

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

**EMPREGO DE MEMBRANA DE CELULOSE
MICROFIBRILAR NA CERATOPLASTIA LAMELAR EM
COELHOS (*O. cuniculus*, LINNAEUS, 1758). ASPECTOS
CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS**

Luciana Ricciardi Macedo

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Junho - 2008

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

**EMPREGO DE MEMBRANA DE CELULOSE
MICROFIBRILAR NA CERATOPLASTIA LAMELAR EM
COELHOS (*O. cuniculus*, LINNAEUS, 1758). ASPECTOS
CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS**

Luciana Ricciardi Macedo

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Junho – 2008

M141e Macedo, Luciana Ricciardi
Emprego de membrana de celulose microfibrilar na ceratoplastia
lamelar em coelhos (*O. cuniculus*, Linnaeus, 1758). Aspectos
clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos / Luciana Ricciardi
Macedo. -- Jaboticabal, 2008
xix, 59 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: José Luiz Laus

Banca examinadora: Dr. Auero Evangelista Santana
Dr. Thiago Luiz de Salles Gomes

Bibliografia

1. Membrana de celulose. 2. Ceratoplastia lamelar. 3. Coelhos. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617.7:636.92

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANA RICCIARDI MACEDO – nascida em 10 de maio de 1968, em São Paulo, capital, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária Otávio Bastos, São João da Boa Vista – SP, em dezembro de 1995. Atua como Médica Veterinária autônoma desde 1996, com ênfase em Oftalmologia Veterinária de Pequenos Animais. Exerceu responsabilidade técnica do Serviço de Oftalmologia Veterinária da Provet (Centro de Diagnóstico Veterinário) em São Paulo entre os anos de 2000 e 2004. Em Janeiro de 2005 tornou-se proprietária e responsável técnica da Pet Oftalmovet - Centro de Oftalmologia Veterinária – Moema – SP até a presente data. Ingressou no Programa de Pós- Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Campus de Jaboticabal, em março de 2006, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus.

"Deus provê, Deus proverá, sua misericórdia não faltará !."

(Pde Marcelo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

... Ao querido Prof. Dr. José Luiz Laus,

Pessoa admirável profissionalmente e pessoalmente pela sua dedicação aos alunos e orientados. Um grande exemplo de competência, conhecimento e dedicação, com quem aprendi não somente Córnea e Cirurgia, mas que colocou-me no caminho para ser um verdadeiro clínico-cientista. Muito Obrigado!!!!

... À minha querida mãe Maria de Lourdes,

que com sua força, coragem e amor, ajuda-me a crescer, em todos os sentidos.

...Ao meu pai Gerson,

exemplo de profissional e entusiasta, um exemplo, que me fortalece, nos momentos alegres e nas dificuldades.

... Ao meu marido, Rubens,

fonte de amor, carinho , dedicação e apoio e amor imensuráveis.

...Ao meu filho Antonio,

desejado e muito amado que se espelha em meus passos para ser um futuro cientista, e que me prestigia com sua inestimável companhia .

*...À minha filha Gabriella,
quem me dá muita alegria, criatividade e imaginação, sempre cantando e feliz,
me transformando dia a dia em uma pessoa melhor.*

*... À minha irmã Cláudia,
inspiração, cumplicidade e energia em minha vida, melhor amiga!!!*

*...Ao meu cunhado Nicolas,
quem com seu exemplo de pesquisador nato, e sua dedicação me guiou e ajudou
muito durante esse trabalho.*

*... Aos meus avós, Basília e Essio (in memoriam), por me ensinar e fortalecer
sempre meu lado espiritual , eu te amo vó!!!. Ao meu avô Prof. Dr. Carlos
Augusto inventor da escada rolante à giro, por ter me doado geneticamente um
pouco de seu brilhantismo e inteligência ,e a minha avó Carmen pela paciência
e esperteza!*

*... Aos meus demais familiares que, de uma forma ou de outra, participaram e
torceram para que eu chegasse até aqui, a minha sogra Geny que sempre cuidou
e se responsabilizou pelos meus filhos, na minha ausência. Sempre me sorrindo
e com muita dedicação, juntamente com o meu sogro Rubens, cunhados e
cunhadas.*

... À minha, Tia Sonia, pela alegria de viver apesar de todos os percalços desta vida. A minha Tia Belinha por todas a sua fé e oração. A minha tia Laura pela deliciosa comida e acolhida que faz pra mim, desde a infância, em Ribeirão Preto. Aos primos Sinval, Regina, Maria Clara e Francisco pela delícia de convívio e intimidade.

... À amiga Renata Garcia, parceira de anos, que sempre e que torna minha vida mais alegre. A Érica e Diego, pela força e amizade, Moniquinha, Tuca, Karina, Cris e Jaime, e toda a família Soffredi de Santos; Grispino de São Paulo; Ricciardi de Ribeirão Preto e Maringá. Aos amigos de São João da Boa Vista e Águas da Prata- SP.

... À querida Aureli, dona das pequenas e carinhosas mãozinhas que ajudavam a cuidar da minha casa e meus filhos durante a minha ausência! Imprescindível!

... À Profa. Dra. Paula Galera

Por entender a importância deste estudo e prestar sua fundamental colaboração e amizade.

... Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier

Por sua colaboração neste estudo, com as técnicas de K₁₆₇ e com toda histologia.

... À Isabel Bueno Santos Menezes, pela disponibilidade de tempo e contribuição científica dispensados à este trabalho na escola paulista de medicina - SP.

... À Fernanda - Medicina – USP, pela gentileza ao me receber e ao auxiliar com brilhantismo minhas avaliações histopatológicas.

... Ao Prof. Dr. Isaac de Castro, medicina – USP , pelo auxílio no delineamento experimental dos tantos projetos e pela confiança ao partilhar idéias.

... Ao Prof. Dr. Rogério Rosa , biologia – USP, pela incansável e eficientíssima ajuda na realização da análise estatística.

... carinhosamente à amiga Denise, companhia constante em Jaboticabal, pelas dicas e paciência no desenvolvimento de parte deste trabalho.

*... À Amiga Laura Pennesi, pela motivação a cada dia, pelo carinho com meus pelas nossas risadas e emocionantes conversas e a amiga Ivelize, que sempre me deu otimismo, ajudou a cuidar de todo esse experimento científico com muito amor, principalmente, pelas mil vezes que repetiu: “Lu, vai dar tudo certo!”
Obrigada Ive!*

... À Fernanda Liguori que estagiou na clínica, e todos estagiários que me ajudaram, pela convivência saudável e companheirismo.

... Aos “super-amigos” Rubens Pasqualin e Renato Credie, pelo companheirismo desde o início da clínica e apoio infindável em todos os aspectos das cirurgias, E Renato, responsável pela anestesia dos coelhos. Gostaria de dizer que não tenho palavras para sua dedicação à ciência, principalmente a esse estudo. Obrigado do fundo do meu coração.

... “Obrigada Elizaeth Aparecida Cancellari, Cid Paroni Filho, Luiz Fernando Nery!!!

... À minha amiga prestativa Bianca, pelo exemplo de profissional que é, por toda ajuda e “chopinhos” desde meu ingresso na Oftalmologia.

... Ao colega Alexandre (“Dedo”), por dividir comigo a discussão deste trabalho e pela ajuda durante a execução dele.

... À querida Letícia e Ângela Frozen e Juan Pablo, obrigada por me ajudar na apresentação .

... Aos demais colegas “oftálmicos”, Andréa, Luciano, Emílio e Miguel e Juliana pelo convívio e apoio e juntamente com o Prof. Laus. Espero manter os laços desta equipe de oftalmologia veterinária!

... À amiga Virginia, pelas comemorações e alegria sempre em me ajudar...

... À todos os meus amigos de Jaboticabal e a todos os colegas da PET OFTALMOVET – Centro de oftalmologia Veterinário - São Paulo, pelo trabalho e auxílio.

... À USP – Faculdade de Medicina Veterinária, por fornecedor dos coelhos, pela disposição ao me atender sempre que necessitei e aos queridos orelhudos, meus amigos coelhinhos, com os quais aprendi muito.

... À minha querida cadela Minie, cega de um olho, pela companhia persistente, fonte de inspiração e amor incondicional.

E a todos que a emoção não me permite lembrar neste momento, mas que fizeram parte deste trabalho de alguma forma ...Valeu!

SUMÁRIO

	Página
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas.....	xvii
Resumo	xviii
Summary	xix
I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1. Aspectos anatomofisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal	1
2. Distúrbios da superfície ocular	5
3. Regeneração epitelial e cicatrização	7
4. Membrana de Celulose.....	11
II. MATERIAL E MÉTODOS	13
1. Considerações éticas	13
2. Animais.....	13
3. Membrana de celulose microfibrilar Bionext®	14
4. Delineamento Experimental.....	15
5. Protocolos de Avaliação	18
III. RESULTADOS	22
1. Avaliação clínica.....	22
2. Histopatologia	31
3. Imunoistoquímica	37
IV. DISCUSSÃO	40
V. CONCLUSÕES.....	46
VI. REFERÊNCIAS	47

Lista de figuras

- Figura 1. Imagem fotográfica da membrana de celulose microfibrilar Bionext®, apresentada em fragmento com dimensões de 1,0 x 1,5 cm e 0,2 mm de espessura aproximadamente.. 14
- Figura 2. Imagens fotográficas de olho de coelho, durante procedimento em ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® 17
- Figura 3. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto ao blefaroespasma segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext® 24
- Figura 4. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à fotofobia, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext® 24
- Figura 5. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à edema, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext® 25
- Figura 6. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à secreção ocular, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext® 25
- Figura 7. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à hiperemia conjuntival, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext® 26

Figura 8. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à neovascularização corneal, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®.....	26
Figura 9. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à opacidade da córnea, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®.....	27
Figura 10. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à pigmentação corneal, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®.....	27
Figura 11. Imagem fotográfica de pós-operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, ao primeiro dia.....	28
Figura 12. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, ao sete dias.....	29
Figura 13. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, aos 15 dias.....	29
Figura 14. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, aos 30 dias.....	30
Figura 15. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, aos 60 dias.....	30

Figura 16. Fotomicrografia da córnea de coelho no 1° dia após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	32
Figura 17. Fotomicrografia da córnea de coelho no 1° dia após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	33
Figura 18. Fotomicrografia da córnea de coelho no 7° dia após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	33
Figura 19. Fotomicrografias de córneas de coelhos aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	34
Figura 20. Fotomicrografias de córneas de coelhos aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	34
Figura 21. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	35
Figura 22. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	35
Figura 23. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	36
Figura 24. Fotomicrografia de córnea de coelho nos 60 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	36
Figura 25. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Imunoistoquímica para marcador de proliferação celular Ki67	37

Figura 26. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	38
Figura 27. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	38
Figura 28. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®	39

Lista de tabelas

- Tabela 1. Valores expressos em médias e desvio padrão, respectivamente, ao teste LSP (Least Significance Difference) para variáveis: Blefaroespasma, Hiperemia conjuntival, Secreção, Fotofobia, Opacidade Corneal, Edema, Pigmentação, Neovascularização, nos períodos de pós-operatório de ceratoplastias lamelares com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em coelhos, durante os períodos : 1 dia (G1); 7 dias (G2); 15 dias (G3); 30 dias (G4); 60 dias (G5). São Paulo, 2008.....23
- Tabela 2. Valores descritos em média e desvio padrão, da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® quanto ao teste ANOVA e pós teste LSD (Least Significance Difference) descrevendo resultados da imunomarcagem com anticorpo Ki67 no epitélio e estroma corneais, aos: 1 dia (G1); 7 dias (G2) ; 15 dias (G3); 30 dias (G4) e 60 dias (G5). São Paulo, 2008.....39

Lista de abreviaturas

G	Gramas
Kg	Kilograma
ml	Mililitros
Mmhg	Milímetros de mercúrio
PIO	Pressão intra-ocular
µm	Micrometros
Ds	Diferença significativa
mc	Membrana celular microfibrilar Bionext°
Campos	(40X /0,17 WD 0,65) microscópio óptico

**EMPREGO DE MEMBRANA DE CELULOSE MICROFIBRILAR NA
CERATOPLASTIA LAMELAR EM COELHOS (*O. cuniculus*, LINNAEUS, 1758).
ASPECTOS CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS**

RESUMO – Avaliaram-se descritivamente, à clínica, à histopatologia e à imunistoquímica (ki 67- marcador de proliferação celular) os resultados, da cicatrização da córnea, após ceratoplastias lamelares com membrana de celulose microfibrilar em coelhos. Para tal, utilizaram-se 30 coelhos, distribuídos em 5 grupos de 6 animais, avaliados por até 60 dias de pós operatório. A avaliação clínica revelou manifestações moderadas de edema, blefaroespasmos, fotofobia desde o segundo dia, evoluindo para formas discretas ou ausentes a partir do sétimo dia, onde observou-se clinicamente o reparo do defeito da córnea. A histopatologia revelou uma fina camada de células escamosas, recobrimo totalmente a área lesada, aos sete dias, e com leve infiltrado de células polimorfonucleares. Observou-se a presença de vasos no epitélio a partir do 15º dia, com regressão aos 48º dias. A imunistoquímica mostrou aumento de células em proliferação aos 15 dias no epitélio ($p= 0,049$) e aos trinta dias no estroma ($p= 0,042$). Frente aos resultados obtidos, há como admitir que mesmo com o defeito corneal concluído, aos sete dias, o sistema de defesa celular ainda se manteve ativo, pois a proliferação celular no epitélio se mostrou mais intensa aos 15 dias de observação, conforme demonstrado imunistoquimicamente. Onde nesse período ocorreu remodelamento e adesão epitelial da córnea, características satisfatórias em ceratoplastia lamelar em coelhos.

Palavras-Chave: ceratoplastia lamelar, coelhos, córnea, imunistoquímica, membrana de celulose, morfologia.

MEMBRANE OF EMPLOYMENT OF PULP MICROFIBRILAR IN LAMELLAR KERATOPLASTY IN RABBITS (*O. cuniculus*, LINNAEUS, 1758). IN CLINICAL, MORPHOLOGICAL AND IMUNOISTOCHEMISTRY

SUMMARY – Were evaluated the clinic, the histopathology and immunohistochemistry (ki 67 - marker of cell proliferation), the results of the membrane of cellulose in lamellar keratoplasty in rabbits. To this end, 30 rabbits were used, divided into 5 groups of 6 animals, assessed by up to 60 days of post-operative. The assessment showed clinical manifestations of moderate swelling, blefarospasmos, photophobia since the second day, evolving into discrete forms or absent from the seventh day, where there was clinically repair the defect of the cornea. The histopathology revealed a thin layer of squamous cells, completely covering the injured area, the seven days, and with mild infiltration of polymorphonuclear cells. There was the presence of vessels in the epithelium from the 15 th day, with regression of days to 48. Immunohistochemistry showed increased cell proliferation in the 15 days in the epithelium ($p = 0049$) and the thirty days in the stroma ($p = 0042$) . Facing the results achieved, as there admit that even with the beginning of healing, and with the defect of the cornea closed to seven days, the system of defence cell remained active, as in the epithelial cell proliferation was more intense at 15 days, as shown imunoistochemistry. Where in that period showed epithelial remodeling and membership, characteristics satisfactory in lamellar keratoplasty in rabbits.

Keywords: lamellar keratoplasty, rabbits, cornea, immunohistochemistry, membrane of cellulose, morphology.

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. Aspectos anatomofisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal

A córnea é uma estrutura anesférica e transparente que, juntamente com a esclera, compõe a túnica fibrosa do olho. A região de transição entre essas duas estruturas chama-se limbo esclerocorneal, mais largo nas porções inferior e superior (KLYCE & BEUERMAN, 1988).

Em espécies domésticas, seu diâmetro horizontal é maior do que o vertical (SLATTER, 1990; BANKS, 1991; GOMES et al., 2002) e sua espessura é espécie dependente, mas usualmente, é inferior a um milímetro. A área central da córnea dos cães possui cerca de 600 μm (GILGER & WHITLEY, 1999); já nos gatos e em coelhos verificam-se 515 μm e 384 μm , respectivamente (RANZANI et al., 2004).

A inervação sensitiva da córnea é mantida por fibras mielinizadas de ramos da divisão oftálmica do V par de nervos cranianos. Ramos dos nervos ciliares longos e curtos se relacionam anatomicamente no espaço supracoroidal, próximo ao limbo, dando origem a 12 – 16 ramos circunferenciais, que inervam o limbo e de onde partem fibras corneais (KLYCE & BEUERMAN, 1988). Do plexo, as fibras nervosas dirigem-se à superfície e, ao atingirem a membrana basal, perdem a mielinização, caracterizando-se como terminações nervosas livres, ou melhor, terminais axônicos que chegam até a camada de células superficiais do epitélio. Basicamente, esses terminais expressam apenas dor (GRAYSON & ARFFA, 1991).

Apesar de ser avascular, a córnea apresenta-se como um tecido extremamente ativo. Sua nutrição vem do filme lacrimal; da conjuntiva tarsal posterior das pálpebras, da vasculatura, presentes no limbo, que são os ramos da artéria ciliar anterior e do humor aquoso (BROOKS, 2004).

O filme lacrimal proporciona à superfície ocular um ambiente úmido e promove nutrição, proteção e uma interface óptica homogênea. O filme lacrimal fornece à córnea nutrientes e oxigênio, além de ter uma série de substâncias com propriedades bactericidas (MATHERS et al., 1996). Tradicionalmente, considera-se que o filme lacrimal seja formado por três camadas: lipídica superficial (mais externa), aquosa intermediária e mucina basal em contato com o epitélio (ROLANDO & ZIERHUT, 2001).

A camada de mucina mantém a lubrificação do epitélio da córnea e conjuntiva. Essa camada é formada pela secreção das células caliciformes da conjuntiva (DARTT, 2004). A camada aquosa é produzida pelas glândulas lacrimais principal e acessórias. Ela é a responsável pelo transporte de nutrientes solúveis em água, substâncias bactericidas como lactoferrina, imunoglobulinas, lisozima, β -lisina entre outras (HAYNES et al., 1999). Fatores de crescimento necessários à proliferação e à diferenciação do epitélio da superfície ocular, como o fator de crescimento epidermal (EGF), e fator de crescimento do ceratócito (KGF) estão presentes na camada aquosa do filme lacrimal (WILSON, 1991; LOHMANN et al., 1998; WILSON et al., 1999; FAGERHOLM, 2000; BALDWIN & MARSHALL, 2002). A camada lipídica é formada, essencialmente, pela secreção das glândulas de Meibomio, e sua função é retardar a evaporação, estabilizando o filme lacrimal. Essas glândulas são ricamente inervadas e sua secreção pode ser modificada, qualitativa ou quantitativamente, por hormônios (SULLIVAN et al., 1999; SULLIVAN et al., 2002; SUZUKI et al., 2002), por dietas (AMBRÓSIO JUNIOR et al., 2002) e por ação de microorganismos (SUZUKI et al., 2002; SHINE et al., 2003). A disfunção das glândulas de Meibomio pode resultar na instabilidade do filme lacrimal e em alterações da superfície ocular (SMITH & FLOWERS, 1995).

No cão e em outras espécies animais, a córnea é formada por quatro camadas distinguíveis. Da mais externa para a mais interna: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. A camada de Bowman, descrita no homem,

não foi descrita nessa espécie (SHIVELY & EPLING, 1970). Considera-se a película lacrimal pré corneal como a quinta camada (NASISSE, 1996). O epitélio corneal é simples, **estratificado** e não queratinizado. Possui padrão básico de membrana basal, composto por células epiteliais basais e ovóides, células "achatadas" e superfície escamosas. As células basais contêm um núcleo, mitocôndria e complexo de Golgi e são aderidas por hemidesmossomos à membrana basal. A membrana basal é composta por fibrilas de colágeno, além de laminina, fibronectina e hialuronato. Com a divisão das células basais, células-filhas são direcionadas à superfície, tornando-se achatadas e perdendo, gradualmente, suas organelas, formam-se discretas projeções vilosas que são revestidas pela camada mucóide do filme lacrimal (GILGER & WHITLEY, 1999).

O estroma é um tecido fibroso que compõe mais de 90% da espessura da córnea. Ele contém fibras colágenas arranjadas e organizadas e uma matriz extracelular de proteoglicanos, que são glicosaminoglicanos covalentemente aderidos à um núcleo protéico. Dez tipos diferentes de colágeno foram identificados no estroma, tanto em formas fibrilares como não fibrilares, porém os tipos I, III, V e VI, são os mais achados (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001; AHMADI & JAKOBIEC, 2002).

Os ceratócitos são células que representam menos de 3% da composição total do estroma. Células inflamatórias e do sistema imune também habitam o estroma. (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001). Os glicosaminoglicanos, colágenos e glicoproteínas são sintetizados pelos ceratócitos, sendo substâncias responsáveis pela manutenção da córnea. O período de substituição do colágeno estromal é variável dentre as espécies, mas, geralmente, pode estender-se por anos (GILGER & WHITLEY, 1999).

A membrana de Descemet é acelular e aparentemente homogênea, ainda que se observem nos animais domésticos e à microscopia eletrônica de transmissão, duas camadas pouco definidas. Uma que se localiza adjacente ao

estroma, e se torna mais espessa com a idade, e outra composta por fibronectina, laminina e colágeno tipo VII.

Eventualmente, as células endoteliais secretam uma nova membrana para preencher os pequenos defeitos produzidos por feridas penetrantes. A membrana de Descemet não se fixa à fluoresceína, apresentando-se como uma estrutura , transparente (STADES et al., 1999).

O endotélio apresenta-se com uma camada única de células poligonais disposta posteriormente à membrana de Descemet, revestindo a câmara anterior. Em decorrência da sua alta atividade metabólica, essas células contêm mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e rugoso abundantes. Sua regeneração é restrita e varia com idade e espécie (SLATTER, 1990; PIGATTO, 2004). As células endoteliais mantêm um sistema de transporte de íons que impede a entrada de água no estroma corneal através de bomba de sódio e potássio ATPase, localizada na membrana dessas células (GEROSKI & EDELHAUSER, 1984).

O estado de deturgescência corneal é mantido por um mecanismo dependente de energia, presente no endotélio e no epitélio corneais. O metabolismo da glicose é a principal fonte de energia da córnea, e dois terços desta é metabolizada pela via Embden-Meyerhof e ciclo de Krebs; o terço remanescente, pela derivação monofosfato hexose (LAUS & ORIÁ, 1999).

As principais funções da córnea incluem suporte às estruturas intra-oculares, refração e transmissão de luz (BOEVÉ & STADES, 2007). Apresenta-se como uma lente convergente responsável por 80% do poder total de refração nas espécies domésticas, o qual é determinado pelo raio de curvatura, pelo índice refrativo do ar e pelo humor aquoso (HELPER, 1989).

As principais condições que a fazem transparente são a ausência de vasos sangüíneos, linfáticos e de pigmentos, e uma superfície óptica lisa (propiciado pelo filme lacrimal), disposição ordenada das fibras de colágeno, fibras nervosas

amielínicas, epitélio não queratinizado e a sua deturgescência (LAUS et al., 1993; SAMPAIO, 2006).

A transparência da córnea, adjunta a sua capacidade de refração permitem com outros constituintes do olho a perfeita formação da imagem (GILGER & WHITLEY, 1999).

2. Distúrbios da superfície ocular

Os distúrbios da superfície ocular e do filme lacrimal decorrem de um grupo heterogêneo de doenças, sejam elas o olho seco, alterações palpebrais, destruição das células germinativas corneais e conjuntivais, destruição da membrana basal, inflamação e alterações neuro-anatômicas da superfície ocular. Tratam-se de alterações que induzem à instabilidade do epitélio corneal, vascularização e inflamação crônicas, e que resultam na perda da transparência da córnea e na diminuição ou perda da acuidade visual (TSENG & TSUBOTA, 1997; GOMES, 2002). O grau do envolvimento de cada uma das alterações varia segundo a enfermidade e o paciente, em que identificações e a abordagem individualizada, baseadas na etiopatogênia, deverão ser consideradas (GOMES, 2002).

Do ponto de vista laboratorial, dois tipos principais de falência da superfície ocular podem ser identificados à citologia de impressão e quanto ao fenótipo epitelial. Um deles mostra a transição patológica do epitélio da superfície ocular não queratinizado normal em queratinizado, a que se dá o nome de metaplasia escamosa (TSENG, 1985). Na conjuntiva, esse evento se dá com perda das células caliciformes. A metaplasia escamosa pode ser causada extrinsecamente pela instabilidade do filme lacrimal, decorrente da resposta imune insatisfatória da superfície ocular (TSENG & TSUBOTA, 1997). Outrossim, por fatores intrínsecos, como os vários tipos de ceratoconjuntivite, como as produzidas por queimaduras químicas. A patogênese da metaplasia escamosa causada por estas

enfermidades ainda é desconhecida e pode estar relacionada à intensa inflamação estromal, bem como, pela falta de suprimento vascular, que resultam em tecido cicatricial (TSENG, 1985). Instalam-se os traumas, mormente os suscitados pela triquiase e pela distiquíase, as meibomites, a ceratoconjuntivite seca e quadros inflamatórios associados à doenças crônicas ou a danos estromais que interferem com a capacidade dos transplantes de limbo ensejam proliferação e diferenciação epiteliais (BRUNELLI et al., 2007).

O segundo tipo de falência da superfície ocular é caracterizado por uma troca do perfil fenotípico epitelial corneal normal por um epitélio conjuntival invasivo, em um processo denominado deficiência límbica (deficiência de células germinativas do limbo (PUANGSRICHARERN & TSENG, 1995; BRUNELLI et al., 2007). Se alterações do limbo e corneanas não forem tratadas poderão induzir a defeitos epiteliais persistentes, úlceras tróficas, conjuntivalização, lesões destrutivas da membrana basal e a perfurações (ANDRADE et al., 2003).

Defeitos epiteliais crônicos constituem complicações freqüentes e podem evoluir para inflamação estromal ou infecção (ASSOULINE, 1993; GOMES et al., 1999). Incluem-se o uso de medicação tópica (lubrificantes sem preservativos e esteróide tópicos), tarsorrafia, transplante de limbo (BRUNELLI et al., 2007) e recobrimento conjuntival (KENYON & TSENG, 1989; TSUBOTA et al., 1999; GOMES et al., 1999).

Os sinais clínicos mais evidentes são blefaroespasmos, fotofobia, epífora, edema, secreção ocular, neovascularização e pigmentação corneais (LAUS, 1999; GILGER & WHITLEY, 1999).

Vários trabalhos reportam a importância da membrana basal e sua relação com as células germinativas do limbo na migração e adesão epiteliais, necessárias à manutenção estrutural e funcional da superfície ocular (BERMAN, 1989; KIM & TSENG, 1995; TSENG & TSUBOTA, 1997; TSUBOTA et al., 1999; GOMES, 2002). A utilização de componentes da matriz extracelular relacionados à adesão e à migração celulares, como fibronectina e laminina, tem proporcionado

préstimos no tratamento de alterações crônicas de cicatrização epitelial (NISHIDA et al., 1983; BERMAN, 1989; ASSOULINE, 1993). Entretanto, a produção desses componentes é laboriosa e de custo elevado (SPIGELMAN et al., 1987). Outra opção que associa vantagens da presença de componentes da matriz extracelular a fatores de crescimento, como EGF e neurotrofinas, relaciona o uso de soro autógeno (TSUBOTA et al., 1999; TALIERI et al., 2005; BROOKS, 2008).

3. Regeneração epitelial e cicatrização

O epitélio corneal apresenta grande capacidade de regeneração que se dá por uma seqüência sistematizada de eventos (LAUS & ORIÁ, 1999; SAMPAIO, 2006). A reepitelização por mitose de uma córnea totalmente desnuda pode ocorrer num período entre 4 e 7 dias, posteriormente à ocorrência da lesão (ZIESKE et al., 1987).

Os defeitos superficiais do estroma corneal são preenchidos por células epiteliais, enquanto os profundos são, inicialmente, revestidos por epitélio e, posteriormente, pelo estroma inferior. As lesões estromais não complicadas recuperam-se sem vascularização. Nas feridas infectadas ou mais severas, a vascularização estará presente. Ocorrerá desorganização das fibrilas de colágeno. Com desorganização e perda da transparência corneal focal (SLATTER, 1990; GILGER & WHITLEY, 1999).

A manutenção da integridade da superfície corneal é considerada como a mais importante, relativamente à preservação da transparência e as qualidades ópticas da córnea (LU et al., 2001; GOMES et al., 2002). O epitélio corneal é parte integrante da superfície ocular e está em constante regeneração. Estima-se que ele seja renovado a cada 7 a 10 dias (TSENG et al., 1998). Após a lesão epitelial, inicia-se a reparação. O processo de reepitelização começa imediatamente à lesão epitelial e envolve interações entre as células epiteliais, estromais, glândula lacrimal e as do sistema imune (LU et al., 2001; WILSON et al., 2001). O reparo do

defeito epitelial pode ser dividido em três fases, de consoante com o tipo de evento preponderante: migração, proliferação e adesão epitelial. Trata-se de condições que se interagem (LU et al., 2001).

Células na periferia da lesão tornam-se achatadas e suas membranas emitem prolongamentos digitiformes que se estendem em direção à ferida (CROSSON et al., 1986).

Em uma segunda fase, evidencia-se intensa atividade mitótica. O defeito epitelial é recoberto, inicialmente, por uma rica camada de células, com estratificação progressiva por camadas celulares que mantém um aspecto alongado semelhante ao das células aladas e superficiais. Uma vez recoberta a área lesada, a migração celular cessa e a resposta mitótica diminui consideravelmente (LU et al., 2001).

Células inflamatórias invadem o estroma corneal, cerca de oito a 12 horas após a lesão primária. Essas células originam-se nos vasos sangüíneos do limbo e do filme lacrimal. Algumas células inflamatórias podem ser encontradas na córnea normal em estado inativo, podendo ser ativadas frente a um estímulo. A função delas é essencialmente de defesa e podem ser identificadas por meio de técnicas específicas de imunoistoquímica específicas (WILSON et al., 1996; TSENG et al., 2002).

A transparência corneal é, na maioria das vezes, restituída, e há remodelamento estromal com estabilidade refrativa (WILSON et al., 1996).

Conduas terapêuticas tendem a aliviar a dor, prevenir descemetoceloses, perfurações e, principalmente, restaurar a anatomia. Nas ceratites ulcerativas profundas, tratamento cirúrgico é requerido. Recomendam-se os recobrimentos conjuntivais, suturas diretas, retalhos conjuntivais e enxertos (autógenos, alógenos ou xenógenos), dentre outros procedimentos (SLATTER, 1990; LAUS, 2000). As condutas terapêuticas são empreitadas de acordo com a apresentação clínica da

lesão. Podendo ser clínicas, cirúrgicas, ou associadas (SLATTER, 1990; GILGER & WHITLEY, 1999).

Conduatas clínicas envolvem o uso tópico e sistêmico de antibióticos e analgésicos. Dentre os fármacos topicamente empregados citam-se os cicloplégicos (atropina e a tropicamida), midriáticos (fenilefrina) (GILGER & WHITLEY, 1999), fármacos de ação anti-proteases (EDTA, acetilcisteína e heparina) (NASISSE, 1996) e o soro sangüíneo (BRUNELLI et al., 2007; BROOKS, 2008). O soro sangüíneo, que contém inibidores de proteinases (alfa2 macroglobulina e beta1-antitripsina), atua de forma competitiva sobre determinadas classes específicas de metaloproteinases (BROOKS, 2008).

A beta irradiação, gamaglobulinas e cauterização têm sido utilizados (STARTUP, 1984; NASISSE, 1996). Delineamentos experimentais com sulfato de condroitina A (RANZANI et al., 2004; TALIERI et al., 2005; WOUK, 2006) e glicosaminoglicanos polissulfatados foram conduzidos e os fármacos recomendados no manejo de úlceras de corneais (TALIERI et al., 2005).

Sobre as manobras de cunho cirúrgico, a ceratotomia puntiforme ou em grade e o recobrimento conjuntival ou de terceira pálpebra, a aplicação de adesivos cirúrgicos (SAMUELSON, 1999), de enxertos de membranas biológicas são alternativas úteis e factíveis (NASISSE, 1996; LAUS, 2000; GELATT, 2003).

Em lesões mais graves, indicam-se as cirurgias reconstrutivas (SAMPAIO, 2006) como o enxerto livre de conjuntiva (SOUZA, 2003) notadamente o pediculado (HAKANSON & MERIDETH, 1987; MORALES et al., 1996), transposições córneo-esclerais (SLATTER, 1990; BRUNELLI et al., 2007), córneo-conjuntivais (GILGER & WHITLEY, 1999; TALIERI et al., 2005).

Inúmeros os que usaram membranas biológicas conduzindo terapêutica à regeneração corneal, como a membrana de celulose (PIPPI & SAMPAIO, 1990; SCHOENAU et al., 1993), cápsula renal eqüina (ANDRADE, 1996), túnica vaginal autógena a fresco (GALERA et al., 1999), escama de sardinha (LAUS, 2000),

pericárdio eqüino (GODOY et al., 2002), túnica vaginal alógena em glicerina (VICENTE, 2003), membrana amniótica ou alantoamiótica (BARROS et al., 1998; SOUZA, 2003) membrana de quitosana (COSTA, 2006), entre os mais citados.

SCHONEAU et al. (1993) avaliaram a membrana de celulose, na ceratoplatia em cães. E observaram resultados satisfatórios quanto ao reparo de córneas.

Barros et al. (1999) utilizaram pericardio de eqüino, conservado em glicerina, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. À microscopia de luz, encontraram infiltrado inflamatório agudo nas fases iniciais, e alguma pigmentação corneal nas fases tardias. Estudos similares foram conduzidos por SAMPAIO et al. (2006) empregando a membrana amniótica com resultados igualmente satisfatórios.

A escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) como sucedânea de lamelas corneais em ceratectomias superficiais mostrou-se útil para fins tectônicos (LAUS, 2000).

BARROS et al. (1995) estudaram membrana fetal eqüina, na ceratoplastia lamelar em coelhos e concluíram tratar-se de um material factível face os bons resultados cicatriciais e as poucas seqüelas.

Investigações científicas mostraram as vantagens da membrana amniótica sobre a redução da inflamação (FAIRBANKS et al, 2003; TIN & TAN, 2006). Relatam haver facilidade de adesão e migração de células epiteliais basais, prevenção da apoptose e restauração do fenótipo epitelial, em córneas que receberam a membrana aminiótica, não ofereceu a mesma rigidez para reparações tectônicas (TI & TAN, 2003). Investigou-se a ação angiogênica produzida pela membrana de quitosana sobre a córnea de coelhos com resultados alentadores (COSTA et al., 2006).

4. Membrana de Celulose

A utilização da membrana de celulose microfibrilar Bionext®, anteriormente conhecida por Biofill®, - curativo – barreira mecânica para feridas, resultou de uma descoberta atribuída à Luis Fernando Farah, em 1983 (REBELLO, 1987, TORRES, 2003). Por facilidade de obtenção (encontrada comercialmente no mercado) esta membrana tem sido empregada como implante para a substituição temporária da pele humana em queimaduras, abrasões, úlceras ou perdas teciduais (REBELLO, 1987; PIPPI & SAMPAIO, 1990; DALECK & BECHARA, 1991; SCHOENAU et al., 1993). Ela foi também, utilizada como substituto de meninge e como material de revestimos de *stents* intravasculares para evitar estenose circunferencial em artérias de grosso calibre (MARQUES, 1996; BROWN & MANNING, 1996; TORRES, 2003).

Em sua composição amontam-se polissacarídeos formados pela união de milhares de moléculas de celobiose (união de duas moléculas de glicose), sintetizadas por bactéria do gênero *Acetobacter xylinum*. comumente encontradas nas frutas em decomposição.

A membrana de celulose discreve-se diferentemente da celulose vegetal. Suas características físicas demonstram a constituição de microfibras não condicionadas, com permeabilidade seletiva, dificultando a entrada de microorganismos e mais permissiva a passagem de vapor de água e trocas entre os tecidos. A facilidade de aplicação justifica-se por ser flexível, homogênea e aderente. Sua aderência aumenta quando embebida em soro fisiológico estéril. Por seu aspecto semi-transparente, relata-se a facilidade de inspeção dos tecidos lesionados, permitindo a observação macroscópica (MARQUES, 1996, BROWN & MANNING, 1996; TORRES, 2003).

A membrana de celulose microfibrilar tem sido empregada em cirurgias reparadoras. Inicialmente, Rebello (1987) realizaram aplicações sobre feridas de pele, dermoabrasões e “*peeling*” facial em humanos. Relatou-se melhora nas

hipercromias, devido sua aderência, permanência e manuseio facilitado a baixos custos. Macroscopicamente, em úlceras traumáticas, observaram-se boa aderência, e ausência de secreção mucóide ou purulenta sob a membrana.

PIPPI (1990) utilizaram, experimentalmente a membrana de celulose, no reparo de lesões lamelares da córnea de coelhos. Em 1993 SCHOENAU et al. repararam com êxito as incisões corneais com sutura e membrana de celulose. Os autores relataram maior rapidez na regeneração do epitélio corneal e diminuição da infiltração por polimorfonucleares.

MARQUES (1996) ao empregar a membrana de celulose em feridas de papilas mamárias em vacas, notificou-a como material adequado para redução da freqüência de curativo, edema mais discreto e maior organização dos feixes de colágeno, comparativamente às feridas controle.

Na reparação microcirúrgica de nervo periférico com sutura e membrana de celulose em ratos, observou-se menor neuroma, comparativamente ao uso de adesivos, e de fio de sutura (TORRES, 2003).

Idealizou-se a presente pesquisa, no escopo de se avaliarem descritivamente, os eventos clínicos, histopatológicos e à imunoistoquímicos, na ceratoplastia lamelar em coelhos, empregando-se membrana de celulose microfibrilar Bionext®.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Considerações éticas

A pesquisa foi realizada atendendo às normas internacionais da *Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)*, de consoante com o Código de Nüremberg (GOLDIM, 1995). Bem como, após aprovação pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal (Protocolo n° 008771-07).

2. Animais

Foram utilizados 30 coelhos, machos, da raça Nova Zelândia, brancos, com peso médio de 3000g e 120 dias de idade em média, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP).

Objetivando-se a utilização de indivíduos em condições padronizadas, os animais foram avaliados, previamente à sua inclusão na pesquisa, seguindo as semiotécnicas clínica e oftálmica rotineiras. Empregaram-se o teste de lágrima de Schirmer ¹, a biomicroscopia com lâmpada em fenda, ² tonometria de aplanção ³, oftalmoscopia binocular indireta ⁴ e a prova da fluoresceína ⁵. Selecionados os coelhos sadios, estes foram identificados e mantidos em gaiolas apropriadas, em

¹ Teste da Lágrima de Schirmer -Ophthalmos®,

² Slit Lamp SL-14 -Kowa Company, USA

³ Tono Pen XL- Mentor Medical Systems

⁴ OHC 3.3 - Eyetec

⁵ Fluoresceína strips - Ophthalmos®

ambiente ventilado, limpo, seco e protegido. Como alimento, forneceu-se ração comercial ⁶ e água potável *ad libitum*.

3. Membrana de celulose microfibrilar Bionext®

O material foi doado pela BIONEXT PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS LTDA - São Paulo- capital, que empregou, como matéria prima, a celulose, sintetizadas por bactéria do gênero *Acetobacter xylinum* (Figura 1).

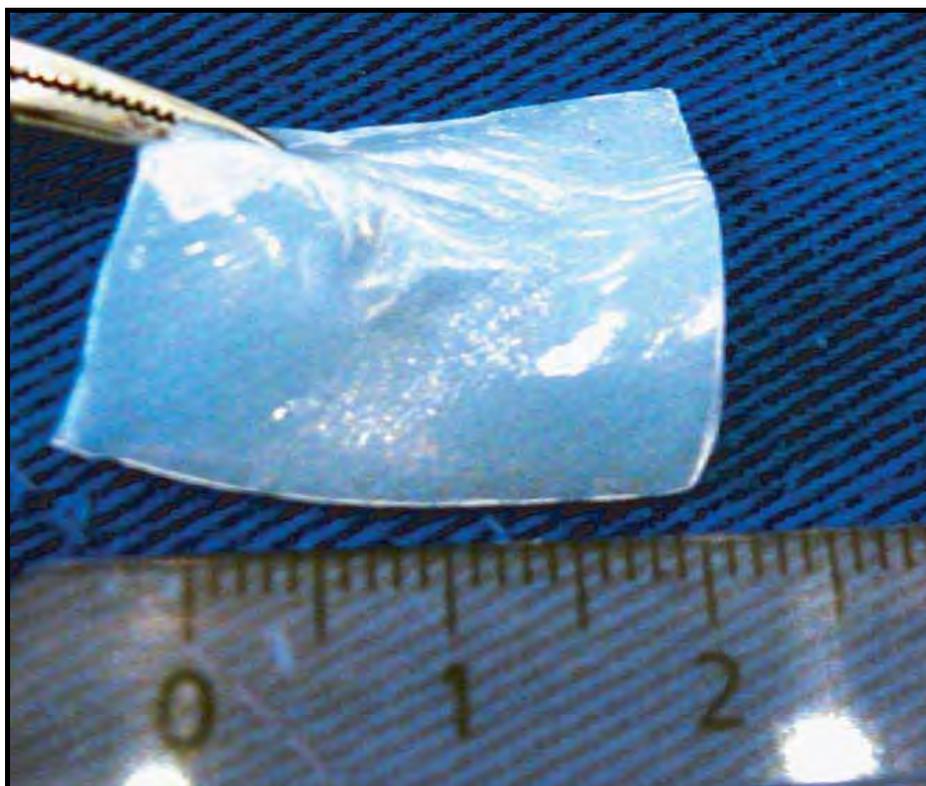


Figura 1. Imagem fotográfica da membrana de celulose microfibrilar Bionext®, apresentada em fragmento com dimensões de 1,0 x 1,5 cm e 0,2 mm de espessura aproximadamente. São Paulo, 2007.

⁶ Ração para coelhos -Purina®

4. Delineamento Experimental

4.1 Grupos Experimentais

Constituíram-se cinco grupos compostos por seis animais para avaliação clínica diária e laboratorial aos um, sete, quinze, 30 e 60 dias de pós-operatório. Consideraram-se os sinais clínicos e os achados histopatológicos e imunohistoquímicos.

4.2 Procedimentos Anestésicos e cirúrgicos

4.2.1 Anestesia

Empregou-se a medicação pré - anestésica com acepromazina⁷ na dose de 0,2 mg/Kg por via subcutânea. Seguiu-se aplicação da associação de quetamina⁸ e cloridrato de xilazina⁹, na dose de 30 e 5 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente, por via intramuscular. Para indução e manutenção anestésicas, utilizou-se o isoflurano,¹⁰ fornecido com máscara facial, diluído em 100% de oxigênio, em circuito com reinalação parcial de gases, dotado em vaporizador universal.

⁷ Acepran® -Vetnil

⁸ Cetamin® -Syntec, Brasil

⁹ Rompum® - Cristália

¹⁰ Isoflurine® -Cristália

4.2.2 Ceratoplastias Lamelares

As intervenções cirúrgicas foram efetuadas com auxílio de microscópio cirúrgico ¹¹, em aumento de 16 vezes. Após medidas rotineiras de anti-sepsia, proteção do campo operatório, blefarostase e fixação do bulbo do olho, as seis e 12 horas, correspondentes a um relógio, com fio monofilamentar encastado de fábrica 4.0 ¹². Criou-se, com auxílio de um trépano ¹³ de 5 mm de diâmetro, um botão lamelar compreendendo epitélio e cerca de metade da espessura do estroma, posicionado centralmente à pupila. A excisão da lamela corneal foi realizada por dissecação com lâmina de bisturi angulada ¹⁴ (Figura 2).

Após secagem da córnea, a membrana de celulose estéril foi mantida por um minuto, em solução salina 0,9% estéril, e recortada no diâmetro de 5 mm e foi fixada diretamente sobre o leito receptor com sutura com pontos simples separados, eqüidistantes, em média de 1 mm, utilizando-se fio monofilamentar encastado de fábrica 9.0. ¹⁵

Findados os tempos operatórios, a região, que fora cuidadosamente irrigada com solução fisiológica estéril 0,9% ¹⁶, foi limpa e os pontos de fixação conjuntival foram soltos (Figura 2).

¹¹ Microscópio Cirurgico MC – M9 -DF Vasconcelos®

¹² Nylon 4-0 (Bioline®, Brasil)

¹³ Trépano para córnea com medidor de profundidade (Jomubi® equipamentos de precisão, Brasil)

¹⁴ CM Phaco Slit Blade Angled 5,2mm; 45 Deg.; Bevel up. (EAGLE, USA)

¹⁵ Nylon 9-0(Johnson´s & Johnson´s)

¹⁶ Solução Fisiológica 0,9% - Halex Istar

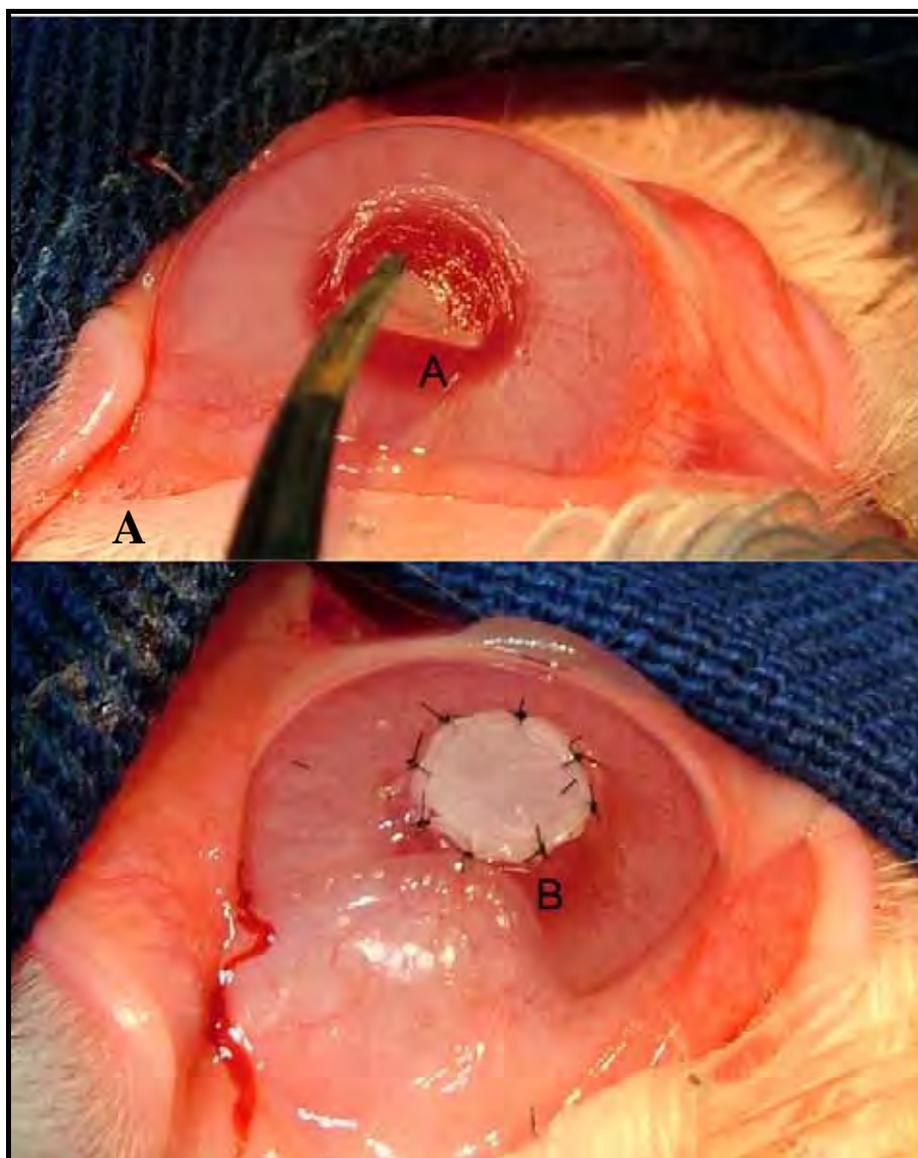


Figura 2. Imagens fotográficas de olho de coelho, durante procedimento em ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Excisão da lamela corneal com lâmina de bisturi angulada (A). Sutura finalizada para a fixação do enxerto (B). São Paulo, 2007.

4.2.3 Cuidados pós-operatórios

Empregou-se, topicamente tobramicina¹⁷ a 0,3% em instilações intercaladas de seis horas durante sete dias consecutivos, e buprenorfina ¹⁸ na dose de 0,02 mg/kg, por via subcutânea, a cada doze horas, durante os cinco dias consecutivos.

5. Protocolos de Avaliação

5.1 Avaliação clínica

Os estudos clínicos tiveram seu início no primeiro dia de pós-operatório e se seguiram a intervalos regulares de 24 horas, durante 60 dias consecutivos. Eventos intercorrentes com a evolução pós-operatória e demais manifestações oculares foram investigados, compilados e catalogados.

Avaliaram-se os graus de blefaroespasma, fotofobia, edema corneal, secreção ocular, hiperemia conjuntival, neovascularização, opacidade e pigmentação corneal. Os parâmetros de comparação, uma vez identificados, foram quali-quantificados segundo critérios em que (0) correspondeu à ausência de quaisquer dos eventos, (1) manifestação leve dos animais, (2) sinais moderados e (3) sinais intensos. Para a avaliação dos eventos, os protocolos semiotécnicos foram os mesmos utilizados na seleção dos mesmos, à exceção da prova de fluoresceína, dado que a membrana de celulose, a exemplo do estroma, é hidrofílica.

¹⁷ Tobramicina 0,3% Solução Oftálmica 5ml (Alcon®, Brasil)

¹⁸ Tengesic® (Shering Plough, Brasil)

5.2 Histopatologia

Para avaliação dos eventos, segundo a microscopia de luz,¹⁹ foram considerados os períodos de um, sete, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. Respectivamente: Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 e Grupo 5.

Seguindo protocolo anestésico já descrito em capítulo anterior e após rigorosa inspeção macroscópica, os olhos foram enucleados de sua órbita, limpos com solução fisiológica 0,9% e imersos em solução fixadora de formol tamponado a 10%. Posteriormente, foram reduzidos sagitalmente à área do enxerto, segundo meridianos paralelos e imersos em álcool etílico, a concentrações crescentes de 70% a 100%. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina,²⁰ cortadas em micrótomo,²¹ à espessura de 3 µm, coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE), e pelo Tricrômico de Masson.

5.3 Imunoistoquímica

5.3.1 Técnica e descrição

As lâminas para avaliação à imunoistoquímica foram processadas igualmente às descritas no capítulo anterior. Em seguida, foram acondicionadas em estufa²² por 40 minutos a uma temperatura de 75°C. Posteriormente, com o propósito de se atingir a recuperação antigênica, as mesmas foram submetidas a 4 passagens de imersão em xilol²³ em temperatura ambiente, e mantidas durante

¹⁹ Microcópico Cirúrgico 342 - Zeiss®

²⁰ PATHCENTRE = Shandon® Liipshaw® - Astmoor, Rucorsns Cheshire, Wat 1 PR England, 171 Industry Dwe, Pittsburgh, Pensilvania – USA

²¹ Microtomos - Shandon® Firene 325

²² Estufa - Fenem®

²³ Xilol (Xilol PA, Dinâmica)

5 minutos em cada uma. Ato contínuo, foram colocadas em panela de vapor ²⁴ a 95 graus, em tampão de EDTA com pH 8,0, por 30 minutos.

Seguiram-se lavagens durante dez minutos em água oxigenada e, posteriormente, em água corrente. Findada esta etapa, as lâminas foram lavadas com tampão TRIS HCL ²⁵, e receberam aplicação do anticorpo Ki67 ²⁶ diluído na proporção de 1:50. Posteriormente, foram mantidas à temperatura de 8°C, durante a noite, por 12 horas.

As lâminas foram submetidas à nova lavagem com tampão TRIS HCL e incubadas com o anticorpo secundário ²⁷ durante 20 minutos para, novamente, serem lavadas com tampão TRIS HCL. Preparou-se a solução de DAB ²⁸ dissolvida em PBS ²⁹ e em peróxido de hidrogênio. Adicionando-se a cada uma das lâminas, que foram mantidas por um período de 15 minutos. Seguiu-se nova lavagem em água corrente e, posteriormente, em água destilada.

O Ki67 é um antígeno expresso durante todo o ciclo celular, exceto em G1 inicial e em G0, sendo que sua expressão antigênica aumenta durante a última metade da fase S, alcançando um pico máximo na fase G2 e mitose. Sua meia-vida é curta, situando-se em torno de menos de uma hora após a mitose, o que é uma vantagem, já que garante apenas a marcação das células que tenham concluído o ciclo celular. Seguiu-se a contagem de células imunomarcadas utilizando o anticorpo Ki67 para avaliação da mitose, quantificando a proliferação celular nas lâminas aqui estudadas.

²⁴ Arno® Exotic

²⁵ Shandon Instant (ph- 7,4)– Pittsburg - Merck®

²⁶ Anticorpo cytotation monoclonal-mouse, anti human KI67, clone MIB-1 (Dako, cod 00027229)

²⁷ Biot. Link Universal (Kit LSAB® + System – HRPDAKO ref K0690)

²⁸ DAB – Diaminobenzidina, da Sigma

²⁹ PBS (ph 7,2) preparado no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Sírio Libanês-SP

5.3.2 Contagem de Células

As leituras das lâminas foram quantificadas por imunorreatividade das células marcadas mostrando uma coloração acastanhada, realizadas em microscópio óptico,³⁰ padronizaram-se em 10 campos microscópicos, na área central do enxerto, sendo cada campo correspondente à área aproximada de 40 X ∞/ 0,17 WD 0,65. Avaliaram-se duas camadas da córnea, o epitélio e o estroma.

As leituras foram realizadas em duplo cego e as imagens foram capturadas e fotografadas³¹, independentemente da intensidade de sua marcação.

5.4 Avaliação à estatística

Os dados foram analisados ao longo do tempo da resposta cirúrgica, sendo:

- A) Análise de escore total e de cada item (sinais clínicos) do escore avaliados diariamente.
- B) Análise das lâminas para imunoistoquímica ao longo do tempo (períodos: um, sete, quinze, 30 e 60 dias) incluindo epitélio e estroma.

Empregaram-se a análise de Variância (ANOVA) e nos pós testes usaram-se comparações múltiplas de médias com teste LSP (least significance difference) apenas para imunoistoquímica.

³⁰ Olympus BX 400®

³¹ Software de captura de imagens PIXE LINK CAPTURE APPLICATION

III. RESULTADOS

1. Avaliação clínica

Não foram verificadas alterações sistêmicas.

Os resultados obtidos, obedecendo o critério quali-quantitativo, revelaram que o blefaroespasma iniciou-se ao primeiro dia, em grau leve (1) em todos os animais, passando a moderado (2) do quarto ao décimo quarto dias, decrescendo para ausente (0) e assim se mantendo dessa forma até os 60 dias (Figura 3 e Tabela 2).

Relativamente á fotofobia, sua manifestação em intensidade, deu-se semelhante ao blefaroespasma (Figura 4 e Tabela 2).

Sobre o edema, ele foi leve (1) do segundo dia ao 18º dia, em todos os animais, decrescendo para ausente (0) e assim se mantendo por toda a avaliação (Figura 5 e Tabela 2).

A secreção ocular mostrou-se em intensidade moderada (2) do segundo dia ao 16º dia, decrescendo para leve (1) entre os dias 17 e 48, para tornar-se ausente ao final das observações (Figura 6 e Tabela 2).

No que se refere a hiperemia conjuntival, foi intensa (3) a partir do segundo dia, envolvendo para moderada (2) até o 28º dia, e ausente(0) aos sessenta dias (Figura 7 e Tabela 2).

A neovascularização foi evidente já ao 15º dia, mas de forma leve até o 48º dia, decrescendo e se tornando ausente (Figura 8 e Tabela 2).

Quanto à opacidade corneal, manifestou-se ausente (0) desde o primeiro até o 44º dia, aumentando para leve (1) por dois dias consecutivos, fato relacionado a dois indivíduos, porém a partir do 46º dia os eventos manifestaram-se ausentes (0) para todos os animais (Figura 9 e Tabela 2).

Relativamente à pigmentação, podê-se somente observá-la a partir do 30° dia em dois animais, apenas, na forma leve e até o onde o 48° dia, para se tornar ausente (0) até o final das observações (Figura 10 e Tabela 2).

Quanto à estatística, encontraram-se diferenças significativas entre médias dos grupos ao longo do tempo (Tabela 1).

Tabela 1. Valores expressos em médias e desvio padrão, respectivamente, ao Teste LSP (Least Significance Difference) para variáveis: Blefaroespasma, Hiperemia conjuntival, Secreção, Fotofobia, Opacidade Corneal, Edema, Pigmentação, Neovascularização, nos período de pós operatório de ceratoplastias lamelares com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em coelhos, durante os períodos : 1 dia (G1); 7 dias (G2); 15 dias (G3); 30 dias (G4); 60 dias (G5). São Paulo, 2008.

Sinais clínicos	G1	G2	G3	G4	G5
Blefaroespasma	1,00 ± 0,78	1,46 ± 0,88	1,17 ± 1,15	0,50 ± 0,84	0,00 ± 0,00
Hiperemia	2,63 ± 0,58	2,17 ± 0,82	2,06 ± 1,11	0,83 ± 1,83	0,67 ± 0,52
Secreção Ocular	1,75 ± 0,74	1,75 ± 0,68	2,11 ± 1,02	0,17 ± 0,41	0,17 ± 0,41
Fotofobia	1,08 ± 0,93	1,33 ± 0,64	1,56 ± 1,10	0,17 ± 0,41	0,00 ± 0,00
Opacidade	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,28	0,72 ± 0,89	0,50 ± 0,55	0,00 ± 0,00
Quemose	1,33 ± 0,96	1,58 ± 0,83	1,72 ± 1,07	0,33 ± 0,84	0,00 ± 0,00
Pigmentação	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,84 ± 0,41	0,00 ± 0,00
Neovascularização	0,04 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,72 ± 1,07	1,00 ± 0,63	0,00 ± 0,00

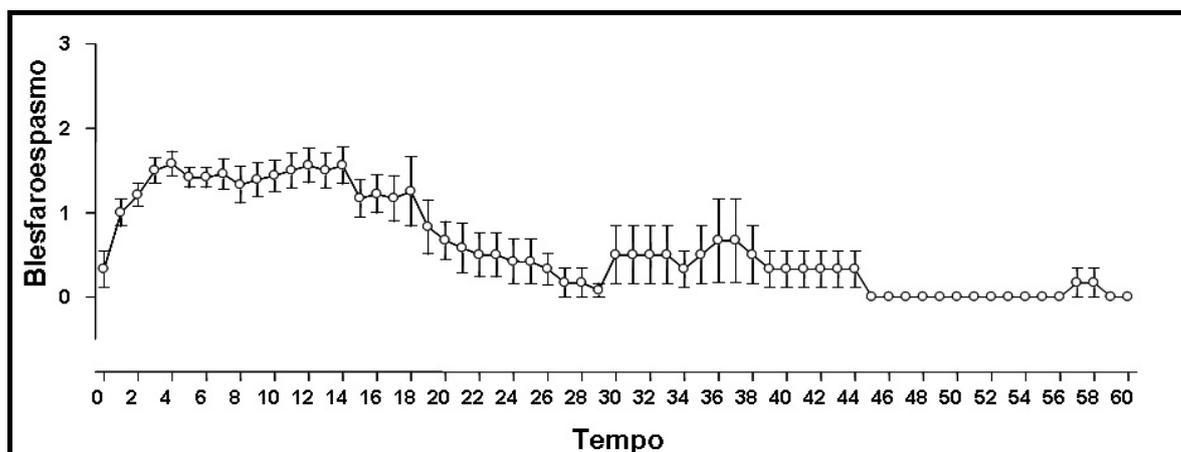


Figura 3. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto ao blefaroespasma segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2008.

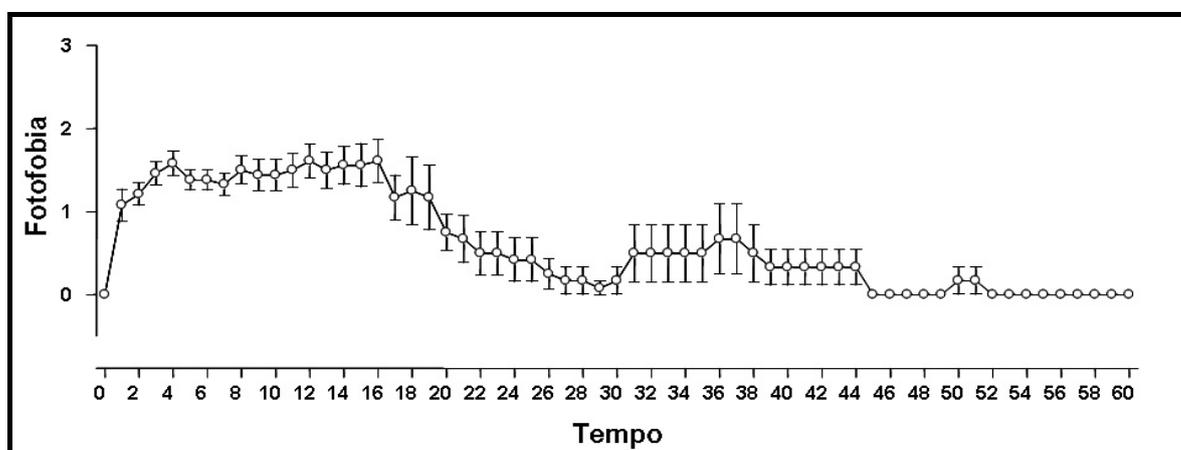


Figura 4. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à fotofobia, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2008.

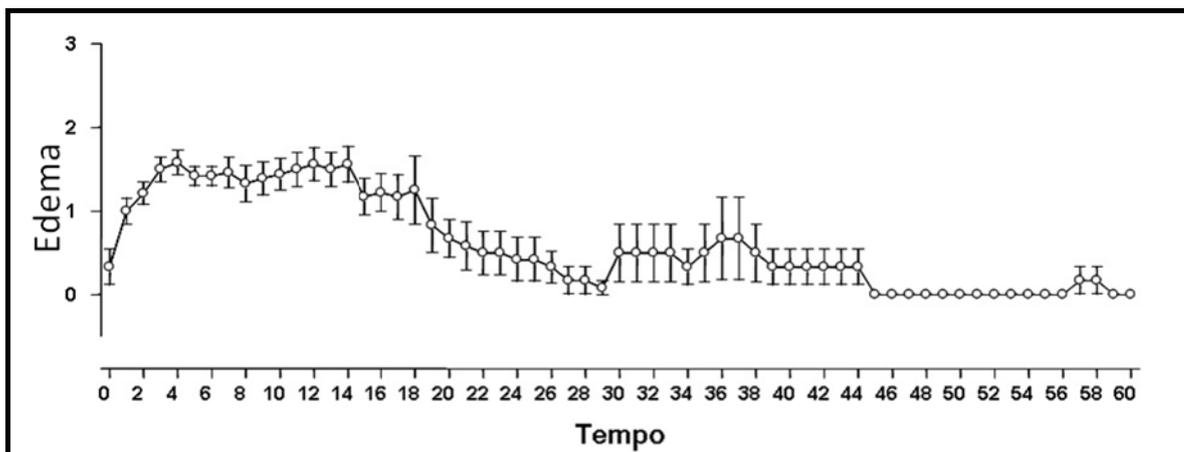


Figura 5. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à edema, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2008.

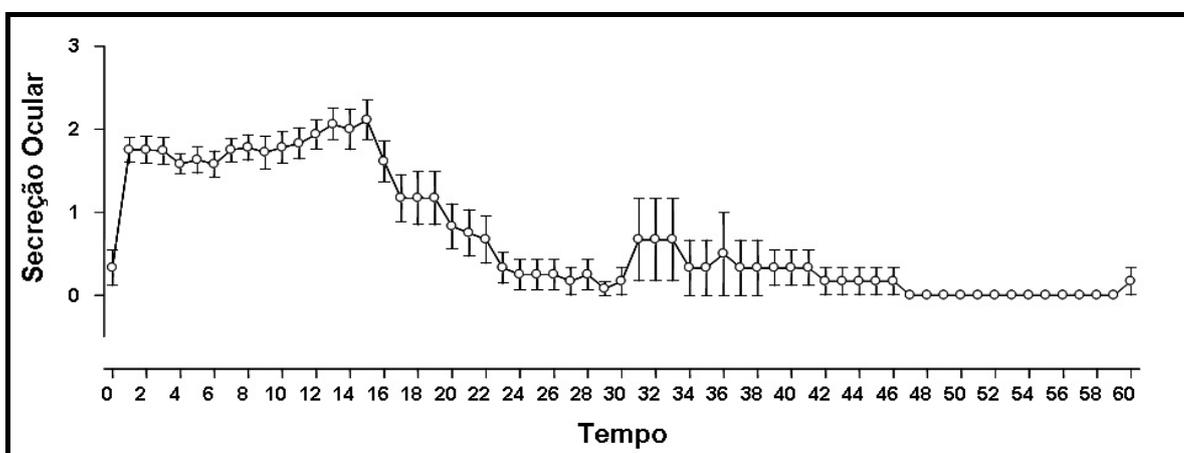


Figura 6. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à secreção ocular, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2008.

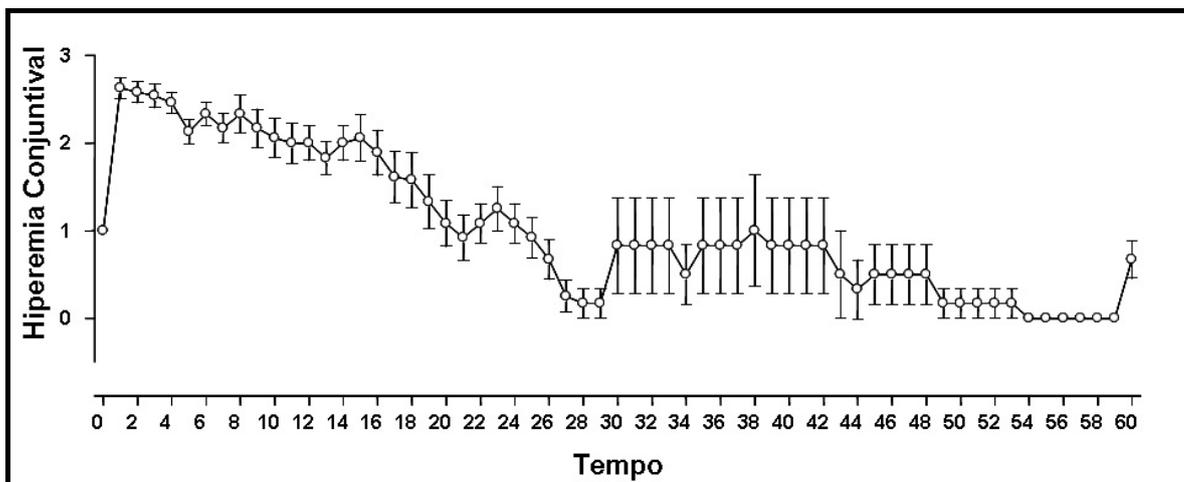


Figura 7. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à hiperemia conjuntival, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2008.

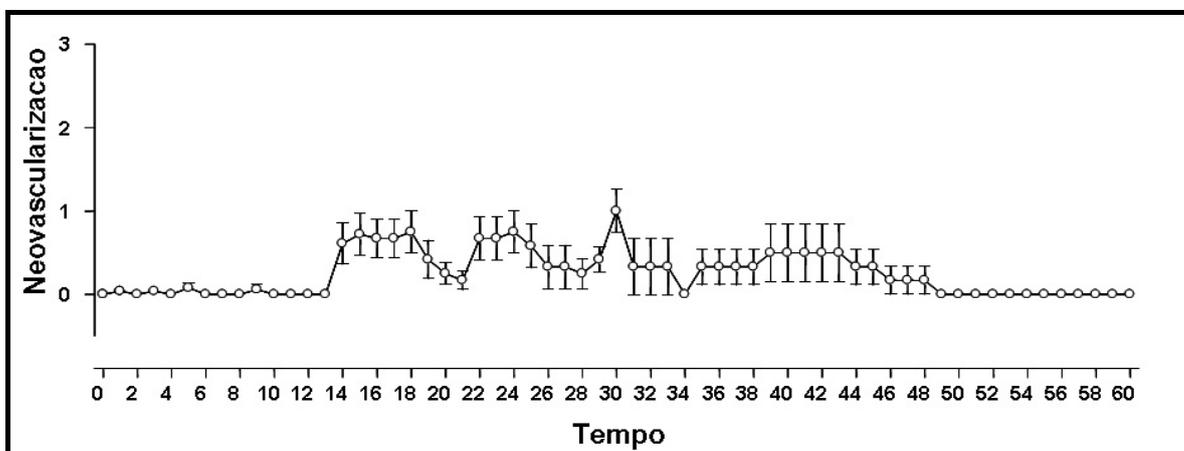


Figura 8. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à neovascularização corneal, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2008.

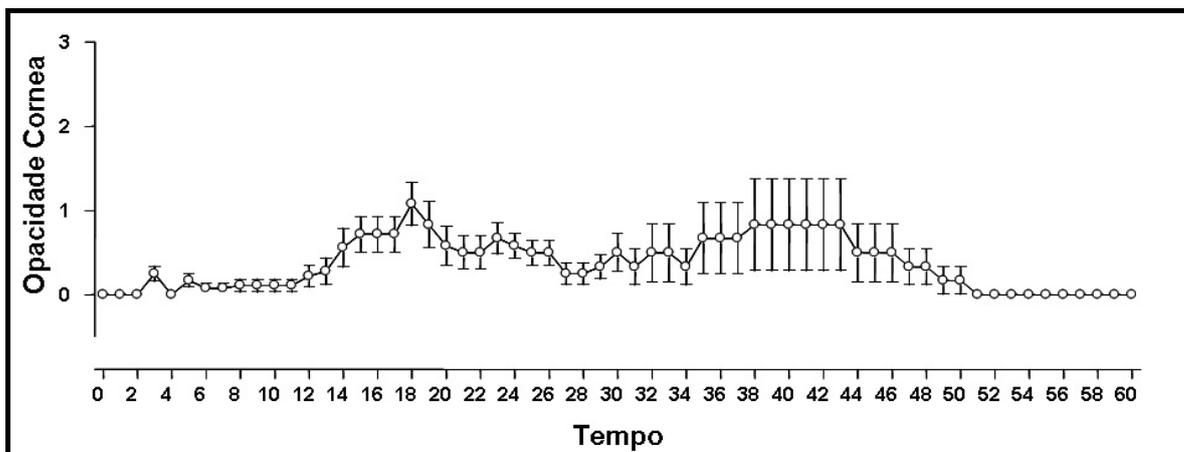


Figura 9. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à opacidade da córnea, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2008.

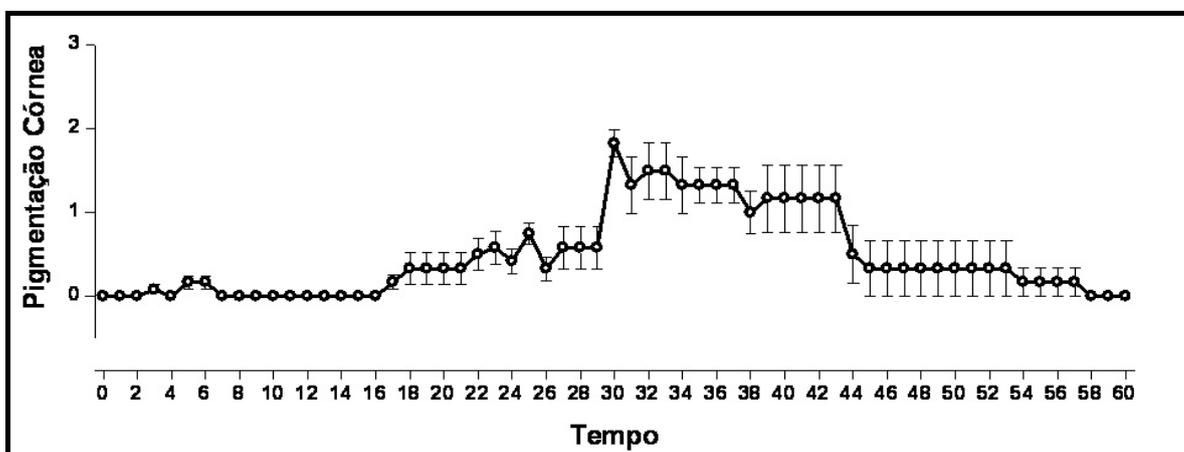


Figura 10. Representação gráfica da avaliação clínica temporal, quanto à pigmentação corneal, segundo o critério quali-quantitativo em córnea de coelhos submetidos à ceratoplastia lamelar com a membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Escala de 0 a 3 corresponde à intensidade dos sinais clínicos: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso. São Paulo, 2007.

As figuras de 11 a 15 ilustram os eventos clínicos que decorreram, notadamente os de maior significação.



Figura 11. Imagem fotográfica de pós-operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, ao primeiro dia. Notar edema moderado na periferia do enxerto (A). Pontos de sutura na córnea (B). São Paulo, 2007.

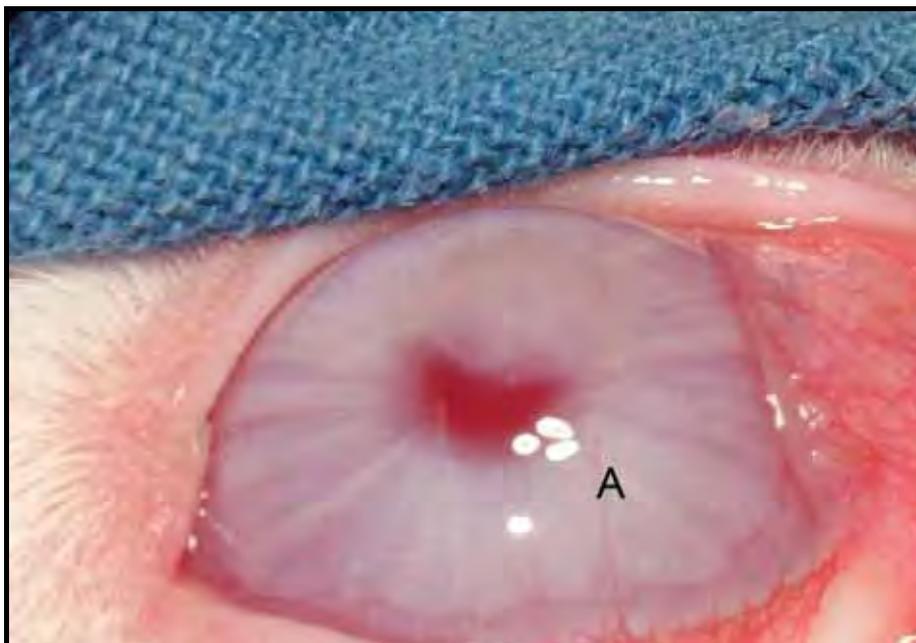


Figura 12. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, ao sete dias. Notar vasos na córnea, epitélio contínuo e protusão leve de terceira pálpebra (A). São Paulo, 2007.



Figura 13. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, aos 15 dias. Notar neovasos sobre a área do enxerto (A). São Paulo, 2007.



Figura 14. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, aos 30 dias. Notar ausência de hiperemia conjuntival e macula na área central (A). São Paulo, 2007.

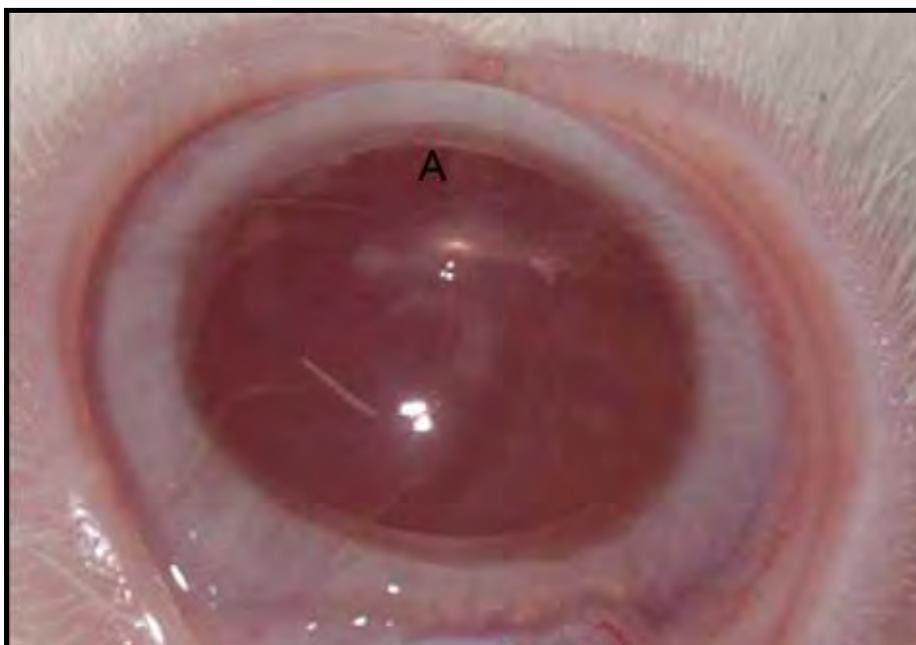


Figura 15. Imagem fotográfica de pós operatório da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® em olho de coelho, aos 60 dias. Notar eixo visual central com leve opacidade (A). São Paulo, 2007.

2. Histopatologia

A análise, à microscopia, das córneas dos grupos avaliados mostrou que em todos os animais, a evolução temporal da reparação cicatricial deu-se de maneira similar. As principais alterações foram identificadas nas áreas próprias às lesões sob o enxerto. Não obstante, evidenciaram-se pequenas diferenças nos componentes celular e vascular e na organização do tecido corneal, entre os grupos.

No primeiro dia, identificou-se ausência do epitélio e o processo inflamatório foi predominantemente polimorfonuclear (PMN), caracterizado pela presença de neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos sub-epiteliais próximos à membrana basal. As fibras colágenas apresentaram-se desorganizadas, entremeadas por fibroblastos ativos (Figura 16 e 17).

A partir do sétimo dia, o infiltrado começou a decrescer, embora se mantivesse presente, proliferação de fibroblastos ativos e desorganização do colágeno. Células mononucleares, representadas por macrófagos, linfócitos e por plasmócitos, evidenciadas por migração leucocitária. Notou-se um novo tecido proporcionando reepitelização corneal (Figura 18).

Aos 15 dias, verificou-se epitélio plano estratificado contínuo mediado pela presença de macrófagos, ceratócitos, poucos linfócitos, raros PMN e proliferação de neovasos englobando o enxerto (Figura 19). O tecido neoformado passou a envolver todo o enxerto. Neste período ele se constituía por muitos fibroblastos, completando sua migração e primeiramente observados a presença moderada de neovasos na periferia do enxerto (Figura 19 e 20).

Aos trinta dias, observou-se tecido mais espesso abaixo do epitélio corneal, formado por inúmeros fibroblastos em remodelação, caracterizando a fase de amadurecimento do tecido cicatricial. Havia ainda, fibras desorganizadas. (Figura 21 e 22).

Aos 60 dias, predominavam raros mononucleares, fibras colágenas organizadas, epitélio corneal não espessado e íntegro (Figura 23 e 24).

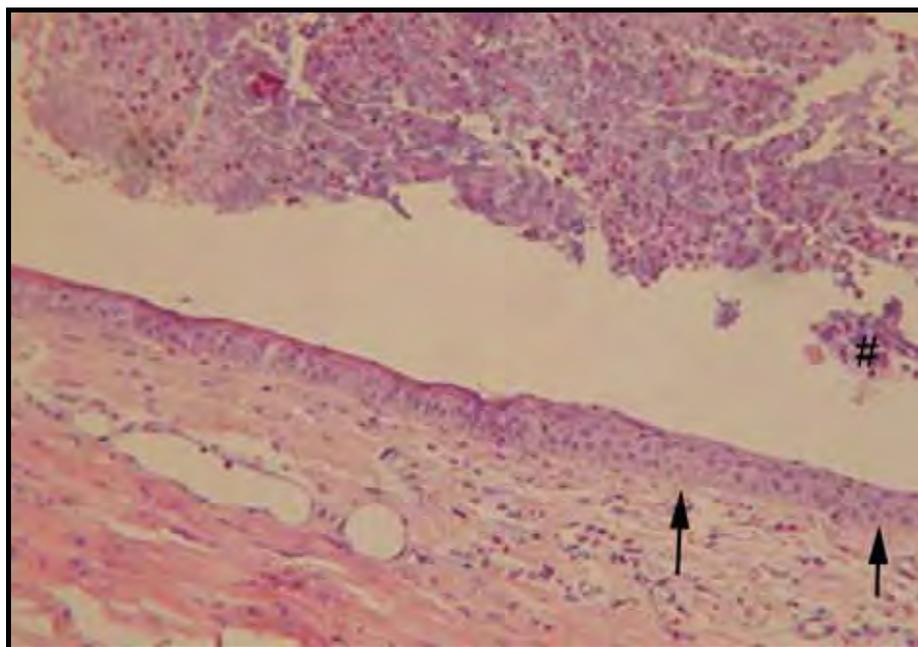


Figura 16. Fotomicrografia da córnea de coelho no 1º dia após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar ausência do epitélio corneal e infiltrado de polimorfonucleares (seta) e enxerto acima do epitélio (#). 40x HE. São Paulo, 2007.

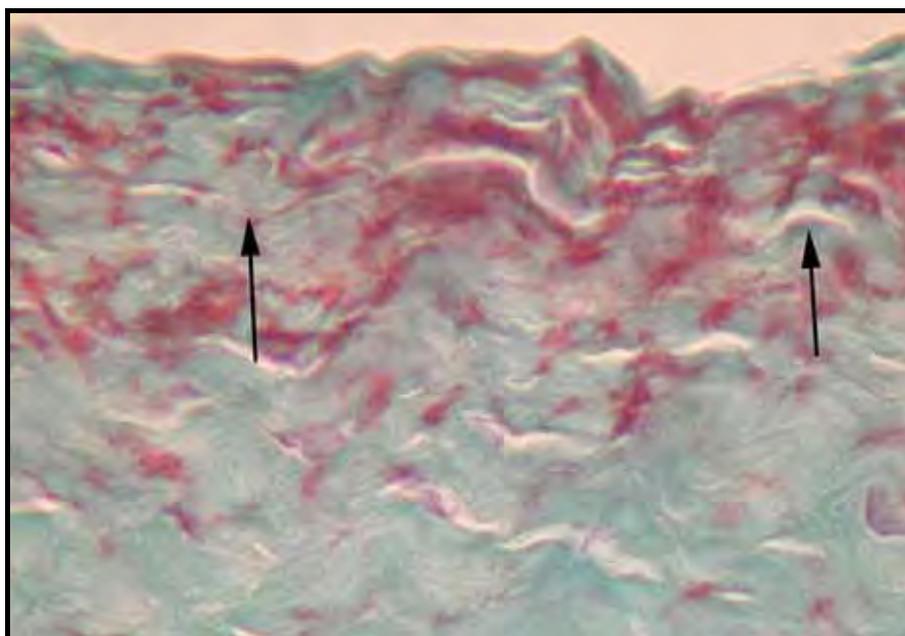


Figura 17. Fotomicrografia da córnea de coelho no 1º dia após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar perda do epitélio corneal com desorganização de fibras colágenas (seta). 40x Tricrômico de Masson. São Paulo, 2007.

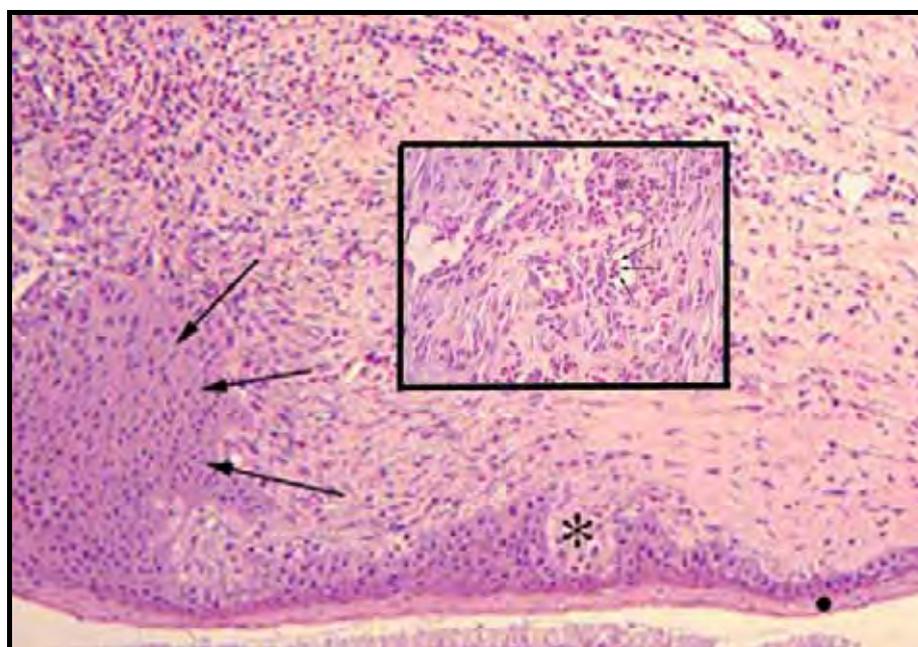


Figura 18. Fotomicrografia da córnea de coelho no 7º dia após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar presença intensa de vasos (seta) com migração de células mononucleares e marginação leucocitária (no detalhe). 40x e 100x. HE. São Paulo, 2007.

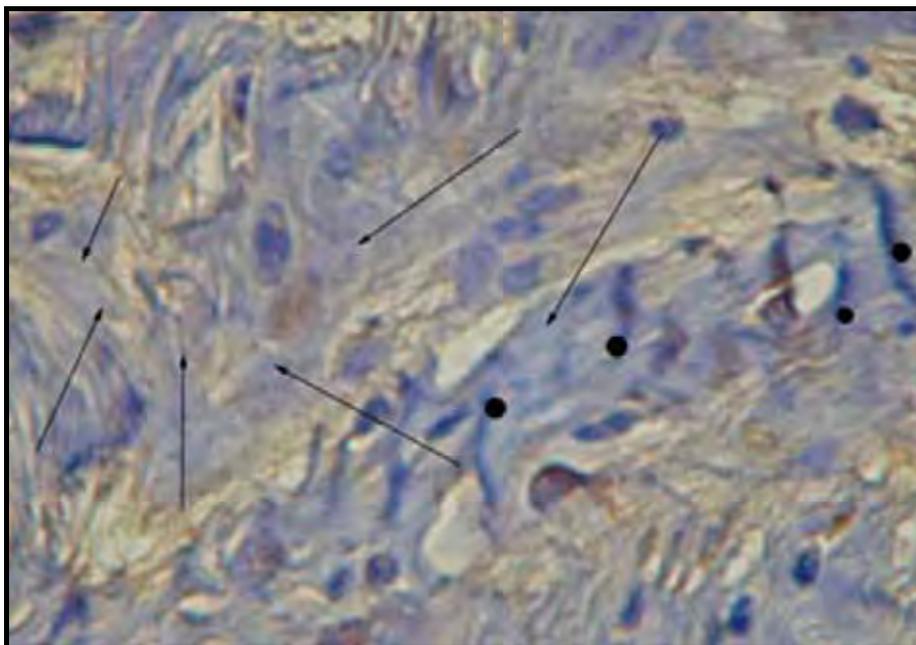


Figura 19. Fotomicrografias de córneas de coelhos aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar tecido neoformado, intensa quantidade de fibras colágenas (setas) e diminutos brotos vasculares e infiltrado inflamatório (●). 40x Tricrômico de Masson. São Paulo, 2007.

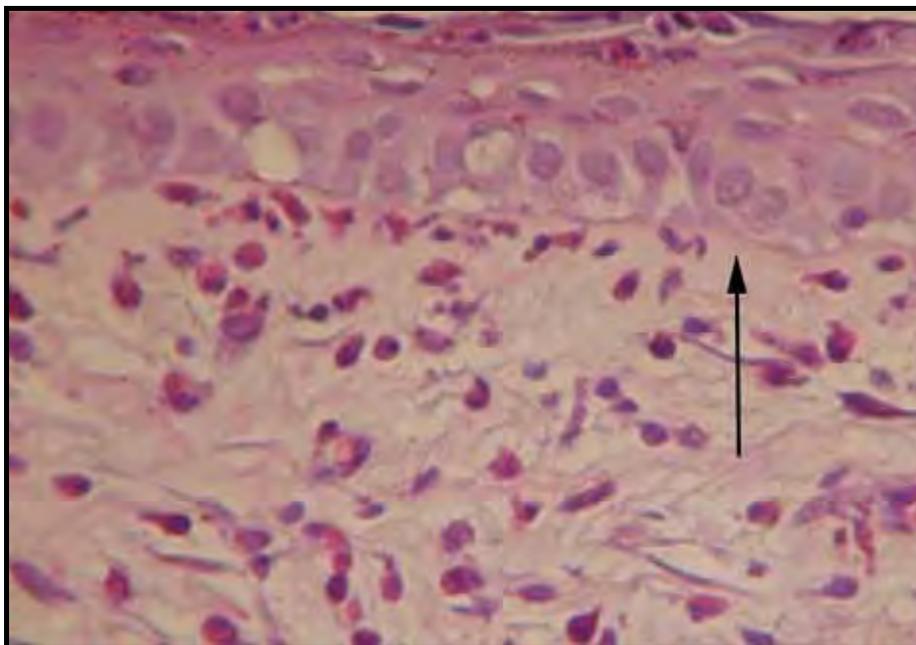


Figura 20. Fotomicrografias de córneas de coelhos aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar hiperplasia com hipertrofia acentuada de células basais (seta). 40x HE. São Paulo, 2007.

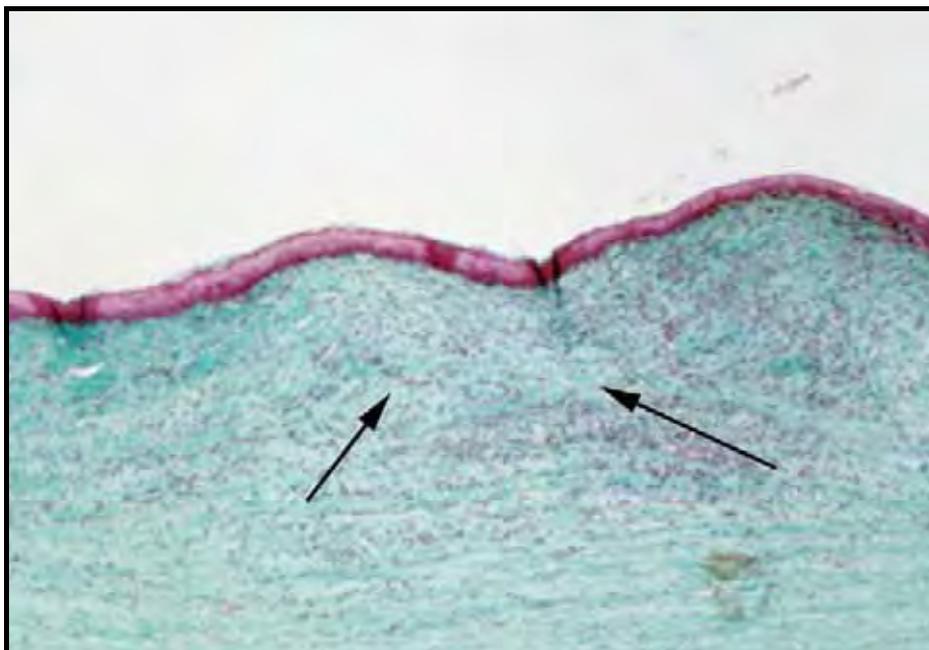


Figura 21. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar colágeno em fase de remodelação (seta). 40x Tricômico de Masson. São Paulo, 2007.

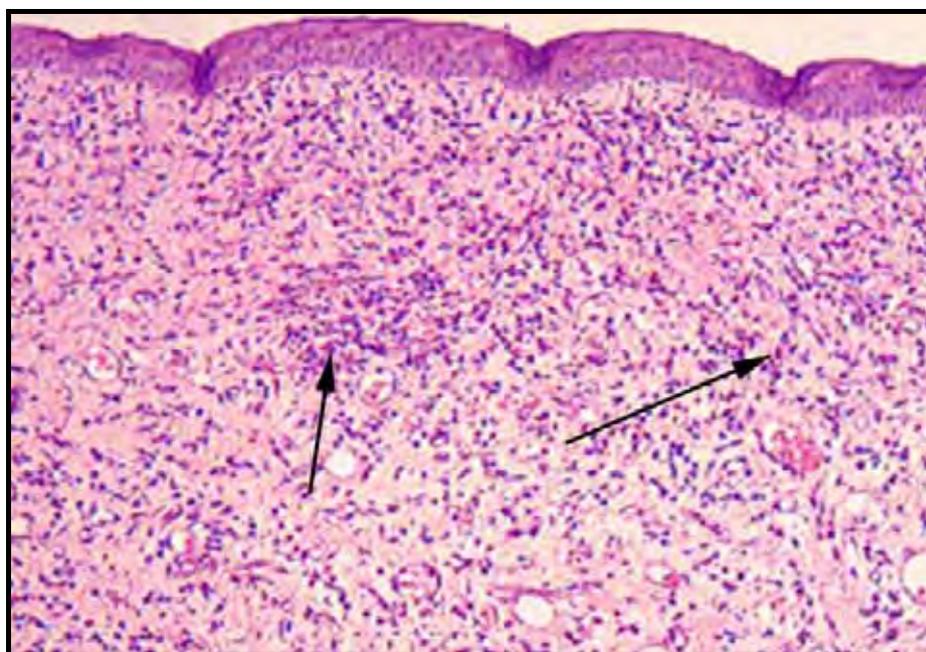


Figura 22. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar presença de neovasos (setas). 40x HE. São Paulo, 2007.

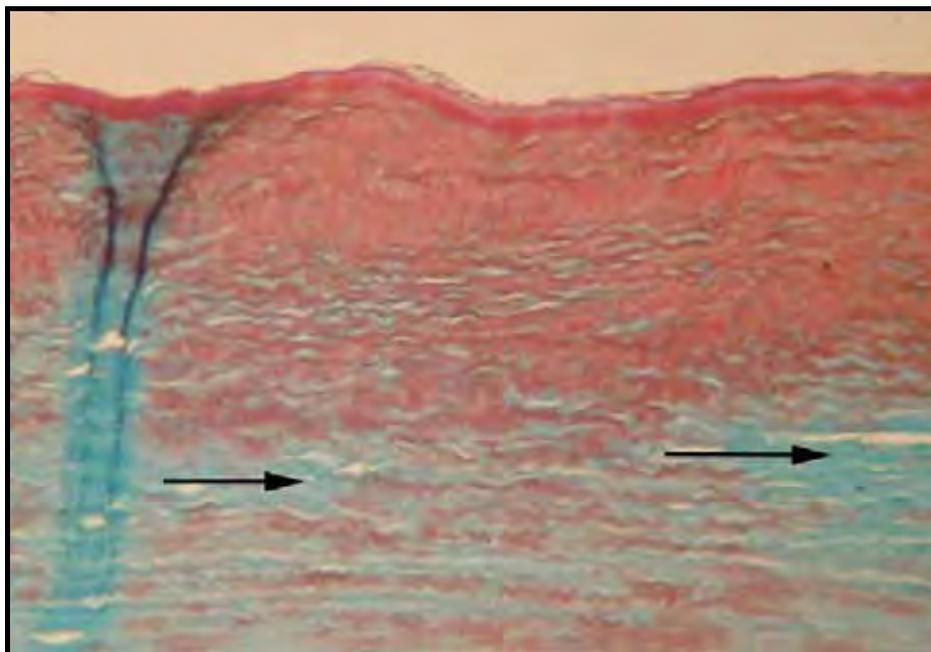


Figura 23. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar organização de fibras colágenas (seta). 40x Tricrômico de Masson. São Paulo, 2007.

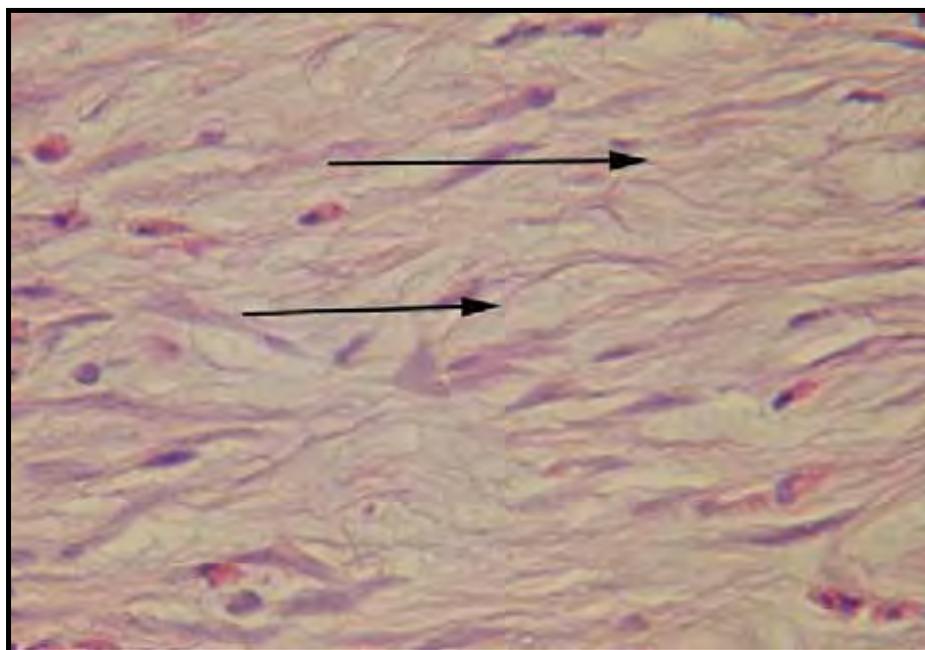


Figura 24. Fotomicrografia de córnea de coelho nos 60 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Notar fibras de colágeno paralelas e ordenadas (seta). 100x HE. São Paulo, 2007.

3. Imunoistoquímica

O número de células marcadas pelo anticorpo Ki67 variou com o tempo de evolução da reparação corneal. Deu-se particularmente no epitélio, exibindo grande variação de células marcadas (Figuras 25 e 26). Os maiores índices quantitativos de mitose por campo foram de $0,71 \pm 0,65$ aos quinze dias de pós-operatório, no epitélio (Figura 27) e de $1,06 \pm 1,78$ aos trinta dias no estroma corneal (Tabela 2 e Figura 28). Houve diferença significativa entre epitélio e estroma ($p = 0,04$).). As médias do índice de mitose para cada período quando comparadas, por Análise de Variância, indicou diferença significativa entre os dois eventos estudados. No epitélio, essas diferenças ocorreram entre os períodos de um dia e 15 dias ($p= 0,042$). Já no estroma observou-se entre o primeiro dia com o 30° dia ($p=0,049$).

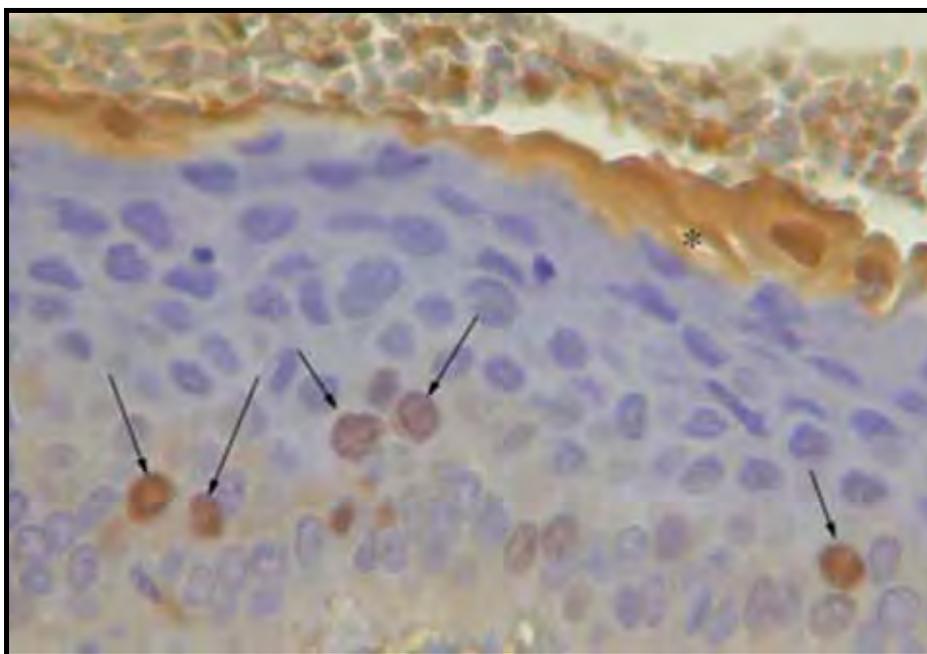


Figura 25. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Imunoistoquímica para marcador de proliferação celular Ki67. Notar diferença de imunorreatividade positiva para as células marcadas no epitélio (setas). 40x. São Paulo, 2007.

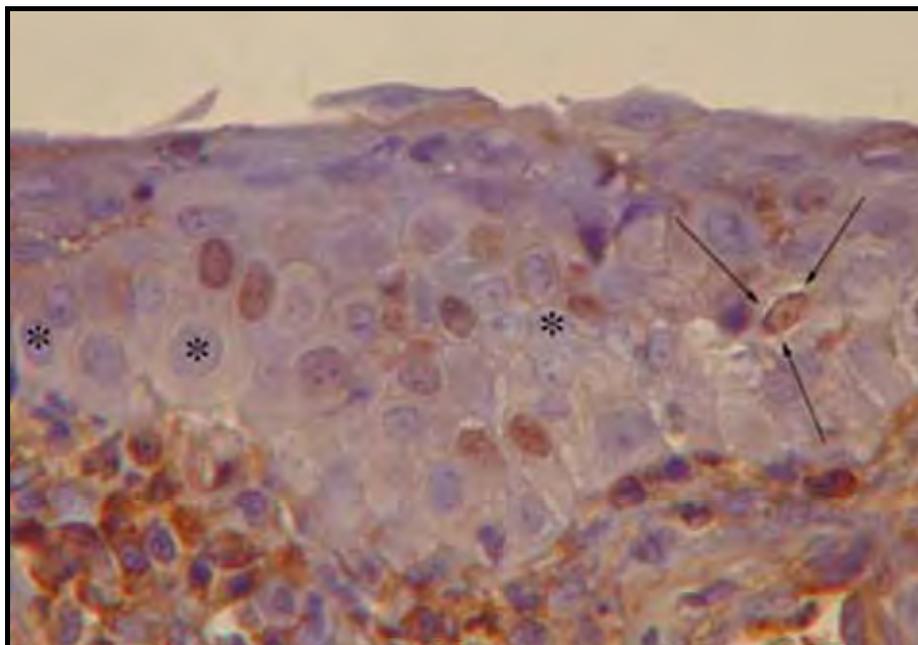


Figura 26. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Imunoistoquímica para marcador de proliferação celular Ki67. Notar padrão granular de coloração do núcleo nas células marcadas (setas) e ausência de imunomarcagem (*). 40x. São Paulo, 2007.

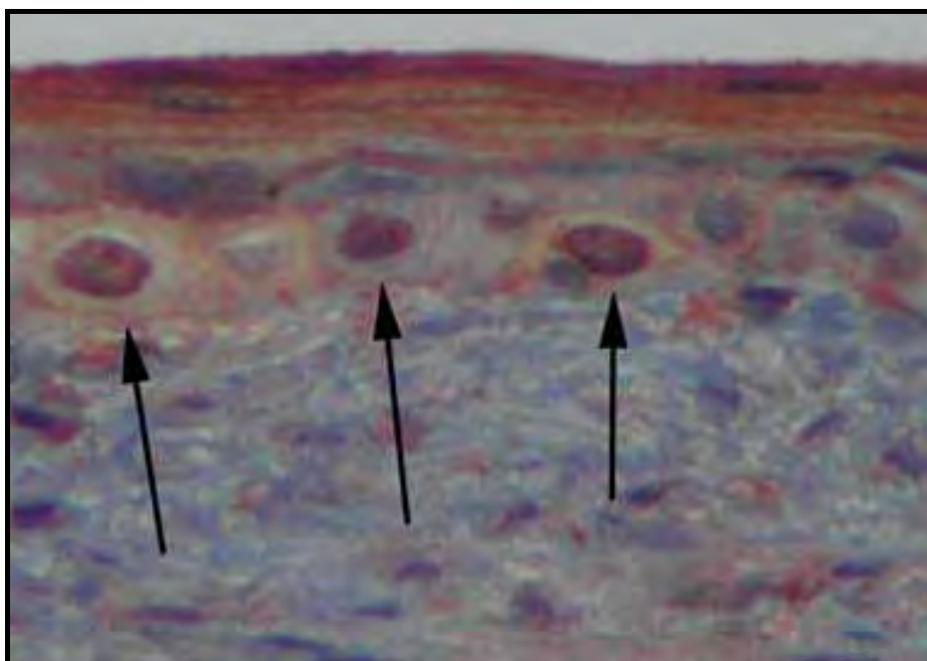


Figura 27. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Imunoistoquímica para marcador de proliferação celular Ki67. Notar padrão granular de coloração do núcleo nas células no epitélio corneal (setas). 40x. São Paulo, 2007.

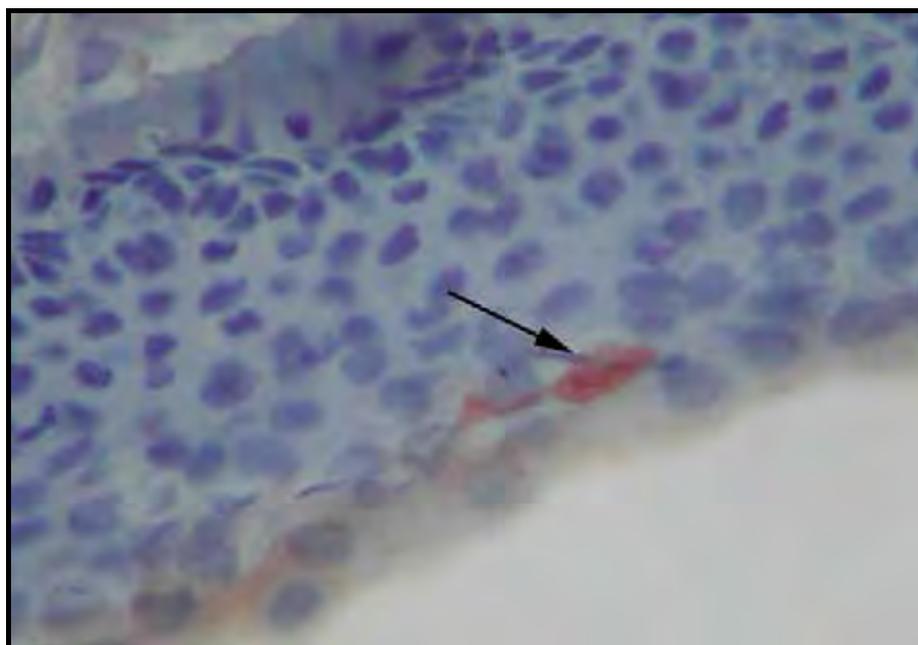


Figura 28. Fotomicrografia de córnea de coelho aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext®. Imunoistoquímica para marcador de proliferação celular Ki67. Notar padrão granular de coloração do núcleo na única célula marcada no epitélio corneal (seta). 40x. São Paulo, 2007.

Tabela 2. Valores descritos em média e desvio padrão, da ceratoplastia lamelar com membrana de celulose microfibrilar Bionext® quanto ao teste ANOVA e pós teste LSD (Least Significance Difference) descrevendo resultados da imunomarcagem com anticorpo Ki67 no epitélio e estroma corneais, aos: 1 dia (G1); 7 dias (G2) ; 15 dias (G3); 30 dias (G4) e 60 dias (G5). São Paulo, 2008.

Córnea	G1	G2	G3	G4	G5
Epitélio	0,25 ± 0,25	0,22 ± 0,27	0,71 ± 0,65	0,47 ± 0,27	0,23 ± 0,31
Estroma	0,05 ± 0,08	0,29 ± 0,36	0,39 ± 0,57	1,06 ± 1,78	0,06 ± 0,08

IV. DISCUSSÃO

A abordagem cirúrgica das afecções corneais, notadamente das ulcerações, consiste como a principal modalidade terapêutica empregada em oftalmologia médica e veterinária (CHEN et al., 2000; ANDREW et al. 2001; DUCHESNE & GALAND, 2001; GELATT & GELATT, 2001). Quando ocorre ruptura do epitélio corneal com exposição do estroma, aumentam o recrutamento e migração de agentes infecciosos e de metaloproteinases, produzidas por bactérias e células corneais danificadas, ensejando a rápida degradação do estroma, ameaçando a integridade do tecido corneal e a visão (GELATT & GELATT, 2001).

Em oftalmologia veterinária, transplantes de córnea não são corriqueiramente praticados pela dificuldade em manterem bancos de córnea viáveis (WILKIE & WHITTAKER, 1997; SLATER & HAKANSON, 1998; GELATT & GELATT, 2001). Por esse motivo, novos materiais reparadores e tectônicos vem sendo estudados (PIPPI & SAMPAIO, 1990; SCHOENAU et al., 1993). A cápsula renal eqüina (ANDRADE, 1996), a túnica vaginal autógena a fresco (GALERA et al., 1999), a escama de sardinha (LAUS, 2000), o pericárdio eqüino (BARROS et al., 1999), a túnica vaginal alógena em glicerina (VICENTE, 2003), a membrana amniótica ou alantoamiótica (BARROS et al., 1998; SOUZA, 2003) e a membrana de quitosana (COSTA, 2006) são alguns dos exemplos.

Em 1987, tem-se o primeiro relato quanto a membrana de celulose microfibrilar para enxertos de pele em seres humanos (REBELLO et al., 1987). No olho de cães, a membrana de celulose microfibrilar foi utilizada experimentalmente pela primeira vez em 1990 na reparação de córneas ulceradas e em defeitos da conjuntiva bulbar (PIPPI & SAMPAIO, 1990; SCHOENAU et al., 1993). Posteriormente, pouco se fez com essa membrana em investigações no âmbito da oftalmologia (TORRES et al., 2003).

Neste experimento, as avaliações clínicas ratificaram os eventos, já observados por outros autores, que utilizaram tal biomaterial em outros tecidos, como a pele de seres humanos, a córnea de coelhos, o epitélio subglótico de mini porcos, e nervo periférico de ratos (REBELLO et al, 1987; PIPPI & SAMPAIO, 1990; DALECK & BECHARA, 1991; SCHOENAU et al., 1993; BROWN & MANNING, 1996; TORRES et al., 2003).

A córnea se mostrou um bom modelo experimental para estudo, notadamente por permitir a mensuração quantitativa da proliferação celular do epitélio e do estroma corneais (AMBRÓSIO et al., 2002; CRESTA & ALVES, 2007). Adjunto, há que se considerar que a antigenicidade das células corneais é menor em comparação com outros tecidos (COSTA et al., 2006). O protocolo anestésico adotado, possibilitou boa imobilização e analgesia, permitindo a consecução dos procedimentos, com o tempo e a segurança prospectados.

A fotofobia e o blefaroespasma, ambos observados a partir do terceiro dia de pós-operatório, decorreram, admite-se, do trauma cirúrgico, e por exposição da inervação nociceptora (STARTUP, 1984; STADES et al. 1999). Ressalta-se o comprometimento imunogênico da córnea (ZIESKE et al. 1987).

A buprenorfina, administrada pela via subcutânea, não obteve com a resposta dolorosa desencadeada pela exposição das fibras nervosas corneais, pois obedece a mecanismos intrínsecos. Os fármacos administrados por esta via, normalmente pouco atingem concentrações terapêuticas na córnea (HAKON et al., 2007). Outrossim, há liberação de fatores pró-inflamatórios originados a partir da conversão dos fosfolípidios da membrana das células corneais destruídas em ácido araquidônico (SAMPAIO et al., 2006).

O edema de córnea se manifestou precocemente (aos dois dias) como opacidade circunjacente à área do enxerto. O evento esperado decorreu da ceratectomia, com quebra da integridade da camada epitelial, alterando-se a manutenção da osmolaridade do estroma anterior (SHIVELY & EPLING, 1970; SLATTER, 1990). O seu desaparecimento, dado por volta do sétimo dia de

evolução, deve-se à migração do epitélio corneal sobre o defeito criado, que fora confirmado à histopatologia.

A histopatologia mostrou reepitelização corneal, com mitose das células basais. Sabe-se que a córnea possui mecanismos próprios de reparação tecidual. A sua proximidade com a conjuntiva, lhe confere subsídios tróficos e de defesa necessárias para a sua reparação (BARROS et al., 1998; SAMPAIO et al., 2006). O emprego de antimicrobiano, à base de (tobramicina à 0,3%) , não ensejou retardo na epitelização corneal, por pouco alterar a morfologia deste tecido (HENDRIX et al., 2001).

Descarga ocular do tipo mucóide, constatada a partir do primeiro dia de pós-operatório, permaneceu por até o 10º dia. O evento decorreu do estímulo das células caliciformes conjuntivais palpebrais, pelo atrito mecânico com os fios de sutura e com a superfície rugosa da membrana (KIM & TSENG, 1995; BARROS et al., 1998). A remissão espontânea dos episódios resultou da eliminação dos fios de sutura e da reepitelização corneal, que ocorreram, do sétimo até o décimo dia de pós-operatório. Outrossim, pelos mecanismos de defesa da própria córnea e da possível propriedade antimicrobiana atribuída à membrana de celulose (PIPPI & SAMPAIO, 1990; TORRES et al., 2003).

Vascularização corneal é esperada e desejada, nos processos envolvendo a sua reparação cicatricial (BARROS et al. 1999; SOUZA, 2003). No presente estudo, as córneas que receberam a membrana de celulose desenvolveram neovasos, a partir do 15º, semelhantemente ao que fora notado por outros autores (BARROS et al. 1998; ANDRADE, 2003). Todavia, na presente pesquisa, a remissão do evento ocorreu por volta do 48º dia de pós-operatório, estando ausente ao 60º dia, tais resultados diferem dos achados por Barros et al. (1998) e Vicenti et al. (2003), que reportam a presença de pequenos neovasos corneais, ainda aos 60 e 100 dias de pós-operatório. Cabe ressaltar que os autores utilizaram outras modalidades de membrana em suas pesquisas.

Conceitua-se angiogênese ou neovascularização, o crescimento de novos capilares a partir de capilares e de vênulas pré-existentes. O equilíbrio entre os fatores angiogênicos e antiangiogênicos é o responsável pela regulação da angiogênese (SAFATLE et al., 2002). Quando há estímulo angiogênico, as células endoteliais alteram sua morfologia, há vasodilatação, degradam a membrana basal, proliferam e migram, formando capilares (SAFATLE et al., 2002). No curso dos eventos inflamatórios, o fator de crescimento do endotélio vascular é responsável pela indução de mitose (HURMERIC et al., 2008).

Os efeitos benéficos da invasão vascular são evidentes quanto à córnea injuriada, e auxiliam na evolução da reparação. A vascularização no tecido corneal resulta em perda de sua transparência, principalmente no eixo pupilar, podendo haver deposição de lipídeos (SAFATLE et al., 2002). Outrossim, o evento pode ensejar pigmentação corneal tardia, rejeição do tecido implantado, fibrose e leucomas cicatriciais, que induzem ao insucesso cirúrgico (COSTA et al., 2006). Antiinflamatórios não esteroidais e os esteroidais, ciclosporina A e o bevacizunab são capazes de atenuar tais intercorrências (HURMERIC et al., 2008).

Embora comparação direta entre eventos clínicos aqui observados não possa ser correlacionada com eventos de outras membranas biológicas, admite-se que a membrana de celulose induz a uma neovascularização mais amena do tecido corneal. Brow e Manning (1996) reportaram haver histocompatibilidade desta membrana com o tecido periférico nervoso. Estudos futuros, avaliando possíveis propriedades anti-angiogênicas da membrana de celulose, comparativamente com as já conhecidas da membrana amniótica merecerão ser conduzidos (Hao et al, 2000).

A mácula resultante da aplicação da membrana de celulose como enxerto lamelar é um evento esperado. Neste estudo, ela ocorreu ao 30º dia de pós-operatório, por reorganização das lamelas corneais e do colágeno. Semelhante ao que foi descrito por Schoenau et al. (1993).

Infiltração inflamatória, à histologia, pôde ser constatada logo ao primeiro dia de pós-operatório, onde preponderaram os polimorfonucleares. Ao sétimo dia, constatou-se a permeabilidade vascular aumentada, pela marginação leucocitária e diapedese, aumentando a capacidade de recrutamento de células de defesa. Outrossim, identificou-se uma estreita camada de células escamosas epiteliais recobrando o defeito corneal. Tais achados coincidiram com os observados por outros autores (BARROS et al., 1998; ANDRADE et al., 1996; LAUS et al., 2000; VICENTI et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006).

No presente estudo, observou-se integração da membrana de celulose à córnea entre o sétimo e o décimo dias de pós-operatório, a exemplo do que fora **observado** quando a membrana amniótica foi empregada na reparação de córneas lesadas pelo n-heptanol (SAMPAIO et al., 2006). A literatura revela que o tempo de permanência do enxerto sobre a área de ceratectomia varia de acordo com a origem do material e as características da superfície ocular. A sua absorção varia segundo a intensidade da inflamação local, como já demonstrado (SAMPAIO et al., 2006). A rápida reabsorção, ocorrida ao sétimo dia, a ausência de sinais de rejeição tecidual tardia e a assimilação do implante foi facilitada devido ao rigoroso controle e cuidado com a anti-sepsia e na habilidade cirúrgica da ceratoplastia lamelar (SLATER, 1990; SAMPAIO et al., 2006).

Métodos têm sido desenvolvidos, para se avaliar a proliferação celular durante a reposta inflamatória (WILSON et al. 2001; BALDWIN & MARSHALL, 2002; ANDRADE, 2003; TIN & TAN, 2006). Estudos quanto à proliferação do epitélio corneal, com o uso de marcadores laboratoriais, poderá ajudar na elaboração de planos de tratamento mais previsíveis e eficazes, assim como na compreensão de uma grande variedade de condições patológicas, o uso de fármacos frente a traumas ou cirurgias (CRESTA & ALVES, 2007). A avaliação quantitativa do Ki67 mostrou-se como um bom marcador para a proliferação celular em epitélio e estroma corneal de coelhos (AMBRÓSIO et al., 2002; CRESTA & ALVES, 2007). Durante a cicatrização corneal, o epitélio necessita

migrar, proliferar-se (mitose) e restabelecer suas adesões. O uso de marcadores de proliferação celular, objeto de estudo deste trabalho, é possível tanto *in vivo* ou *in vitro* (CRESTA & ALVES, 2007).

O Ki67 é um antígeno expresso durante todo o ciclo celular, exceto em G1 inicial e em G0, sua expressão antigênica aumenta durante a última metade da fase S, alcançando o pico máximo na fase G2 da mitose (CRESTA & ALVES, 2007). Sua meia-vida é curta, situando-se em torno de menos de uma hora após a mitose. Tal constitui-se vantagem, já que garante a marcação apenas das células que tenham concluído o ciclo celular (CRESTA & ALVES, 2007).

Os resultados obtidos à análise imunoistoquímica demonstraram que as médias de imunomarcção para o Ki67 diferiram estatisticamente no 15º dia para o epitélio corneal e no 30º dia para o estroma corneal, comparativamente aos demais períodos avaliados ($p < 0,05$). Os achados confirmam que a córnea possui mecanismos intrínsecos que se exacerbam, mesmo após a do defeito corneal ser concluído. Pois neste estudo, o evento da cicatrização, foi observado clinicamente aos sete dias. Porém, no que concerne a reorganização do estroma, o maior contingente de proliferação de células, imunomarcadas pelo Ki67, se deu aos 30 dias, o que se correlaciona com os achados histopatológicos, nos quais se notaram remodelamento do colágeno estromal nesse período.

Com este estudo demonstraram-se, descritivamente, eventos clínicos, histopatológicos e de proliferação celular, neste último caso pela expressão do Ki67. Sugere-se a realização de futuras investigações com marcadores referentes à degradação do tecido corneal, notadamente o das metaloproteinases e do fator de crescimento do endotélio vascular.

V. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos segundo, as condições em que a pesquisa fora concebida, conclui-se que:

- a membrana de celulose microfibrilar apresenta bons resultados quando utilizada na ceratoplastia lamelar em coelhos. Ocorrendo assimilação do implante e ausência de rejeição.

- O marcador de proliferação celular Ki67 permite avaliar a reepitelização corneal aos sete dias e , de forma mais marcante, aos 15 dias do pós operatório.

-

VI. REFERÊNCIAS

AHMADI, A. J.; JAKOBIEC, F. A. Corneal wound healing: cytokines and extracellular matrix proteins. **International Ophthalmology Clinics**, Philadelphia, v. 42, n. 3, p. 13-22, Summer, 2002.

AMBRÓSIO JÚNIOR, R.; STELZNER, S. K.; BOERNER, C. F.; HONAN, P. R.; MCINTYRE, D. J. Nutrition and dry eye: the role of lipids. **Review of Refractive Surgery**, Santa Clara, CA, v. 3, n. 3, p. 29-35, Aug. 2002.

ANDRADE, A. L. **Emprego experimental da cápsula renal de equino (*Equus caballus*) conservada em glicerina, no reparo de ceratectomias superficiais em cães (*Canis familiaris*): avaliação clínica e morfológica.** 1996. Tese (Mestrado)—Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1996.

ANDRADE, A. L. **Efeitos da membrana amniótica humana sobre a cicatrização de córneas de coelho submetidas a traumas mecânico e químico:** aspectos clínicos, morfológicos e bioquímicos. 2003. 253 p. Tese (Doutorado)—Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

ANDREW, S. E.; TOU, S.; BROOKS, D. E. Corneal transposition for the treatment of feline corneal sequestra: a retrospective study of 17 cases (1990-1998). **Veterinary Ophthalmology**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 107-111, 2001.

ASSOULINE, M. L' epithelium cornéen. In: _____. **Neurophysiologie epithelial.** Masson: Paris, 1993. p. 28-40.

BALDWIN, H. C.; MARSHALL, J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: a review. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, Hvidovre, v. 80, n. 3, p. 238-247, Jun. 2002.

BANKS, W. J. Princípios gerais de histologia. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. p. 3-9.

BARROS, P. S. M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L. Preserved equine amniotic membrane used in the repair of the cornea of the dog. **Investigative Ophthalmology & Vision Science**, St. Louis, v. 36, n. 4. p. 982-985, 1995.

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

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; RIGUEIRO, M. Ceratoplastia lamelar experimental em cães com pericárdio eqüino conservado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 186-196, 1999.

BERMAN, M. The pathogenesis of corneal epithelial defects. **Acta Ophthalmologica - Supplementum**, Copenhagen, v. 192, p. 55-64, 1989.

BOEVÉ, M. H.; STADES, F. C. Diseases and surgery of the canine vitreous. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4. ed. Ames, IA: Blackwell, 2007. p. 932-943.

BROOKS, D. E.; OLLIVIER, F. J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, n. 3, p. 611-622. May. 2004.

BROOKS, D. E.; PLUMMER, C. E.; KALLBERG, M. E.; BARRIE, K. P.; OLLIVIER, F. J.; HENDRIX, D. V.; BAKER, A.; SCOTTY, N. C.; UTTER, M. E.; BLACKWOOD, S. E.; NUNNERY, C. M.; BEN-SHLOMO, G.; GELATT, K. N. Corneal transplantation for inflammatory keratopathies in the horse: Visual outcome in 206

cases (1993-2007). **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, GB. v. 11, n. 2. p. 123-133, Mar/Apr. 2008.

BROWN, O. E.; MANNING, S. C. Microbial flora of the subglottis in intubated pediatric patients. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 97-105, Apr. 1996.

BRUNELLI, A. T. J.; VICENTE, F. A. M.; CHAHUD, F.; ORIÁ, A. P.; BOLZAN, A. A.; CAMPOS, C. F.; DORIA NETO, F. A.; LAUS, J. L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1194-1204, Oct. 2007.

CHEN, H. J.; PIRES, R. T.; TSENG, S. C. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 84, n. 8, p. 826-833, 2000.

COSTA, T. A. C.; ANDRADE, A. L.; BINOTTO, T. E.; PLEPIS, A. M. G.; BEVILACQUA, L.; SOUZA, W. M. Avaliações clínica e morfométrica da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córneas de coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 69, n. 6, p. 817-821, nov./dec. 2006.

CRESTA, F. B.; ALVES, M. R. Avaliação da cinética do epitélio corneano com marcadores de proliferação celular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 70, n. 6, p. 953-960, nov./dec. 2007.

CROSSON, C. E.; KLYCE, S. D.; BEUERMAN, R. W. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 27, n. 4, p. 464-473, Apr. 1986.

DALECK, C. R.; BECHARA, G.H. Curativo biológico Biofill® no tratamento de feridas cutâneas em cães, resultados parciais. **Boletim Ciência Veterinária – Sp**, Jaboticabal, SP, v. 5, n. 1, p. 26-33, 1991.

DARTT, D. A. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. **Experimental Eye Research**, New York, v. 78, n. 2, p. 173-185, Feb. 2004.

DUA, H. S.; GOMES, J. A.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 78, n. 5, p. 401-408, May, 1994.

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

FAGERHOLM, P. Wound healing after photorefractive keratectomy. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, Fairfax, VA, v. 26, n. 3, p. 432-447, Mar. 2000

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. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 523-547, fev. 2003.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L. Use of autogenous vaginal membrane testes in lamellar keratoplasty in dogs (*Canis Familiaris* – Linnaeus, 1758). In: CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 24., 1999, Lyon. **Proceedings...** Lyon: W.S.A.V.A., 1999.

GEBHARDT, B. M.; SHI, W. Experimental corneal allograft rejection. **Immunology Research**, New York, v. 25, n. 1, p.1-26, 2002.

GELATT, K. N. Oftalmologia dos animais exóticos. In:_____. **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2003. p. 413-438.

GELATT, K. N.; GELATT, J. P. Surgery of cornea and sclera. In:_____. **Small Animal Ophthalmic Surgery**. Oxford: Butterworth & Heinemann, 2001. p. 180-218.

GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 25, n. 9, p. 1056-1060, Sep. 1984.

GILGER, B. C.; WHITLEY, D. Surgery of the cornea and sclera. In: GELLAT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 675-700.

GODOY, C. A. L.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Lamelar keratoplasty in dogs using equine fetal membrane as graft: experimental study. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 65, n. 5, p. 545-549, set./out. 2002.

GOLDIM, J. R.; FRANCISCONI, C. F. Os comitês de ética hospitalar. **Revista de Medicina ATM**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 327-334, 1995.

GOMES, J. A. P.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N.; CUNHA, M. C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular nas ceratoconjuntivites cicatríciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 62, n. 5, p. 562-576, out. 1999.

GOMES, J. A. P.; PIRES, R. T.; ALVES, M. R.; LUI NETO, A. Epitélio. In: _____. **Doenças da superfície ocular: diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002. p. 4-33.

GRAYSON, M.; ARFFA, R. C. Córnea. In: _____. **Grayson's diseases of the cornea**. 3. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1991. p. 32-46.

HAKANSON, N. E.; MERIDETH, R. E. Conjunctival pedicle grafting in the treatment of corneal ulcers in the dog and cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Denver, CO, v. 23, p. 641-648, 1987.

HAO, Y.; MA, D. H.; HWANG, D. G.; KIM, W. S.; ZHANG, F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. **Cornea**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 348-352, 2000.

HAYNES, R. J.; TIGHE, P. J.; DUA, H. S. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 83, n. 6, p. 737-741, Jun. 1999.

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

HENDRIX, D. V.; WARD, D. A.; BARNHILL, M. A. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 10, p. 1664-1669, 2001.

HURMERIC, V.; MUMCUOGLU, T.; ERDURMAN, C.; KURT, B.; DAGLI, O.; DURUKAN, A. H. Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. **Cornea**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 357-362, 2008.

KENYON, K. R.; TSENG, S. C. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 96, n. 5, p. 709-722; discussion 722-723, May, 1989.

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

KLYCE, S. D.; BEUERMAN, R. W. Structure and function of the cornea. In: KAUFMAN, H. E.; BARON, B. A.; MCDONALD, M. B.; WALTMAN, S. R. (Ed.). **The cornea**. New York: Churchill Livingstone, 1988. p. 3-54.

KURPAKUS-WHEATER, M.; KERNACKI, K. A.; HAZLETT, L. D. Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, Stuttgart, v. 36, n. 3, p. 185-259. 2001.

LAUS, J. L.; FERREIRA A. L.; ANDRADE, A. L. The use of the sardine scale (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), preserved in glicerine, in experimental lamellar keratoplasties in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000100007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 Jun. 2008.

LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Doenças corneanas em pequenos animais. **Revista de Educação Continuada do Crmv Sp**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 26-33, 1999.

LAUS, J. L.; ROSSI, M. A.; SOUZA, M. S. B.; BARROS, P. S. M.; MORALES, A. Avaliação dos efeitos de um novo adesivo para fins biológicos (Colagel) ceratoplastia experimental em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 183-193, 1993.

LOHMANN, C. P. Epidermal growth factor (EGF) in tears in excimer laser photorefractive keratectomy. Responsible for postoperative refraction and "haze"? **Ophthalmologe**, Berlin, v. 95, n. 2, p. 80-87, Feb. 1998.

LU, L.; REINACH, P. S.; KAO, W. W. Corneal epithelial wound healing. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 226, n. 7, p. 653-664, Jul. 2001.

MARQUES, J. A.; MORAES, J. R. E.; TEIXEIRA NETO, F. Tratamento alternativo de feridas de papilas mamárias de vacas através do emprego de membrana biológica Biofill®. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 102-106, 1996.

MATHERS, W. D.; LANE, J. A.; ZIMMERMAN, M. B. Tear film changes associated with normal aging. **Cornea**, Philadelphia, v. 15, n. 3, p. 229-234, May, 1996.

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

MORALES, A.; LAUS, J. L.; SOUZA, M. S. B.; SANTOS, J. M.; FIGUEIREDO, F.; VALERI, V. Comparação entre enxertos autólogos livres e pediculados de conjuntiva no reparo de ceratectomias superficiais. Estudo experimental em cães (*Canis familiares*, LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 28-31, 1996.

NASISSE, M. P. Canine ulcerative keratitis. In: GLAZE, M. B. **The compendium collection: ophthalmology in small animal practice**. 2. ed. New Jersey: Veterinary Learning Systems, 1996. p. 45-57.

NISHIDA, T.; NAKAGAWA, S.; AWATA, T.; OHASHI, Y.; WATANABE, K.; MANABE, R. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 97, n. 5 Pt 1, p. 1653-1657, Nov. 1983.

PIGATTO, J. A.; ANDRADE, M. C; LAUS, J. L.; SANTOS, J. M.; BROOKS, D. E.; GUEDES, P. M.; BARROS, P. S. Morphometric analysis of the corneal endothelium of Yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, GB, v. 7, n. 3, p. 205-208, May/Jun. 2004.

PIPPI, N. L.; SAMPAIO, A. J. S. A. Estudos preliminares sobre o comportamento do Biofill na ceratoplastia lamelar em coelhos. **Revista do Centro Ciências Rurais**, Rio Grande do Sul, v. 20, n. 3-4, p. 297-302, 1990.

PUANGSRICHARERN, V.; TSENG, S. C. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 102, n. 10, p. 1476-1485, Oct. 1995.

RANZANI, J. J. T.; SAMPAIO, G. R.; CAVALCANTI, G.A.O.; CROCCI, A.J. Influência do sexo e do peso sobre mensuração do comprimento axial do bulbo ocular no cão. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 20, n. 1, p. 44-51, 2004.

REBELLO, C.; ALMEIDA, D. A.; LIMA JÚNIOR, E. M.; DORNELAS, M. P. Bio-fill, um novo substituto de pele: nossa experiência. **Revista Brasileira de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 6, p. 407-414, nov./dez. 1987.

ROLANDO, M.; ZIERHUT, M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. **Survey of Ophthalmology**, Boston, v. 45, p. S203-S210, Mar. 2001. Supplement 2.

SAFATLE, A. M. V.; BARROS, P. S. M.; MALUCELLI, B. E.; GUERRA, J. E. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 189-195, 2002.

SAMPAIO, R. L.; RANZANI, J. J. T.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; STACCIARINI, M. S.; BRAGA, E. M.; BORREZZI, C. Aspectos clínicos e imunopatológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco e conservada em glicerina: estudo experimental em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 58, n. 6, p. 1077-1085, dec. 2006.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K. N. **Verterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 31-150.

SCHOENAU, L. S. F.; PIPPI, N. L.; SCHOSSIER, J. E. V. Avaliação clínica premiliminar do fechamento comparativo de incisões corneanas com sutura e

Biofill® película celusósica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 173-177, 1993.

SHINE, W. E.; MCCULLEY, J. P.; PANDYA, A. G. Minocycline effect on meibomian gland lipids in meibomianitis patients. **Experimental Eye Research**, New York, v. 76, n. 4, p. 417-420, Apr. 2003.

SHIVELY, J. N.; EPLING, G. P. Fine structure of the canine eye: cornea. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 31, n. 4, p. 713-722, Apr. 1970.

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

SLATTER, D.; HAKANSON, N. Córnea e esclerótica. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 1436-1461.

SMITH, R. E.; FLOWERS JR, C. W. Chronic blepharitis: a review. **CLAO Journal**, New York, v. 21, n. 3, p. 200-207, Jul. 1995.

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. Tese (Doutorado)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SPIGELMAN, A. V.; DEUTSCH, T. A.; SUGAR J. Application of homologous fibronectin to persistent human corneal epithelial defects. **Cornea**, New York, v. 6, n. 2, p. 128-130, 1987.

STADES, F. C.; BOEVÉ, M. H.; NEUMANN, W.; WTMAN, M. Córnea e sclera. In: _____. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. p. 107-127.

STARTUP, F. G. Corneal ulceration in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 737-752, 1984.

SULLIVAN, D. A.; KRENZER, K. L.; SULLIVAN, B. D.; TOLLS, D. B.; TODA, I.; DANA, M. R. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 40, n. 6, p. 1261-1265, May, 1999.

SULLIVAN, D. A.; YAMAGAMI, H.; LIU, M.; STEAGALL, R. J.; SCHIRRA, F.; SUZUKI, T.; KRENZER, K. L.; CERMAK, J. M.; SULLIVAN, R. M.; RICHARDS, S. M.; SCHAUMBERG, D. A.; DANA, M. R.; SULLIVAN, B. D. Sex steroids, the meibomian gland and evaporative dry eye. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 506, n. Pt A, p. 389-399, 2002.

SUZUKI, T.; SULLIVAN, B. D.; LIU, M.; SCHIRRA, F.; RICHARDS, S. M.; YAMAGAMI, H.; SULLIVAN, D. A. Estrogen and progesterone effects on the morphology of the mouse meibomian gland. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 506, n. Pt A, p. 483-488, 2002.

TALIERI, I. C.; HONSHO, C. S.; NUNES, N.; SOUZA, A. P.; DUQUE, J. C. Comportamento da pressão intra-ocular segundo os efeitos cardiorrespiratórios e hemodinâmicos induzidos pela anestesia com desflurano, em cães submetidos à hipovolemia experimental. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 68, n. 4, p. 521-526. jul./ago. 2005.

TI, S. E.; TAN, D. T. Tectonic corneal lamellar grafting for severe escleral melting after pterygium surgery. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 110, n. 6, p. 1126-1136, Jun. 2006.

TORRES, M. F. P.; GRAÇA, D. L.; FARIAS, E. L. P. Reparação microcirúrgica de nervo periférico por meio de sututra, cola de fibrina ou bainha de Biofill® em

ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 1104-1116, out. 2003.

TSENG, S. C. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 92, n. 6, p. 728-733, Jun. 1985.

TSENG, S. C.; MELLER, D.; ANDERSON, D. F.; TOUHAMI, A.; PIRES, R. T.; GRÜTERICH, M.; SOLOMON, A.; ESPANA, E.; SANDOVAL, H.; TI, S. E.; GOTO E. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane for treating corneal diseases with total limbal stem cell deficiency. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 506, n. Pt B, p. 1323-1334, 2002.

TSENG, S. C.; 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. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 116, n. 4, p. 431-441, Apr. 1998.

TSENG, S. C.; TSUBOTA, K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 124, n. 6, p. 825-835, Dec. 1997.

TSUBOTA, K.; SATAKE, Y.; KAIDO, M.; SHINOZAKI, N.; SHIMMURA, S.; BISSEN-MIYAJIMA, H.; SHIMAZAKI, J. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 22, p. 1697-1703, Jun. 3, 1999.

VICENTI, F. A.; LAUS, J. L.; COSTA NETO, J. M.; TALIERI, I. C.; CAMPOS, C. F.; JORGE, A. T.; FERREIRA, A. L.; FANTINATTI, A. P. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on wound healing in corneas of dogs following keratoplasty. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, GB, v. 6, n. 3, p. 255-263, Sep. 2003.

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

WILSON, S. E. Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 111, n. 6, p. 763-765, Jun. 15, 1991.

WILSON, S. E.; HE, Y. G.; WENG, J.; LI, Q.; MCDOWALL, A. W.; VITAL, M.; CHWANG, E. L. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. **Experimental Eye Research**, New York, v. 62, n. 4, p. 325-327, Apr. 1996.

WILSON, S. E.; MOHAN, R. R.; MOHAN, R. R.; AMBRÓSIO JUNIOR, R.; HONG, J.; LEE, J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 625-637, Sep. 2001.

WILSON, S. E.; LIANG, Q.; KIM, W. J. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 40, n. 10, p. 2185-2190, Sep. 1999.

WOUK, A. F. P. F. Ação do sulfato de condroitina "A" associado à ciprofloxacina em úlceras de córnea em cavalos. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 4, n. 4, p. 11-20. out./dez. 2006.

ZIESKE, J. D.; HIGASHIJIMA, S. C.; SPURR-MICHAUD, S. J.; GIPSON, I. K. Biosynthetic responses of the rabbit cornea to a keratectomy wound. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 28, n. 10, p. 1668-1677, Oct. 1987.