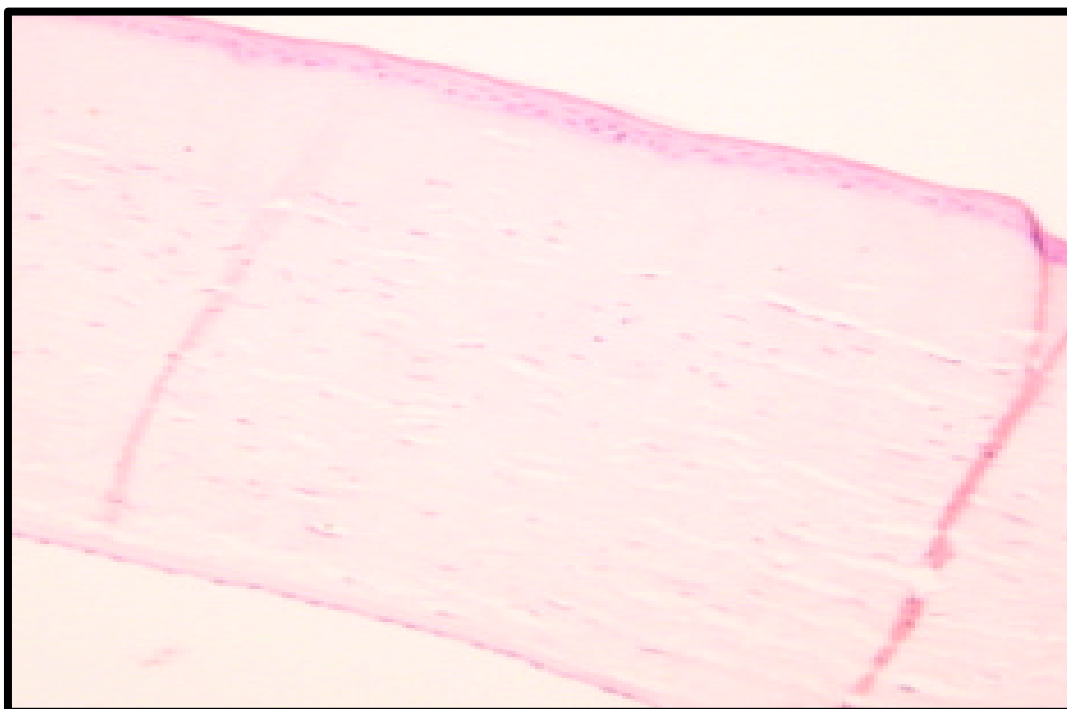


Figura 21 - fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 1 (controle) aos 7 dias. Observa-se disposição da camada estromal anterior, com material amorfo e raros ceratócitos, referente a edema (HE, 100X).

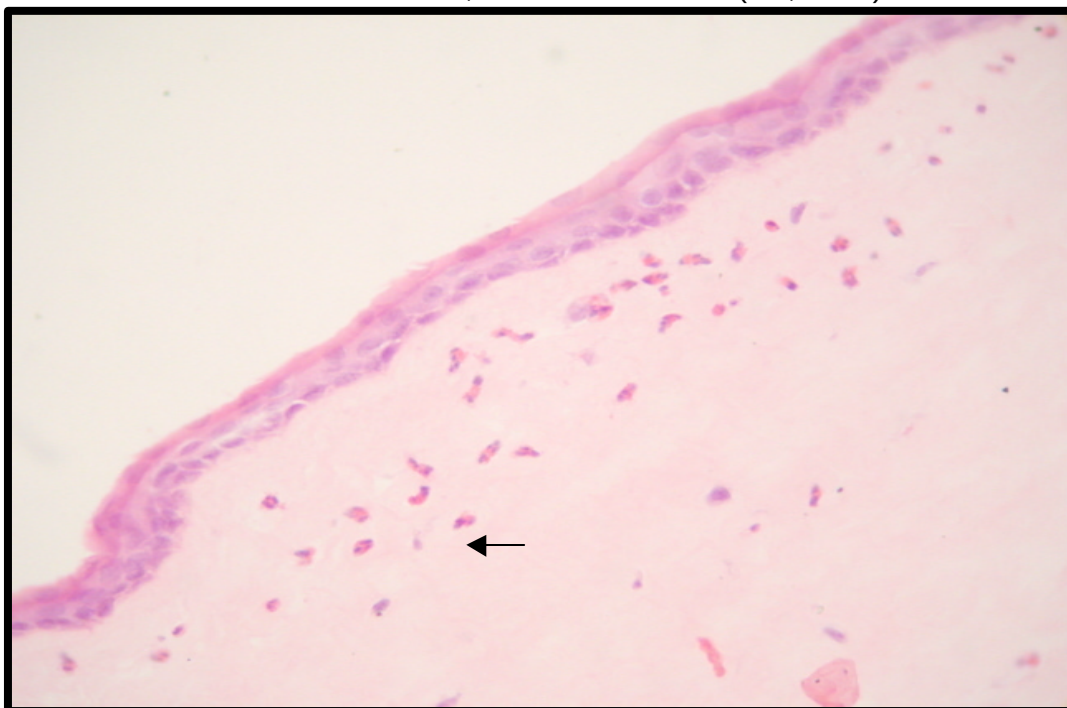


Figura 22 - fotomicrografia da córnea de coelho referente ao grupo 1 (controle) aos 7 dias. Nota-se camada epitelial irregular e estroma com edema e polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (seta); (HE, 400X).

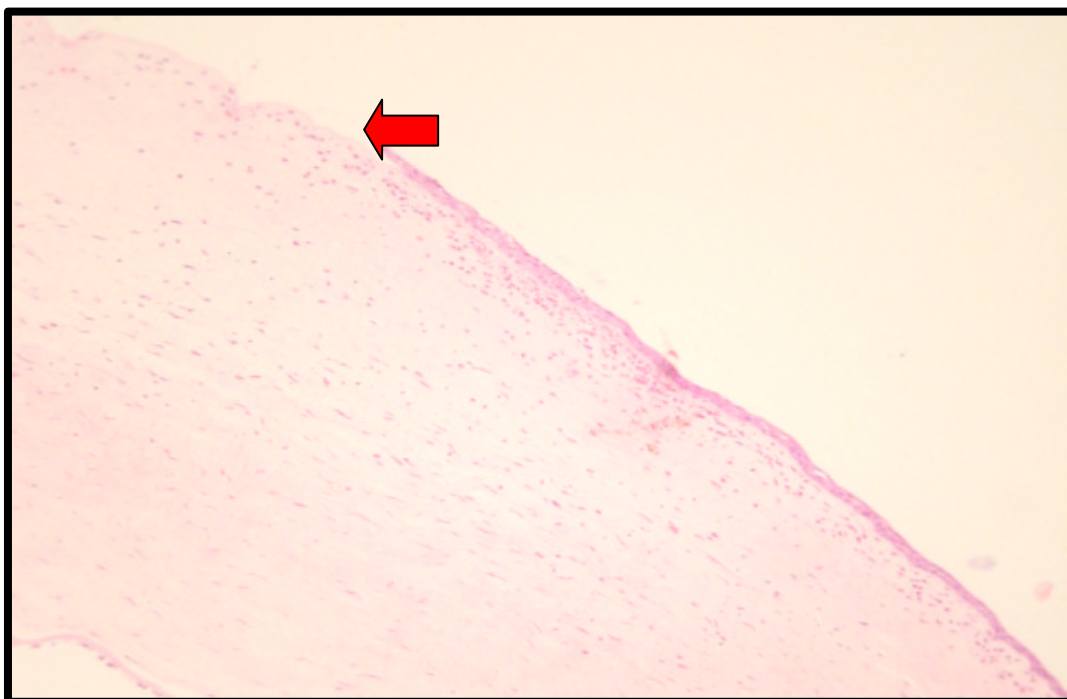


Figura 23 - fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana amniótica em meio próprio) aos 7 dias. Observa-se área de abrasão epitelial (seta vermelha) e intenso acúmulo de polimorfonucleares no estroma (HE, 100X).

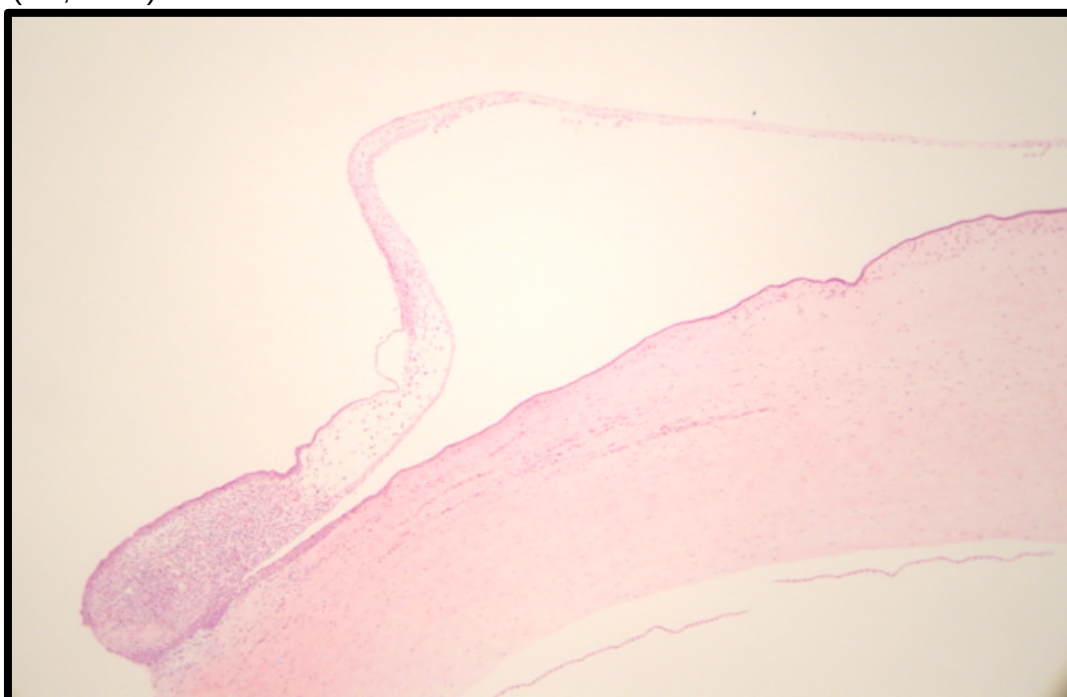


Figura 24 - fotomicrografia da córnea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião) aos 7 dias, com a membrana amniótica aderida à conjuntiva perilímbica e recobrindo a superfície da córnea. Nota-se presença de infiltrado inflamatório no estroma da córnea e da membrana (HE, 50X).

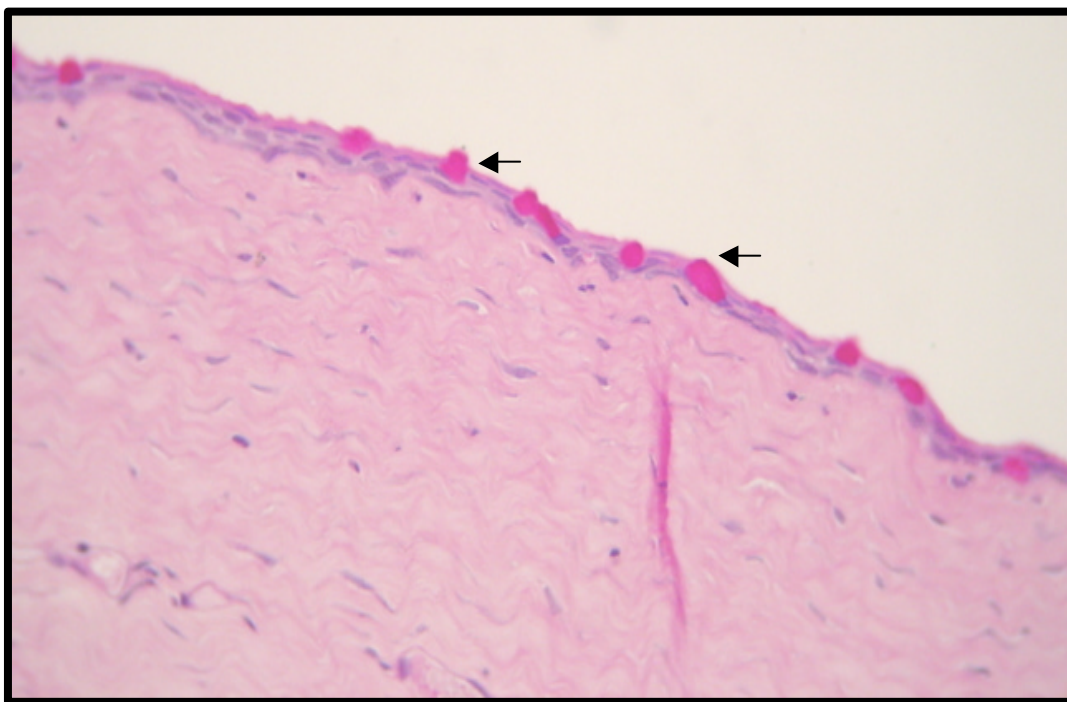


Figura 25 - fotomicrografia da cornea direita de coelho referente ao grupo 2 (membrana em meio próprio) aos 15 dias. Observa-se presença de células caliciformes (seta) na camada epitelial, caracterizando deficiência límbica (PAS, 400X).

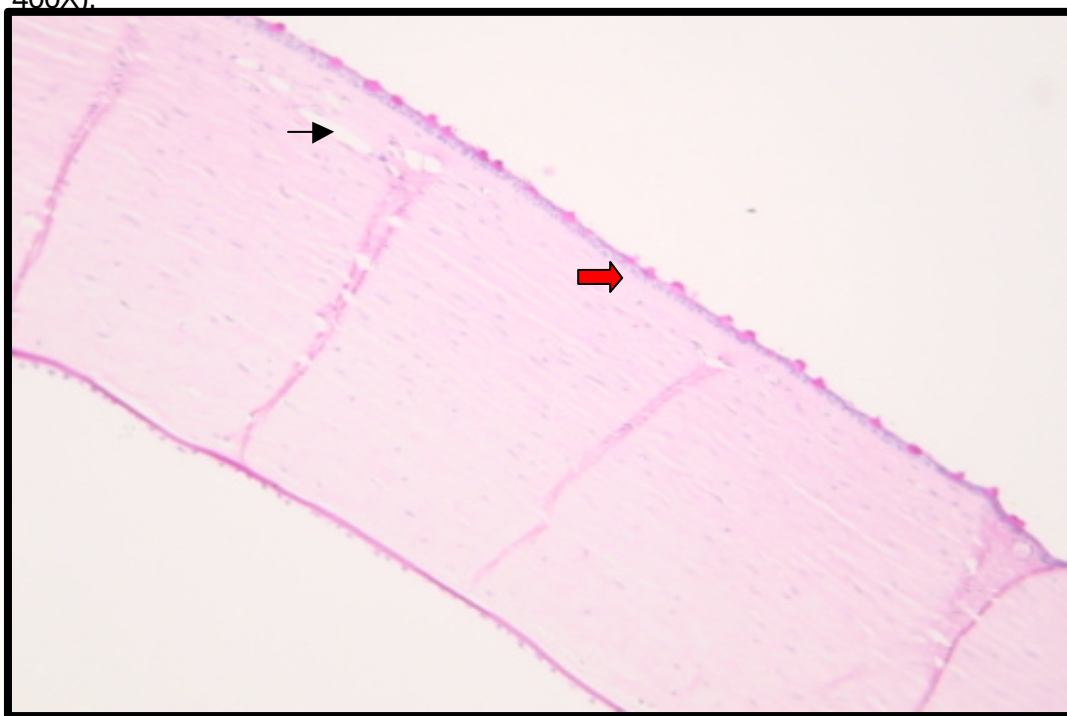


Figura 26 - fotomicrografia da cornea direita de coelho referente ao grupo 3 (membrana em meio de embrião) aos 30 dias. Observa-se presença de neovasos (seta) e células caliciformes (seta vermelha); (HE, 100X).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

6.1 QUANTO À METODOLOGIA

Dentre as enfermidades oculares dos animais domésticos, sem dúvida, uma das mais importantes é a ceratite ulcerativa, tanto pela sua freqüência como pelo risco de agravação e conseqüente perda da visão. Não raramente, a terapêutica clínica é ineficiente para conter um processo ulcerativo, acarretando, quando não a perfuração, uma reação cicatricial intensa e redução da acuidade visual. Visando evitar estas complicações, tem-se desenvolvido, ao longo dos anos, diversas terapias, entre elas, técnicas variadas de ceratoplastia. Tanto na área humana quanto na veterinária, diversos materiais biológicos e sintéticos têm sido estudados para reparação da superfície corneana, visando manter sua função tectônica e sua transparência. O primeiro estudo sobre materiais biológicos conservados em glicerina, na medicina veterinária, surgiu na década de 80, quando Kavinski (1980) relatou o uso de pericárdio homólogo para tratamento de úlcera de córnea em cão. Nos anos seguintes, outros relatos surgiram, como uso de perióstio autólogo (KOENING & KAUFMANN, 1983), escama de sardinha (LAUS, 1994), peritônio homólogo (GARCIA et al., 1996), cápsula renal (ANDRADE, 1996), pericárdio eqüino (BARROS et al., 1997), túnica vaginal (GALERA, 1999), submucosa intestinal (LEWIN, 1999; FEATHERSTONE &

SANSOM, 2000) e membranas fetais (BARROS et al., 1998; GODOY et al., 2002). Todos estes trabalhos concluem a viabilidade de seus implantes, porém relatam intensa reação inflamatória e formação de leucoma, que podem intervir na acuidade visual, quando utilizados na região central da córnea. Por outro lado, dentre as fetais, a membrana amniótica (MA), além de proteção mecânica, mostrou ter outras propriedades, como auxiliar na redução da reação inflamatória (SHIMMURA et al, 2001) e da opacidade cicatricial (WANG et al., 2001; WOO et al., 2001); possui ainda outros efeitos relacionados à ela, como adesão e migração das células epiteliais basais, redução de fibrose, prevenção da apoptose, restauração do fenótipo epitelial corneano, antiaderência conjuntival (KIM & TSENG, 1995b; SHIMAZAKI et al., 1998), além de ação antibacteriana (KJAERGAARD et al., 2001), inibidora de proteinases (KIM et al, 2000) e apresentar diversos fatores de crescimento, como EGF, TGF- β , HGF, que estimulam a epitelização (SAITO et al., 1998); refere-se ainda, a não indução de rejeição imunológica após o transplante, pelo fato de não expressar a maioria dos antígenos de histocompatibilidade HLA (ADINOLFI et al., 1982; SHIMAZAKI et al., 1998) e não induzir resposta inflamatória (HOULIHAN et al., 1995). Por todos estes atributos, optou-se pela sua utilização neste estudo.

A escolha de coelhos como modelo experimental baseou-se na sua extensa utilização em estudos da área médica, visto que eles

possuem grande similaridade anatômica e histológica com os olhos humanos e mais ainda com animais domésticos (BANKS, 1991; GELATT, 1999). Outro fator refere-se à sua aquisição, devido ao fácil acesso ao Biotério Central, além de permitir melhor padronização que cães, já que sua produção dentro do Biotério é desenvolvida com acondicionamento, alimentação e reprodução controlados.

O protocolo anestésico adotado, utilizando-se acepromazina, via intramuscular, para tranquilização e a associação comercial de tiletamina e zolazepam, para analgesia e hipnose (HALL & CLARKE, 1991), foi eficiente quanto ao tempo e tipo de procedimento os quais os animais foram submetidos, além disto, a via intravenosa, para administração do anestésico, propiciou redução das doses utilizadas e rápida indução anestésica, o que diminuiu o tempo cirúrgico, além do fácil acesso às veias auriculares. A complementação da analgesia com colírio de proparacaína foi importante para auxiliar a manutenção anestésica.

O método de indução da lesão corneana foi baseado em estudos sobre sua reparação corneana e que retratam a importância do limbo e da conjuntiva, compreendendo a superfície ocular com unidade funcional (KIM & TSENG, 1995a; TSUBOTA et al., 1996; SHIMAZAKI et al., 1997; LEE & TSENG, 1997). A utilização do n-heptanol, para remoção do epitélio corneano e límbico, visou induzir a lesão e remover completamente as células germinativas do limbo responsáveis pela reparação do epitélio corneano (DUA & AZUARA-BLANCO, 2000b); a ele

associou-se a peritomia em 360° para remoção do tecido conjuntivo frouxo subepitelial e episclera, assegurando que as células germinativas fossem removidas; esta técnica baseou-se em estudos descritos por Tseng et al. (1984), Parente (1999) e Ávila (2001).

A técnica de sutura da MA baseou-se em relatos descritos por Tseng et al. (1998), Letko et al. (2001) e Gomes et al. (2003), que utilizaram-na com a técnica tipo “*overlay*”, ou seja, suturando-a à episclera, próximo ao limbo, para recobrir toda a superfície corneana lesada e suprir a deficiência das células germinativas. O padrão de sutura pode ser simples interrompido ou contínuo e o fio, *nylon* ou *vicryl*, tipo 9-0 ou 10-0; optou-se, assim, pela sutura em pontos simples separados com *nylon* 9-0, para simplificar o procedimento e reduzir o tempo cirúrgico. Os pontos podem ser removidos após três semanas (PRABHASAWAT & TSENG, 1997), porém optou-se por não retirá-los visto que não provocaram reação inflamatória na conjuntiva, que poderia ser proporcionada pela remoção cirúrgica dos mesmos.

A utilização de placentas de diversas espécies é descrita na literatura, sendo a humana a mais utilizada (KIM & TSENG, 1995a; KIM & TSENG, 1995b; TSUBOTA et al., 1996; LEE & TSENG, 1997; SHIMAZAKI et al., 1997; SHIMAZAKI et al., 1998; AZUARA-BLANCO et al., 1999; KRUSE et al., 1999; CHEN et al., 2000; HONAVAR et al., 2000; SRIDHAR et al., 2000; DUCHESNE et al., 2001; GEORGIADIS & TERZIDOU, 2001; HANADA et al., 2001; PARIDAENS et al., 2001;

PRABHASAWAT et al., 2001; SRIDHAR et al., 2001; WANG et al., 2001; ESPANA et al., 2002; SOLOMON et al., 2002; BARABINO et al., 2003; FAIRBANKS et al., 2003; GOMES et al., 2003; SU et al., 2003). Porém, outros estudos descrevem a captação da MA a partir de placenta eqüina (BARROS, et al., 1998), leporina (MONTEIRO et al., 2000), felina (KAVINSKI, 2002) e canina (SOUZA, 2003). Considerando-se acesso relativamente fácil à placenta canina na área veterinária, optou-se por tal, visando ampliar sua utilização. Deve-se, outrossim, considerar que o material deve ser coletado de parto tipo cesariana, a termo, sem sinais de sofrimento fetal ou aborto infeccioso, para garantir sua integridade e evitar transmissão de enfermidades infecciosas ao receptor (TRELFOORD & TRELFOORD-SAUDER, 1979) e não se deve utilizá-la também, coletada durante parto via vaginal, para evitar contaminação durante o percurso de sua expulsão, conforme descrito por Adds et al. (2001b); após a coleta foi então lavada, para remoção de coágulos e líquidos fetais, utilizando-se solução salina estéril e soluções contendo antibióticos, a fim de evitar eventuais riscos de contaminação (ENGEL et al., 2003).

Neste experimento foram avaliados dois métodos de preservação, um próprio para conservação de MA e outro para congelamento de embrião, composto por albumina bovina enriquecida. O meio para conservação de membrana amniótica possui os mesmos componentes utilizados no meio Eagle modificado de Dulbecco, desenvolvido para conservação de córnea, adicionado de glicerol, na

proporção 1:1. (LEE & TSENG, 1997; TSENG et al., 1998; AVILA, 2001; WOO et al., 2001; GOMES et al., 2003; MARINHO et al., 2003). Quanto ao outro meio, utilizou-se o método de conservação de embrião, visto que este sofre o mesmo processo de criopreservação que a MA, propondo-se comparar a sua efetividade para outros materiais biológicos. A finalidade do glicerol, assim como do DMSO, é de manter a integridade da estrutura celular durante a fase de congelamento, evitando a formação de cristais; este método, caracterizado pela solidificação de um líquido, não por cristalização, mas por aumento da viscosidade, é chamado vitrificação (FAHY et al., 1984; PARKS & GRAHAM, 1992). Outros métodos são descritos para conservação da MA, como criopreservação com DMSO a 10% (AZUARA-BLANCO et al., 1999) ou 1,5M (SHIMAZAKI et al., 1997), glicerina (KIM & TSENG, 1995a; BARROS, 1998; MONTEIRO et al., 2000) ou refrigeração a fresco em solução de cloreto de sódio a 0,9% (MEJÍA et al., 2000; ADDS et al., 2001a). O que difere estes métodos é o tempo de viabilidade e condição da estrutura celular. Sua utilização a fresco (refrigerada a 7°C, durante no máximo 14 dias), demonstrou apresentar os mesmos resultados clínicos e laboratoriais da membrana congelada, porém, apresentou certas desvantagens, como tempo de armazenamento e risco de infecção do receptor, já que os resultados dos testes sorológicos podem demorar mais que seu tempo hábil de uso. Todos estes métodos não preservam as células epiteliais da MA, que se mantêm viáveis por apenas 24 h, em solução salina, após a coleta, mas a

criopreservação manteve a mesma estrutura morfológica que a membrana fresca (KRUSE et al, 2000). Considerando-se que a utilização da MA está relacionada à matriz celular e não ao transplante de células funcionais, optou-se pela criopreservação, ao invés da conservação a fresco ou em glicerina, por manter, mais adequadamente e por tempo mais prolongado, suas características distintas.

Os sinais clínicos foram avaliados conforme descrito por Kim & Tseng (1995a) e Ávila et al. (2001), que induziram a deficiência de células límbicas, semelhante a este estudo, sendo quantificados, de forma subjetiva, segundo considerações feitas por Munger (2002) sobre experimentação animal.

Os tempos preconizados para avaliação morfológica foram baseados em estudos prévios (KIM & TSENG, 1995a; MONTEIRO et al., 2000; WOO et al., 2001), que utilizaram o mesmo modelo animal para avaliação da cicatrização corneana, considerando-se período máximo de 30 dias deste processo. A córnea e a região do limbo foram avaliadas por meio de exame histopatológico convencional, com coloração de HE. Além desta, a coloração de PAS auxiliou na avaliação da membrana basal epitelial e da presença de células caliciformes. Assim, o exame histopatológico permitiu estudo adequado destes tecidos em sua totalidade, quanto aos parâmetros previamente estabelecidos. Outro método de avaliação da presença de células caliciformes que poderia ser

empregado é a citologia por impressão, que coleta células da superfície corneana (PRABHASAWAT & TSENG, 1997)

6.2 RESULTADOS CLÍNICOS

Quanto ao tempo de permanência da MA na superfície ocular, Monteiro et al. (2000) mantiveram os olhos dos animais recobertos com tarsorrafia e, ao desfazê-la aos sete dias, não observaram presença da membrana; neste estudo, porém, pôde-se observá-la, parcialmente fixa a alguns pontos, até 11 dias pós-cirúrgicos. Possivelmente, devido à membrana canina ser mais espessa que a leporina, o tempo necessário para sua absorção seja maior. Outros estudos semelhantes não trazem esta informação.

Os sinais de fotofobia e blefarospasmo estiveram presentes em todos os animais utilizados no experimento e ocorreram devido ao ato cirúrgico, que induziu exposição das terminações nervosas da córnea e da conjuntiva (NASISSE, 1996; KERN, 1990). Seguiram padrões semelhantes observados em cães, submetidos a ceratoplastias lamelares e penetrantes, porém durante período reduzido em relação a estes (GARCIA et al., 1996; BARROS et al., 1997; BARROS et al., 1998; GODOY et al., 2002). Nos grupos tratados, apresentaram-se em grau e tempo maiores em relação ao controle, provavelmente devido à presença do fio de sutura, que prolongou o estímulo dos nervos sensoriais.

A secreção ocular se mostrou em quantidade e coloração semelhantes nos três grupos, indicando que não houve sinal de infecção ocasionada pela presença da membrana. A hiperemia conjuntival, todavia, foi mais intensa nos grupos tratados, principalmente em G2, evidenciando a alteração ocular devido à presença dos pontos.

Os sinais clínicos que indicam deficiência límbica são: defeitos epiteliais persistentes ou recorrentes, neovascularização superficial, opacidade, inflamação crônica, calcificação, irregularidade da superfície epitelial, ulceração e *melting* (TSENG, 1996; DUA & AZUARA-BLANCO, 2000b). Todos os animais apresentaram indícios de deficiência de células límbicas, com neovascularização, opacidade e defeitos epiteliais recorrentes, corroborando as observações feitas por Kim & Tseng (1995a) e Ávila et al. (2001) que utilizaram método idêntico para indução da lesão.

Quanto à evolução de cada sinal, todos os animais dos grupos controle e tratados apresentaram neovascularização, que não foi suprimida pela membrana amniótica, pois, ao final de cada momento não se observou diferença clínica entre os grupos, ao contrário da avaliação de Monteiro et al. (2000) a qual foi significativamente maior no grupo controle aos 30 dias.

A opacidade corneana esteve presente por período maior em G2 em relação a G1 e G3, semelhantes entre si, divergindo dos relatos de Wang et al. (2001) e Woo et al. (2001), que observaram

redução da opacidade corneana em coelhos após ceratectomia por *excimer laser*, tratados com transplante de MA, entretanto estes animais não apresentavam deficiência de células germinativas.

Referente aos defeitos epiteliais recorrentes, estes foram detectados em sete animais pertencentes ao G1, cinco ao G2 e seis ao G3, dias após a córnea apresentar-se epitelizada, com teste de fluoresceína negativo, sugerindo ser mais um indício de que houve a indução de deficiência límbica, que não foi corrigida pela presença da membrana amniótica.

Tais sinais clínicos, presentes em todos os grupos corroboraram os resultados obtidos por Ávila et al. (2001) que, assim como o presente estudo, concluiu que a membrana amniótica sozinha não restaurou o fenótipo epitelial, ao contrário do resultado obtido com o transplante de limbo associado à membrana. Kim & Tseng (1995a), entretanto, obtiveram sucesso em 40% dos animais, com reconstituição do fenótipo epitelial corneano, dado não condizente com o obtido neste estudo.

O epitélio corneano apresenta-se em estado de regeneração constante, onde as células superficiais, permanentemente liberadas no filme lacrimal, são simultaneamente substituídas por novas células vindas das camadas basais que, por sua vez, são repostas por outras células que migram a partir do limbo. A intensidade deste processo de descamação deve ser equivalente à proliferação de novas células,

para que a camada epitelial mantenha-se estável (THOFT & FRIEND, 1983). Após uma agressão, ocorre uma intensificação da regeneração fisiológica, sob influência de proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento (DUA et al., 1994). Koizumi et al. (2000) relataram que o epitélio amniótico contém diversos fatores de crescimento (EGF, KGF, HGF, b-FGF) que podem auxiliar a migração epitelial. Neste estudo, o processo de reparação epitelial completou-se em, no máximo, 13 dias e, em média, em seis a oito dias, concordando com os dados de Kim & Tseng (1995a) e Monteiro et al. (2000) onde as córneas mostraram epitelização progressiva completa neste mesmo período.

O grupo tratado com membrana conservada em meio para embrião apresentou, clinicamente, menor tempo de reparação epitelial, em relação aos outros dois grupos, fato este observado nos três momentos relacionados. Acredita-se, assim, que este meio pode ter preservado melhor a membrana basal das células epiteliais, favorecendo sua influência sobre o epitélio corneano.

6.3 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

A presença da MA nos cortes histológicos foi observada aderida ao epitélio conjuntival e recobrindo o epitélio corneano, em dois cortes do G2, aos sete dias, diferindo do relato de Monteiro et al. (2000), que não a detectaram em nenhum corte aos 7, 15 ou 30 dias. Segundo relato de Gris et al. (2002), um paciente que recebeu a membrana para correção de defeito epitelial persistente, apresentava, clínica e histologicamente, parte do enxerto três meses depois, abaixo do novo recobrimento epitelial e com formação de nova membrana basal entre eles. Estes autores descreveram, ainda, que córneas avasculares apresentam reabsorção mais lenta da membrana, o que pode justificar tal tempo tão prolongado de permanência, ao contrário do observado neste estudo, visto que a reação inflamatória foi muito mais intensa. Outros relatos, clínicos ou experimentais, não informam o tempo de permanência da membrana na superfície ocular.

A constatação de células caliciformes (células *goblet*) na superfície corneana é a maior indicação de deficiência límbica, pois caracteriza o crescimento do epitélio conjuntival sobre a córnea, denominado conjuntivalização (DUA & AZUARA-BLANCO, 2000b). Neste estudo, estas células foram observadas próximas ao limbo, em alguns animais, já no primeiro momento, aos 7 dias, intensificando-se nos momentos seguintes, em todos os grupos, não havendo diferença

significativa entre eles ao término do experimento, concluindo-se, portanto, que a presença da membrana, conservada em ambos os meios, não suprimiu seu crescimento, ao contrário do relato de Prabhasawat & Tseng (1997).

A avaliação do edema estromal foi realizada baseando-se nas alterações relacionadas à espessura e eosinofilia desta camada, em relação ao corte de um olho normal. A separação das lamelas não foi considerada como parâmetro pois pode ocorrer devido a artefatos de processamento do material (SPENCER, 1985). Comparativamente, esta alteração foi mais intensa apenas aos sete dias do G2, porém, apesar de não haver diferença significativa ao término dos demais momentos, os percentis demonstram que houve redução aos 30 dias, em relação aos demais e nos grupos tratados em relação ao controle; portanto, a membrana, em ambos os meios, foi capaz de minimizar este efeito nos momentos mais tardios, semelhante ao relato de Monteiro et al. (2000). Devido à MA ter ação sobre o movimento iônico e atuar na reabsorção ativa do sódio no espaço intercelular, mantendo o balanço entre as forças hidrostáticas e osmóticas (TRELFORD & TRELFORD-SAUDER, 1979), é possível que o edema estromal tenha sido minimizado por ela nos grupos tratados.

Quanto à neoformação vascular, não houve diferença estatística significativa, entretanto, pôde-se observar que os vasos se apresentaram em maior número aos sete dias nos animais tratados,

igualando-se ao controle, aos 15 dias e tornando-se levemente tênues em relação a este, aos 30 dias, sendo que Monteiro et al. (2000) relataram a mesma evolução nos animais tratados em relação ao controle. Esta atividade foi relatada por Hao et al. (1999) que descreveram proteínas antiangiogênicas presentes na MA e por Trelford et al. (1975) que também observaram este efeito inibitório da neovascularização.

O infiltrado inflamatório apresentou-se estatisticamente mais intenso aos sete dias do G2, comparado aos demais momentos e grupos. Embora não houvesse diferença estatística, biologicamente pôde-se notar que as células reduziram, de forma qualitativa, nos momentos mais tardios, com intensidade muito próxima entre os três grupos ao término do experimento. Woo et al. (2001), entretanto, relataram que houve supressão da reação pela presença da MA, pois observaram menor número de células inflamatórias no grupo tratado comparado ao controle.

Quanto ao tipo celular leucocitário, a reação inflamatória aguda predominou em todos os momentos, caracterizada pela presença de polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos. No momento inicial, houve predomínio de neutrófilos, de acordo com Spencer (1985), que os qualifica como o “símbolo” deste tipo de reação. Entretanto, estas células têm tempo médio de vida curto, sendo menor que dois dias nos tecidos corpóreos. Este dado pode justificar a preponderância de eosinófilos nos demais momentos, pois estes possuem tempo hábil maior. Outros tipos

celulares também foram encontrados, sendo estes, plasmócitos, linfócitos e histiócitos, porém em quantidades inferiores. Linfócitos e plasmócitos estão relacionados com a resposta imunológica específica e reações de hipersensibilidade, que caracterizam rejeições a transplantes (SPENCER, 1985; LIGHTMAN, 1989); considerando-se que estas células foram visualizadas em quantidades restritas comparadas com os demais tipos, tanto no grupo controle, como nos tratados, pode-se afirmar que não houve sinais de rejeição ao implante neste experimento, corroborando os achados de Kubo et al. (2001), que compararam membrana amniótica humana e pele humana, implantados sob o estroma corneano e sob a cápsula renal em ratos, e notaram a ausência de linfócitos CD4+ e CD8+ no grupo transplantado com membrana e presença intensa destes no outro grupo.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, sob a metodologia aplicada, pôde-se concluir que:

❖ O n-heptanol associado ao procedimento cirúrgico foi capaz de induzir deficiência total de células germinativas do limbo, definida pelos sinais clínicos e morfológicos.

❖ A membrana não reduziu a reação inflamatória nos animais tratados, ao contrário, houve intensificação do processo no momento inicial, mas que se igualou aos não tratados na avaliação final.

❖ A cicatrização do tecido corneano apresentou-se parcialmente eficiente, pois houve reparação epitelial e ausência de opacidade, mas com persistência de neovascularização e, em alguns casos, de defeitos epiteliais recorrentes, tanto nos animais tratados como nos controles.

❖ O transplante de membrana amniótica xenógena não foi eficiente para o tratamento de deficiência total de células germinativas.

❖ O tempo de reparação epitelial foi menor nos animais tratados com a membrana preservada em meio para embrião, em relação aos animais não tratados ou tratados com a membrana em meio próprio

❖ A membrana amniótica, conservada em meio para embrião, mostrou-se mais adequada que a mesma conservada em meio próprio, o que indica melhor preservação de sua estrutura morfológica e, conseqüentemente, das propriedades aplicadas à ela.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS³

ADDS, P.J.; HUNT, C.; DART, J. Amniotic membrane grafts, fresh or frozen? A clinical and in vitro comparison. **Br. J. Ophthalmol.**, v.85, n.8, p.905-907, 2001a.

ADDS, P.J.; HUNT, C.; HARTLEY, S. Bacterial contamination of amniotic membrane. **Br. J. Ophthalmol.**, v.85, n.2, p.228-230, 2001b.

ADINOLFI, M.; AKLE, C.A.; MCCOLL, I.; FENSOM, A.H.; TANSLEY, L.; CONNOLLY, P.; HIS, B.L.; FAULK, W.P.; TRAVERS, P.; BODMER, W.F. Expression of HLA antigens, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. **Nature**, v.295, n.5847, p.325-327, 1982.

ANDRADE, A.L. **Emprego experimental da cápsula renal de equino (*Equus caballus*, LINNAEUS, 1758), preservada em glicerina, no reparo de ceratectomias superficiais em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). Avaliação clínica e morfológica.** 1996. 74p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

³ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database.** Philadelphia, 1996. 468p.

ARFFA, R.C. **Grayson's diseases of the cornea**. 3. ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. 725p.

AVILA, M.; ESPANA, E.M.; MORENO, C.; PENA, C. Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in a rabbit model. **Cornea**, v.20, n.4, p.414-420, 2001.

AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C.T.; DUA, H.S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Br. J. Ophthalmol.**, v.83, n.4, p.399-402, 1999.

BANKS, W.J. Olho e ouvido. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. p.589-617.

BARABINO, S.; ROLANDO, M.; BENTIVOGLIO, G.; MINGARI, C.; ZANARDI, S.; BELLOMO, R.; CALABRIA, G. Role of amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction in ocular cicatricial pemphigoid. **Ophthalmology**, v.110, n.3, p.474-480, 2003.

BARROS, P.S.M.; GARCIA, J.A.; LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L.; GOMES, T.L.S. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Vet. Ophthalmol.**, v.1, n.2-3, p.119-123, 1998.

BARROS, P.S.M.; SAFATLE, A.M.V.; RIGUEIRO, M. Uso do pericárdio eqüino conservado em glicerina como enxerto penetrante da córnea em cães. Estudo experimental. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.34, n.3, p. 138-141, 1997.

BROWN, S.I.; HOOK, C.W. Isolation of stromal collagenase in corneal inflammation. **Am. J. Ophthalmol.**, v.72, n.6, p.1139-1142, 1971.

BUDENZ, D.L.; BARTON, K.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. **Am. J. Ophthalmol.**, v.130, n.5, p.580-588, 2000.

CAMPOS, C.F. **Estudo dos efeitos do soro sangüíneo autógeno, comparativamente aos da acetilcisteína, sobre a cicatrização de úlceras corneanas produzidas por álcali em cães.** 2000. 104 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CHEN, H.; PIRES, R.T.F.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. **Br. J. Ophthalmol.**, v.84, n.8, p.826-833, 2000.

CREMONINI, D.N.; RANZANI, J.J.T.; BRANDÃO, C.V.S.; RODRIGUES, G.N. Avaliação do uso tópico do sulfato de condroitina A associado à ciprofloxacina (Ciprovet®) no tratamento de úlcera de córnea em cães. **Ciênc. Anim.**, v.11, supl.1, p.226, 2001.

DE ROTH, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. **Arch. Ophthalmol.**, v.23, p.522-525, 1940.

DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. **Br. J. Ophthalmol.**, v.84, n.3, p. 273-278, 2000a.

DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey Ophthalmol.**, v.44, n.5, p. 415-425, 2000b.

DUA, H.S.; GOMES, J.A.P.; SINGH A. Corneal epithelial wound healing. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 78, n.5, p. 401-408, 1994.

DUCHESNE, B.; TAHI, H.; GALAND, A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation. **Cornea**, v.20, n.2, p.230-232, 2001.

ENGEL, D.P.; SOUZA, C.E.B.; FREITAS, D.; GOMES, J.A.P.; SOUZA, L.B. Microbiological contamination of amniotic membrane and its processing and preserving protocol's efficacy. In: ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY, 75, 2003. **Proceedings**...Fort Lauderdale: ARVO, 2003.

ESPANA, E.M.; PRABHASAWAT, P.; GRUETERICH, M.; SOLOMON, A.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. **Br. J. Ophthalmol.**, v.86, n.6, p. 640-645, 2002.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitricification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, n.4, p.407-426, 1984.

FAIRBANKS, D.; VIEIRA, L.A.; SANTOS, W.D.; ATTIE, G.C.G.; GOMES, J.A.P.; FREITAS, D. Membrana amniótica no tratamento dos afinamentos corneais e esclerais. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.66, n.1, p.71-76, 2003.

FEATHERSTONE, H.; SANSOM, J. Intestinal submucosa repairs in two cases of feline ulcerative keratitis. **Vet. Rec.**, v.146, p.136-138, 2000.

GALERA, P.D. **Emprego da túnica vaginal autógena, a fresco, em ceratopatias lamelares experimentais em cães.** 1999. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GARCIA, J.A.; BARROS, P.S.M.; LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L.; SAFATLE, A.M.V. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 33, supl., p.290-294, 1996.

GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology.** 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1544p.

GEORGIADIS, N.S.; TERZIDOU, C.D. Epiphora caused by conjunctivochalasis: treatment with transplantation of preserved human amniotic transplantation. **Cornea**, v.20, n.6, p.619-621, 2001.

GODOY, C.A.L.; GUERRA, J.L.; BARROS, P.S.M. Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal eqüina como enxerto. Estudo experimental. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.65, n.5, p.545-549, 2002.

GOMES, J.A.P.; PIRES, R.T.F.; ALVES, M.R.; NETTO, A.L. **Doenças da superfície ocular:** diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002. 130p.

GOMES, J.A.P.; SANTOS, M.S.; CUNHA, M.C.; MASCARO, V.L.D.; BARROS, J.N.; SOUZA, L.B. Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. **Ophthalmology**, v.110, n.3, p.466-473, 2003.

GRIS, O.; WOLLEY-DOD, C.; GÜELL, J.L.; TRESSERRA, F.; LERNA, E.; CORCOSTEGUI, B.; ADÁN, A. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. **Ophthalmology**, v.109, n.3, p.508-512, 2002.

HAFFNER, J.C.; FECTEAU, K.A.; EILER, H. Inhibition of collagenase breakdown of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum and acetylcysteine. **Vet. Ophthalmol.**, v.6, n.1, p.67-72, 2003.

HAKANSON, N.E.; MERIDETH, R.E. Conjunctival pedicle grafting in the treatment of corneal ulcers in the dog and cat. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.23, p.641-8, 1987.

HALL, L.W.; CLARKE, K.W. Anaesthesia of birds, laboratory animals and wild animals. In:_____. **Veterinary anaesthesia**. London: Baillière Tindall, 1991. p.339-354.

HANADA, K.; SHIMAZAKI, J.; SHIMMURA, S.; TSUBOTA, K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. **Am. J. Ophthalmol.**, v.131, n.3, p.324-331, 2001.

HAO, Y.X.; MA, D.H.K.; KIM, WS. Identification of anti-neovascularization proteins in human amniotic membrane. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.40, supl.579, p.3045, 1999.

HELPER, J.C. Diseases and surgery of the cornea and sclera. In:_____ **Magrane's canine ophthalmology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p.102-149.

HONAVAR, S.G.; BANSAL, A.K.; SANGWAN, V.S.; RAO, G.N. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. **Ophthalmology**, v.107, n.5, p.975-979, 2000.

HOULIHAN, J.M.; BIRO, P.A.; HARPER, H.M.; JENKINSON, H.S.; HOLMES, C.H. The human amnion is a site of MHC class 1b expression

evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. **J. Immunol.**, v.154, n.11, p.5665-5674, 1995.

KAVINSKI, L.C. Pericardium patch grafts for treatment of corneal lesions in dogs In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 7, 1980, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1980. p.17.

KAVINSKI, L.C.; TEIXEIRA, R.B.; PRESOTTO, E.J. Transplante de membrana amniótica para reconstrução da superfície corneal pós-ceratectomia em gatos com seqüestro corneal. Santa Catarina: CRMVSC, 2002. Disponível em: <<http://www.crmvsc.org.br/cientifico.htm>>. Acesso em: 19.nov.2002.

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.20, n.3, p.643-666, 1990.

KIM, J.C.; TSENG, S.C.G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v.14, n.5, p.473-484, 1995a.

KIM, J.C.; TSENG, S.C.G. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in

severely damaged rabbit corneas. **Korean J. Ophthalmol.**, v.9, n.1, p.32-46, 1995b.

KIM, J.S.; KIM, J.C.; NA, B.K.; JEONG, J.M.; SONG, C.Y. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. **Exp. Eye Res.**, v.70, n.3, p.329-337, 2000.

KJAERGAARD, N.; HEIN, M.; HYTTEL, L.; HELMIG, R.B.; SCHONHEYDER, H.C.; ULDBJERG, N.; MADSEN, H. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.94, n.2, p.224-229, 2001.

KOENING, S.B.; KAUFMANN, HE. The treatment of necrotizing scleritis and autogenous periosteal graft. **Ophthalmic Surg.**, v.14, n.12, p.1029-1032, 1983.

KOIZUMI, N.J.; INATOMI, T.J.; SOTOZONO, C.J.; FULLWOOD, N.J.; QUANTOCK, A.J.; KINOSHITA, S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. **Curr. Eye Res.**, v. 20, n.3, p.173-177, 2000.

KRUSE, F.E.; JOUSSEN, A.M.; ROHRSCHEIDER, K.; YOU, L.; SINN, B.; BAUMANN, J.; VÖLCKER, H.E. Criopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. **Graefe Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v.238, n.1, p.68-75, 2000.

KRUSE, F.E.; ROHRSCHEIDER, K.; VÖLCKER, H.E. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. **Ophthalmology**, v.106, n.8, p.1504-1511, 1999.

KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R.; USUI, M. Immunogenicity of amniotic membrane in experimental xenotransplantation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.42, n.7, p.1539-1546, 2001.

LAUS, J.L. **Emprego da escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis*, STEIDACHNER, 1859) conservada em glicerina, como sucedâneo de córneas no reparo de ceratectomia superficiais: estudo experimental em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758).** 1994. 71p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

LEE, S.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 123, n.3, p.303-312, 1997.

LETKO, E.; STECHSCHULTE, S.U.; KENYON, K.R.; SADEQ, N.; ROMERO, T.R.; SAMSON, C.M.; NGUYEN, Q.D.; HARPER, S.L.; PRIMACK, J.D.; AZAR, D.T.; GRUTERICH, M.; DOHLMAN, C.H.; BALTATZIS, S.; FOSTER, C.S. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. **Arch. Ophthalmol.**, v.119, n.5, p.659-663, 2001.

LEWIN, G.A. Repair of a full-thickness corneoscleral defect in a German Shepherd dog using porcine small intestinal submucosa. **J. Small Anim. Pract.**, v.40, p.340-342, 1999.

LIGHTMAN, S. **Immunology of eye diseases**. Lancaster: Kluwer Academic Publishers, 1989. 171p.

LIMA, A.L.H.; DANTAS, M.C.N.; ALVES, M.R. **Doenças externas oculares e córnea**. Rio de Janeiro: Ed. Cultura Médica, 1999. 535p.

MARGO, C.E., GROSSNIKLAUS, H.E. **Ocular histopathology**: a guide to differential diagnosis. Philadelphia: Saunders, 1991.

MARINHO, D.; HÖFLING-LIMA, A.L.; KWITKO, S.; TSENG, S.C.G. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation? **Cornea**, v.22, n.4, p.338-342, 2003.

MARTINS, J.A.P. **Placentologia**. São Paulo: Roca, 1986. 218p.

MEJÍA, L.F.; ACOSTA, C.; SANTAMARÍA, J.P. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. **Cornea**, v. 19, n.3, p.288-291, 2000.

MILLER, W.W. Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs. **Vet. Med.**, v.91, n.10, p. 916-922, 1996.

MONTEIRO, E.C.L.; SCHELLINI, S.A.; MARQUES, M.E.A.; KAMEGASAWA, A.; PADOVANI, C.R. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 63, n.1, p. 33-37, 2000.

MORALES, A. **Comparação entre enxertos autólogos livres e pediculados de conjuntiva no reparo de ceratectomias superficiais: estudo experimental em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758)**. 1994. 77p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MUNGER, R.J. Veterinary ophthalmology in laboratory animal studies. **Vet. Ophthalmol.**, v.5, n.2, p.167-175, 2002.

NASISSE, M.P. Canine ulcerative keratitis. In:_____. **Ophthalmology in small animal practice**. New Jersey: Veterinary Learning Systems, 1996.

NEME, B. Placenta humana. In:_____. **Obstetrícia básica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. p.13-33.

PARENTE, D.R. **Modelos de neovascularização corneana em coelhos: análise clínica e morfológica**. 1999. 150p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PARIDAENS, D.; BEEKHUIS, H.; VAN DEN BOSCH, W.; REMEYER, L.; MELLES, G. Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. **Br. J. Ophthalmol.**, v.85, n.6, p.658-661, 2001.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PRABHASAWAT, P.; TESAIBUL, N.; KOMOLSURADEJ, W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. **Br. J. Ophthalmol.**, v.85, n.12, p.1455-1463, 2001.

PRABHASAWAT, P.; TSENG, S.C.G. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. **Arch. Ophthalmol.**, v.115, n.11, p.1360-1367, 1997.

RANZANI, J.J.T.; CREMONINI, D.N.; RODRIGUES, G.N.; MANNARINO, R. Avaliação da eficácia no uso tópico de sulfato de condroitina A no tratamento de úlcera de córnea experimental em coelhos. **Ciência Animal**, v.11, supl.1, p.226, 2001.

SAITO, H.; SHIMAZAKI, J.; SHIMAZAKI, N. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 39, S428, 1998.

SAMPAIO, R.L. **Estudo comparativo entre o adesivo biológico de fibrina e o sintético n-butilcianoacrilato nas ceratoplastias lamelares experimentais em cães.** 1999. 107p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

SCHRAGE, N.F.; LANGEFELD, S.; ZSCHOCKE, J.; KUCKELKORN, R.; REDBRAKE, C.; REIM, M. Eye burns: an emergency and continuing problem. **Burns**, v.26, n.8, p.689-699, 2000.

SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patient with recurrent pterygium associated with symblepharon. **Br. J. Ophthalmol.**, v.82, n.3, p.235-240, 1998.

SHIMAZAKI, J.; YANG, H.; TSUBOTA, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. **Ophthalmology**, v.104, n.12, p.2068-2076, 1997.

SHIMMURA, S.; SHIMAZAKI, J.; OHASHI, Y.; TSUBOTA, K. Anti-inflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. **Cornea**, v.20, n.4, p.408-413, 2001.

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

SMITH, V.A.; HOH, H.B.; EASTY, D.L. Role of ocular matrix metalloproteinases in peripheral ulcerative keratitis. **Br. J. Ophthalmol.**, v.83, n.12, p.1376-1383, 1999.

SOLOMON, A.; MELLER, D.; PRABHASAWAT, P.; JOHN, T.; ESPANA, E.M.; STEUHL, K.P.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetoceles and deep ulcers. **Ophthalmology**, v.109, n.4, p.694-703, 2002.

SORSBY, A.; HAYTHORNE, J.; REED, H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. **Br. J. Ophthalmol.**, v.31, p.409-418, 1947.

SOUZA, M.S.B. **Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica.** 2003. 161p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPENCER, W.H. **Ophthalmic pathology: an atlas and textbook.** 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1985. v.1, 547p.

SRIDHAR, M.S.; BANSAL, A.K.; SANGWAN, V.S.; RAO, G.N. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 130, n.1, p.134-137, 2000.

SRIDHAR, M.S.; SANGWAN, V.S.; BANSAL, A.K.; RAO, G.N. Amniotic membrane transplantation in the management of shield ulcers of vernal keratoconjunctivitis. **Ophthalmology**, v. 108, n.7, p.1218-1222, 2001.

STARTUP, F.G. Corneal ulceration in the dog. **J. Small Anim. Pract.**, v.25, n.12, p.737-752, 1984.

SU, W.; CHANG, S.; HUANG, S. Amniotic membrane transplantation for corneal perforation related to vitamin A deficiency. **Ophthalmic Surg. Lasers Imaging**, v.34, n.2, p.140-144, 2003.

THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.24, n.10, p.1442-1443, 1983.

TRELFORD, J.D.; HANSON, F.W.; ANDERSON, D.G. Wound healing and the amniotic membrane. **J. Med.**, v.6, n. 5-6, p.383-388, 1975.

TRELFORD, J.D.; TRELFORD-SAUDER, M. The amnion in surgery, past and present. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.134, n.7, p.833-845, 1979.

TSENG, S.C.G. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. **Mol. Biol. Rep.**, v.23, n.1, p.47-58, 1996.

TSENG, S.C.G.; HIRST, L.W.; FARAZDAGHI, M.; GREEN, W.R. Goblet cell density and vascularization during conjunctival transdifferentiation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.25, n.10, p.1168-1176, 1984.

TSENG, S.C.G.; PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; GRAY, T.; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Arch. Ophthalmol.**, v.116, n.4, p.431-441, 1998.

TSUBOTA, K.; GOTO, E.; SHIMMURA, S.; SHIMAZAKI, J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. **Ophthalmology**, v.106, n. 10, p.1984-1989, 1999.

TSUBOTA, K.; SAKATE, Y.; OHYAMA, M.; TODA, I.; TAKANO, Y.; ONO, M.; SHINOZAKI, N.; SHIMAZAKI, J. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 122, n.1, p.38-52, 1996.

WANG, M.X.; GRAY, T.B.; PARK, W.C.; PRABHASAWAT, P.; CULBERTSON, W.; FORSTER, R.; HANNA, K.; TSENG, S.C.G. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. **J. Cataract. Refract. Surg.**, v.27, n.2, p.310-319, 2001.

WOO, H.M.; KIM, O.K.; KWEON, O.K.; KIM, D.Y.; NAM, T.C.; KIM, J.H.
Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal
remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. **Br. J.
Ophthalmol.**, v. 85, n.3, p.345-349, 2001.

WOUK, A.F.P.F.; TIEPPO, T.; LIMA, R. Polysulfated glycosaminoglycan
used for the treatment of indolent corneal ulcers in horses. **Arch. Vet. Sci.**,
v.2 (supl.), p.36, 1997.

WYNN, R.M.; CORBETT, J.R. Ultrastructure of the canine placenta and
amnion. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.103, n.6, p.878-887, 1969.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 718p.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

Botucatu, 19 de dezembro de 2003.

DANIELA NOGUEIRA CREMONINI