UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA – FMVA

THIAGO DE MELO PEDROZA

APLICAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOCELULOSE EMBEBIDA EM CIPROFLOXACINA NA CERATOPLASTIA LAMELAR

Araçatuba – SP
2019

THIAGO DE MELO PEDROZA

APLICAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOCELULOSE EMBEBIDA EM CIPROFLOXACINA NA CERATOPLASTIA LAMELAR

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientador: Prof. Associado Alexandre Lima de Andrade

Araçatuba – SP
2019

P372a

Pedroza, Thiago de Melo
Aplicação da membrana de biocelulose embebida em ciprofloxacina na ceratoplastia lamelar / Thiago de Melo Pedroza. -- Araçatuba, 2019
74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Alexandre Lima de Andrade

1. Membrana (biologia). 2. Celulose. 3. Córnea. 4. Cães. 5. Gatos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Aplicação da membrana de biocelulose embebida em ciprofloxacina na cirurgia plastica palpebral

AUTOR: THIAGO DE MELO PEDROZA
ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. SÍLVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE

Araçatuba, 16 de agosto de 2019.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THIAGO DE MELO PEDROZA - nascido em 16 de setembro de 1988 na cidade de Maceió-AL. Médico Veterinário formado pelo Centro Universitário Cesmac-AL, no ano de 2013. Ingressou em 2014 na pós-graduação Equalis em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos animais, tendo-o concluído em 2015. Ingressou em 2016 na pós-graduação Anclivepa-SP em Oftalmologia Veterinária, tendo-o concluído em 2018. Iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, campus de Araçatuba – SP, em março de 2017, sob orientação do Professor Associado Alexandre Lima de Andrade.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois se mostrou presente em todos os momentos.

Ao meu querido orientador, Professor Alexandre, que me acolheu de maneira fraternal. Exerceu sua função como orientador de maneira ilustre. Concedeu-me uma das maiores oportunidades profissionais. Ao seu lado na faculdade, amadureci pessoalmente, tecnicamente e acadêmicamente. Serei eternamente grato, pois hoje tenho segurança em exercer a oftalmologia veterinária.

Aos meus pais, Hermógenes e Luiza, que jamais teria alcançado a satisfação profissional sem vocês. Desafiando meus limites. Eu os levo sempre em meu coração e, por isso, nunca estou sozinho.

À minha irmã, Thayná, que é minha companheira e tem grande parte do meu amor.

À minha vó, Maria José, que sempre esteve presente em minha vida com uma demonstração de um amor puro.

À Sarah, minha namorada, por sempre estar do meu lado, compreensiva e demonstração de carinho nos mínimos detalhes.

À todos os educadores e amigos que fizeram parte da minha trajetória na minha formação em Medicina Veterinária.

Ao Laboratório de engenharia de biomateriais da Universidade de Araraquara (UNIARA) por conceder a membrana estudada.

Ao professor Patto e à professora Flávia Eugênio nos concelhos e aprendizados no Hospital Veterinário. Agregaram grandiosamente no meu conhecimento.

Aos pós-graduandos, Fernando, Hugo e Aline pela linda amizade e parceria neste período em Araçatuba.

Ao Sr. Arlindo, Sra. Sandra e Amanda, que me acolheram e representaram o significado de família em Araçatuba.

À CAPES pela bolsa de auxílio financeiro.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, por toda a oportunidade e estrutura física, que permitiu-me aprender e desenvolver minha pesquisa. Além de todos os funcionários desta mesma instituição, pois colaboraram de maneira significativa.

À todos os tutores e pacientes envolvidos no estudo. Hoje, tornei-me um profissional melhor para ajudar novos pacientes.

Muito obrigado!

PEDROZA, T. M. **Aplicação da membrana de biocelulose embebida em ciprofloxacina na ceratoplastia lamelar**. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

Avaliaram-se os sinais clínicos oculares da ceratoplastia lamelar, utilizando-se a membrana de biocelulose (MB) embebida em ciprofloxacina em duas espessuras, no tratamento de úlceras de córneas profundas e/ou perfuradas, em cães e gatos, com ceratite ulcerativa com sequestro de córnea. A celulose possui aplicações importantes na engenharia de tecidos, como a reparação e cicatrização de feridas. Os principais exemplos são as aplicações que incluem engenharia de vasos sanguíneos, tecido neural, osso, cartilagem, fígado e tecido adiposo, reconstrução da uretra e *dura-máter*, reparação de tecido conjuntivo e defeitos cardíacos congênitos, construção de barreiras protetoras e aplicações oftalmológicas, principalmente construção de contato lentes. Os animais foram divididos igualmente em dois grupos, onde um (G-HE) recebeu a membrana hidratada espessa e outro recebeu (G-HD) hidratada delgada. Previamente ao emprego da MB, as mesmas foram recortadas em discos de 3-4mm e adaptadas ao leito das úlceras, utilizando-se sutura não perfurante total, em pontos simples isolados. Instituiram-se, por terapia pós-operatória, colírios à base de ciprofloxacina, diclofenaco sódico, atropina, lubrificante ocular e colar do tipo elizabetano. As causas das úlceras foram, também, tratadas. Avaliaram-se os sinais clínicos oculares no pós-operatório aos 3, 7, 15, 30 e 60 dias. A MB e os pontos de suturas foram removidos ao trigésimo dia. Sinais clínicos como blefarospasmo, presença de secreção ocular, hiperemia conjuntival e vascularização corneal estiveram presentes em ambos os grupos até o 15º dia de pós-operatório reduzindo, gradualmente, ao longo do tempo. Não foram observados sinais de rejeição da membrana nos períodos avaliados. Portanto a MB favoreceu a epitelização corneal, sendo uma alternativa terapêutica para lesões corneais infectadas ou não. No entanto, a MB induz a uma maior angiogênese nos casos de perfuração, com consequente ceratite pigmentar intra e perilesional.

Palavras-chaves: Membranas. Celulose. Córnea. Cães. Gatos.

PEDROZA, T. M. **Application of ciprofloxacin embedded biocellulose membrane in lamellar keratoplasty.** 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Clinical ocular signs of lamellar keratoplasty were evaluated using a two-thickness ciprofloxacin-embedded biocellulose membrane (MB) in the treatment of deep and / or perforated corneal ulcers in dogs and cats with sequestered ulcerative keratitis. of cornea. Cellulose has important applications in tissue engineering, such as wound repair and healing. Top examples are applications that include blood vessel engineering, neural tissue, bone, cartilage, liver and adipose tissue, urethral and dura mater reconstruction, connective tissue repair and congenital heart defects, protective barrier construction and ophthalmic applications, mainly construction of contact lenses. The animals were divided equally into two groups, where one (G-HE) received the thick hydrated membrane and the other received thin hydrated (G-HD). Prior to the use of MB, they were cut in 3-4mm discs and adapted to the ulcer bed, using total non-perforating suture, in isolated single stitches. Postoperative therapy was followed by eye drops based on ciprofloxacin, diclofenac sodium, atropine, eye lubricant and Elizabethan collar. The causes of ulcers were also treated. Postoperative ocular clinical signs were evaluated at 3, 7, 15, 30 and 60 days. MB and suture stitches were removed on day 30. Clinical signs such as blepharospasm, presence of ocular discharge, conjunctival hyperemia, and corneal vascularization were present in both groups until the 15th postoperative day, gradually decreasing over time. No signs of membrane rejection were observed in the evaluated periods. Therefore, MB favored corneal epithelialization, being a therapeutic alternative for infected or uninfected corneal lesions. However, MB induces greater angiogenesis in perforation cases, with consequent intra and perilesional pigmentary keratitis.

Keywords: Membranes. Cellulose. Cornea. Dogs. Cats.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição de animais em que foram empregadas as duas membranas de biocelulose hidratada espessa (G-HE) e membrana de biocelulose hidratada delgada (G-HD). 56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação gráfica dos sinais oculares	60
Figura 2 -	Imagens fotográficas da apresentação clínica nos diferentes momentos de avaliação do animal número 1 com membrana hidratada espessa	62
Figura 3 -	Imagens fotográficas da apresentação clínica nos diferentes momentos de avaliação do animal número 1 que recebeu a MB hidratada delgada	63

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Percentual
µm	Micrômetro
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ASA	american society of anesthesiologists
BAL	Broncoalveolar
C	Canino
CCS	Ceratoconjuntivite seca
cm^2	Centímetros quadrados
CNF	Celulose nanofibrilada
COX-2	Ciclooxigenase-2
EGF	Fator de crescimento epidérmico
F	Fêmea
Fe	Felino
G-HD	Grupo das membranas hidratadas delgadas
G-HE	Grupo das membranas hidratadas espessas
HepaRG	Células progenitoras hepáticas humanas
HV	Hospital Veterinário
in vitro	Fora do organismo vivo
in vivo	Dentro do organismo vivo
kg	Kilos
M	Macho
M0	Primeiro dia do atendimento ao paciente
M15	15 dias após a realização da ceratoplastia lamelar
M3	3 dias após a realização da ceratoplastia lamelar
M30	30 dias após a realização da ceratoplastia lamelar
M60	60 dias após a realização da ceratoplastia lamelar
M7	7 dias após a realização da ceratoplastia lamelar
MB	Membrana de biocelulose
mg	Miligramas

mm	Milímetros
n	Número de pacientes
NCB	Nanocelulose bacteriana
nm	Nanômetros
º	Graus
ºC	Graus Celsius
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
SC	Sequestro corneal felino
SP	São Paulo
SRD	Sem raça definida
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNIARA	Universidade de Araraquara
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 - MEMBRANA DE BIOCELULOSE NA OFTALMOLOGIA VETERINÁRIA 14
1.1 Aspectos gerais – Anatomofisiologia 14
1.2 Aspectos sobre a cicatrização da córnea 17
1.3 Ceratite ulcerativa 20
1.4 Membrana de celulose bacteriana 23
1.5 Referências 32
2 CAPÍTULO 2 – APLICAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOCELULOSE EMBEBIDA EM CIPROFLOXACINA NA CERATOPLASTIA LAMELAR 50
2.1 Introdução 50
2.2 Material e método 52
2.3 Resultados e discussão 55
2.4 Conclusão 66
2.5 Referências 66
ANEXO A – Comitê de Ética 74

1 CAPÍTULO 1 – MEMBRANA DE BIOCELULOSE NA OFTALMOLOGIA VETERINÁRIA

1.1 Aspectos Gerais – Anatomofisiologia

O bulbo do olho é composto por estruturas que são encarregadas de oferecer proteção, nutrição, acomodação e percepção da luz, com o propósito de enfocar uma imagem (SLATTER, 2005). Ele é dividido em três túnicas. São elas: túnicas fibrosa, vascular e nervosa (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). A túnica fibrosa é a mais externa e fazem parte dela, a córnea e a esclera (SAMUELSON, 1999).

A túnica fibrosa é responsável pelo formato do bulbo do olho, que é imperativo para oferecer um sistema visual funcional, além de atuar como uma barreira infecciosa entre o meio externo e as estruturas intraoculares (DELMONTE; KIM, 2011; GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GELATT, 2003). A porção mais anterior do olho de cães e gatos, a córnea, é totalmente transparente, logo permite a passagem de feixes luminosos e atua como uma lente que converge os mesmos raios de luz à retina (SAMUELSON, 1999). Logo, a sua transparência é garantida devido à ausência de vasos, células sanguíneas e pigmentos, controle do conteúdo aquoso, disposição regular e organizada das fibras colágenas, e por constituir uma superfície ótica lisa, graças ao filme lacrimal pré-corneal (SLATTER, 2005).

A segunda túnica ocular é a úvea, composta pela coroide, corpo ciliar e íris. É a camada amplamente vascularizada e pigmentada do olho que tem como função a nutrição e remoção de metabólitos da maioria das estruturas oculares, principalmente aquelas que são avasculares (córnea e lente). A terceira camada é a nervosa, que compreende a junção de retina e nervo ótico e é responsável pela fototransdução (SAMUELSON, 1999; GELATT, 2003).

O sistema visual é formado por duas lentes, a córnea e a lente, cujo poder refrativo converge os raios luminosos, levando-os para uma camada neurossensorial na retina para a formação da imagem (SLATTER, 2005). As células fotossensíveis retinianas transmitem impulsos elétricos para o córtex visual através do nervo ótico (SAMUELSON, 1999). Com o objetivo de controlar esse processo, há um sistema de diafragma, íris-pupila, que regula a entrada luminosa no olho, junto a um sistema de acomodação do cristalino, realizado pelo complexo de músculos ciliares e ligamentos zonulares (SLATTER, 2005).

A córnea possui um comprimento horizontal maior do que o vertical, variando entre 12,5mm e 17mm. Os cães tem uma maior espessura corneal no centro (SLATTER, 2005), possuindo 0,558 ±0,076, e 0,617 ±0,073 na periferia dorsal (GELATT, 2003) e os gatos possuem uma espessura no centro de 0,8-1mm e 0,4-0,6mm na periferia (SAMUELSON, 2013). É um dos tecidos mais sensíveis do organismo animal (DELMONTE; KIM, 2011), pois é intensamente inervado pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo, principalmente em 3 e 9 horas (DELMONTE; KIM, 2011). Os cães dolicocefálicos possuem maior sensibilidade corneal, enquanto mesocefálicos e braquicefálicos menor sensibilidade (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

A córnea possui quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). O filme lacrimal pré-corneal pode ser considerado como a quinta camada, embora não seja histologicamente visível. O filme pré-corneal possui 3 camadas, entre elas a aquosa, lipídica e mucosa. A camada mais profunda é a mucosa, que se ancora à camada de células superficiais corneais por uma projeção de microvilosidades. Histologicamente, o epitélio corneal é do tipo simples, escamoso e não-queratinizado, com padrão básico de membrana basal, células epiteliais basais, células aladas e células superficiais escamosas (SLATTER, 2005). As células basais, aderem-se à membrana basal por hemidesmossomos (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). A membrana basal do epitélio é composta de colágeno, lamininas, hialuronato de sódio e fibronectinas (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

O estroma compõe 90% da espessura total da córnea. É composto por colágeno, substância fundamental, fibrócitos e ceratócitos. Também, podem-se encontrar linfócitos entremeados, macrófagos e neutrófilos. Os glicosaminoglicanos e as glicoproteínas estão presentes como componentes da matriz extra-celular e formam o suporte da estrutura corneal. A transparência do estroma da córnea é devido à disposição ortogonal das fimbrilas de colágeno, que se dispõe em perfeito paralelismo com espaços regulares (SLATTER, 2005).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio, sendo delgada, homogênea, acelular e produzida pelo endotélio (HERRERA, 2008). Está localizada entre o estroma posterior e endotélio anteriormente. Possui elasticidade e aumenta sua espessura com a idade (SLATTER, 2005), pois sua multiplicação celular é constante (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

O endotélio é constituído por uma camada unicelular e se localiza posteriormente à membrana de Descemet. Ele reveste anteriormente a câmara anterior do bulbo ocular (SLATTER, 2005). Suas células possuem um formato predominantemente hexagonal, e diminuem de tamanho e em quantidade de acordo com a idade do animal. Cães jovens apresentam, em média, 2500 a 2800 células endoteliais por milímetro quadrado (mm^2). Injúrias endoteliais podem diminuir a densidade destas células, prejudicando-o gravemente, porque possuem uma capacidade de mitose limitada (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Estas células possuem um grande número de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, devido ao intenso metabolismo (SLATTER, 2005).

Por ser um tecido avascular, a córnea recebe seu suprimento nutricional por um processo de diálise pelos vasos do plexo peri-limbar (HELPER, 1989). Segundo Slatter (2005), o metabolismo da glicose fornece a maioria da necessidade energética dos tecidos corneais. A via de Embden-Meyerhof metaboliza, aproximadamente, dois terços desta fonte de energia, e o ciclo de Krebs um terço. Já o fornecimento de oxigênio é proveniente do humor aquoso, filme lacrimal pré-corneal captado da atmosfera, plexo capilar límbico e capilares da conjuntiva palpebral.

O humor aquoso e a lágrima circundam a córnea, portanto a manutenção da sua deturgescência é muito importante para sua transparência (HERRERA, 2008). As células epiteliais e endoteliais realizam o influxo de água no estroma, devido a sua elevada quantidade de dispositivos de bombas de sódio/potássio. O endotélio desempenha uma função de barreira pelas junções celulares, denominadas *zônula occludens,* e dependem de íons cálcio (GELATT, 2003).

Devido à perfeita organização das lamelas de colágeno no estroma, qualquer injúria na córnea pode comprometer a sua transparência (SLATTER, 2005). Para a cicatrização do tecido corneal, é necessária uma ação complexa de proteinases, fatores de crescimento e citocinas produzidas pelo epitélio, ceratócitos estromais, células inflamatórias e glândulas lacrimais (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

1.2 Aspectos sobre a cicatrização da córnea

A cicatrização de uma solução de continuidade na córnea obedece a uma sequência de eventos organizados (KERN, 1990), que se inicia a partir de algumas substâncias secretadas no leito da lesão, como fibrina, fibrinogênio e fibronectina. Com o epitélio corneal aviltado, ocorrerá um deslizamento e mitose das células epiteliais de forma centrípeta (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007) que tentam re-popular o leito da úlcera. No entanto, percebe-se uma excelente capacidade de regeneração (SLATTER, 2005) mas, que pode se complicar. O deslizamento das células circunjacentes à margem da lesão se inicia, aproximadamente, 1 hora decorrida da lesão (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007), podendo haver recuperação da população de células perdidas em torno de uma semana. No início, os neutrófilos se infiltram e envolvem a lesão sob estímulos quimiotáticos que atraem outros polimorfonucleares que chegam através do filme lacrimal. Eles irão remover os “debris” celulares remanescentes (NASISSE, 1985; KERN, 1990) e na área acometida, os ceratócitos morrem e, nas áreas circunjacentes, eles se transformam em fibroblastos que migram para a lesão, onde sintetizam colágeno e mucopolissacarídeos da substância fundamental (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005). As células epiteliais adjacentes começam a se deslizar, em algumas horas, para cobrir o defeito. As células epiteliais restauram sua arquitetura em poucos dias, em média, 5 a 7 dias. Estímulos nervosos, hormonais, mensageiros bioquímicos e fatores de crescimento influenciam o processo de mitose e deslizamento epitelial (NASISSE, 1985; KERN, 1990). A adesão do epitélio ao estroma corneal só ocorrerá após a recuperação da membrana basal epitelial (KERN, 1990).

Entretanto, durante o processo de cicatrização, os vasos, oriundos do limbo, podem ser requeridos e podem carrear pigmentos de melanina para o estroma anterior que, consequentemente, compromete a transparência (SLATTER, 2005). Lesões epiteliais que acometem todo o diâmetro corneal até o limbo, com perda de células-tronco, podem evoluir a um processo em que a conjuntiva invade a córnea, denominado conjuntivalização (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Nestes casos, a perda da transparência é total, com prejuízos à visão.

O colágeno depositado após a cicatrização será remodelado, havendo uma compactação, porém neste período haverá desorganização fibrilar (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). A cicatriz irá remodelar e diminuir sua densidade nas semanas seguinte, mas não irá desaparecer. Já na cicatrização de úlceras complicadas há mais infiltrado celular, logo existirá uma cicatriz mais densa (SLATTER, 2005).

Nas perfurações corneais, os bordos da membrana de Descemet retraem e há uma tentativa de formação de um tampão de fibrina. Algumas horas depois, observa-se tumefação e aumento do tamanho das células endoteliais com o objetivo de recobrir a área perfurada. Estas células podem ficar aumentadas em volume de maneira permanente ou ocorrer sobreposição celular. Caso haja uma justaposição adequada do endotélio, a descemet se estende para cobrir o defeito. Durante a cicatrização, ocorrem inflamação crônica, defeitos epiteliais recorrentes e vascularização corneal. Quando há inflamação exuberante, pode ocorrer a secreção de algumas enzimas que acabam por degradar o colágeno sadio, podendo ter envolvimento bacteriano ou não (NASISSE, 1985; KERN, 1990; SLATTER, 2005).

A regeneração endotelial ocorre simultaneamente pela divisão mitótica e aumento no tamanho das células (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009), podendo haver edema corneal e opacidade permanentes. Em lesões extensas, o endotélio não consegue recobrir e uma região de tumefação e estroma edematoso persistente (SLATTER, 2005).

As enzimas proteolíticas e os fatores de crescimento estão envolvidos no processo de reparação tecidual. A manutenção e reparo da matriz extracelular estromal requer um balanço entre sua síntese, degradação e remodelação. As enzimas proteolíticas têm papel importante na degradação e remodelação da matriz extracelular estromal, e sua ação exacerbada é controlada por inibidores de proteinases naturais existentes no filme pré-corneal e córnea, a exemplo do inibidor de proteinase α-1, α2-macroglobulina e inibidores de metaloproteinases, principalmente 2 e 9. As enzimas proteolíticas são produzidas por microorganismos, células inflamatórias, células epiteliais corneais e fibroblastos (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Um desequilíbrio entre as enzimas proteolíticas e os inibidores de proteinases pode culminar em *melting* corneal (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; ION; IONASCU; BIRTOIU, 2015), sendo o motivo, também, da não cicatrização de úlceras superficiais (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Os fatores de crescimento, por exemplo, o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador beta (TGFβ) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) organizam a cicatrização corneal, apresentando funções como estimular a síntese de proteína, mitose epitelial e estromal; a síntese de matriz extracelular e quimiotaxia de células inflamatórias; e a síntese de fibronectina, ácido hilaurônico e colagenase, respectivamente (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Lesões no endotélio corneal permitirão expor o endotélio, que é altamente hidrofílico, podendo ocorrer um edema corneal e consequente opacidade permanente (HELPER, 1989). As principais alterações corneais à injúria são edema, vascularização, formação cicatricial, pigmentação, infiltração celular e acúmulo de substância anormal no interior da córnea (SLATTER, 2005).

O edema corneal corresponde ao excesso de fluido que se acumula no interior do estroma, pois a água possui afinidade pelos componentes da matriz extra-celular, como os proteoglicanos. Neste sentido, há divisão das lamelas colágenas, implicando em perda da transparência, podendo ser focal ou difuso (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

A bomba endotelial possui uma elevada atividade, já que se opõe à pressão intraocular. Caso haja uma lesão endotelial, irá comprometer a função das bombas de Na^+/K^+ e, consequentes, edemas corneais (HERRERA, 2008). Se o equilíbrio de fluido for reestabelecido e a causa removida, a córnea restabelece a sua transparência. Quando crônico, pode resultar em vascularização, ceratite bolhosa e pigmentação corneal (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; SLATTER, 2005).

A vascularização corneal pode ser superficial e/ou profunda. Ocorre em resposta a inúmeras condições. A primeira ocorre no terço anterior do estroma, geralmente apresenta vasos vermelho-vivos, ramificados e contínuos e são originários da circulação conjuntival do limbo. A vascularização profunda, apresenta-se com os vasos contínuos com a circulação ciliar que desaparecem no limbo, além de se apresentarem com coloração vermelho-escuro e mais retilíneos. Este tipo de vasculização é denominada como do tipo “dicotomizada” ou “brush like”. A profundidade da lesão corneal primária pode ser indicada pela profundidade dos vasos invasores (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; SLATTER, 2005); desta forma, a vascularização superficial se apresenta em decorrência de processos irritativos na superfície corneal (ceratites superficiais), enquanto a profunda ocorre em processos

envolvendo o estroma e/ou uveais (ceratites profundas e uveítes) (HERRERA, 2008). Geralmente, a vascularização é benéfica, pois carreia suprimento sanguíneo para auxiliar a cicatrização, porém resulta em diminuição da transparência corneal e migração de pigmento (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; SLATTER, 2005).

Após uma lesão estromal, as fibrilas colágenas produzidas pelos ceratócitos, fibroblastos e macrófagos invasores não apresentam um paralelismo, o que resulta, também, em redução da transparência. Assim, há interferência na ação refrativa da córnea. Quanto mais profunda a lesão inicial, mais densa é a cicatriz, dificultando, assim, o retorno da transparência (SLATTER, 2005).

O pigmento estromal se origina a partir da proliferação dos melanoblastos límbicos, enquanto o pigmento no epitélio surge pela camada basal do epitélio (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005). Em casos crônicos, o epitélio corneal pode se reverter para um padrão simples semelhante à pele, com espessamento, formação cilíndrica em rede e queratinização (SLATTER, 2005). O pigmento pode estar presente no epitélio e/ou estroma superficial e, comumente, está associado a processos inflamatórios crônicos (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

1.3 Ceratite ulcerativa

Devido à posição anterior da córnea, a mesma está vulnerável às condições externas e às enfermidades dos anexos oftálmicos (HERRERA, 2008). As ceratites com soluções de continuidade encontram-se entre as afecções oculares mais frequentes em cães (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008), na qual, cães de raças braquicefálicas são mais incidentes (HERRERA, 2008). Compreendem lesões em que há perda do epitélio corneal, com exposição de porções variáveis do estroma (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005) e são consideradas uma emergência oftálmica, já que podem progredir para exposição da membrana de Descemet – denominada descemetocele – e consequente perfuração da córnea, podendo evoluir para uma perda visual completa (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

As ceratites ulcerativas são classificadas quanto à sua profundidade, isto é, superficial, profunda, descemetocele e perfuração. A superficial ocorre quando há

lesão apenas epitelial e exposição do estroma superficial. A profunda se caracteriza por acometer mais de 50% da espessura estromal. A descemetocele quando há exposição da membrana de Descemet. E, quando há perda de todas as camadas da córnea com comunicação com a câmara anterior, descreve-se como uma perfuração (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Todas as úlceras, se não tratadas corretamente, podem evoluir para uma endoftalmite (SLATTER, 2005), e podem resultar, também, em glaucoma e/ou *phitisis bulbi*, com perda do bulbo do olho (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). A etiologia é variada e requerem um diagnóstico preciso, com resolução da causa primária e tratamento específico (BERCHT, 2009).

As causas das ceratites ulcerativas mais comuns são traumas, anormalidades palpebrais, ciliares e do aparelho lacrimal, infecções (bacterianas, micóticas ou virais), origem neurotrófica e lesões químicas. Quando profunda, causas iatrogênicas também devem ser consideradas, como o uso inadequado de corticosteroides ou outros agentes capazes de retardar a cicatrização ou potencializar a infecção (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

A proliferação descontrolada de metaloproteases pode causar a ceratomalácia ou *melting* corneal (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009) e, quando instalada, apresenta-se com aspecto gelatinoso e coloração acinzentada nos bordos da lesão. A perfuração pode ocorrer em até 48 horas (HERRERA, 2008; SLATTER, 2005). A técnica de *cross-linking,* atualmente, é uma das opções para tratamento (POT et al., 2014; SPIESS et al., 2014). Devido a sua rápida progressão, há uma potencial perda da visão (ION; IONASCU; BIRTOIU, 2015).

O diagnóstico de lesões corneais é realizado através do histórico, sinais clínicos (blefarospasmo, opacidade, fotofobia, secreção, por exemplo) e o teste de tingimento pela fluoresceína (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). O corante se fixa ao estroma da córnea, que é hidrofílico, porém não cora a membrana de Descemet, pois é hidrofóbica (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Outros sinais clínicos que podem estar presentes são miose, hipópio e *flare* do aquoso, devido a uma possível uveíte secundária (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005).

É muito importante identificar a causa da úlcera e tratá-la, pois assim haverá uma boa evolução clínica (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008). É essencial a criação de um ambiente ideal para que ocorra a reparação da

lesão e prevenção da sua evolução, a partir de medidas terapêuticas precisas (SLATTER, 2005).

Em casos de úlceras superficiais, o tratamento conservador à base de colírios é o mais indicado. Deve ser instituído com o emprego de antibioticoterapia, midriáticos/cicloplégicos, inibidores de metaloproteinases e anti-inflamatórios não esteroidais, além do uso obrigatório do colar do tipo elisabetano (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Os antibióticos de escolha nas úlceras estromais profundas progressivas são a tobramicina ou uma fluorquinolona, como a ciprofloxacina ou moxifloxacina, em alta frequência (a cada 1 ou 2 horas) (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Nos casos de úlceras profundas, há indicação cirúrgica, pois a córnea sofre uma destruição rápida do colágeno, não havendo capacidade de se defender até que se instale a vascularização. Este processo de criação de vasos sobre a córnea se inicia 4 ou 5 dias após o surgimento da lesão, sendo necessários alguns dias até que os vasos alcançarem o leito da úlcera (HERRERA, 2008). Assim, técnicas cirúrgicas fornecem uma base mecânica de proteção, somada ao aporte vascular (GELATT, 2003). Neste caso, o recobrimento conjuntival é a técnica indicada (HERRERA, 2008), e, tendo em vista a variedade de técnicas para sua realização, elencam-se o pediculado, bipediculado, livre, 180º (em campus) e 360º (HOLLINGSWORTH, 2003).

As úlceras perfuradas são emergência e podem ser tratadas de maneira semelhante a uma úlcera profunda, entretanto, apresenta um prognóstico desfavorável e/ou ruim (HERRERA, 2008).

Os enxertos conjuntivais consistem em tecido conjuntival dissecado finamente, sem abordar a cápsula de Tenon, seguido de transposição para a córnea, recobrindo o defeito epitelial. Fornecem tecido fibrovascular para preencher o defeito corneal, além do suporte mecânico e trófico, que disponibilizam à lesão leucócitos, anticolagenases naturais como a α2-macroglobulina e antibióticos sistêmicos (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

A técnica de enxertos conjuntivais possui uma desvantagem, pois a conjuntiva é naturalmente opaca, logo prejudicará a visão. Buscando evitar esse prejuízo da técnica, outros materiais são estudados (CHOW; WESTERMEYER, 2015). Além da conjuntiva bulbar, pode ser utilizada conjuntiva palpebral nos enxertos. Será um enxerto livre, denominado em ilha, suturada ao leito da úlcera com padrão simples interrompido. A desvantagem é a perda da irrigação sanguínea. O sucesso desta

técnica está relacionado com a vascularização corneal, que irá suprir a necessidade celular para que a cicatrização ocorra (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

O maior risco de qualquer procedimento de enxertia é a deiscência do recobrimento da lesão, que pode ocorrer concomitante à progressão da lesão (GELATT, 2003), perda das suturas que sustentam o enxerto, excessiva tensão na conjuntiva e presença da cápsula de Tenon após a dissecação (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Segundo Gellat (2003), também é possível realizar as técnicas cirúrgicas de transposição corneoescleral e utilização de aloenxertos corneais.

Estudos foram conduzidos, há alguns anos, na possibilidade de encontrar alternativas de enxertos corneais em úlceras profundas e persistentes (FERREIRA et al., 2013). Dentre elas, podem-se citar a cápsula renal equina (ANDRADE et al., 1999), escama de sardinha (*Sardinela brasilienses*) (LAUS; FERREIRA E ANDRADE, 2000), submucosa intestinal suína (BUSSIERES et al., 2004), membrana de poliuretana vegetal derivada da mamona (MORALES et al., 2005), membrana de celulose microfibrilar (MACEDO et al., 2010), pericárdio homólogo ou heterólogo (DULAURENT et al., 2014; HÜNNING et al., 2009), submucosa de bexiga suína (CHOW; WESTERMEYER, 2015), e membrana amniótica homóloga ou heteróloga (ANDRADE et al., 2009; FERREIRA et al., 2013; ION et al., 2016; SAMPAIO et al., 2006; TSUZUKI et al., 2008; VONGSAKUL et al., 2009), que devem ser consideradas pelos melhores resultados. Avaliando a transparência corneal e qualidade de refração pós-operatória, a membrana amniótica vem sendo utilizada de maneira extensiva em lesões corneais na medicina humana e veterinária (ION et al., 2016), além das suas propriedades antifibrótica, antiangiogênica, antiprotease e anti-inflamatórias (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

1.4 Membrana de Celulose Bacteriana

Recentemente, outros sistemas foram desenvolvidos para a liberação de medicamentos oculares, como o carreamento de fármacos com um sistema de liberação lenta e/ou aplicabilidade direta em colírios ou materiais de silicone-hidrogel (ACHOURI et al.,2013; MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2013).

O biopolímero mais abundante no planeta Terra é a celulose, que se trata de um polímero linear de glicose. A nanocelulose é uma celulose na forma de

nanoestruturas, que possui característica de não ser superior a 100nm em uma dimensão (um plano). Quando se refere à outras dimensões (2D e 3D), essas estruturas podem atingir centenas de nanômetros (nm), micrômetros ou até mais, principalmente nos casos de nanofibras eletrônicas. As nanoestruturas de celulose podem ser divididas de acordo com sua morfologia, como nanofibrilas, nanofibras, “nanowhiskers”, nanocristais, nanobastões e nanobolas. As nanofibrilas estão comumente presentes na celulose bacteriana, onde formam um hidrogel (SANO et al., 2010; MARTÍNEZ ÁVILA et al., 2014; COSTA et al., 2017), ou podem ser adquiridos de plantas, particularmente da madeira, pela hidrólise, oxidação e desintegração mecânica (SHVEDOVA et al, 2016; JULIE CHANDRA et al., 2016; FARADILLA et al, 2017; LIU et al., 2018; VALENTIM et al., 2018; MARTELLI-TOSI et al., 2018; KONTTURI et al., 2018). A expressão “nanofibras” é geralmente utilizada para estruturas fibrosas mais espessas e longas em comparação às nanofibrilas, particularmente estruturas criadas por eletrofiação de celulose sem aditivos ou em compósitos com outros polímeros naturais e sintéticos. As nanofibras da *Electrospun* têm, frequentemente, mais de 100 nm de diâmetro. No entanto, elas são fibras de escala submicrônica, porém o termo “nanofibras” se tornou amplamente usado (NOVOTNA et al., 2014). A distinção entre os termos “nanofibrilas” e “nanofibras” é, muitas vezes, não especificada. Há autores que se referiram às nanofibrilas presentes na celulose bacteriana como “nanofibras”, por exemplo (TORRES et al., 2012; BOTTAN et al., 2015). Todas estas nanoestruturas são tipicamente preparadas por hidrólise ácida de celulose, que destrói as regiões amorfas, enquanto os segmentos cristalinos da celulose permanecem intactos.

A celulose, como um polímero natural, inclui a nanocelulose, e é geralmente obtida de fontes naturais, embora resíduos industriais de fábricas de cerveja, por exemplo, possam produzi-las (SHAHABI-GHAHFARROKHI et al., 2015), ou de resíduos sólidos urbanos (*Panax ginseng*, resíduos de chás usados, resíduos de tecidos de algodão, papelão velho), que são considerados os novos precursores importantes da nanocelulose "verde" (CHEN et al., 2018). Há quatro fontes naturais de nanocelulose: bactérias, plantas, algas e animais. A celulose bacteriana, também conhecida como celulose microbiana (FU et al., 2013; YUEN et al., 2017), é confeccionada extracelularmente por bactérias gram-negativas de vários gêneros. Entre elas, elencam-se *Acetobacter, Achromobacter, Aerobacter, Agrobacterium,*

Alkaligenes, Azotobacter , *Pseudomonas, Rhizobium.*, *Rhodobacter, Salmonella, Sarcina* e*,* particularmente, *Gluconacetobacter*, que é a produtora mais eficiente (QIU et al., 2016; PICHETH et al., 2017). A espécie mais amplamente utilizada de *Gluconacetobacter* é *Gluconacetobacter xylinus* (SANO et al., 2010; AHREM et al., 2014). Outras espécies importantes a serem destacadas são: *Gluconacetobacter hansenii* (COSTA et al., 2017; DOS REIS et al., 2018; LAZARINI et al., 2018), *Gluconacetobacter kombuchae (*SASKA et al., 2017), *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) europaeus* (DUBEY et al., 2017) e uma estirpe *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) medellinensis* resistente ao pH baixo (OSORIO et al., 2018). O crescimento bacteriano e a produção de nanocelulose podem ser melhorados pela presença de leveduras ou extrato de levedura no meio de cultura (SASKA et al., 2017; KAMINAGAKURA et al., 2018), ou pelo co-cultivo simbiótico com *Medusomyces gisevii* (ZHARIKOV et al., 2018).

A celulose bacteriana é quimicamente semelhante à celulose vegetal, porém não possui subprodutos como lignina, pectina e hemicelulose, constituída por uma rede reticulada única de fibras finas (WIEGAND et al., 2015). A nanocelulose vegetal pode ser obtida a partir de árvores, arbustos, ervas diversas, gramíneas, flores, raízes, suculentas, etc. As árvores incluem folhas de árvores, por exemplo, bétulas (KOLAKOVIC et al., 2011; KOLAKOVIC; LAAKSONEN et al., 2012; KOLAKOVIC; PELTONEN et al., 2012; SIRVIÖ et al., 2014; HAKKARAINEN et al., 2016; LIU et al., 2016). e várias árvores coníferas (EMPSON et al., 2014; BASU; LINDH et al., 2017; BASU; HONG et al., 2017; BASU; HEITZ et al., 2018; BASU; STROMME et al., 2018), por exemplo, *Pinus radiata* (POWELL et al., 2016). Outras fontes vegetais importantes que podem ser incluídas são: a cana-de-açúcar (LI et al., 2012; RAMPHUL et al., 2017), a grama, *Miscanthus Giganteus (*CUDJOE et al., 2017) por exemplo, ou *Imperata brasiliensis* (DE CARVALHO BENINI et al., 2018), bambu (SINGLA et al., 2017), casca de arroz (SUPRAMANIAM et al., 2018), folha de milho (SHARIF HOSSAIN et al., 2018), palha triticale (TARRÉS et al., 2017), folha de abacaxi (SOUZA et al., 2018), palha de soja (MARTELLI-TOSI et al., 2018), cenoura (VARANASI et al., 2018) e agave (CHÁVEZ-GUERRERO et al., 2018), particularmente *Agave sisalana*, isto é, sisal (BONNÉ et al., 2008).

A pele é o maior órgão do corpo humano com várias funções vitais importantes, particularmente como barreira contra os efeitos adversos do meio

ambiente ao organismo (dano químico, dano de radiação, por exemplo, por luz ultravioleta e infecção microbiana). Outras funções importantes da pele é a termorregulação, sensação de temperatura, toque, pressão e dor, mantendo a umidade apropriada nos tecidos subjacentes, excreção de íons, água e várias moléculas (por exemplo, lipídios e proteínas), e também produção e armazenamento de vários biomoléculas, como pigmentos, vitamina D e queratinas para a formação de apêndices epidérmicos (RODRIGUES et al., 2014; BASU; LINDH et al., 2017; LOH et al., 2018). Por conseguinte, existe uma necessidade essencial de se regenerar ou, pelo menos, de reparar a pele danificada, particularmente através de métodos de engenharia de tecidos da pele e indução de cicatrização ativa de feridas.

A nanocelulose possui várias propriedades vantajosas para estas aplicações, como resistência mecânica apropriada, alta capacidade de absorção de água, que permite manter a umidade na pele lesionada e, ao mesmo tempo, absorver o exsudato das feridas (KRAMER al., 2006; KLEMM et al., 2006; ; SULAEVA et al., 2015; HAKKARAINEN et al., 2016; BASU; LINDH et al., 2017; SUN et al., 2017; BASU; HEITZ et al., 2018). A morfologia em nanoescala da nanocelulose imita a arquitetura em nanoescala da matriz extracelular nativa e, assim, a nanocelulose pode ser considerada um substrato adequado para a adesão e crescimento de células da pele, embora a não degradabilidade deste material seja um fator importante que limita seu uso direto como suporte celular. Por último, mas não menos importante, alguns tipos de nanocelulose, por exemplo, nanocelulose derivados de madeira, tem um efeito antimicrobiano (POWELL et al., 2016; BASU; HEITZ et al., 2018), ou este efeito pode ser induzido por incorporação de materiais nanocelulose com vários íons e compostos (SULAEVA et al., 2015; LI et al., 2018)

O uso de nanocelulose na engenharia de tecidos e áreas relacionadas, como cicatrização de feridas e interação de material celular, foi desenvolvido, juntamente com aplicações de nanocelulose na indústria e tecnologia, incluindo várias biotecnologias, como a biossensibilização e a administração controlada de medicamentos, como paracetamol (BODHIBUKKANA et al., 2006; KOLAKOVIC et al., 2011), ibuprofeno (SUPRAMANIAM et al., 2018), metotrexato (MENEGUIN et al., 2017), diclofenaco (SILVA et al., 2014), propranolol (BODHIBUKKANA et al., 2006), gentamicina (XIAO et al., 2018), ceftriaxona (LAZARINI et al., 2018), peptídeos antibacterianos (WEISHAUPT et al., 2018).

A engenharia de tecidos da pele envolve a reconstrução de duas camadas principais da pele, a saber, a epiderme, isto é, a camada superficial da pele formada principalmente por queratinócitos, e a derme, a camada interna da pele formada principalmente por fibroblastos. Devido à sua certa semelhança com os tecidos moles naturais, incluindo a pele, a celulose bacteriana é o tipo de nanocelulose mais amplamente utilizado para a reconstrução dessas camadas (LOH et al., 2018). De fato, a celulose bacteriana é um hidrogel contendo nanofibrilas, que imita o componente fibrilar da matriz extracelular natural. A celulose bacteriana tem uma grande capacidade de reter umidade, e também possui propriedades mecânicas apropriadas, como força, módulo de elasticidade, elasticidade e conformabilidade (SULAEVA et al., 2015; MAHDAVI et al., 2016). Em 2006, filmes finos de celulose bacteriana foram usados como substratos para o cultivo de queratinócitos da pele humana transformada e linhas celulares normais de fibroblastos da pele humana. Os filmes apoiaram a disseminação, crescimento e migração nos queratinócitos, mas não nos fibroblastos, que formaram aglomerados e se destacaram dos filmes. Esse fenômeno foi explicado pela adesão relativamente fraca do material celular em comparação com a adesão célula-célula relativamente forte nos fibroblastos, o que gera uma força contrátil (SANCHAVANAKIT et al., 2006). No entanto, em um estudo de Kingkaew et al. (2010), os filmes de celulose bacteriana mostraram-se bons substratos para a adesão, disseminação e crescimento de queratinócitos e fibroblastos de pele humana. Da mesma forma, uma rede em três dimensões estruturada por superfície de nanofibras de celulose bacteriana também forneceu um bom suporte para queratinócitos humanos e fibroblastos e estimulou a cicatrização de feridas cutâneas experimentais em camundongos (BOTTAN et al., 2015).

Uma questão importante é que os curativos devem proteger a ferida contra infecções microbianas, causadas, principalmente, por bactérias. Embora a nanocelulose bacteriana seja considerada um curativo quase ideal, ela não apresenta propriedades antibacterianas quando usada sozinha. Portanto, numerosos estudos têm lidado com a incorporação de celulose bacteriana com vários agentes antibacterianos, tais como agentes à base de metais, antissépticos, antibióticos e várias moléculas antibacterianas derivadas da natureza. Os agentes à base de metais usados para modificação da celulose bacteriana incluem várias formas de prata, tais como sulfadiazina de prata (LUAN et al., 2012) e nanopartículas de prata (WU et al.,

2014), ambas ativas contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A nanocelulose bacteriana (NCB) é considerada um dos materiais mais adequados para curativos de pele. Isso se deve às suas propriedades físicas, químicas e biológicas favoráveis, como mencionado acima, como pureza química, propriedades mecânicas favoráveis e capacidade de absorção de água (WIEGAND et al., 2015; SULAEVA et al., 2015; MAHDAVI et al., 2016).

A própria NCB, ou seja, sem quaisquer aditivos, mostrou uma grande capacidade de estimular a cicatrização de feridas, ou seja, a regeneração da epiderme e da derme. A celulose bacteriana acelerou o processo de cicatrização em comparação com uma gaze convencional, manifestada pela maior espessura da epiderme e derme regenerada, maior número de vasos sangüíneos recém-criados, maior expressão de colágeno e menor número de mastócitos. células infiltrando o local danificado. Ao mesmo tempo, a celulose bacteriana não mostrou efeitos tóxicos no fígado e rim, como revelado pelos níveis de alanina transaminase, aspartato transaminase, fosfatase alcalina, nitrogênio urêico no sangue, creatinina e lactato desidrogenase no soro sangüíneo (KWAK et al., 2015).

Uma interessante aplicação de nanocelulose bacteriana foi a criação de coberturas transparentes para feridas, que permitiram o monitoramento ótico em tempo real da cicatrização de feridas, e também o diagnóstico da infecção e inflamação em feridas crônicas (SPRINGER et al., 2018). Outro curativo transparente foi desenvolvido pela combinação de bigodes de celulose bacteriana com um hidrogel de poli (2-hidroxietil metacrilato) e nanopartículas de prata, que conferiram ao curativo uma atividade antibacteriana. Ao mesmo tempo, esse material facilitou o crescimento de fibroblastos, o que indicou sua não toxicidade (DI et al., 2017).

A nanocelulose foi também já foi utilizada na engenharia de tecido neural (INNALA et al., 2014), engenharia de tecidos de cartilagem (MARTÍNEZ ÁVILA et al., 2014), em degeneração do disco intervertebral (PEREIRA et al., 2018), engenharia de tecidos hepáticos (MALINEN et al., 2014), engenharia de tecido adiposo (KRONTIRAS et al., 2015), cultura de células-tronco pluripotentes humanas (LOU et al., 2014), engenharia de tecido vascular (HONG et al., 2015), reconstrução uretral (LV et al.,

2018), reconstrução da *dura-máter* (GOLDSCHMIDT et al., 2016), reparo de defeitos cardíacos congênitos (LANG et al., 2015).

No campo dos anestésicos locais, a lidocaína foi incorporada à celulose bacteriana a fim de reduzir a dor, especialmente em feridas por queimaduras, e assim melhorar a cicatrização da ferida (BRASSOLATTI et al., 2018).

Estudos que documentam considerável citotoxicidade e atividade pró-inflamatória de nanocelulose in vitro e in vivo também surgiram. In vitro, cinco tipos de materiais de nanocelulose derivados de madeira eram praticamente não citotóxicos para células humanas semelhantes a macrófagos, quando comparados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e nanomateriais, como revelado por um ensaio *Alamar blue*. No entanto, o perfil multiplex da secreção de citocinas e quimiocinas indicou que os materiais nanocelulósicos induziram respostas inflamatórias potentes em doses sub-citotóxicas (BHATTACHARYA et al., 2017). In vivo, nanocristais de celulose derivados da madeira mostraram induzir uma resposta inflamatória em camundongos após a aspiração, manifestada por um aumento de leucócitos e eosinófilos nos pulmões, recuperados por lavado broncoalveolar (BAL) e supra-regulação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Esses nanocristais também induziram estresse oxidativo e dano tecidual, manifestados por um acúmulo de proteínas modificadas oxidativamente e um aumento na atividade da lactato desidrogenase no fluido BAL (YANAMALA et al., 2014). Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo de Shvedova et al. (2016). A exposição de camundongos a nanocristais de celulose derivada da madeira respirável causou inflamação e dano pulmonar, induziu estresse oxidativo, aumento dos níveis de colágeno e fator de crescimento transformador no pulmão e prejuízo das funções pulmonares. Além disso, esses efeitos foram mais pronunciados em camundongos fêmeas do que em camundongos machos (SHVEDOVA et al., 2016). Nanocelulose sulfonada obtida da semente de *Khaya sengalensis* mostrou toxicidade renal em ratos, manifestada por hipernatremia, aumento do status antioxidante e expressões imuno-histoquímicas da sintase induzida do óxido nítrico e ciclooxigenase-2 (COX-2) nos rins (ADEWUYI et al., 2018).

A citotoxicidade e a imunogenicidade da nanocelulose podem ser moduladas pelas suas propriedades físico-químicas, por exemplo, funcionalizando-a

com grupos químicos específicos ou dotando-a de uma carga elétrica. A celulose nanofibrilada (CNF) derivada da madeira modificada com grupos carboximetil (nanocelulose aniônica) e hidroxipropiltrimetilamônio (nanocelulose catiônica) provocou um efeito pró-inflamatório menor do que a CNF não modificada em fibroblastos dérmicos humanos, em células MRC-5 e em macrófagos humanos Células THP-1 (LOPES et al., 2017). No entanto, os filmes aniônicos de CNF ativaram significativamente as células THP-1 em direção a um fenótipo pró-inflamatório, enquanto a celulose catiônica e não modificada induziu apenas uma leve ativação dessas células (HUA et al., 2015).

A nanocelulose possui um espectro de propriedades físicas, químicas e biológicas vantajosas. Sua grande área superficial específica permite a adsorção de vários átomos, íons, moléculas e células microbianas. Materiais oriundos de nanocelulose porosos são capazes de separar várias moléculas e reter objetos microbianos. Os materiais à base de nanocelulose em geral têm alta resistência mecânica, inércia química e propriedades morfológicas, físicas, químicas, elétricas, térmicas e ópticas personalizáveis, propriedades de barreira e efeitos antimicrobianos e biocompatibilidade sem toxicidade ou baixa toxicidade e com baixa imunogenicidade. Ao mesmo tempo, são materiais que possuem uma grande vantagem quanto ao custo relativamente baixo, com alta disponibilidade e renovabilidade. Os materiais de nanocelulose surgiram, portanto, como materiais promissores para uma ampla gama de aplicações biomédicas, nomeadamente purificação de ar e soluções aquosas, filtração e ultrafiltração, embalagem de alimentos e outros produtos sensíveis, conservação de artefatos históricos, construção de isolantes térmicos e retardadores de chama, extração e armazenamento de energia, acústica, sensores e liberação controlada de medicamentos.

Aplicações oftalmológicas da nanocelulose incluem a construção de lentes de contato. Para sua construção, foi desenvolvido um hidrogel macroporoso altamente transparente, composto de poli (álcool vinílico) reforçado com nanofibrilas de celulose e contendo mais de 90% de água. O hidrogel exibiu alta transparência com um índice de refração próximo ao da água, muito boas propriedades de bloqueio de raios ultravioletas e comportamento mecânico semelhante ao colágeno elástico típico para tecidos moles (TUMMALA et al., 2017). Foi também feita uma tentativa para

reconstruir córnea experimentalmente danificada em coelhos utilizando membranas de celulose bacterianas puras e membranas compósitas de celulose bacteriana / policaprolactona, mas os resultados foram considerados insatisfatórios. O exame histológico mostrou ausência de epitélio nas membranas, fibroplasia próxima aos implantes, infiltrado inflamatório linfático com células gigantes, desorganização do colágeno e presença de fibras colágenas imaturas (SEPÚLVEDA et al., 2016).

Cremonini et al. (2010) utilizaram a membrana de biocelulose embebida em ofloxacino 0,3% na forma de lente de contato em cães, na ceratite ulcertativa experimental. Observaram que a membrana promoveu liberação gradual de ofloxacina, em concentração adequada, até o terceiro dia de avaliação, demonstrando efeito antimicrobiano, apesar da concentração do antibiótico ser menor que no grupo tratado com colírio do mesmo princípio ativo.

Em outro estudo, a membrana de celulose bacteriana, associada ou não à policaprolactona, foi utilizada experimentalmente como substituto tecidual na córnea de coelhos. Elas foram aplicadas por meio de ceratoplastia interlamelar e observaram que não houve epitelização completa nos implantes por um período de 45 dias. Histologicamente, sugeriram que não houve um comportamento biocompatível devido à exacerbada reação inflamatória. Foram observados fibroblastos aderidos à membrana e entenderam que, a ausência de poros limitou a migração celular. Sendo assim, concluíram que a membrana desempenhou uma função protetora à superfície ocular, entretanto, mostrou-se desfavorável ao ser utilizadas como implantes no tecido corneal de coelhos (SEPÚLVEDA et al., 2016).

Hoje, os avanços médicos voltados à cirurgia da córnea são inquestionáveis. Atualmente, frente ao exposto em outras modalidades médicas, a aplicação da membrana de biocelulose sobre a córnea pode ser apontada como uma técnica promissora no tratamento das alterações da superfície ocular. Assim, objetivou-se, neste trabalho, observar o comportamento clínico da presença da membrana de biocelulose, em duas espessuras, no tratamento da ceratite ulcerativa em cães e gatos. Um assunto que merece novas e originais investigações.

1.5 REFERÊNCIAS

ACHOURI, D.; ALHANOUT, K.; PICCERELLE, P.; ANDRIEU, V. Recent advances in ocular drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1599-1617, 2013.

ADEWUYI, A.; OTUECHERE, C. A.; ADEBAYO, O. L.; ANAZODO, C.; PEREIRA, F. V. Renal toxicological evaluations of sulphonated nanocellulose from Khaya sengalensis seed in Wistar rats. **Chem**. **Biol**. **Interact**., v. 284, p. 56–68, 2018. doi: 10.1016/j.cbi.2018.02.015.

AHREM, H.; PRETZEL, D.; ENDRES, M.; CONRAD, D.; COURSEAU, J.; MÜLLER, H.; JAEGER, R.; KAPS, C.; KLEMM, D. O.; KINNE, R. W. Laser-structured bacterial nanocellulose hydrogels support ingrowth and differentiation of chondrocytes and show potential as cartilage implants. **Acta Biomater**., v. 10, p. 1341–1353, 2014. doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.004.

ANDRADE, A. L.; GOMES, J. A. P.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V.; CAMPOS, M. Aspectos clínicos e morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 127-142, 2009.

ANDRADE, A. L.; LAUS, J. L.; FIGUEIREDO, F.; BATISTA, C. M. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophtalmology**, v. 2, p. 79-82, 1999.

BASU A., HONG J., FERRAZ N., Hemocompatibility of Ca2+ -crosslinked nanocellulose hydrogels: Toward efficient management of hemostasis. **Macromo**l. **Biosci**., v. 17, n. 11, 2017. doi: 10.1002/mabi.201700236.

BASU, A.; HEITZ, K.; STRØMME, M.; WELCH, K.; FERRAZ, N. Ion-crosslinked wood-derived nanocellulose hydrogels with tunable antibacterial properties: Candidate

materials for advanced wound care applications. **Carbohydr**. **Polym**., v.181, p. 345–350, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.10.085.

BASU, A.; LINDH, J.; ÅLANDER, E.; STRØMME, M.; FERRAZ, N. On the use of ion-crosslinked nanocellulose hydrogels for wound healing solutions: Physicochemical properties and application-oriented biocompatibility studies. **Carbohydr**. **Polym**., v. 174, 2017.

BASU, A.; STRØMME, M.; FERRAZ, N. Towards tunable protein-carrier wound dressings based on nanocellulose hydrogels crosslinked with calcium ions. **Nanomaterials**., v. 8, n. 7, p. 550, 2018. doi: 10.3390/nano8070550.

BERCHT, B. S. Úlcera de Córnea Profunda em Cães. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Porto Alegre**, 2009.

BHATTACHARYA, K.; KILIÇ, G.; COSTA, P. M.; FADEEL, B. Cytotoxicity screening and cytokine profiling of nineteen nanomaterials enables hazard ranking and grouping based on inflammogenic potential. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 6, p. 809–826, 2017.

BODHIBUKKANA, C.; SRICHANA, T.; KAEWNOPPARAT, S.; TANGTHONG, N.; BOUKING, P.; MARTIN, G. P.; SUEDEE, R. Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. **J. Controll. Release.**, v. 113, n. 1, p. 43–56, 2006. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.03.007.

BONNÉ M. J., EDLER K. J., BUCHANAN J. G., WOLVERSON D., PSILLAKIS E., HELTON M., THIELEMANS W., MARKEN F., Thin-film modified electrodes with reconstituted cellulose−PDDAC films for the accumulation and detection of triclosan. **J**. **Phys**. **Chem**. **C**., v. 112, n. 10, p. 2660–2666, 2008. doi: 10.1021/jp709783k.

BOTTAN, S.; ROBOTTI, F.; JAYATHISSA, P.; HEGGLIN, A.; BAHAMONDE, N.; HEREDIA-GUERRERO, J. A.; BAYER, I. S.; SCARPELLINI, A.; MERKER, H.; LINDENBLATT, N.; et al. Surface-structured bacterial cellulose with guided assembly-

based biolithography (GAB) **ACS Nano**., v. 9, p. 206–219, 2015 doi: 10.1021/nn5036125.

BRASSOLATTI, P.; KIDO, H. W.; BOSSINI, P. S.; GABBAI-ARMELIN, P. R.; OTTERÇO, A. N.; ALMEIDA-LOPES, L.; ZANARDI, L. M.; NAPOLITANO, M. A.; DE AVÓ, L. R. D. S.; FORATO, L. A. et al. Bacterial cellulose membrane used as biological dressings on third-degree burns in rats. **Biomed. Mater. Eng.**, v. 29, n. 1, p. 29–42, 2018.

BUSSIERES, M.; KROHNE, S. G.; STILES, J.; TOWNSEND, W. M. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. **Veterinary Ophtalmology**, v. 7, n. 5, p. 352-359, 2004.

CHÁVEZ-GUERRERO, L.; SEPÚLVEDA-GUZMÁN, S.; SILVA-MENDOZA, J.; AGUILAR-FLORES, C.; PÉREZ-CAMACHO, O. Eco-friendly isolation of cellulose nanoplatelets through oxidation under mild conditions. **Carbohydr. Polym..** v. 181, p. 642–649, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.100.

CHEN, Y. W.; LEE, H. V. Revalorization of selected municipal solid wastes as new precursors of “green” nanocellulose via a novel one-pot isolation system: A source perspective. **Int**. **J**. **Biol**. **Macromo**l., v. 107, p.78–92, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.143.

CHOW, D. W. Y.; WESTERMEYER, H. D. Retrospective evaluation of corneal reconstruction using ACell Vet^{TM} alone in dogs and cats: 82 cases. **Veterinary Ophtalmology**, p. 1-10, 2015.

COSTA, A. F. S.; ALMEIDA, F. C. G.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacterhansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. **Front. Microbiol**., v. 8, p. 2027, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.02027.

CREMONINI, D. N.; RANZANI, J. J. T.; CUNHA, M. L. R. S.; TONIN, F. G.; BRANDÃO, C. V. S.; MESSADEQ, Y. Liberação intraocular de ofloxacina associada a lente de

contato biossintética em ceratite bacteriana experimental em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 4, p. 791-796, 2010.

CUDJOE, E.; HUNSEN, M.; XUE, Z.; WAY, A. E.; BARRIOS, E.; OLSON, R. A.; HORE, M. J. A.; ROWAN, S. J. Miscanthus Giganteus: A commercially viable sustainable source of cellulose nanocrystals. **Carbohydr**. **Polym**., v. 155, p. 230–241, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.08.049.

DE CARVALHO BENINI, K. C. C.; VOORWALD, H. J. C.; CIOFFI, M. O. H.; REZENDE, M. C.; ARANTES, V. Preparation of nanocellulose from *Imperatabrasiliensis* grass using Taguchi method. **Carbohydr**. **Polym**., v. 192, p. 337–346, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.03.055.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract Refract Surgery**, v. 37, n. 3, p. 588-598, 2011.

DI, Z.; SHI, Z.; ULLAH, M. W.; LI, S.; YANG, G. A transparent wound dressing based on bacterial cellulose whisker and poly (2-hydroxyethyl methacrylate) **Int**. **J**. **Biol**. **Macromol**., v. 105, p. 638–644, 2017. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.075.

DOS REIS, E. M.; BERTI, F. V.; COLLA, G.; PORTO, L. M., Bacterial nanocellulose-IKVAV hydrogel matrix modulates melanoma tumor cell adhesion and proliferation and induces vasculogenic mimicry in vitro. **J**. **Biomed**. **Mater**. **Res. Part B Appl. Biomater**., v. 106, p. 2741–2749, 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34055.

DUBEY, S.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, P.; SINGH, J.; SINHA, N.; SINGH, R. P. From rotten grapes to industrial exploitation: Komagataeibactereuropaeus SGP37, a micro-factory for macroscale production of bacterial nanocellulose. **Int**. **J**. **Biol**. **Macromol**., v. 96, p. 52–60, 2017. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.016.

DULAURENT, T.; AZOULAY, T.; GOULLE, F.; DULAURENT, A.; MENTEK, M.; PEIFFER, R. L.; ISARD, P. Use of bovine pericardium (Tutopatch®) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. **Veterinary Ophtalmology**, v. 17, n. 2, p. 91-99, 2014.

EMPSON, Y. M.; EKWUEME, E. C.; HONG, J. K.; PAYNTER, D. M.; KWANSA, A. L.; BROWN, C.; PEKKANEN, A. M.; ROMAN, M.; RYLANDER, N. M.; BROLINSON, G. P.; Freeman, J. W. High elastic modulus nanoparticles: A novel tool for subfailure connective tissue matrix damage. **Transl**. **Res**., v. 164, n. 3, p. 244–257, 2014. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.004.

FARADILLA, R. H. F.; LEE, G.; ARNS, J.-Y.; ROBERTS, J.; MARTENS, P.; STENZEL, M. H.; ARCOT, J.; Characteristics of a free-standing film from banana pseudostem nanocellulose generated from TEMPO-mediated oxidation. **Carbohydr**. **Polym**., v. 174, p. 1156–1163, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.07.025.

FERREIRA, G. T. N. M.; SOUZA, T. F. B.; SAKAMOTO, S. S.; SILVA, T. C. C. ANDRADE, A. L. Aspectos clínicos do enxerto conjuntival 360º e do implante da membrana amniótica criopreservada no tratamento de úlceras de córnea em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1239-1252, 2013.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydr**. **Polym**., v. 92, p.1432–1442, 2013. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.071.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Afecções da Túnica Fibrosa. In: _. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2009. p. 69-96.

GELATT, K. N. Doenças e Cirurgias da Córnea e Esclera do Cão. In: _. **Manual de oftalmologia veterinária**. 1ª ed. Barueri: Manole, 2003. p. 125-164.

GILGER, B. C.; BENTLEY, E.; OLLIVIER, F. J. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: GELATT K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4ª ed. Iowa: Blackwell, 2007. v. 2. p. 690-752.

GOLDSCHMIDT, E.; CACICEDO, M.; KORNFELD, S.; VALINOTI, M.; IELPI, M.; AJLER, P. M.; YAMPOLSKY, C.; RASMUSSEN, J.; CASTRO, G. R.; ARGIBAY, P.

Construction and in vitro testing of a cellulose dura mater graft. **Neurol. Res.**, v. 38, n. 1, p. 25–31, 2016. doi: 10.1080/01616412.2015.1122263.

HAKKARAINEN, T.; KOIVUNIEMI, R.; KOSONEN, M.; ESCOBEDO-LUCEA, C.; SANZ-GARCIA, A.; VUOLA, J.; VALTONEN, J.; TAMMELA, P.; MÄKITIE, A.; LUUKKO, K. et al. Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. **J**. **Controll**. **Release**., v. 244, p. 292–301, 2016. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.07.053.

HELPER, L.C. **Magrane's: Canine Ophthalmology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p. 297.

HERRERA, D. Afecções da Córnea. In: _. **Oftalmologia clínica em animais de companhia**. 1ª ed. São Paulo: MedVet, 2008. p. 111-140.

HOLLINGSWORTH, S. R. Corneal surgical techniques. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 3, p. 161-167, 2003.

HONG, F.; WEI, B.; CHEN, L. Preliminary study on biosynthesis of bacterial nanocellulose tubes in a novel double-silicone-tube bioreactor for potential vascular prosthesis. **BioMed Res. Int.** v. 2015, p.1–9, 2015. doi: 10.1155/2015/560365.

HUA, K.; ÅLANDER, E.; LINDSTRÖM, T.; MIHRANYAN, A.; STRØMME, M.; FERRAZ, N. Surface chemistry of nanocellulose fibers directs monocyte/macrophage response. **Biomacromolecules,** v. 16, n. 9, p. 2787–2795, 2015. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00727.

HUANG, J. -W.; LV, X. -G.; LI, Z.; SONG, L. -J.; FENG, C.; XIE, M. -K.; LI, C.; LI, H. -B.; WANG, J. -H.; ZHU, W. -D., et al. Urethral reconstruction with a 3D porous bacterial cellulose scaffold seeded with lingual keratinocytes in a rabbit model. **Biomed. Mater.**, v. 10, n. 5, 2015. doi: 10.1088/1748-6041/10/5/055005.

HÜNNING, P. S.; RIGON, G. M.; BEHEREGARAY, W. K.; PRESSER, D.; MUCCILLO, M; PIGATTO, J. A. T. Reparação de perfuração ocular em um cão usando pericárdio

homólogo preservado em glicerina. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 37, n. 2, p. 195-199, 2009.

INNALA, M.; RIEBE, I.; KUZMENKO, V.; SUNDBERG, J.; GATENHOLM, P.; HANSE, E.; JOHANNESSON, S. 3D culturing and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells on bacterial nanocellulose scaffolds. **Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.**, v. 42, n. 5 p. 302–308, 2014. doi: 10.3109/21691401.2013.821410.

ION L.; IONASCU I.; BIRTOIU A. Melting keratitis in dogs and cats. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 342-349, 2015.

ION, L.; IONASCU, I.; JOZ, C. G.; CERRADA, I.; BIRTOIU, A.; HUGUET, E. Human amniotic membrane transplantation in the treatment of feline corneal sequestrum: preliminary results. **AgroLife Scientific Journal**, v. 5, n. 1, p. 91-98, 2016.

JULIE CHANDRA, C. S.; GEORGE, N.; NARAYANANKUTTY, S. K. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from arecanut husk fibre. **Carbohydr**. **Polym**., v.142, p.158–166, 2016.

KAMINAGAKURA, K. L. N.; SUE SATO, S.; SUGINO, P.; KATAKI DE OLIVEIRA VELOSO L., DOS SANTOS D. C., PADOVANI C. R., BASMAJI P., OLYVEIRA G., SCHELLINI S. A., Nanoskin® to treat full thickness skin wounds**. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater**., v. 107, n. 3, p. 724-732, 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34166. in press.

KERN, T. J. Ulcerative keratitis. **Vet. Clin. North Am. Small. Pract**., v. 20, p. 643-66, 1990.

KINGKAEW, J.; JATUPAIBOON, N.; SANCHAVANAKIT, N.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Biocompatibility and growth of human keratinocytes and fibroblasts on biosynthesized cellulose–chitosan film. **J. Biomater. Sci. Polym. Edit.**, v. 21, n. 8-9, p. 1009–1021, 2010. doi: 10.1163/156856209X462763.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HEßLER, N.; HORNUNG, M.; SCHMAUDER, H. -P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. In: KLEMM, D. **Polysaccharides.** 2ª ed. Berlin: Springer. 2006. v. 205. p. 49–96.

KOLAKOVIC, R.; LAAKSONEN, T.; PELTONEN, L.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-dried nanofibrillar cellulose microparticles for sustained drug release. **Int**. **J**. **Pharm**., v. 430, n. 1-2, p. 47–55, 2012. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.031.

KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAAKSONEN, T.; PUTKISTO, K.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J., Spray-dried cellulose nanofibers as novel tablet excipient. **AAPS PharmSciTech**., v. 12, n. 4, p. 1366–1373, 2011. doi: 10.1208/s12249-011-9705-z.

KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J.; LAAKSONEN, T., Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. **Eur. J**. **Pharm**. **Biopharm**., v. 82, n. 2, p. 308–315, 2012. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.06.011.

KONTTURI, E.; LAAKSONEN, P.; LINDER, M. B.; NONAPPA; GRÖSCHEL, A. H.; ROJAS, O. J.; IKKALA, O. Advanced materials through assembly of nanocelluloses. **Adv. Mater**., v. 30, p. 1703779, 2018. doi: 10.1002/adma.201703779.

KRAMER, F.; KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; HEßLER, N.; WESARG, F.; FRIED, W.; STADERMANN, D. Nanocellulose polymer composites as innovative pool for (bio)material development. **Macromol. Symp**., v. 244, p. 136–148, 2006. doi: 10.1002/masy.200651213.

KRONTIRAS, P.; GATENHOLM, P.; HÄGG, D. A. Adipogenic differentiation of stem cells in three-dimensional porous bacterial nanocellulose scaffolds. **J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.**, v. 103, n. 1, p. 195–203, 2015. doi: 10.1002/jbm.b.33198.

KWAK, M. H.; KIM, J. E.; GO, J.; KOH, E. K.; SONG, S. H.; SON, H. J.; KIM, H. S.; YUN, Y. H.; JUNG, Y. J.; HWANG, D. Y. Bacterial cellulose membrane produced by

Acetobacter sp. A10 for burn wound dressing applications. **Carbohydr. Polym.**, v. 122, p. 387–398, 2015. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.049.

LANG, N.; MERKEL, E.; FUCHS, F.; SCHUMANN, D.; KLEMM, D.; KRAMER, F. MAYER-WAGNER S., SCHROEDER C., FREUDENTHAL F., NETZ H., et al. Bacterial nanocellulose as a new patch material for closure of ventricular septal defects in a pig model. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.,** v. 47, n. 6, p. 1013–1021, 2015. doi: 10.1093/ejcts/ezu292.

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**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2000.

LAZARINI, S. C.; YAMADA, C.; BARUD, H. S.; TROVATTI, E.; CORBI, P. P.; LUSTRI, W. R. Influence of chemical and physical conditions in selection of Gluconacetobacterhansenii ATCC 23769 strains with high capacity to produce bacterial cellulose for application as sustained antimicrobial drug-release supports. **J**. **Appl**. **Microbiol**., v. 125, p. 777–791, 2018. doi: 10.1111/jam.13916.

LI, J.; CHA, R.; MOU, K.; ZHAO, X.; LONG, K.; LUO, H.; ZHOU, F.; JIANG, X. Nanocellulose-based antibacterial materials. **Adv. Healthc. Mater**., v. 7, n. 20, 2018. doi: 10.1002/adhm.201800334.

LI, J.; WEI, X.; WANG, Q.; CHEN, J.; CHANG, G.; KONG, L.; SU, J.; LIU, Y. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. **Carbohydr**. **Polym**., v. 90, n. 4, p. 1609–1613, 2012. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.07.038.

LIU, J.; CHENG, F.; GRÉNMAN, H.; SPOLJARIC, S.; SEPPÄLÄ, J.; ERIKSSON, J. E.; WILLFÖR, S.; XU, C., Development of nanocellulose scaffolds with tunable structures to support 3D cell culture. **Carbohydr**. **Polym**., v. 148, p. 259–271, 2016. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.064.

LIU, Y.; SUI, Y.; LIU, C.; LIU, C.; WU, M.; LI, B.; LI, Y. A physically crosslinked polydopamine/nanocellulose hydrogel as potential versatile vehicles for drug delivery and wound healing. **Carbohydr. Polym**., v.188, p. 27–36, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.093.

LOH, E. Y. X.; MOHAMAD, N.; FAUZI, M. B.; NG, M. H.; NG, S. F.; MOHD AMIN, M. C. I. Development of a bacterial cellulose-based hydrogel cell carrier containing keratinocytes and fibroblasts for full-thickness wound healing. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p.2875, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-21174-7.

LOPES, V. R.; SANCHEZ-MARTINEZ, C.; STRØMME, M.; FERRAZ, N. In vitro biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: Surface chemistry aspect. **Part. FibreToxicol**., v. 14, n. 1, 2017. doi: 10.1186/s12989-016-0182-0.

LOU, Y. -R.; KANNINEN, L.; KUISMA, T.; NIKLANDER, J.; NOON, L. A.; BURKS, D.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. The use of nanofibrillar cellulose hydrogel as a flexible three-dimensional model to culture human pluripotent stem cells. **Stem Cells Dev.**, v. 23, n. 4, p. 380–392, 2014. doi: 10.1089/scd.2013.0314.

LUAN, J.; WU, J.; ZHENG, Y.; SONG, W.; WANG, G.; GUO, J.; DING, X. Impregnation of silver sulfadiazine into bacterial cellulose for antimicrobial and biocompatible wound dressing. **Biomed. Mater**., v. 7, n. 6, 2012. doi: 10.1088/1748-6041/7/6/065006.

LV, X.; FENG, C.; LIU, Y.; PENG, X.; CHEN, S.; XIAO, D.; WANG, H.; LI, Z.; XU, Y.; LU, M. A smart bilayered scaffold supporting keratinocytes and muscle cells in micro/nano-scale for urethral reconstruction. **Theranostics.**, v. 8, n. 11, p.3153–3163, 2018. doi: 10.7150/thno.22080.

MACEDO, L. R.; RIBEIRO, A. P.; CONCEIÇÃO, L. F.; GALERA, P. D.; LAUS, J. L. Experimental lamelar keratoplasty in rabbits using microfibrilar celulose membrane. Clinical, morphological and immunohistochemical findings. **Ciência Rural**, v. 40, n.2, p. 378-383, 2010.

MAHDAVI, M.; MAHMOUDI, N.; REZAIEANARAN, F.; SIMCHI, A. Electrospinning of nanodiamond-modified polysaccharide nanofibers with physico-mechanical properties close to natural skins. **Mar**. **Drugs**., v. 14, p.128, 2016. doi: 10.3390/md14070128.

MALAEKEH-NIKOUEI, B.; VAHABZADEH, S. A.; MOHAJERI, S.A. Preparation of a Molecularly Imprinted Soft Contact Lens as a New Ocular Drug Delivery System for Dorzolamide. **Current Drug Delivery**, v. 10, n. 3, p. 279-285, 2013.

MALINEN, M. M.; KANNINEN, L. K.; CORLU, A.; ISONIEMI, H. M.; LOU, Y. -R.; YLIPERTTULA, M. L.; URTTI, A. O. Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels. **Biomaterials**, v. 35, n. 19, p. 5110–5121, 2014. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.020.

MARKMAN, C.; FRACALANZZA, S. E. L.; NOVAES Jr., A. B. et al. Slow release of tetracicline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration**. J. Periodontol**, v. 66, p. 978-983, 1995.

MARTELLI-TOSI, M.; MASSON, M. M.; SILVA, N. C.; ESPOSTO, B. S.; BARROS, T. T.; ASSIS, O. B. G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydr**. **Polym**., v.198, p. 198:61–68, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.053.

MARTÍNEZ ÁVILA H.; SCHWARZ, S.; FELDMANN, E.-M.; MANTAS, A.; VON BOMHARD, A.; GATENHOLM, P.; ROTTER, N. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Appl. Microbiol. Biotech**., v. 98, p. 7423-7435, 2014. doi: 10.1007/s00253-014-5819-z.

MENEGUIN, A. B.; FERREIRA CURY, B. S.; DOS SANTOS, A. M.; FRANCO, D. F.; BARUD, H. S.; DA SILVA FILHO, E. C. Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release. **Carbohydr. Polym**., v. 157, p. 1013–1023, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.10.062.

MORALES, A.; BARROS, P. S. M.; NETO, J. B.; GILBERTO, C.; SALVADOR, C. N.; MIGLIATI, E. R. Experimetal use of a castor bean (Ricinus communis L.) oil derived polymer in lamellar, interlamellar and penetrating implant in rabbit's córnea. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, p. 31-37, 2005.

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

NOVOTNA, K.; ZAJDLOVA, M.; SUCHY, T.; HADRABA, D.; LOPOT, F.; ZALOUDKOVA, M.; DOUGLAS, T. E. L.; MUNZAROVA, M.; JUKLICKOVA, M.; STRANSKA, D.; et al. Polylactide nanofibers with hydroxyapatite as growth substrates for osteoblast-like cells. J. **Biomed. Mater. Res**., v. 102, p. 3918–3930, 2014. doi: 10.1002/jbm.a.35061.

OSORIO, M.; FERNÁNDEZ-MORALES, P.; GAÑÁN, P.; ZULUAGA, R.; KERGUELEN, H.; ORTIZ, I.; CASTRO, C. Development of novel three-dimensional scaffolds based on bacterial nanocellulose for tissue engineering and regenerative medicine: Effect of processing methods, pore size, and surface area: Development of novel three-dimensional scaffolds. **J**. **Biomed**. **Mater. Res. Part A.**, v. 107, n. 2, p. 348–359, 2018. doi: 10.1002/jbm.a.36532.

PAVÓN, J. J.; ALLAIN, J. P.; VERMA, D.; ECHEVERRY-RENDÓN, M.; COOPER, C. L.; REECE, L. M.; SHETTY, A. R.; TOMAR, V. In situ study unravels bio-nanomechanical behavior in a magnetic bacterial nano-cellulose (MBNC) hydrogel for neuro-endovascular reconstruction. **Macromol. Biosci.**, v. 19, n. 2, 2018. doi: 10.1002/mabi.201800225.

PEREIRA, D. R.; SILVA-CORREIA, J.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L.; PANDIT, A.; BIGGS, M. J. Nanocellulose reinforced gellan-gum hydrogels as potential biological substitutes for annulus fibrosus tissue regeneration. **Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.**, v. 14, n. 3, p. 897–908, 2018. doi: 10.1016/j.nano.2017.11.011.

PICHETH, G. F.; PIRICH, C. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; WOEHL, M. A.; SAKAKIBARA, C. N.; DE SOUZA, C. F.; MARTIN, A. A.; DA SILVA, R.; DE FREITAS, R. A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **Int**. **J**. **Biol**. **Macromol**., v. 104, p. 97–106, 2017. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171.

POT, S. A.; GALLHOHÖFER, N. S.; MATHEIS, F. L.; VOELTER-RATSON, K.; HAFEZI, F.; SPIESS, B. M. Corneal collagen cross-linking as treatment for infectious and noninfectious corneal melting in cats and dogs: results of a prospective, nonrandomized, controlled trial. **Veterinary Ophtalmology**, v. 17, n. 4, p. 250-260, 2014.

POWELL, L. C.; KHAN, S.; CHINGA-CARRASCO, G.; WRIGHT, C. J.; HILL, K. E.; THOMAS, D. W. An investigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth on novel nanocellulose fibre dressings. **Carbohydr**. **Polym**., v. 137, p. 191–197, 2016. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.024.

QIU, Y.; QIU, L.; CUI, J.; WEI, Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Mater**. **Sci. Eng**. **C**., v. 59, p. 303–309, 2016. doi: 10.1016/j.msec.2015.10.016.

RAMPHUL, H.; BHAW-LUXIMON, A.; JHURRY, D. Sugar-cane bagasse derived cellulose enhances performance of polylactide and polydioxanone electrospun scaffold for tissue engineering. **Carbohydr**. **Polym**., v. 178, p. 238–250, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.09.046.

RODRIGUES, C.; DE ASSIS, A. M.; MOURA, D. J.; HALMENSCHLAGER, G.; SAFFI, J.; XAVIER, L. L.; DA CRUZ FERNANDES, M.; WINK, M. R. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model. **PLoS ONE.**, v. 9, n. 5, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0096241.

SAMPAIO, R. L.; RANZANI, J. J. T.; JÚNIOR, V. R.; STACCIARINI, M. S.; BRAGA, E. M.; BORREZZI, C. Aspectos clínicos e imunopatológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena fresca e conservada em glicerina. Estudo

experimental em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1077-1085, 2006.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: _. **Gellat, K. N. Veterinary Ophthalmology.** 3ª ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 31-150.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. In: GELATT K. N. **Veterinary Ophthalmology.** 5ª ed, Iowa: John Wiley & Sons, 2013, p. 39-170.

SANCHAVANAKIT N., SANGRUNGRAUNGROJ W., KAOMONGKOLGIT R., BANAPRASERT T., PAVASANT P., PHISALAPHONG M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnol. Prog**., v. 22, n. 4, p. 1194–1199, 2006. doi: 10.1021/bp060035o.

SANO, M. B.; ROJAS, A. D.; GATENHOLM P.; DAVALOS, R. V. Electromagnetically controlled biological assembly of aligned bacterial cellulose nanofibers. **Ann. Biomed**. **Eng**., v.38, p. 2475–2484, 2010. doi: 10.1007/s10439-010-9999-0.

SASKA, S.; TEIXEIRA, L. N.; DE CASTRO RAUCCI, L. M. S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; FRANCHI, L. P.; DOS SANTOS, R. A.; SANTAGNELI, S. H.; CAPELA, M. V.; DE OLIVEIRA, P. T. Takahashi C.S., et al. Nanocellulose-collagen-apatite composite associated with osteogenic growth peptide for bone regeneration. **Int**. **J**. **Biol**. **Macromol**., v. 103, p. 467–476, 2017. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.086.

SEPÚLVEDA, R. V.; VALENTE, F. L.; REIS, E. C. C.; ARAÚJO, F. R.; ELEOTÉRIO, R. B.; QUEIROZ, P. V. S.; BORGES, A. P. B. Universidade Federal De Viçosa Brazil bacterial cellulose and bacterial cellulose/polycaprolactone composite as tissue substitutes in rabbits' cornea. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 36, n. 10, p. 986–992, 2016. doi: 10.1590/s0100-736x2016001000011.

SHAHABI-GHAHFARROKHI, I.; KHODAIYAN, F.; MOUSAVI, M.; YOUSEFI, H. Green bionanocomposite based on kefiran and cellulose nanocrystals produced from beer industrial residues. Int. **J**. **Biol**. **Macromol**., v. 77, p. 85–91, 2015. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.055.

SHARIF HOSSAIN, A. B. M.; UDDIN, M. M.; VEETTIL, V. N.; FAWZI, M. Nano-cellulose based nano-coating biomaterial dataset using corn leaf biomass: An innovative biodegradable plant biomaterial. **Data Br**., v. 17, p. 162–168, 2018. doi: 10.1016/j.dib.2017.12.046.

SHVEDOVA, A. A.; KISIN, E. R.; YANAMALA, N.; FARCAS, M. T.; MENAS, A. L.; WILLIAMS, A.; FOURNIER, P. M.; REYNOLDS, J. S.; GUTKIN, D. W.; STAR, A.; et al. Gender differences in murine pulmonary responses elicited by cellulose nanocrystals. **Part. FibreToxicol**., v. 13, p. 28, 2016. doi: 10.1186/s12989-016-0140-x.

SILVA, N. H. C. S.; RODRIGUES, A. F.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P. C.; ROSADO, C.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. **Carbohydr. Polym**., v. 106, p. 264–269, 2014. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.014.

SINGLA, R.; SONI, S.; KULURKAR, P. M.; KUMARI, A.; MAHESH, S.; PATIAL, V.; PADWAD, Y. S.; YADAV, S. K. In situ functionalized nanobiocomposites dressings of bamboo cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound healing. **Carbohydr**. **Polym**., v. 155, p. 152–162, 2017. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.08.065.

SIRVIÖ, J. A.; KOLEHMAINEN, A.; VISANKO, M.; LIIMATAINEN, H.; NIINIMÄKI, J.; HORMI, O. E. O. Strong, self-standing oxygen barrier films from nanocelluloses modified with regioselective oxidative treatments. **ACS Appl**. **Mat**. **Interfaces**., v. 6, p. 14384–14390, 2014. doi: 10.1021/am503659j.

SLATTER, D. **Córnea e esclera**. In: _. Fundamentos de oftalmologia veterinária. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 283-338.

SOUZA S. F., MARIANO M., REIS D., LOMBELLO C. B., FERREIRA M., SAIN M., Cell interactions and cytotoxic studies of cellulose nanofibers from Curauá natural

fibers. **Carbohydr**. **Polym**., v. 201, p. 87–95, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.08.056.

SPIESS, B. M; POT, S. A.; FLORIN, M.; HAFEZI, F. Corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of melting keratitis in cats and dogs: a pilot study. **Veterinary Ophtalmology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2014.

SPRINGER, S.; ZIEGER, M.; HIPLER, U. C.; LADEMANN, J.; ALBRECHT, V.; BUECKLE, R.; MEß, C.; KAATZ, M.; HUCK, V. Multiphotonic staging of chronic wounds and evaluation of sterile, optical transparent bacterial nanocellulose covering: A diagnostic window into human skin. **Skin Res. Technol**., v. 25, n. 1, p. 68–78, 2018. doi: 10.1111/srt.12597.

SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. **A review. Biotechnol. Adv.**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.009.

SUN, F.; NORDLI. H. R.; PUKSTAD, B.; KRISTOFER GAMSTEDT, E.; CHINGA-CARRASCO, G. Mechanical characteristics of nanocellulose-PEG bionanocomposite wound dressings in wet conditions. J**. Mech. Behav. Biomed. Mater**., v. 69, p. 377–384, 2017. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.01.049.

SUPRAMANIAM, J.; ADNAN, R.; MOHDKAUS, N. H.; BUSHRA, R.; Magnetic nanocellulose alginate hydrogel beads as potential drug delivery system. **Int**. **J**. **Biol**. **Macromol**., v. 118, p. 640–648, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.043.

TARRÉS, Q.; DELTELL, A.; ESPINACH, F. X.; PÈLACH, M. À.; DELGADO-AGUILAR, M.; MUTJÉ, P. Magnetic bionanocomposites from cellulose nanofibers: Fast, simple and effective production method. **Int**. **J**. **Biol**. **Macromol**., v. 99, p. 29–36, 2017. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.072.

TORRES, F.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. **J**. **Funct**. **Biomater**., v. 3, p. 864–878, 2012. doi: 10.3390/jfb3040864.

TSUZUKI, K; YAMASHITA, K.; IZUMISAWA, Y.; KOTANI, T. Microstructure and glycosaminoglycan ratio of canine cornea after reconstructive transplantation with glycerin-preserved porcine amniotic membranes. **Veterinary Ophtalmology**, v. 11, n. 4, p. 222-227, 2008.

TUMMALA G.K., JOFFRE T., ROJAS R., PERSSON C., MIHRANYAN A. Strain-induced stiffening of nanocellulose-reinforced poly (vinyl alcohol) hydrogels mimicking collagenous soft tissues. **Soft Matter**., v. 13, n. 21, p. 3936–3945, 2017. doi: 10.1039/C7SM00677B.

VALENTIM, R.; ANDRADE, S.; DOS SANTOS, M.; SANTOS, A.; PEREIRA, V.; DOS SANTOS, I.; DIAS, C.; DOS REIS, M.; Composite based on biphasic calcium phosphate (HA/β-TCP) and nanocellulose from the Açaí tegument**. Materials**., v. 11, p. 2213, 2018. doi: 10.3390/ma11112213.

VARANASI, S.; HENZEL, L.; SHARMAN, S.; BATCHELOR, W.; GARNIER, G. Producing nanofibres from carrots with a chemical-free process. **Carbohydr**. **Polym**., v. 184, p. 307–314, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.056.

VONGSAKUL, S.; TUNTIVANICH, P.; SIRIVAIDYAPONG, S.; KALPRAVIDH, M. Canine amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction of created deep corneal ulcers in dogs. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 2, p. 135-144, 2009.

WEISHAUPT, R.; HEUBERGER, L.; SIQUEIRA, G.; GUTT, B.; ZIMMERMANN, T.; MANIURA-WEBER, K.; SALENTINIG, S.; FACCIO, G. Enhanced antimicrobial activity and structural transitions of a nanofibrillated cellulose–nisin biocomposite suspension. **ACS Appl. Mater. Interfaces.**, v. 10, n. 23, p. 20170–20181, 2018. doi: 10.1021/acsami.8b04470.

WIEGAND, C.; MORITZ, S.; HESSLER, N.; KRALISCH, D.; WESARG, F.; MÜLLER, F. A.; FISCHER, D.; HIPLER, U. -C. Antimicrobial functionalization of bacterial

nanocellulose by loading with polihexanide and povidone-iodine. **J**. **Mater**. **Sci**. **Mater**. **Med**., v. 25, n. 10, p.245, 2015. doi: 10.1007/s10856-015-5571-7.

WU, J.; ZHENG, Y.; WEN, X.; LIN, Q.; CHEN, X.; WU, Z. Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation in vitro and in vivo. **Biomed. Mater**., v. 9, n. 3, 2014. doi: 10.1088/1748-6041/9/3/035005.

XIAO, Y.; RONG, L.; WANG, B.; MAO, Z.; XU, H.; ZHONG, Y.; ZHANG, L.; SUI, X. A light-weight and high-efficacy antibacterial nanocellulose-based sponge via covalent immobilization of gentamicin. **Carbohydr. Polym**., v. 200, p. 595–601, 2018. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.091.

YANAMALA, N.; FARCAS, M. T.; HATFIELD, M. K.; KISIN, E. R.; KAGAN, V. E.; GERACI, C. L.; SHVEDOVA, A. A. In vivo evaluation of the pulmonary toxicity of cellulose nanocrystals: A renewable and sustainable nanomaterial of the future. **ACS Sustain. Chem. Eng.**, v. 2, 2014.

YUEN, J. D.; WALPER, S. A.; MELDE, B. J.; DANIELE, M. A.; STENGER, D. A. Electrolyte-sensing transistor decals enabled by ultrathin microbial nanocellulose. **Sci**. **Rep**., v. 7, 2017. doi: 10.1038/srep40867.

ZHARIKOV, A. N.; LUBYANSKY, V. G.; GLADYSHEVA, E. K.; SKIBA, E. A.; BUDAEVA, V. V.; SEMYONOVA, E. N.; ZHARIKOV, A. A.; SAKOVICH, G. V. Early morphological changes in tissues when replacing abdominal wall defects by bacterial nanocellulose in experimental trials. **J**. **Mater**. **Sci**. **Mater**. **Med**., v. 29, n. 7, p. 95, 2018. doi: 10.1007/s10856-018-6111-z.

2 CAPÍTULO 2 - APLICAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOCELULOSE EMBEBIDA EM CIPROFLOXACINA NA CERATOPLASTIA LAMELAR

2.1 INTRODUÇÃO

O bulbo do olho é composto pelas túnicas fibrosa, vascular e nervosa que, em conjunto, são encarregadas de formar a imagem (GELATT, 2003; SLATTER, 2005; GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). A túnica fibrosa é a mais externa, que se divide na córnea e esclera (SAMUELSON, 1999). Constitui-se na túnica responsável pelo formato do bulbo do olho, sendo imperativa para oferecer um sistema visual funcional, além de atuar como barreira contra patógenos entre o meio e as estruturas intraoculares (GELATT, 2003; GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; DELMONTE; KIM, 2011). A córnea é transparente, avascular e não pigmentada, e exerce, portanto, papel fundamental na refringência dos feixes luminosos que nela incidem, encaminhando-os à retina (SAMUELSON, 1999; SALTTER, 2005). Por ser a camada externa é a mais vulnerável à traumas externos e àqueles advindos das enfermidades dos anexos oculares (HERRERA, 2008), gerando as ceratites ulcerativas.

As ceratites ulcerativas constituem-se em soluções de continuidade da córnea, que variam em extensão e profundida. Encontram-se entre as afecções oculares mais frequentes em cães (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008), sendo as raças braquicefálicas as mais acometidas, inclusive por causa da sua sensibilidade corneal reduzida (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008). Compreendem lesões em que há perda do epitélio corneal, com exposição de porções variáveis do estroma (SLATTER, 2005; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009) e são consideradas uma emergência oftálmica, já que podem progredir para exposição da membrana de Descemet, denominada descemetocele e, consequente, perfuração da córnea. Condutas terapêuticas inadequadas podem resultar em perda visual completa (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Assim, um protocolo correto é necessário para aliviar a dor, prevenir a progressão das úlceras (descemetoceles, perfurações) e restaurar, tectonicamente, a anatomia da córnea. Nesse sentido, estudos foram conduzidos a encontrar alternativas cirúrgicas de enxertos corneais que são mandatórios em úlceras profundas e persistentes (FERREIRA et al., 2013). Dentre elas, citam-se a cápsula renal equina (ANDRADE et al., 1999), escama de sardinha (*Sardinela*

brasilienses) (LAUS; FERREIRA E ANDRADE, 2000), submucosa intestinal suína (BUSSIERES et al., 2004; GOULLE, 2012), membrana de poliuretana vegetal derivada da mamona (MORALES et al., 2005), membrana de celulose microfibrilar (MACEDO et al., 2010), pericárdio homólogo ou heterólogo (HÜNNING et al., 2009; DULAURENT et al., 2014), submucosa de bexiga suína (CHOW; WESTERMEYER, 2015; BALLAND et al., 2015), e membrana amniótica homóloga ou heteróloga (SAMPAIO et al., 2006; ANDRADE et al., 2009; VONGSAKUL et al., 2009; FERREIRA et al., 2013; ION et al., 2016; TSUZUKI et al., 2008). Entre as membranas biológicas, a membrana amniótica vem sendo utilizada extensivamente em lesões corneais na medicina humana e veterinária (ION et al., 2016), pois os resultados apontam para uma melhor transparência corneal e qualidade de refração pós-operatória, além das suas propriedades antifibrótica, antiangiogênica, antiproteolítica e anti-inflamatórias (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Alternativamente, outras membranas naturais ou biossintéticas surgem como uma tentativa de substituição às membranas biológicas, em particular quanto às suas características únicas de durabilidade e permeabilidade. Neste sentido, a membrana de biocelulose (MB) é um biomaterial emergente e atraente, uma vez que proporciona uma ampla aplicação, principalmente na medicina, como por exemplo em curativos de úlceras de queimadura de segundo ou terceiro grau, na confecção de microvasos artificiais e na engenharia de tecidos como cartilagem e osso (FONTANA et al., 1990; KLEMM et al., 2001; SVENSSON et al., 2005; SASKA; TEIXEIRA et al., 2012; SASKA; SCAREL-CAMINAGA et al., 2012). Ela é produzida a partir de uma bactéria gram-negativa (*Acetobacter xylinum*) que tem sido estudada desde a década de 60, pois possui a característica de sintetizar um material semelhante à celulose, entretanto de origem animal (CARSON et al., 1967).

Estudos foram conduzidos utilizando-se membrana em associação ao cultivo de células endotéliais, células musculares lisas e condrócitos, cujos resultados foram promissores (SVENSSON, 2005; HELENIUS, 2006; BACKDAHL, 2006; RAMBO, 2008). A sua estrutura nanofibrilar representa um suporte macromolecular interessante para a adição de compostos ativos, portanto, com o desenvolvimento de sistemas específicos de liberação controlada de medicamentos (antibióticos, analgésicos, antiinflamatórios, hormônios e anticancerígenos) (TROVATTI, 2011; TROVATTI, 2012). Na oftalmologia, sistemas foram desenvolvidos para a liberação de fármacos oculares, em um sistema de liberação lenta e sua aplicabilidade direta

em colírios ou materiais de silicone-hidrogel (ACHOURI et al., 2013; MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2013), o que torna imperativo conduzir estudos desta natureza nesta área de atuação.

A MB possui características biossintéticas, tornando-a inerte, atóxica e seletivamente permeável, atuando como uma barreira aos micro-organismos (GATTAZ SOBRINHO, 1989); possui estrutura semelhante à derme, permitindo ser utilizada como substituto em lesões, reduzindo a dor e auxiliando na reparação cicatricial. A membrana apresenta boa aceitação pelo organismo, protegendo e auxiliando na cicatrização de áreas com soluções de continuidade, além de evitar a contaminação por microrganismos, por permeabilidade seletiva (REBELLO et al., 1987; MARKMAN et al., 1995). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar clinicamente o emprego da MB em duas espessuras, embebida em ciprofloxacina 0,3%, no tratamento de úlceras profundas de córnea, perfuradas ou não, em cães e gatos.

2.2 MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba / UNESP – campos de Araçatuba. Os atendimentos ambulatoriais e as cirurgias foram realizadas no Hospital Veterinário (HV) “Luiz Quintiliano de Oliveira”. O referido trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (processo FOA número: 00809-2018).

Foram selecionados 14 cães e 2 gatos, entre machos e fêmeas, de diferentes raças, peso e idade, atendidos na rotina do serviço de clínica de pequenos animais do Hospital Veterinário da UNESP-Araçatuba, que apresentavam úlceras de córnea profundas, perfuradas ou não e sequestro corneal felino, e que tiveram consentimento prévio do proprietário, mediante assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido para participarem da pesquisa. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos numericamente iguais e receberam MB hidratada espessa (G-HE) e hidratada delgada (G-HD) (Quadro 1).

Todos os animais foram submetidos a exame físico geral e oftálmico de rotina. Quanto ao último, realizou-se o teste da lágrima de Schirmer I (teste de Schirmer Ophthalmos®), tonometria de aplanação (Tono-pen XL®), teste de

tingimento com fluoresceína (fluoresceína strips Ophthalmos®), biomicroscopia por lâmpada de fenda (Kowa SL-14®) e oftalmoscopia indireta (Eyetec FOH-5.0®), quando possível. Para atestar a saúde clínica geral, foram realizados exames hematológicos e bioquímicos, previamente aos procedimentos cirúrgicos de enxertia lamelar parcial ou total.

Os pacientes, que apresentavam causa de base da úlcera corneal, foram tratados concomitantemente. Os casos de distiquíase e cílio ectópico foram corrigidos no momento do ato cirúrgico. Já os pacientes com ceratoconjuntivite seca quantitativa e qualitativa, iniciou-se o tratamento com colírio de Tacrolimus 0,03% (Ophthalmos®), desde o primeiro dia da consulta.

A MB foi desenvolvida pela equipe do Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais da Universidade de Araraquara (UNIARA). Elas foram confeccionadas em meio enriquecido para crescimento pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, durante 72 horas até se obter uma manta de 9 mm de espessura. Ato contínuo, esta manta foi embebida em solução tampão, para atingir o pH=7 e, posteriormente, acondicionada em freezer -80º C.

Como a manta era espessa para o uso que se pretendia, elas passaram por um processo de prensagem mecânica controlada, em ambiente estéril. Desta forma, obteveram-se membranas com espessuras de 2mm (membrana espessa) e de 0,5 mm (membrana delgada). O objetivo desta manobra foi remover o excedente de líquido da manta, mediante sua propriedade hidrofílica. Ato contínuo, elas foram recortadas em discos com diâmetros de 6 e 8 mm com auxílio de “punch” cirúrgico, seguidas de higienização com água destilada estéril. Posteriormente, elas foram introduzidas em frascos de colírios à base de ciprofloxacina a 0,3% (Alcon, Brasil), por no mínimo 24 horas, sob refrigeração. E, por fim, os frascos foram congelados em freezer à -20ºC e assim mantidos até o momento do uso, semelhante à Cremonini et al. (2010). No momento das cirurgias, a espessura das membranas foi, também, mensurada. Assim, elas foram aplicadas ao leito da úlcera e/ou na correção das perfurações, após descongelamento, com as espessuras de 2,2mm e 0,7mm. Para as lesões extensas, havia disponibilidade de membranas com área total de 1,5cm^2, sob mesmas condições.

Os animais utilizados no presente estudo eram pacientes da rotina hospitalar e apresentavam diferentes dados de resenha e classificação ASA (BENSON, 1997), não foi possível adotar um único protocolo anestésico mas, em sua maioria, foram

utilizadas medicações pré-anestésicas por via intramuscular (fenotiazínicos e opioides), indução com propofol por via intravenosa e manutenção com isofluorano por via inalatória, além de bloqueio anestésico peribulbar com lidocaína, para os casos em que não havia descemetocele e perfuração corneal. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião, sob magnificação.

Todos os pacientes foram operados no dia seguinte da data da apresentação. Após preparo rotineiro do campo operatório (SLATTER, 2005), os pacientes foram submetidos à ceratoplastia lamelar (n=9 olhos) e total (n= 7 olhos) com a aplicação da MB com os bordos avançando 2mm ao leito da úlcera corneal. As membranas foram suturadas nos padrões de sutura simples isolado e/ou contínua com mononáilon 9-0, não perfurantes totais.

Após o procedimento cirúrgico, todos os cães receberam o mesmo protocolo terapêutico adotado no primeiro dia de atendimento. Para tanto, foram prescritos colírios à base de ciprofloxacino (Ciloxan®, Alcon) a cada seis horas, diclofenaco sódico (Still®, Allergan) a cada oito horas e lubrificante ocular (Vidisic gel®, Bausch&Lomb) a cada oito horas, durante 30 dias. Por questões bioéticas, adotou-se conduta analgésica à base de cloridrato de tramadol por via oral (3,0 mg/kg), a cada oito horas, por 5 dias, além da instilação de colírio à base de atropina 0,5% a cada 12 horas (KERN, 2004) para cicloplegia, controlando, assim, a ocorrência de sinéquias.

Adotou-se o colar do tipo Elizabetano, para prevenir a automutilação. Ao final dos 30 dias após a cirurgia, a membrana e os pontos foram removidos.

Os olhos operados foram avaliados temporalmente aos 0, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório (M0=antes da cirurgia, M3, M7, M15, M30 e M60). Nos momentos de avaliação, foram estudadas as seguintes variáveis, com preenchimento de ficha individual e categorizadas em escores , com modificações a partir de Andrade et al. (2009): blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival, vascularização corneal (0-ausente; 1-discreto; 2-moderado; 3-intenso), defeito epitelial, quemose, conjuntivalização, descemetocele, perfuração corneal, sinéquias e pigmentação corneal (0-ausente; 1-presente). Todas as avaliações foram registradas por dois avaliadores cegos, que computavam os escores dos parâmetros estudados, além de documentos fotográficos das imagens.

A análise estatística foi realizada empregando-se o *teste de Wilcoxon* para comparar as variáveis qualitativas ordinais (escore) entre os grupos em cada

momento, *teste de Fisher* para comparar as variáveis qualitativas nominais (presente e ausente) entre os grupos em cada momento e *teste de Mann-Whitney* para comparar os momentos no mesmo grupo. Foi adotado nível de significância de 5%, e utilizado o programa SAS (*Statistical Analysis System*).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizou-se a MB espessa em sete cães (87,5%) e um gato (12,5%); entre eles, seis eram machos (75%) e duas fêmeas (25%). Quanto às raças, a de maior incidência foi a shih-tzu, com cinco pacientes (62,5%), um pug (12,5%), um sem raça definida (12,5%), um bulldog francês (12,5%) e; a lesão mais frequente, na data da apresentação, foram as perfurações corneais, em quatro animais (50%), três úlceras corneais profundas (37,5%) e uma descemetocele (12,5%). A causa mais comum foi a ceratoconjuntivite seca (50%), dois casos decorrentes de traumas (25%): um por cílio ectópico (12,5%) e outro por distiquíase (12,5%).

A membrana de biocelulose delgada foi aplicada em oito olhos sendo, sete caninos (87,5%) e um felino (12,5%); entre eles, cinco machos (62,5%) e três fêmeas (37,5%); a maior incidência foi na raça shih-tzu com quatro animais (50%), um da raça chihuahua (12,5%), um em yorkshire (12,5%), um em bulldog francês (12,5%) e um persa (12,5%). Na data da apresentação, foram diagnosticadas três úlceras corneais profundas (37,5%), três perfurações corneais (37,5%), uma descemetocele (12,5%) e um sequestro corneal felino (12,5%). A causa mais frequente foram quatro ceratoconjuntivites secas (50%), três traumas (37,5%) e um sequestro corneal (12,5%). O Quadro 1 apresenta os dados referentes aos animais incluídos no estudo. Packer et al. (2015), informaram uma maior ocorrência de úlceras em cães da raça Shih-tzu, confome ocorreu neste estudo. A órbita rasa e consequentes bulbos oculares proeminentes, bem como pregas nasais exuberantes, os predispõe à esta condição clínica.

Quadro 1 – Distribuição de animais em que foram empregadas as duas membranas de biocelulose hidratada espessa (G-HE) e membrana de biocelulose hidratada delgada (G-HD), quanto à espécie, raça, sexo, idade, causa da ceratite ulcerativa e tipo de lesão. Araçatuba (SP), 2019.

	Animal	Espécie	Raça	Sexo	Idade (anos)	Causa	Lesão
Grupo Hidratada Espessa	1	C	Pug	M	2	CCS	Úlcera/ Descemetocele
	2	Fe	SRD	F	3	Trauma	Perfuração corneal
	3	C	Shih-tzu	M	2	Ectópico	Perfuração corneal
	4	C	Shih-tzu	M	5	CCS	Úlcera Profunda
	5	C	Shih-tzu	F	2	Trauma	Úlcera Profunda
	6	C	Shih-tzu	M	3	Distiquíase	Perfuração corneal
	7	C	Shih-tzu	M	2	CCS	Perfuração corneal
	8	C	Bulldog Francês	M	2	CCS	Úlcera Profunda
Grupo hidratada Delgada	1	C	Shih-tzu	M	8 meses	CCS	Úlcera Profunda
	2	C	Chihuahua	M	1	Trauma	Perfuração corneal
	3	C	Shih-tzu	F	3	Trauma	Perfuração corneal
	4	C	Shih-tzu	M	1	Trauma	Perfuração corneal
	5	C	Shih-tzu	M	3	CCS	Úlcera Profunda
	6	C	Yorkshire	F	4	CCS	Descemetocele
	7	C	Bulldog Francês	M	2	CCS	Úlcera Profunda
	8	Fe	Persa	F	3	SC	Úlcera Profunda

Legenda: C: canino; Fe: felino; SRD: sem raça definida; M: macho; F: fêmea; CCS: ceratoconjuntivite seca; SC: sequestro corneal.

Intentou-se utilizar a MB, por se tratar de um biomaterial emergente na medicina, amplamente utilizada como substituto da pele e porque sua utilização demonstrou, em outras modalidades médicas, um resultado satisfatório. Na oftalmologia veterinária, Cremonini et al. (2010) a utilizaram sob a forma de lente de contato com liberação de ofloxacina, na ceratite ulcerativa experimental e concluíram que o material biossintético foi eficaz na liberação do fármaco, permitindo a cicatrização das úlceras.

Não se encontraram óbices no seu manuseio durante o procedimento cirúrgico, pois a manta da MB, quer seja espessa ou delgada, apresentou boa maleabilidade, flexibilidade e resistência ao ser transpassada pela agulha e fio de sutura, além de resistir à tensão dos nós a ela aplicada. Salienta-se que, antes de realizar as suturas, foram removidos todos tecidos inflamados, necróticos e pigmentados dos leitos ulcerados e/ou perfurados. Optou-se por recortar a membrana 2mm além das áreas das úlceras e tecido corneal perdido, a fim de que ela cobrisse o leito ulcerado e preenchesse o defeito estromal, permitindo, assim, que a cicatrização com reparação ocorresse abaixo do enxerto. Enxertos aplicados com a mesma intenção devem exceder em 10% o tamanho do leito receptor. Considerando-se que não oferecem suprimento vascular, sua ação se dará, apenas, por proteção mecânica, o que os tornam menos vantajosos, comparativamente aos pediculados (GALERA, LAUS e ORIÁ, 2009). AS MB foram suturadas em porções de córnea saudável e não houve deiscência dos pontos (BALLAND, 2015) até o momento 30 (M30), em que a sutura e membrana foram removidas. Empregou-se o padrão de sutura contínuo e/ou interrompido simples, de acordo com a acomodação na córnea. O padrão simples interrompido foi aplicado às úlceras de menor diâmetro e, a associação dos dois padrões, nas lesões de maior diâmetro; ambas não perfurantes totais (SLATTER, 2005).

Comparando-se a adaptibilidade da MB sobre a superfície corneal, observou-se que a membrana hidratada delgada apresentou uma melhor acomodação na curvatura da córnea do que a membrana hidratada delgada. A principal dificuldade foi encontrada no momento de removê-la. Observou-se que a membrana estava aderida às córneas, principalmente, nos casos perfuração corneal, o que já era esperado, pois a membrana ocupou o segmento de córnea perdida. Ainda que, com dificuldade (GOULLE, 2012), a mesmas foram totalmente removidas por delaminação com auxílio de uma lâmina de bisturi.

Com relação às alterações oculares, os pacientes que receberam a membrana hidratada espessas demonstraram discreto blefarospasmo nos primeiros dias após a cirurgia, provavelmente porque ela proporcionou um maior conforto após a reparação, uma vez que os cabos dos nós da sutura ficaram sepultados na membrana. Sugere-se sua correlação com a estimulação das terminações nervosas do epitélio e estroma corneais (WARING, 1984) e fios de sutura junto à córnea sensibilizando as incursões palpebrais, bem como, pela ocorrência da uveíte reflexa e/ou pós-operatória, vigentes nos casos de perfuração corneal (KERN, 1990). Esse sinal clínico reduziu em M3 em três pacientes que foram classificados com o escore moderado no M0. Os pacientes do G-HD mantiveram os escores da primeira avaliação e, em todos os animais de ambos os grupos, o blefarospasmo reduziu temporalmente, tornando-se ausente 30º dia de pós-operatório. Não houve diferença estatística entre os grupos e momentos estudados quanto a este parâmetro (Figura 1A).

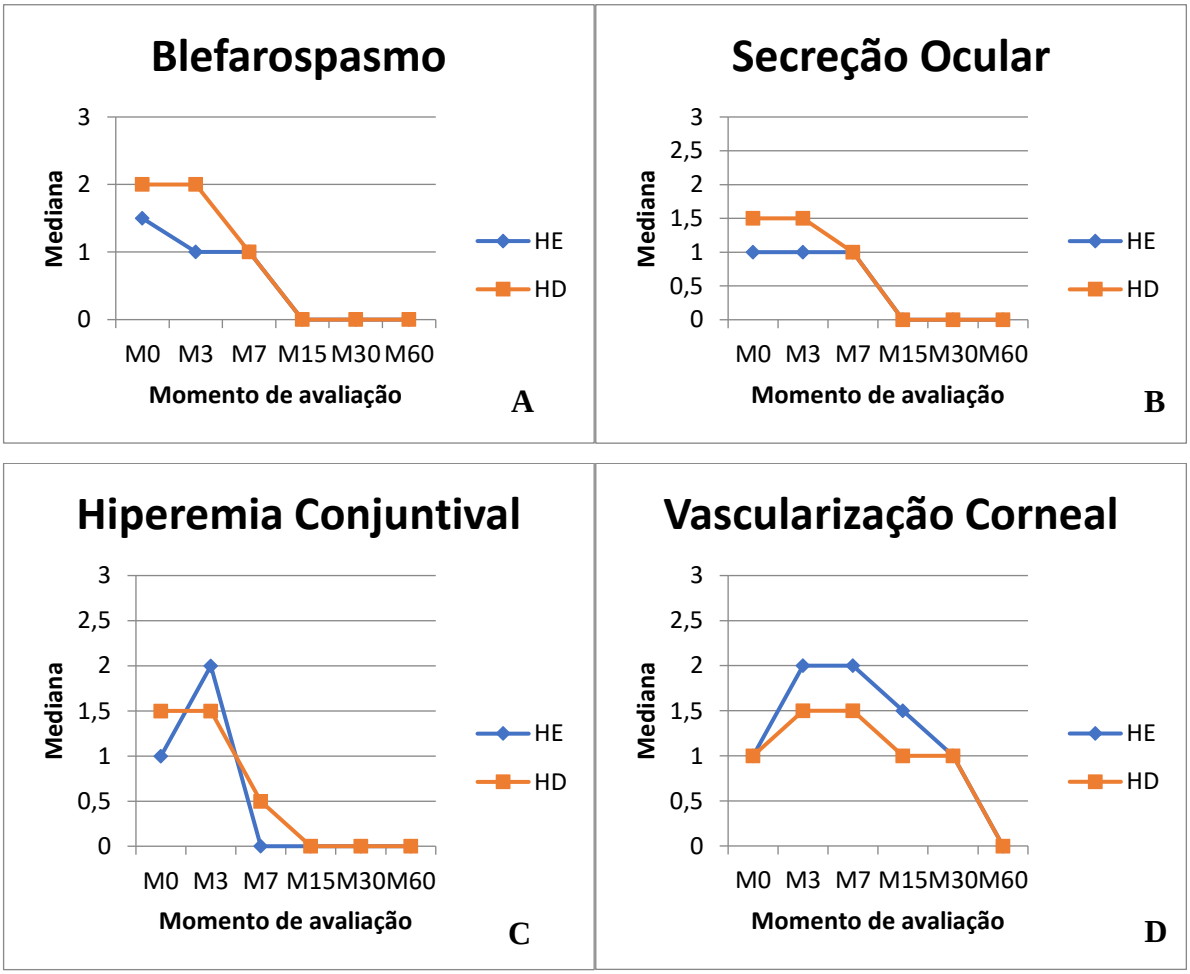
O processo inflamatório conjuntival deflagrado a partir da gravidade das úlceras corneais e associado à uveíte reflexa, provavelmente, proporcionou estímulo das células caliciformes, aumentando a quantidade de muco produzido fisiologicamente (HENDRIX, 2007), levando ao predomínio de secreção mucoide (GONÇALVES, 1975). Ela esteve presente, de forma discreta, na maioria dos pacientes do G-HE até o M7, reduzindo significativamente, no M15, tornando-se ausente no trigésimo dia (ANDRADE et al., 1999). Comparativamente ao G-HD, metade dos pacientes se comportou de forma similar aos pacientes do G-HE, nos mesmos períodos. Tais dados não diferem do que já foram descritos na literatura (ANDRADE et al., 1999; LAUS et al., 2000; BALLAND et al., 2015). Não houve diferença estatística entre os grupos e momentos estudados quanto a este parâmetro (Figura 1B).

Observou-se hiperemia conjuntival em ambos os grupos, no entanto, ela foi mais evidente no G-HE aos três dias de pós-operatório (M3), reduzindo no M7, até se tornar ausente a partir do 15º dia. Houve um comportamento semelhante nos pacientes que receberam a MB hidrata delgada. A congestão conjuntival é comum em conjuntivites agudas e após cirurgias intraoculares e da superfície ocular (YANOFF e FINE, 1989; MUNGER, 2009). Ela se instala rapidamente após um trauma ou exposição a alérgenos ou toxinas. Era esperado, portanto, que ela já fosse observada nos períodos iniciais, pela condição clínica oftálmica primária e pelo procedimento de

ceratoplastia. Não houve associação significante, quanto a este parâmetro, entre os grupos estudados em todos os momentos de avaliação (Figura 1C).

A MB incitou um processo inflamatório, que cursou com angiogênese corneal moderada já aos três dias de pós-operatório em ambos os grupos, reduzindo, temporalmente, a partir dos 15 dias de pós-operatório, até se tornar ausente no M60. A angiogênese é um mecanismo de múltiplos eventos controlados por fatores ativados e inibidores, que são liberados quando algum estímulo induz à mudança das células endoteliais de estado de quiescência para um fenótipo de replicação e invasão (IRULEA-ARISPE et al., 1997). Como a córnea é uma estrutura avascular, era esperado que a membrana induziria à vascularização corneal, pois o mecanismo de cicatrização nesta estrutura é conduzido pela ação combinada de mediadores inflamatórios e de fatores de crescimento gerados posteriormente à injúria. Entre eles, destacam-se o fator de crescimento epidermal, fator de crescimento derivado de plaquetas fator de crescimento transformador beta, fator de crescimento de ceratinócitos, neurotropinas e interleucinas (Il-1 e fator de necrose tumoral alfa). No entanto, atualmente, é inegável o papel do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o fator de crescimento placentário, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F (VALIATTI et al., 2011). Entre eles, o VEGF-A é o mais investigado atualmente, pois ele possui maior propriedade pró-angiogênica, permitindo o aparecimento de novos vasos (IRANI et al., 2017). O VEGF-B é fracamente angiogênico, porém ele permite a persistência de vasos já existentes. Embora não tenha sido objetivo deste estudo avalia-los, é possível inferir que ambos tenham participado do processo de vascularização corneal dos cães em que a MB foi aplicada com participação ativa do VEGF-A até o 15º dia de pós-operatório, período que o VEGF-B assume a manutenção dos vasos e posterior redução gradativa (IRANI et al., 2017). Não houve diferença estatística entre os grupos e momentos estudados quanto a este parâmetro (Figura 1D).

Figura 1 – Representação gráfica dos sinais oculares: blefarospasmo (A), secreção ocular (B), hiperemia conjuntival (C) e vascularização corneal (D) dos pacientes incluídos no estudo (G-HE e G-HD) ao longo do tempo, cujos valores estão representados por suas medianas dos escores adotados. Araçatuba, 2019.



Fonte: Dados da pesquisa

Ainda sobre as alterações que interferem na qualidade de visão, analisadas pelo teste de ameaça visual, observou-se baixa capacidade em todos os animais decorrente de pigmentação corneal. Ela ocorreu pela perpetuação da vascularização, que esteve presente, sob a forma discreta, até os 30 dias de pós-operatório. Observou-se, também, que os pacientes com perfuração corneal apresentaram maior intensidade de vascularização, provavelmente pela ocorrência de sinéquia anterior, conforme descreveu Goulle (2012), ao estudar em cães a submucosa de intestino delgado de porco, como enxerto na ceratoplastia. O mesmo pode-se afirmar quanto ao leucoma cicatricial, que esteve presente em maior proporção nestes casos.

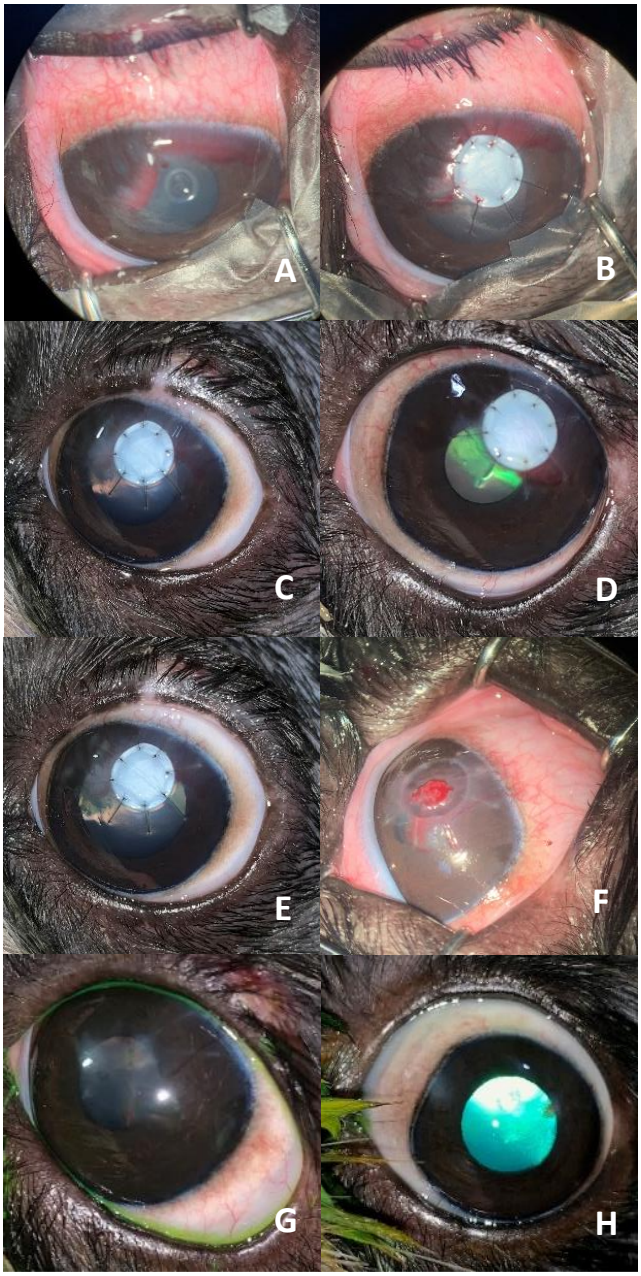
Em dois casos de perfuração corneal do G-HD (pacientes #3; paciente #4) os animais desenvolveram glaucoma secundário com discreta buftalmia, devido à uveíte intensa/sinéquia anterior. Como terapia, eles receberam à base de cloridrato de brinzolamida 1% (Azopt®, Alcon), a cada 12 horas. O quadro de buftalmia foi resolvido após 15 dias de tratamento, no entanto, houve perda visual, provavelmente, pelo processo de neurodegeneração secundário à elevação da pressão intraocular (GELATT; BROOKS; KÄLLBERG, 2007).

As córneas em que foram empregadas a membrana hidratada espessa e delgada apresentaram opacidade em todos os momentos de avaliação, mesmo aos 30 dias de pós-operatório. Acredita-se que a MB, independente da espessura, atuou apenas como um tampão no defeito corneal, visto que todos os animais apresentaram positividade para o teste de tingimento pela fluoresceína neste momento (M30). Aos 60 dias, observou-se que as úlceras foram epitelizadas, demonstrando quadro de cicatrização, porém, leucoma cicatricial de diferentes extensões, foi reconhecido. Nenhum paciente apresentou quemose ou conjuntivalização, não havendo necessidade de reoperá-los. Também nenhum dos casos evoluiu para endoftalmite. As Figuras 2 e 3 mostram a evolução pós-operatória de dois casos tratados com MB hidratada espessa e delgada, respectivamente.

Figura 2 – Imagens fotográficas da apresentação clínica nos diferentes momentos de avaliação do animal número 1 com membrana hidratada espessa. A: olho no momento basal com úlcera difusa e descemetocele, hiperemia conjuntival moderada, vascularização corneal (invasão cerática 360º) e leucoma; B: aspecto do pós-operatório imediato do implante da membrana de biocelulose em toda a extensão da úlcera; C: aspecto aos três dias pós-operatório. Notar MB aplicada ao leito ulcerado e vascularização corneal a 3 mm, perilesional; D: aos sete dias. Notar a membrana de aspecto amarelado; E: aos quinze dias. Notar deformação da MB de aspecto amarelado; F: aspecto aos trinta dias após remoção dos pontos e da MB. Notar presença de moderado tecido de granulação, granulomas de ponto, sem epitelização; G: aos sessenta dias. Notar intensa pigmentação em toda extensão da úlcera cicatrizada; H: aos noventa dias. Notar discreta transparência corneal e redução da pigmentação.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3 – Imagens fotográficas da apresentação clínica nos diferentes momentos de avaliação do animal número 1 que recebeu a MB hidratada delgada. A: olho no momento basal com ceratite ulcerativa profunda, hiperemia conjuntival moderada, vascularização corneal perilesional e edema corneal discreto perilesional; B: aspecto do pós-operatório imediato do implante da membrana de biocelulose; C: aspecto aos três dias pós-operatório. Notar edema perilesional e vascularização corneal; D: aos sete dias. Notar edema corneal e aumento da vascularização cornal; E: aos quinze dias. Notar edema corneal e aumento da vascularização cornal; F: aspecto aos trinta dias após remoção dos pontos e da MB. Notar presença de discreto tecido de granulação, sem epitelização; G: aos sessenta dias. Notar discreto leucoma cicatricial e mácula perilesional, com epitelização da úlcera; H: aos noventa dias. Notar transparência corneal e névula discreta.



Fonte: Dados da pesquisa

Não foi possível preservar a visão em todos os pacientes que receberam a MB. Elencam-se, entre eles, dois animais que receberam a membrana espessa (pacientes #7 e #8) e três que receberam a delgada (pacientes #3, #4 e #6). Isso pode ser explicado porque as ceratoplastias têm por objetivo principal, a reparação tectônica com preservação do bulbo do olho, a fim de se evitar condutas drásticas como enucleação ou evisceração (SLATTER, 2005; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). No entanto, nos demais pacientes, a córnea periférica à lesão, reassumiu a sua transparência, o que permitiu, a eles, a visão periférica com preservação do bulbo do olho.

Dos dois felinos foram incluídos no estudo, um apresentavam perfuração corneal e o outro sequestro de córnea. Os mesmos receberam a MB espessa e delgada, respectivamente. No felino com sequestro corneal, realizou-se ceratectomia lamelar profunda (GRAHAM et al., 2017) e reparo com MB. Pode-se admitir que, apesar do animal ser de espécie diferente dentro do grupo, houve evolução similar aos demais, sem sinais de rejeição ou extrusão do enxerto. Para aplicações médicas, a biocompatibilidade dos materiais é imperativa, uma vez que o material não deva induzir uma resposta inflamatória exacerbada ou citotoxicidade (CAVICCHIOLI et al., 2015). Pode-se admitir que a aplicação da MB na córnea não incita cautela ou receio por parte dos cirugiões, pois não houve nenhum caso de extrusão e/ou necrose corneal que caracterizassem fenômeno de rejeição.

Cavicchioli et al. (2015) estudaram a MB impregnada por ciprofloxacina pela análise de Raman, *in vitro*, e concluíram que a membrana não induz à citotoxicidade, genotoxicidade ou mutação celular. Cremonini et al. (2010) demonstraram que lentes de contato confeccionadas com MB promoveram liberação gradual de ofloxacina, em concentração adequada, até o terceiro dia de avaliação, apresentando, portanto, efeito antimicrobiano em úlceras experimentais em cães. Neste estudo, não foi possível realizar testes *in vitro* da liberação da ciprofloxacina, mas acredita-se que ela tenha exercido algum efeito antibacteriano, pela evolução pós-operatória observada, principalmente pela não observação de quadros de endoftalmite. O antibiótico em questão, apresentam amplo espectro de ação contra patógenos gram-negativos e positivos. Entretanto, estudos utilizando fluorquinolonas de quarta geração, merecem investigações, por serem mais potentes (OLIVEIRA, 2007; WONG et al., 2012).

Foi possível acompanhar, clinicamente, três animais além dos 60 dias propostos neste trabalho. Assim, evidenciou-se melhora clínica do quadro oftálmico, principalmente quanto à transparência corneal. Isto reforça a necessidade de realizarem estudos sob as mesmas condições adotando-se períodos mais longos.

Apesar de Sepúlveda et al. (2016) terem concluído pela não biocompatibilidade da MB associada à poliprolactona na enxertia interlamelar em coelhos, esse ponto não foi observado neste experimento, mas, há de se considerar que a membrana foi aplicada de forma e em espécies distintas. Apesar de terem sido observados sinais clínicos inflamatórios, os mesmos não remetem à sinais de extrusão da membrana, mesmo nos casos mais complicados, em comparação aos autores acima. Os autores ressaltaram que não houve epitelização completa dos implantes em períodos tardios, além da reação inflamatória exacerbada. A epitelização, aqui observada, ocorreu em todos os casos admitidos neste estudo. Porém, este estudo limitou-se à avaliação clínica, além de salientar que a MB não estava associada a outros compósitos que pudessem selar os espaços entre as fiblilas da membrana, como relatados pelos autores

O uso da MB parece ser uma alternativa terapêutica no tratamento de úlceras de córnea profundas, descemetoceles e perfurações, uma vez que permitiu a cicatrização sem ser incorporada à uma estrutura naturalmente transparente. Esta membrana promoveu proteção física à ulceração corneal, bem como resistência mecânica e estabilidade estrutural, sem perda ocular, na maioria dos casos. A sua textura flexível e macia parece ter provido aos pacientes um conforto adicional enquanto, a membrana permaneceu suturada à superfície ocular. Além de que houve boa aceitação deste procedimento e do aspecto cosmético final, por parte dos tutores.

Enfatiza-se que estudos adicionais sejam realizados, aplicando-as em um número maior de pacientes sob mesmas condições e adotando-se períodos mais longos de avaliação. Além da possibilidade de serem mantidas por um período menor na superfície ocular, visando-se induzir discretas vascularizações e pigmentações corneis. Abre-se uma oportunidade de estudos para aplicação desta membrana em outras espécies.

2.4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições aqui estabelecidas, é possível concluir que a membrana hidratada delgada, apresenta melhor acomodação do leito de úlceras profundas e perfurações do que a hidratada espessa. As membranas funcionaram como um tampão protetor ao defeito corneal, sem serem incorporada à córnea. Portanto, a MB se constitui uma alternativa viável nas ceratoplastias lamelares e totais. Destaca-se a dificuldade para sua remoção da superfície ocular, exaltação vascular corneal, além de induzir a pigmentação.

2.5 REFERÊNCIAS

ACHOURI, D.; ALHANOUT, K.; PICCERELLE, P.; ANDRIEU, V. Recent advances in ocular drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1599-1617, 2013.

ANDRADE, A. L.; GOMES, J. A. P.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V.; CAMPOS, M. Aspectos clínicos e morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 127-142, 2009.

ANDRADE, A. L.; LAUS, J. L.; FIGUEIREDO, F.; BATISTA, C. M. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophtalmology**, v. 2, p. 79-82, 1999.

BACKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials,** v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006.

BALLAND, O.; POINSARD, A.; FAMOSE, F.; GOULLE, F.; ISARD, P.; MATHIESON, I.; DULAURENT, T. Use of a porcine urinary bladder acellular matrix for corneal reconstruction in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2015.

BENSON, J.; DWYER, L.; HELLYER, P. et al. Preanesthetic evaluation and risk assessment of small-animal patients. **The veterinary continuing education advisor** – Supplement to Veterinary Medice, v. 1, p. 1-14, 1997.

BUSSIERES, M.; KROHNE, S. G.; STILES, J.; TOWNSEND, W. M. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. **Veterinary Ophtalmology**, v. 7, n. 5, p. 352-359, 2004.

CARSON, J. H.; SOWDEN, L. C.; COLVIN, J. R. The induction of birefringence in pellicles of bacterial cellulose from Acetobacter xylinum by lipids. **Can. J. Microbiol**, v. 13, p. 837-844, 1967.

CAVICCHIOLI, M.; CORSO, C. T.; COELHO, F.; MENDES, L.; SASKA, S.; SOARES, C. P.; SOUZA, F. O.; FRANCHI, L. P.; CAPOTE, T. S. O.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Characterization and cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluations of bacterial cellulose membranes incorporated with ciprofloxacin: a potential material for use as therapeutic contact lens. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 4, n. 7, p. 1626-1647, 2015.

CHOW, D. W. Y.; WESTERMEYER, H. D. Retrospective evaluation of corneal reconstruction using ACell Vet™ alone in dogs and cats: 82 cases. **Veterinary Ophtalmology**, p. 1-10, 2015.

CREMONINI, D. N.; RANZANI, J. J. T.; CUNHA, M. L. R. S.; TONIN, F. G.; BRANDÃO, C. V. S.; MESSADEQ, Y. Liberação intraocular de ofloxacina associada a lente de contato biossintética em ceratite bacteriana experimental em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 4, p. 791-796, 2010.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract Refract Surgery**, v. 37, n. 3, p. 588-598, 2011.

DULAURENT, T.; AZOULAY, T.; GOULLE, F.; DULAURENT, A.; MENTEK, M.; PEIFFER, R. L.; ISARD, P. Use of bovine pericardium (Tutopatch®) graft for surgical

repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. **Veterinary Ophtalmology**, v. 17, n. 2, p. 91-99, 2014.

FERREIRA, G. T. N. M.; SOUZA, T. F. B.; SAKAMOTO, S. S.; SILVA, T. C. C. ANDRADE, A. L. Aspectos clínicos do enxerto conjuntival 360º e do implante da membrana amniótica criopreservada no tratamento de úlceras de córnea em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1239-1252, 2013.

FONTANA, J. D.; DESOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I.L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DESOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 253-264, 1990.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Afecções da Túnica Fibrosa. In: _. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2009. p. 69-96.

GATTAZ SOBRINHO, A. Uma película celulósica no tratamento das queimaduras do II e III graus. **Rev. Bras. Cir**, v. 79, p. 45-51, 1989.

GELATT, K. N. Doenças e Cirurgias da Córnea e Esclera do Cão. In: _. **Manual de oftalmologia veterinária**. 1ª ed. Barueri: Manole, 2003. p. 125-164.

GELATT, K. N.; BROOKS, D. E.; KÄLLBERG M. E. The canine glaucomas. In: _. **Gellat, K. N. Veterinary Ophthalmology.** 4ª ed. Gainesville: Blackwell Publishing, 2007. p. 753-811.

GILGER, B. C.; BENTLEY, E.; OLLIVIER, F. J. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: GELATT K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 4ª ed. Iowa: Blackwell, 2007. v. 2. p. 690-752.

GONÇALVES, C. P. Keratitis. In: _. **Oftalmologia**. 4ª ed. Brasília: Atheneu, 1975. p. 131-140.

GOULLE, F. Use of porcine small intestinal submucosa for corneal reconstruction in dogs and cats: 106 case. **Journal of small animal practice**, v. 53, p. 34-43, 2012.

GRAHAM, K. L.; WHITE, J. D.; BILLSON, F. M. Feline corneal sequestra: outcome of corneoconjunctival transposition in 97 cats (109 eyes). **Journal of feline medice and surgery**, v. 19, n. 6, p. 710-716, 2017.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B.; In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **J Biomed Mater Res A,** v. 76, n. 2, p. 431-438, 2006.

HENDRIX, D. V. H. Diseases and surgery of the canine anterior uvea. In: _. **Gellat, K. N. Veterinary Ophthalmology.** 4ª ed. Gainesville: Blackwell Publishing, 2007. p. 812-858.

HERRERA, D. Afecções da Córnea. In: _. **Oftalmologia clínica em animais de companhia**. 1ª ed. São Paulo: MedVet, 2008. p. 111-140.

HÜNNING, P. S.; RIGON, G. M.; BEHEREGARAY, W. K.; PRESSER, D.; MUCCILLO, M; PIGATTO, J. A. T. Reparação de perfuração ocular em um cão usando pericárdio homólogo preservado em glicerina. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 37, n. 2, p. 195-199, 2009.

ION, L.; IONASCU, I.; JOZ, C. G.; CERRADA, I.; BIRTOIU, A.; HUGUET, E. Human amniotic membrane transplantation in the treatment of feline corneal sequestrum: preliminary results. **AgroLife Scientific Journal**, v. 5, n. 1, p. 91-98, 2016.

IRANI, Y. D.; SCOTNEY, P. D.; KLEBE, S. ; MORTIMER, L. A.; NASH, A. D.; WILLIAMS, K. A. An Anti-VEGF-B Antibody Fragment Induces Regression of Pre-Existing Blood Vessels in the Rat Cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n 9, p. 3404-3413, 2017.

IRUELA-ARISPE, M. L., DVORA, K. H. Angiogenesis: a dinamic balance of stimulators and inhibitors. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 76, p. 672-88, 1997.

KERN, T. J. Antibacterial agents for ocular therapeutics. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract**, v. 34, p. 655-668, 2004.

KERN, T. J. Ulcerative keratitis. **Vet. Clin. North Am. Small. Pract**., v. 20, p. 643-66, 1990.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 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**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2000.

MACEDO, L. R.; RIBEIRO, A. P.; CONCEIÇÃO, L. F.; GALERA, P. D.; LAUS, J. L. Experimental lamelar keratoplasty in rabbits using microfibrilar celulose membrane. Clinical, morphological and immunohistochemical findings. **Ciência Rural**, v. 40, n.2, p. 378-383, 2010.

MALAEKEH-NIKOUEI, B.; VAHABZADEH, S. A.; MOHAJERI, S.A. Preparation of a Molecularly Imprinted Soft Contact Lens as a New Ocular Drug Delivery System for Dorzolamide. **Current Drug Delivery**, v. 10, n. 3, p. 279-285, 2013.

MARKMAN, C.; FRACALANZZA, S. E. L.; NOVAES Jr., A. B. et al. Slow release of tetracicline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration**. J. Periodontol**, v. 66, p. 978-983, 1995.

MORALES, A.; BARROS, P. S. M.; NETO, J. B.; GILBERTO, C.; SALVADOR, C. N.; MIGLIATI, E. R. Experimetal use of a castor bean (Ricinus communis L.) oil derived polymer in lamellar, interlamellar and penetrating implant in rabbit's córnea. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, p. 31-37, 2005.

MUNGER, R.J. Catarata. In: _. LAUS, J.L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos.** 1a. Ed. São Paulo: Roca, 2009. p.116-32.

OLIVEIRA, A. D. D.; HÖFLING-LIMA, A. L.; BELFORT JR., R.; GAYOSO, M. F.; FRANCISCO, W. Fluoroquinolone susceptibilities to methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative Staphylococcus isolated from eye infection**. Arq Bras Oftalmol**, v. 70, n. 2, p. 286-289, 2007.

PACKER, R. M.; HENDRICKS, A.; BURN, C. C. Impact of facial conformation on canine health: corneal ulceration. **PLoS**, v. 10, n. 5, p. 1-16, 2015.

RAMBO, C.; RECOUVREUX, D.; CARMINATTI, C.; PITLOVANCIV, A.; ANTONIO, R.; PORTO, L. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 28, n. 4, p. 549-554, 2008.

REBELLO, C.; ALMEIDA, D. A.; LIMA Jr., E. M. et al. Biofill um novo substituto de pele. **Rev. Bras. Cir**, v. 77, p. 407-414, 1987.

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

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: _. **Gellat, K. N. Veterinary Ophthalmology.** 3ª ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 31-150.

SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEIXEIRA, L. N.; FRANCHI, L. P.; DOS SANTOS, R. A.; GASPAR, A.; DE OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A.; TAKAHASHI, C.; MESSADDEQ, Y. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 23, n. 9, p. 2253-2266, 2012.

SASKA, S.; TEIXEIRA, L. N.; DE OLIVEIRA, P. T.; GASPAR, A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y.; MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 41, p. 22102-22112, 2012.

SEPÚLVEDA, R. V.; VALENTE, F. L.; REIS, E. C. C.; ARAÚJO, F. R.; ELEOTÉRIO, R. B.; QUEIROZ, P. V. S.; BORGES, A. P. B. Compósito de celulose bacteriana e celulose bacteriana / policaprolactona como substitutos teciduais na córnea de coelhos. **Pesq. Veterinario. Bras.**, v. 36, n. 10, 2016.

SLATTER, D. **Córnea e esclera**. In: _. Fundamentos de oftalmologia veterinária. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 283-338.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG, M.; GATENHOLM. P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.

TROVATTI, E.; FREIRE, C. S. R.; PINTO, P. C.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; ROSADO, C. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In vitro diffusion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 83-87, 2012.

TROVATTI, E.; SILVA, N.; DUARTE, I. F.; ROSADO, C. F.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Biocellulose Membranes as Supports for Dermal Release of Lidocaine. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4162-4168, 2011.

TSUZUKI, K; YAMASHITA, K.; IZUMISAWA, Y.; KOTANI, T. Microstructure and glycosaminoglycan ratio of canine cornea after reconstructive transplantation with glycerin-preserved porcine amniotic membranes. **Veterinary Ophtalmology**, v. 11, n. 4, p. 222-227, 2008.

VALIATTI, F. B.; CRISPIM, D.; BENFICA, C.; VALIATTI, B. B.; KRAMER, C. K.; CANANI, L. H. Papel do fator de crescimento vascular endothelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. n. 55, v.2, p. 106-113, 2011.

VONGSAKUL, S.; TUNTIVANICH, P.; SIRIVAIDYAPONG, S.; KALPRAVIDH, M. Canine amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction of created deep corneal ulcers in dogs. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 2, p. 135-144, 2009.

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

WONG, C. A.; GALVIS, V.; TELLO, A.; VILLAREAL, D.; REY, J. J. Susceptibilidad antibiótica in vitro a fluoquinolonas. **Archivos de la sociedad española de oftalmologia**, v. 87, n. 3, p. 72-78, 2012.

YANOFF, M.; FINE, B.S. **Ocular pathology: a text and atlas**. 3ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1989.

ANEXO A – Comitê de Ética

FLS. 36
PROC. 0809/18
RUB.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ceua unesp araçatuba

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Uso da membrana de celulose bacteriana com liberação de ciprofloxacino em úlceras de córnea de cães e gatos"**, Processo FOA nº 00809-2018, sob responsabilidade de Alexandre Lima de Andrade apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 13 de Dezembro de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Agosto de 2019.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Use of the bacterial cellulose membrane with release of ciprofloxacin on the corneal ulcers from dogs and cats"**, Protocol FOA nº 00809-2018, under the supervision of Alexandre Lima de Andrade presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 13, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 31, 2019.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br