

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPRIEDADES ANISOTRÓPICAS E REFRATIVAS DE
CÓRNEAS DE COELHOS, APÓS IMPLANTAÇÃO DE
INLAYS DE COLÁGENO TIPO I EXTRAÍDO DE TENDÃO
FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL DE BOVINO**

Alexandre Augusto Franchi de Barros Sobrinho
Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPRIEDADES ANISOTRÓPICAS E REFRATIVAS DE
CÓRNEAS DE COELHOS, APÓS IMPLANTAÇÃO DE
INLAYS DE COLÁGENO TIPO I EXTRAÍDO DE TENDÃO
FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL DE BOVINO**

Alexandre Augusto Franchi de Barros Sobrinho

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Aldrovani

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

B277p

Barros Sobrinho, Alexandre Augusto Franchi de

Propriedades anisotrópicas e refrativas de córneas de coelhos, após
implantação de inlays de colágeno tipo I extraído de tendão flexor digital
superficial de bovino / Alexandre Augusto Franchi de Barros Sobrinho. --
Jaboticabal, 2019

50 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: José Luiz Laus

Coorientadora: Marcela Aldrovani Rodrigues

1. Oftalmologia. 2. Materiais biomédicos. 3. Colágeno Tipo I. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PROPRIEDADES ANISOTRÓPICAS E REFRATIVAS DE CÓRNEAS DE COELHOS,
APÓS IMPLANTAÇÃO DE INLAYS DE COLÁGENO TIPO I EXTRAÍDO DE TENDÃO
FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL DE BOVINO

AUTOR: ALEXANDRE AUGUSTO FRANCHI DE BARROS SOBRINHO

ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ LAUS

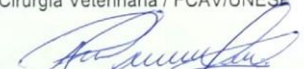
COORDINADORA: MARCELA ALDROVANI RODRIGUES

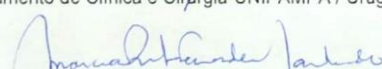
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARCELA ALDROVANI RODRIGUES
UNIFRAN / Franca/SP


Profa. Dra. CLÁUDIA VALÉRIA SEULLNER BRANDÃO
Depto. de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / FMVZ/Botucatu - Unesp


Pós-doutorando IVAN RICARDO MARTINEZ PADUA
Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP


Profa. Dra. ROBERTA MARTINS CRIVELARO
Departamento de Clínica e Cirurgia-UNIPAMPA / Uruguai/RS


Profa. Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de abril de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALEXANDRE AUGUSTO FRANCHI DE BARROS SOBRINHO – nascido em 08 de fevereiro de 1986, na cidade de Guaranésia, Minas Gerais, filho de Maria Inês Franchi e Carlos Manuel Carvalho de Barros Sobrinho. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade do Estado de Santa Catarina, em agosto de 2010. Em 2014, tornou-se mestre em Cirurgia Veterinária pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, nível Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, do qual, atualmente, é aluno regular do curso de Doutorado e atuante do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus. Atua em pesquisas na área de oftalmologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Carlos e Maria Inês, meus irmãos Fernando e Iara por todo o apoio e incentivo durante todos esses anos longe de casa.

À minha esposa, Fernanda, por ser quem você é e estar comigo em todos os momentos, de alegria e tristeza, desde o início do mestrado. Sem você eu não conseguiria e também nada disso teria sentido.

Ao Prof. Dr. José Luiz Laus, pela oportunidade, ensinamentos e por ter me aberto as portas do seu Serviço de Oftalmologia. Seguirei o seu exemplo de ética e trabalho em prol dos pacientes.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Marcela Aldrovani, pelos ensinamentos e paciência, e por ter compartilhado comigo um pedaço da sua linha de pesquisa, sem você esse doutorado não aconteceria.

À Roberta Renzo, que foi minha primeira dupla de atendimento, me ensinando muito sobre oftalmologia clínica e cirúrgica. Sem você hoje não saberia nem como fazer um flap de 3ª pálpebra.

Aos meus amigos de atendimento, Tiago Barbalho Lima, Luciano Fernandes da Conceição, Miguel Ladino Silva, Ivan Ricardo Martinez Pádua por todos os ensinamentos sobre oftalmologia. Muito do que sei hoje aprendi com vocês.

À Karina Kamachi Kobashigawa e Paloma do Espírito Santo Silva, por me ajudarem em muitas situações (inclusive todo o experimento) e se tornarem amigas que vou levar para o resto da vida.

À Flor Claros Chacaltana e Roberta Martins Crivelaro, minhas 2 parceiras de atendimento, muito obrigado pelo tempo e conhecimentos compartilhados, sou uma pessoa e oftalmologista melhor hoje graças a vocês.

À Daniela Moura dos Santos e Gabriela Morais Madruga, por se tornarem amigas tão próximas e me ajudarem a passar por momentos difíceis, com um pouco de leveza e muitas risadas. Vou levar vocês, também, para o resto da vida.

Às minhas companheiras de atendimento, Camila Pinho Balthazar da Silveira, Karina Herência, Francimery Fachini e Marcella Filézio, obrigado por estarem presentes sempre que precisei de alguém.

À Profa. Dra. Gillian McLellan, por me dar a oportunidade de fazer o doutorado sanduíche em Madison, WI. Aprendi muito e cresci muito como pessoa graças à sra.

À todos os funcionários do hospital veterinário Laudo Natel, da FCAV UNESP

À todos, que de alguma forma, me ajudaram tanto na execução do projeto, quanto na caminhada até aqui.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche concedida

À FAPESP, pela bolsa e auxílio concedido para a realização da pesquisa (proc. 2016/00743-1).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Aos coelhos da pesquisa, sem os quais esse doutorado também não existiria.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3 OBJETIVOS	8
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1 Extração de colágeno tipo I de tendão flexor digital superficial bovino e confeção de membranas	8
4.2 Considerações quanto à ética	9
4.3 Animais e delineamento experimental	9
4.4 Procedimentos anestésico e cirúrgico.....	10
4.5 Avaliações clínicas.....	12
4.6 Refratometria e ceratometria	12
4.7 Histopatologia	13
4.8 Anisotropia óptica	13
4.8.1 Birrefringência	13
4.9 Estatística.....	14
5 RESULTADOS	14
5.1 Avaliação clínica	14
5.2 Refratometria e ceratometria	15
5.3 Histopatologia	20
5.4 Anisotropia óptica	21
5.4.1 Birrefringência	21
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÕES	30
8 REFERÊNCIAS.....	31
APÊNDICE A.....	39
APÊNDICE B.....	43

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Propriedades anisotrópicas e refrativas em córneas de coelhos, após implantação de *inlays* de colágeno tipo I extraído de tendão flexor digital bovino**", protocolo nº 6.330/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de junho de 2016.

Vigência do Projeto	20/06/2016 a 10/12/2017
Espécie / Linhagem	<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Nova Zelândia Branco
Nº de animais	36 animais
Peso / Idade	Aproximadamente 3kg
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Unesp / Câmpus de Botucatu

Jaboticabal, 02 de junho de 2016.


Prof.^a Dr.^a Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

PROPRIEDADES ANISOTRÓPICAS E REFRAATIVAS DE CÓRNEAS DE COELHOS, APÓS IMPLANTAÇÃO DE *INLAYS* DE COLÁGENO TIPO I EXTRAÍDO DE TENDÃO FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL DE BOVINO

RESUMO – Membranas a base de colágeno tipo I extraído de tendão flexor digital superficial bovino foram estudados como possível matéria prima para confecção de *inlays* corneais. Elas foram implantadas nos estromas corneais de olhos direitos de 16 coelhos da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos ou fêmeas, em higidez sistêmica. Um “bolso” foi criado na região central de cada córnea para implantação e posicionamento da membrana (*inlay*) dentro do estroma anterior (grupo CM, 16 coelhos). Córneas com “bolso”, sem implantação de membranas (grupo SM, 16 coelhos), bem como córneas intactas (grupo controle, 4 coelhos sem qualquer procedimento cirúrgico) foram estudadas. Os grupos CM e SM foram avaliados clinicamente quanto a presença de blefarospasmo, hiperemia conjuntival, edema, secreção ocular e neovascularização e quanto às propriedades refrativas e a curvatura da córnea imediatamente antes (basal) e transcorridos 3, 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório. Quatro animais dos grupos CM e SM, escolhidos ao acaso, foram submetidos à eutanásia ativa, em diferentes tempos, para colheita de córneas, as quais juntamente com córneas intactas do grupo controle, foram processadas para estudos comparativos em anisotropias ópticas (birrefringências total, de forma e intrínseca). Todas as variáveis contínuas foram testadas para a normalidade estatística. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Os procedimentos cirúrgicos realizados na córnea dos animais do grupo SM não alteraram a refração ($p = 0,479$). As córneas no grupo CM apresentaram-se com hipermetropia, astigmatismo e equivalente esférico alterados (vs. basal) a partir do terceiro dia de pós-operatório, e esses parâmetros se mantiveram alterados até o vigésimo oitavo dia de avaliação ($p < 0,01$). A curvatura corneal não foi alterada pelos procedimentos realizados nos grupos SM ($p=0,3$) e CM ($p=0,28$). Observaram-se elevações nas birrefringências totais e de forma das córneas nos grupos CM e SM, nos diferentes tempos avaliados, comparativamente às córneas no grupo controle. As proporções de aumento da birrefringência total foram de 4,15%, 2,98%, 2,99% e 2,79% no grupo CM e de 2,76%, 0,19%, 3,14% e 3,36% no grupo SM, aos 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório, respectivamente. Os valores de birrefringência intrínseca oscilaram nos grupos estudados e entre os diferentes tempos de avaliação, representando mudanças em “turnover” associadas com remodelamento estromal. A membrana colagênica, à luz da histopatologia, mostrou-se segura, de degradação lenta, não tóxica e biocompatível com o tecido corneal de coelhos. Ademais, alterou tanto a refração corneal quanto a birrefringência total no curto prazo, porém sem alterar a curvatura corneal. Ela é portanto um material promissor para estudos futuros visando aperfeiçoamento e uso como *inlays*.

Palavras-chave: birrefringência, biomaterial, colágeno; córnea; *inlay*; curvatura corneal

ANISOTROPIC AND REFRACTIVE PROPERTIES OF RABBIT CORNEAS, AFTER IMPLANTATION OF TYPE I COLLAGEN INLAYS EXTRACTED FROM BOVINE SUPERFICIAL DIGITAL FLEXOR TENDON

ABSTRACT – Membranes based on type I collagen extracted from bovine superficial digital flexor tendon were studied as a possible raw material for making corneal inlays. They were implanted in the right-eye, on the corneal stroma of 16 New Zealand White rabbits, male or female, adults, in apparently systemic health. A "pocket" was created in the central region of the cornea for implantation and positioning of the membrane (inlay) within the anterior stroma (CM group, 16 rabbits). Corneas with pocket, without implantation of membranes (SM group, 16 rabbits), as well as intact corneas (control group, 4 rabbits without any surgical procedure) were studied. The CM and SM groups were clinically evaluated for the presence of blepharospasm, conjunctival hyperemia, edema, ocular secretion and neovascularization, and on the refractive properties and curvature of the cornea immediately before (baseline) and after 3, 7, 14, 21 and 28 days of the postoperative period. Four animals, randomly choose from CM and SM groups were submitted to active euthanasia at different times to harvest the corneas, which, together with intact corneas from the control group, were processed for comparative studies in optical anisotropy (total, form and intrinsic birefringences). All continuous variables were tested for statistical normality. Differences with $p < 0.05$ were considered significant. Surgical procedures performed on the corneas of the SM group did not alter the refraction ($p = 0.479$). The corneas in the CM group presented with altered hypermetropia, astigmatism and spherical equivalent (vs. basal) from the third postoperative day ($p < 0.01$) onwards, and those changes were maintained until the twenty-eighth day of evaluation. The corneal curvature was not altered by the procedures performed in the SM ($p = 0.3$) and CM ($p = 0.28$) groups. Elevations in total and form birefringence of the corneas were observed in the CM and SM groups at the different evaluated times, compared to the corneas in the control group. The proportions of increase of total birefringence were 4.15%, 2.98%, 2.99% and 2.79% in the CM group and 2.76%, 0.19%, 3.14% and 3, 36% in the SM group at 7, 14, 21 and 28 postoperative days, respectively. The intrinsic birefringence values oscillated in the studied groups and between the different evaluation times, representing changes in turnover associated with stromal remodeling. The collagen membrane, on the histopathological evaluation, was shown to be safe, to have a slow degradation time, to be non-toxic and biocompatible with rabbit corneal tissue. In addition, it altered both the corneal refraction and the total birefringence in the short term, but without altering the corneal curvature. It is, therefore, a promising material for future studies aiming the improvement and use as an inlay.

Keywords: birefringence, biomaterial, collagen, cornea, inlay, corneal curvature

LISTA DE ABREVIATURAS

CK - Ceratoplastia condutiva

D - Dioptria

LASIK - *Laser assisted in situ keratomileusis*

MEC - Matriz extracelular

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mm - Milímetro

n_D – Índices de refração

nm – Nanômetro

PPL – Plano de luz polarizada

RO – Retardo óptico

WLS - *Wave like structures*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Em A, incisão em córnea clara com bisturi calibrado de 300 μm . Em B, extensão do bolso no estroma corneal com bisturi crescente angulado, em C, com dissector de Martinez e em D, membranas de colágeno utilizadas no estudo (setas).
.....11

Figura 2. A e B. Gráficos boxplots representando mudanças temporais nos valores médios de refração, em dioptrias, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). C, Gráfico de intervalo de confiança de 95% de Tukey, mostrando as comparações estatísticas no grupo CM. Observe as linhas centrais em zero. Se um intervalo não tem um intervalo em zero, as médias das amostras comparadas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).16

Figura 3 A e B. Gráficos boxplots representando mudanças temporais nos valores médios de astigmatismo, em dioptrias, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). C, Gráfico de intervalo de confiança de 95% de Tukey, mostrando as comparações estatísticas no grupo CM. Observe as linhas centrais em zero. Se um intervalo não tem um intervalo em zero, as médias das amostras comparadas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).17

Figura 4 A e B. Gráficos boxplots representando mudanças temporais nos valores médios de equivalente esférico, em dioptrias, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). C, Gráfico de intervalo de confiança de 95% de Tukey, mostrando as comparações estatísticas no grupo CM. Observe as linhas centrais em zero. Se um intervalo não tem um intervalo em zero, as médias das amostras comparadas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).18

Figura 5 A e B. Gráficos boxplots representando mudanças temporais nos valores médios de curvatura, em milímetros, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). ($p < 0,05$).19

Figura 6. Micrografias de córneas do grupo CM, no dia 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) de pós-operatório, mostrando a membrana de colágeno (seta) integrada ao estroma. Hematoxilina & Eosina.20

Figura 7. Imagens representativas dos brilhos de birrefringências observados nas córneas estudadas a 45 graus do plano da luz polarizada. As fibras apresentaram brilho não homogêneo. Em A, B, C e D, grupo operado que não recebeu membrana (SM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. Em E, F, G e H, grupo que recebeu membrana (CM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. As setas nas imagens E, F, G, e H correspondem ao local de implantação da membrana. Em I, grupo controle. Em J, esquema ilustrando o posicionamento dos cortes em relação ao PPL.....22

Figura 8. Imagens representativas dos brilhos de birrefringências observados nas córneas estudadas, a 90 graus do plano da luz polarizada. As fibras apresentaram brilho não homogêneo. Em A, B, C e D, grupo operado que não recebeu membrana (SM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. Em E, F, G e H, grupo que recebeu membrana (CM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. As setas nas imagens E, F, G e H correspondem ao local de implantação da membrana. Em I, grupo controle. Em J, esquema ilustrando o posicionamento dos cortes em relação ao PPL.....23

Figura 9 Curvas de birrefringência de forma comparando córneas nos grupos SM (A) e CM (B), em diferentes tempos de avaliação pós-operatória, com córneas controle.24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de retardo óptico das córneas estudadas.....	25
---	----

1 INTRODUÇÃO

A córnea é um tecido transparente, avascular e ricamente innervado. Sua principal função é transmitir e refratar a luz que chega ao olho. Seu formato/curvatura é crucial para o desempenho da função refrativa. Ela tem propriedades líquido cristalinas, razão pela qual é capaz de remodelar e de responder com adaptação ou flexibilidade a uma série de intervenções ou a eventos fisiológicos ou patológicos. Uma característica das estruturas líquido cristalinas é a natureza anisotrópica, que, no caso da córnea, emerge do arranjo periódico organizado das fibrilas e das fibras colágenas do estroma. O arranjo colagênico estromal que confere propriedades anisotrópicas ópticas à córnea é o mesmo que determina a sua curvatura, refração e biomecânica. Portanto, há interesse clínico e científico em se estudar anisotropia em córneas saudáveis, bem como em se avaliarem os efeitos de intervenções cirúrgicas sobre tal. A investigação da anisotropia óptica corneal representa estratégia eficaz para se detectarem alterações no grau de empacotamento e no diâmetro das fibras colágenas, bem como para se estabelecerem a orientação e os padrões intercruzamentos dos componentes fibrilares dentro das lamelas estromais.

Crescente é o número de intervenções cirúrgicas que envolvem enxertia ou transplantação de biomateriais para a córnea. Biomateriais para cirurgia corneal devem reproduzir requisitos estruturais e funcionais do tecido hospedeiro, além de proporcionarem resistência mecânica, biocompatibilidade, transparência ou semi-transparência. Usualmente, os biomateriais são confeccionados com polímeros naturais e sintéticos. Enquanto polímeros naturais tendem a ter excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, os sintéticos permitem maior personalização de propriedades físico-químicas desejáveis, porém carecem de biodegradabilidade.

O colágeno é o maior componente da matriz extracelular (MEC) animal. A aplicação dessa proteína (especialmente colágeno tipo I) em engenharia de tecido corneal é viável e tem sido reportada por diferentes autores. Isso porque o colágeno é um material de extração fácil e de baixo custo, além de próprio ao estroma da córnea. Colágenos para aplicações industriais, incluindo uso clínico-cirúrgico, são normalmente extraídos de tendões, como o flexor digital bovino.

Há relatos de que a implantação de biomateriais membranosos de colágeno no estroma corneal pode suscitar modificações na curvatura da córnea, o que possibilitaria seu emprego na correção de erros refrativos. Desse modo, além da aplicação usual em ceratoplastias lamelares, na liberação de fármacos, ou, ainda, para o carreamento de células, membranas colágenas têm sido avaliadas como *inlays*. Quanto a isto, há mais estudos clínicos que investigações laboratoriais. Apesar do uso crescente, poucas pesquisas quantificaram os efeitos da implantação de membranas colágenas tipo *inlays* sobre o arranjo de colágeno estromal, bem como sobre seus efeitos relativamente às anisotropias ópticas corneais.

Pelo exposto, com a presente pesquisa informaram-se sobre os efeitos da implantação intraestromal de membranas de colágeno tipo I extraído de tendão flexor digital bovino, suas propriedades refrativas e topográficas (curvatura) e anisotropia óptica na córnea de coelhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Um dos desafios atuais das ciências básicas e translacionais aplicadas à oftalmologia é potencializar a evolução da tríade custo-risco-benefício que acompanha o emprego de células, de biomembranas e de polímeros na prática oftálmica, notadamente no manejo de afecções corneais. Dentre as expectativas, há interesse em se ampliar a gama de materiais poliméricos capazes de se integrarem à córnea, sem risco de rejeição, e de promoverem rearranjos na organização supramolecular da matriz extracelular (MEC) estromal. O estroma representa cerca de 90% da espessura total da córnea (Slatter, 2005; Gilger, 2007).

O termo organização supramolecular, ou supraorganização, refere-se à interação e ao arranjo macromolecular que confere funcionalidade e propriedades biomecânicas à córnea (Scoot, 1995; Rifles e Thorsteinsdóttir, 2012; Mattia e Otto, 2015). Colágenos fibrilares e proteoglicanos representam as principais macromoléculas supraorganizadas da MEC estromal (Cooper *et al.*, 2005; Mei; *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015).

As fibrilas colágenas da córnea apresentam diâmetro menor que o comprimento de onda da luz visível, condição necessária para que a córnea seja

transparente. Em mamíferos, elas distam uniformemente entre si e organizam-se espacialmente em lamelas de fibras. O arranjo lamelar das fibras colágenas relaciona-se com as propriedades mecânicas da córnea, especialmente o ângulo de curvatura, e é determinante para o poder refrativo (Slatter, 2005; Gilger, 2007). Em decorrência da supraorganização do estroma, quando a luz permeia o tecido corneal, as ondas secundárias que interagem com as fibrilas de colágeno se anulam em todas as direções, exceto para a frente, razão pela qual a córnea é transparente (Meek e Knupp, 2015). Os proteoglicanos são glicoconjugados macromoleculares versáteis, com funções variadas, que podem apresentar, em sua estrutura, oligossacarídeos dos tipos N- ou O-ligados (Sweet et al., 1977; Lohmander et al., 1980; Kuc e Scott, 1997; Chakravarti et al., 1998; Iozzo e Schaefer, 2015). Uma das funções dos proteoglicanos corneais é regular a espessura das fibrilas e das fibras colágenas estromais, bem como o espaçamento inter-fibras (Michelacci, 2003; Quantock e Young, 2008). Os proteoglicanos estão intimamente associados com as fibrilas colágenas em um arranjo espacial que otimiza as interações entre as cadeias glicânicas dos proteoglicanos e as cargas positivas dos aminoácidos que formam a molécula de colágeno. Por isso, as fibras colágenas dessa estrutura são percebidas como elementos mistos (Lewis et al., 2010).

A MEC supraorganizada não é estática ou inerte. Ela é ativa, pois possui *turnover* dinâmico governado por fenômenos sincronizados, determinados geneticamente, de automontagem e desmontagem moleculares (Hay, 1991; Lehn, 2002; Giraud Guille et al., 2005; Acton, 2013). Supraorganizações de MEC, como a córnea, são hábeis em responder com adaptação ou remodelamento (positivo ou negativo) a uma série de eventos ou intervenções, como *lasers*, cirurgias, atividades enzimáticas, fármacos, demandas ou desordens fisiológicas, patógenos, estímulos mecânicos ou elétricos e implantação de biomateriais (Sellaro, 1999; Silva et al., 2006; Aldrovani e Vidal, 2007; Aldrovani et al., 2007; Götzinger et al., 2007; Retamoso et al., 2010; Sahu et al., 2010; Silva et al., 2013; Freedman et al., 2014; Arokiaraj e Palacios, 2014).

Em décadas passadas, promover o remodelamento dos componentes supraorganizados da MEC estromal corneal, por implantação de biomateriais poliméricos, era considerado estratégia eficaz em ceratoplastias lamelares, para se recrutarem fatores de crescimento, enzimas e células remanescentes atuantes na

reparação corneal (Fagerholm, *et al.*, 2010). Na atualidade, biomateriais poliméricos (membranas, hidrogéis, micelas, lipossomas e dispositivos) tornaram-se úteis também para a liberação controlada ou prolongada de fármacos, o carreamento de células progenitoras cultivadas *ex vivo*, promoção do estabelecimento de sítios de interação célula-MEC, e incitar ativação ou ocorrência de sinergia entre moléculas solúveis (Valdetaro *et al.*, 2016; Chen e Liu, 2016). Muitos biomateriais poliméricos estão sendo investigados em cirurgias refrativas, sob a forma de *inlays* e de *onlays* corneais, os quais constituem opções às técnicas tradicionais de *laser assisted in situ keratomileusis* (LASIK) e de ceratoplastia condutiva (CK). Relativamente a olhos humanos, o *onlay* é um dispositivo óptico inserido entre o epitélio corneal e a camada de Bowman, enquanto o *inlay* é um biomaterial inserido abaixo da membrana de Bowman, dentro do estroma corneal (Wu *et al.*, 2014).

A função primária do *inlay* é promover alterações na curvatura da córnea, corrigindo erros de refração (Wu *et al.*, 2014). O primeiro *inlay* foi desenvolvido por Barraquer, em 1949 (Barraquer, 1949). Diferentes materiais já foram testados na confecção de *inlays*, incluindo o vidro Flint e os acrílicos. Os primeiros *inlays* falharam em seus propósitos e suscitaram intercorrências graves, como necrose corneal e extrusão do implante (Alió *et al.*, 2004; Gomaa *et al.*, 2010). Contudo, graças aos avanços tecnológicos (Alió *et al.*, 2004; Gomaa *et al.*, 2010) e as descobertas nos campos da ciência de materiais e da nanotecnologia, o interesse da comunidade científica por esses dispositivos ressurgiu no final da década de 1990 (Yilmaz *et al.*, 2008).

Polímeros sintéticos não biodegradáveis representam, na atualidade, as matérias-primas de escolha para construção de biomateriais para *inlays*, mas como desvantagem, necessitam de remoção cirúrgica, após promoverem as alterações desejadas no ângulo de curvatura corneal (Yilmaz *et al.*, 2008). Pesquisadores discutem se polímeros naturais degradáveis poderiam oferecer vantagens, pois seriam eliminados lentamente por rotas enzimáticas envolvendo metaloproteínases e lisozimas sintetizados no microambiente da córnea. Apesar do potencial terapêutico e da importância clínico-cirúrgica, há poucos estudos sobre alterações em refração secundários à implantação intra-estromal de biomateriais confeccionados com polímeros naturais. Dos polímeros naturais, destaca-se o

colágeno tipo I, dentre outras razões, porque ele é um componente do estroma da córnea (Michelacci, 2003).

Colágeno tipo I têm como unidade estrutural o tropocolágeno, uma macromolécula linear, semiflexível, com dimensões de 300 nm em comprimento e 1,5 nm em diâmetro (Hay, 1991; van der Rest e Garrone, 1991; Michelacci, 2003; Ricard-Blum, 2011). O tropocolágeno é formado por três cadeias polipeptídicas, que se entrelaçam, formando uma tripla hélice cujos resíduos de aminoácidos se dispõem em sequência repetitiva do tipo -Gly-X-Y-, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido, mas, frequentemente, X é prolina e Y é hidroxiprolina (Hay, 1991; van der Rest e Garrone, 1991; Michelacci, 2003). Há homologia estrutural entre as moléculas de colágeno dos vertebrados, o que explica porque colágenos de uma espécie podem ser implantados em outra espécie (Li, 2002; An *et al.*, 2016).

Três fatores importantes credenciam o colágeno como biomaterial: os baixos índices de alergenicidade (cerca de 2% para colágeno heterólogo) e a alta biocompatibilidade; as características de autorreconhecimento e de autoassociação molecular *in vitro*, que permitem reconstituição de preparações colagênicas fibrilares a partir de soluções de extração; baixo custo dos reagentes usados na extração frente ao volume considerável de colágeno que se consegue obter (Li, 2002). A quantidade de colágeno tipo I obtida de uma fonte doadora, por procedimento de extração em meio ácido, depende primariamente da extensão da quebra das ligações não covalentes e covalentes que não estão estabilizadas por ligações cruzadas aldimina (Reddy *et al.*, 2002). Comparado com outros polímeros naturais, o colágeno tipo I é vantajoso por permitir que suas propriedades, incluindo as de degradação (mais rápida ou lenta), sejam modificadas por tratamentos químicos, físicos, térmicos ou enzimáticos, possibilitando a confecção de biomateriais com diferentes características macroscópicas e mecânicas (rigidez/elasticidade, resistência às forças tensionais e compressivas) (Reddy *et al.*, 2002).

Pele, cartilagem e tendão de bovinos, de ovinos e de suínos constituem importantes fontes de colágenos (matéria-prima) para fins de pesquisa ou industriais (Li, 2002).

Tendões são estruturas anatomicamente interpostas entre músculos e ossos, cuja função é transmitir a força gerada pela contração muscular, para o osso, possibilitando a movimentação articular (Aldrovani, 2004). Quando saudáveis, os

tendões são brancos, viscoelásticos e apresentam extensa MEC colagênica (Aldrovani, 2004). Em estado de repouso, as fibras colágenas dos tendões apresentam padrão ondulado que, à microscopia de polarização, revela alternância entre bandas claras e escuras, denominadas *crimps* (ou *wave like structures*, WLS). A morfologia do *crimp* difere entre os tendões e está associada com propriedades biomecânicas e de estabilidade físico-química do colágeno (Giraud-Guille *et al.*, 2003; Vidal e Mello, 2010).

O tendão flexor digital superficial, bem como o tendão calcâneo de bovinos, são bem caracterizados quanto à morfologia do *crimpe* à estabilidade físico-química do colágeno. Portanto, figuram entre os mais empregados para a extração de colágenos. A morfologia do *crimpe* correlata à cristalinidade e ao tipo de mesofase apresentado por fibras colágenas reconstituídas de meios acídicos (Giraud-Guille *et al.*, 2003; Giraud-Guille *et al.*, 2005; Aldrovani, 2004). Tal condição é importante para a seleção da fonte doadora. As mesofases correspondem à “textura” dos cristais líquidos e, no caso de fibras colágenas, podem ser nemáticas colestéricas ou *twisted-grain-boundary* (Vidal, 2003; Aldrovani e Vidal, 2007). À luz da nanotecnologia, a definição atual de tendão é “corpo quiral com características de cristal *twisted-grain-boundary*” (Vidal, 2010).

Há relatos sobre aplicações de colágeno tipo I extraídos de tendões bovino no tratamento de lesões da mucosa duodenal e de queimaduras químicas da pele e da superfície ocular, no carreamento de células epiteliais pigmentares da retina, na construção de lentes destinadas ao cultivo de células tronco do limbo corneoescleral e na ceratoplastia lamelar, entre outras (Ma *et al.*, 2003; Hacket *et al.*, 2009; Warnke *et al.*, 2013). O colágeno tipo I de bovinos já foi usado na confecção de substitutos corneais (Hacket *et al.*, 2009). Trata-se de material com aplicações crescentes em bioengenharia de tecidos oculares e em medicina regenerativa corneal (Hacket *et al.*, 2009). Todavia, fenômenos em nanoescala, decorrentes do remodelamento de biomateriais de colágeno tipo I, notadamente os de bovinos, promovem na interface córnea-implante, permanecem indeterminados. Desconhece-se, também, se a implantação de biomateriais de colágeno tipo I de tendões bovinos para a córnea causa alterações refrativas, e se eventuais alterações seguem padrões repetitivos de ordem molecular.

As anisotropias ópticas correspondem a fenômenos em nanoescala. Elas estão relacionadas com refração, transparência, biomecânica e curvatura corneais,

(Lehn, 2002; Palmer *et al.*, 2007; Webber *et al.*, 2010). A rede molecular que confere propriedades anisotrópicas à córnea é a mesma que responde por sua funcionalidade, ou seja, a colagênica. Diferentes aspectos dessa rede podem ser minuciosamente investigados empregando-se ferramentas biofotônicas, notadamente as que envolvem interação do tecido corneal com fótons de luz polarizada (Barros Sobrinho *et al.*, 2018) (**APÊNDICE A**). A anisotropia óptica corneal, portanto, resulta de elementos periodicamente ordenados nos níveis atômico e molecular (Bennet, 1967; Cassim *et al.*, 1968; Kim *et al.*, 2000, Savenkoy e Sydurok, 2005; Silva *et al.*, 2006; Vidal e Mello, 2006; Aldrovani *et al.*, 2007; Jacques, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013) e reflete as propriedades físicas macro e microscópicas da estrutura.

A incidência de ondas eletromagnéticas polarizadas sobre a córnea, à similitude do que ocorre em outras estruturas anisotrópicas, enseja mudanças na fase dos componentes ortogonais do vetor elétrico, que se conhecem por birrefringência (Bennet, 1967; Cassim *et al.*, 1968; Kiernan, 1990; Kim *et al.*, 2000; Louis-Dorr *et al.*, 2004; Savenkoy e Sydurok, 2005; Silva *et al.*, 2006; Aldrovani e Vidal, 2007; Vidal e Mello, 2006; Jacques, 2013).

A birrefringência é a anisotropia óptica que resulta da diferença de índices de refração da estrutura, acarretando propagação de luz com velocidades e direções diferentes (Wied, 1966; Bennet, 1967; Kim *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006; Aldrovani e Vidal, 2007; Vidal e Mello, 2010; Fesenko *et al.*, 2016). Ela se expressa pela equação $\Delta n = n_y - n_x$, onde n_y é o índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário e n_x é o índice de refração na direção do raio ordinário. Adjunto, ela informa sobre a supraorganização dos colágenos fibrilares e é constituída por duas frações: a intrínseca e a de forma (Wied, 1966; Bennet, 1967; Kim *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006; Aldrovani e Vidal, 2007; Vidal e Mello, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013). A birrefringência intrínseca se deve às transições eletrônicas ($\pi-\pi^*$) nas ligações peptídicas planares situadas ao longo do eixo das fibras. O retardo óptico (RO) associado à ela está representado pela equação: $RO = S \cdot e^2 / 2 \epsilon_0 m \omega_0^2$, onde S é o número de ligações peptídicas por centímetro quadrado; e corresponde à carga do elétron; m corresponde à massa do elétron; ϵ_0 é a permissividade do espaço (constante dielétrica); e ω_0 é a frequência de ressonância do elétron (Bennet, 1967; Silva *et al.*, 2006; Aldrovani e Vidal, 2007; Vidal e Mello, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013). A birrefringência de forma ocorre em meios dielétricos

heterogêneos e, portanto, é um efeito óptico não linear. Na MEC, ela resulta da compatibilidade dos comprimentos de onda do fóton com as dimensões nanométricas e a organização das moléculas de colágenos fibrilares (Cassim *et al.*, 1968; Kiernan, 1990; Kim *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006; Aldrovani e Vidal, 2007; Vidal e Mello, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013). As frações intrínseca e de forma da birrefringência total corneal podem ser estabelecidas pela construção de curvas correlacionando valores de retardo óptico com índices crescentes de refração (Aldrovani *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

Objetivou-se, com a pesquisa, implantarem-se biomateriais colagênicos no estroma corneal de coelhos, para se avaliar a possível utilização dessa matéria prima como *inlay* corneal e quantificarem-se propriedades refrativas (refração e equivalente esférico), topográficas (curvatura corneal) e anisotrópicas na interface córnea-biomaterial, além da sua evolução clínica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extração de colágeno tipo I de tendão flexor digital superficial bovino e confecção de membranas

Tendões digitais superficiais foram obtidos de bovinos, após abate em “abatedouro” regulamentado e autorizado pela Vigilância Sanitária, localizado na região de Ribeirão Preto, interior de São Paulo. A origem do material foi comprovada por emissão de nota fiscal, como previsto nos incisos do Artigo 1, da instrução normativa 169 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, de 20 de fevereiro de 2008. Seu uso foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen número A9A4B18), no atendimento da Lei Federal número 13.123/2015.

O processo de extração de colágeno e o produto final obtido (membrana), foram patenteados junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI, número BR 10 2018 010323 7) e estão disponíveis para licenciamento. O **APÊNDICE B** descreve os processos usados na confecção das membranas.

4.2 Considerações quanto à ética

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO). Outrossim, sob a expressa autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – proc. Nº 6.330/16) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal. Todos os procedimentos foram realizados no centro cirúrgico do Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Os princípios éticos estabelecidos pelo *Canadian Council on Animal Care (Principles of Laboratory Care, NIH publication no 8523, revised 2011)* foram obedecidos.

4.3 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 36 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos ou fêmeas, fornecidos pelo biotério da Unesp, Câmpus de Botucatu, com peso médio de 3 kg. Eles foram mantidos individualmente, em ambiente ventilado e em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, com dieta à base de ração comercial e de água potável, à vontade. Previamente à sua inclusão na pesquisa, eles foram avaliados à semiotécnica oftálmica balizada no teste lacrimal de Schirmer¹, na biomicroscopia com luz em fenda², na tonometria de aplanação³, na oftalmoscopia binocular indireta⁴ e na prova do tingimento pela fluoresceína⁵. Apenas indivíduos livres de alterações oculares e com aparente

¹ Ophthalmos, São Paulo, Brasil

² Kowa SL14, Iseaki, Japão

³ TonoPen, Reichert, Buffalo, EUA

⁴ Eyetec, São Carlos, Brasil

⁵ Ophthalmos, São Paulo, Brasil

saúde sistêmica foram utilizados na pesquisa. Apenas o olho direito de cada um foi submetido à experimentação.

Os animais foram distribuídos em três grupos: os dois primeiros foram constituídos por 16 coelhos cada. Eles foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de um “bolso” no estroma corneal anterior, local onde se implantou (grupo CM, experimental) ou não (grupo SM, controle negativo) a membrana de colágeno previamente confeccionada. Os olhos dos coelhos dos grupos CM e SM foram clinicamente avaliados. As propriedades refrativas e a curvatura da córnea foram quantificadas antes da cirurgia (basal) e transcorridos 3, 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório. Após cada avaliação, excetuando-se a do terceiro dia, quatro coelhos de cada grupo foram escolhidos, ao acaso, para eutanásia ativa e colheita das córneas destinadas aos estudos em anisotropia óptica, precedidos por avaliação histológica.

O grupo controle foi formado por quatro animais não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico, servindo apenas como doadores de córneas “normais” ou “não operadas”, para os estudos comparativos.

4.4 Procedimentos anestésico e cirúrgico

Empregou-se a anestesia do tipo dissociativa, induzida e mantida pela associação de xilazina⁶ (5mg/kg) com cetamina⁷ (20mg/kg). Os animais foram preparados para procedimento asséptico, em decúbito lateral esquerdo, a cabeça estabilizada sobre um *vacuum pillow*⁸, e a região periorbital tricotomizada. Realizou-se a antisepsia empregando-se solução aquosa de iodopovidona⁹ 10% nas pálpebras, diluída na proporção 1:1, vol/vol. Utilizou-se, em complementação à anestesia dissociativa, colírio de tetracaína contendo 0,1% de fenilefrina¹⁰. Realizou-se a antisepsia da córnea e da conjuntiva com solução de iodopovidona 10%, na diluição 1:50, vol/vol, em solução salina. Após isolamento do campo operatório, realizou-se a blefarostase mecânica¹¹. Um “bolso” foi confeccionado no

⁶ Agener União, São Paulo, Brasil

⁷ Agener União, São Paulo, Brasil

⁸ Olympic Vac Pac, San Carlos, EUA

⁹ Riodeine, São José do Rio Preto, Brasil

¹⁰ Allergan, Dublin, Irlanda

¹¹ Blefarostato de Barraquer, Stell inox, São Paulo, Brasil

estroma axial da córnea (eixo visual). A incisão foi feita com bisturi calibrado¹² de 300 μ m (profundidade do bolso) (Figura 1A), em olhos centralizados com anel de Fine-Thornton¹³. Bisturi crescente angulado¹⁴ e dissector de Martinez¹⁵ foram utilizados para estender o plano de dissecção, por 12 mm (Figuras 1B e C). Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo cirurgião, empregando-se microscópio cirúrgico¹⁶.

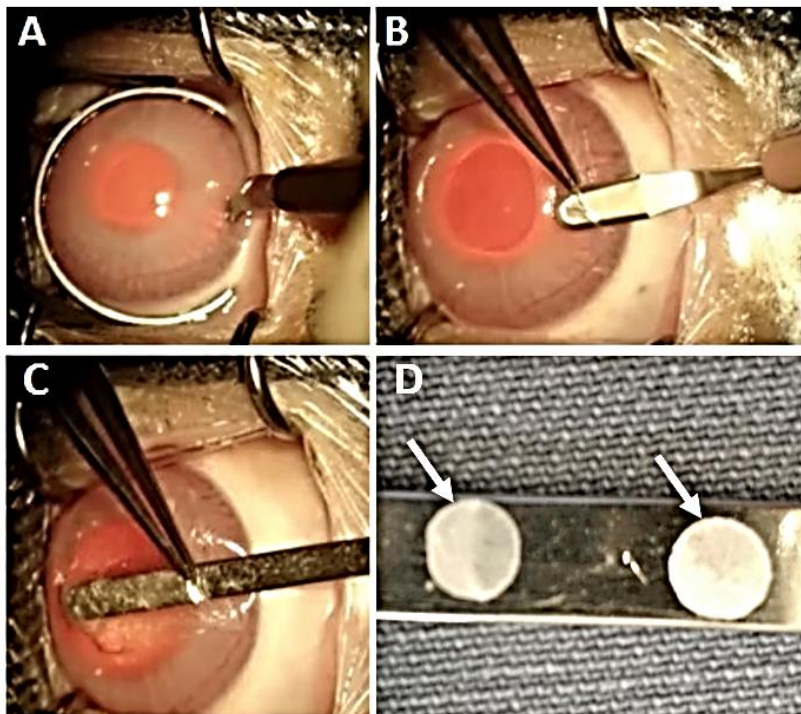


Figura 1. Em A, incisão em córnea clara, de coelho Nova Zelândia Branco, com bisturi calibrado de 300 μ m. Em B, extensão do bolso no estroma corneal com bisturi crescente angulado, em C, com dissector de Martinez e em D, membranas de colágeno utilizadas no estudo (setas).

Membranas de colágeno, com 3 mm de diâmetro, esterilizadas por radiação ultravioleta, foram então implantadas no leito estromal do grupo CM. O “bolso” corneal não foi suturado após o procedimento (Yilmaz *et al.*, 2008). Todos os olhos (grupos CM e SM) foram protegidos com lente de contato corneoescleral Purevision

¹² Razor, Osaka, Japão

¹³ Duckworth&Kent, Baldock, Inglaterra

¹⁴ Alcon, São Paulo, Brasil

¹⁵ Stell inox, São Paulo, Brasil

¹⁶ M-900, DF Vasconcelos, São Paulo, Brasil

2,¹⁷ com diâmetro de 14mm. As lentes foram removidas no terceiro dia de pós-operatório.

Os animais receberam cloridrato de tramadol¹⁸ na dose de 4 mg/kg, pela via subcutânea, em intervalos regulares de 8 horas, por cinco dias. Ademais, colírio¹⁹ à base de neomicina, polimixina B e dexametasona foi utilizado a cada 8 horas, até o momento de colheita das córneas.

4.5 Avaliações clínicas

Os animais foram avaliados com biomicroscópio com lâmpada em fenda⁷ e eventuais irregularidades na superfície ocular foram registradas. As avaliações foram realizadas a cada três dias até o vigésimo oitavo dia. Os eventos relacionados a blefarospasmo, hiperemia conjuntival, edema de córnea, secreção conjuntival e neovascularização foram anotados e classificados em: ausente, discreto, moderado e intenso (Andrade *et al.*, 1999). As membranas não tomavam todo o eixo óptico.

4.6 Refratometria e ceratometria

Sob contenção física delicada, a região central da córnea dos coelhos foi avaliada empregando-se Auto refrator²⁰ PRK-7000, calibrado em modo automático com auxílio de olho teste (dispositivo que acompanha o equipamento). Consideraram-se, para cada olho, em cada avaliação, a média calculada de cinco medidas consecutivas. A refração foi expressa também utilizando-se o equivalente esférico (EE). A emetropia foi definida como sendo o erro refrativo entre -0,5 e +0,5 dioptria (D) (Kubai *et al.*, 2008).

¹⁷ Bausch & Lomb, Nova Iorque, EUA

¹⁸ Agener União, São Paulo, Brasil

¹⁹ Maxitrol, Alcon, São Paulo, Brasil

²⁰ Potec, Daejeon, Coréia do Sul

4.7 Histopatologia

Aspectos histopatológicos e fenômenos de anisotropia óptica foram qualitativamente quantificados em córneas (grupos CM, SM e controle) fixadas em formalina 10% tamponada²¹, desidratadas em soluções decrescentes de etanol²², clareadas em xilol²³ e processadas para inclusão rotineira em parafina Histosec livre de dimetilsulfóxido²⁴. Cortes longitudinais com 7 µm de espessura foram confeccionados (Aldrovani e Vidal, 2007; Ribeiro *et al.*, 2013). Para a histologia, as córneas com tal destinação foram coradas com hematoxilina e eosina (Holzer *et al.*, 2006), e a presença de células inflamatórias, na interface córnea-biomaterial, foi avaliada.

4.8 Anisotropia óptica

4.8.1 Birrefringência

Após avaliação qualitativa do brilho, a birrefringência foi estudada em cortes histológicos “desparafinizados”, não corados, embebidos em soluções contendo índices de refração (n_D) crescentes: água, $n_D = 1,333$; glicerina 20%, $n_D = 1.360$; glicerina 40%, $n_D = 1.386$; glicerina 60%, $n_D = 1.413$; glicerina 80%, $n_D = 1.435$; e glicerina pura, $n_D = 1.471$ (Aldrovani *et al.*, 2007). Para cada índice, 60 medidas de retardo óptico foram realizadas com o eixo longo do corte corneal posicionado a 45 graus do plano de luz polarizada (PPL). Para avaliação das ondulações (*crimp*) as córneas foram posicionadas com o longo eixo a 90 graus do PPL. Empregou-se microscópio quantitativo de luz polarizada²⁵ equipado com objetiva de 20x, optovar 1, filtro de interferência passa-banda em 546 nm e compensador de Brace-Köhler $\lambda/10$ (Olympus, Tóquio, Japão). Nos grupos CM e SM, avaliaram-se as fibras colágenas das interfaces córnea-biomaterial e córnea-incisão, respectivamente. As avaliações no grupo controle foram aleatórias, sempre realizadas no estroma anterior da córnea central. Curvas de birrefringência de forma foram construídas

²¹ Dinâmica, São Paulo, Brasil

²² Synth, São Paulo, Brasil

²³ Synth, São Paulo, Brasil

²⁴ Merck, Darmstadt, Alemanha

²⁵ Olympus BX53-P, Tóquio, Japão

plotando-se os valores médios de retardo óptico, em função dos meios de embebição.

4.9 Estatística

As variáveis foram testadas para a normalidade estatística. Comparações foram feitas empregando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via e ANOVA para medidas repetidas. O pós-teste teste de Tukey foi aplicado, quando necessário. Resultados são expressados como média $\pm$ desvio padrão e estão representados por *boxplots* e por gráficos de intervalo de confiança de 95% de Tukey. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Todos os cálculos, gráficos e as comparações estatísticas foram feitos usando *software* comercialmente disponível²⁶.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

Nenhum dos olhos operados, nos grupos CM ou SM, desenvolveu blefarospasmo ou neovascularização corneal ou apresentou irregularidades (ulcerações) na superfície. No terceiro dia de pós-operatório, todos os coelhos no grupo CM apresentaram hiperemia conjuntival discreta, 66,6% apresentaram secreção mucóide discreta e 11,1% tiveram edema corneal focal discreto. No grupo SM, 100% dos coelhos apresentaram hiperemia conjuntival discreta, 60% tiveram secreção mucóide discreta e 10% apresentaram edema focal discreto. No sexto dia de pós-operatório, 38,8% dos animais do grupo CM apresentavam hiperemia discreta, 11,1% apresentaram secreção mucóide discreta e 11,1% tiveram edema focal discreto; os mesmos percentis foram encontrados no grupo SM. A partir do nono dia de pós-operatório, as manifestações clínicas arrefeceram para não mais serem observadas.

²⁶ Minitab 18™, Minitab, San Diego, EUA

5.2 Refratometria e ceratometria

Os procedimentos cirúrgicos realizados na córnea dos animais do grupo SM não alteraram a refração ($p = 0,479$, ANOVA para medidas repetidas) (Figura 2 A). Os coelhos do grupo CM apresentaram mudanças na refração, do terceiro até o vigésimo oitavo dia de pós-operatório (Figura 2 B e C) ($p < 0,01$ vs. basal, pós-teste de Tukey).

A avaliação basal revelou que 16,66% e 83,34 % dos coelhos no grupo CM eram emétopes e hipermétropes, respectivamente; e que 47,37%, 5,26% e 47,37% dos coelhos no grupo SM eram emétopes, míopes, e hipermétropes, respectivamente. Após o procedimento cirúrgico, todos os coelhos no grupo CM mostraram-se hipermétropes. No grupo SM, as proporções de emétopes, míopes e hipermétropes foram de 17,64%, 5,88% e 76,48% aos 7 dias, de 13,33%, 13,33% e 73,34% aos 14 dias e de 9,1%, 18,18%, 72,72% aos 21 dias, respectivamente. Com 28 dias de avaliação, 20% dos coelhos eram emétopes e 80% hipermétropes.

Todas as córneas apresentaram astigmatismo desde a avaliação basal. Os procedimentos executados nas córneas do grupo SM não ensejaram alterações nos valores de astigmatismo (Figura 3A) ($p = 0,105$). A implantação de membranas nas córneas do grupo CM suscitou aumento do astigmatismo (Figura 3 B e C), caracterizada por redução dos valores médios, em dioptrias, encontrados ($p < 0,01$).

Quanto ao equivalente esférico, não se encontraram alterações no grupo SM, em qualquer dos momentos avaliados ($p=0,99$). No grupo CM, os equivalentes esféricos observados nos pós-operatórios foram maiores que os do basal (Figura 4) ($p = 0,03$).

Não houve diferenças em curvatura corneal, entre momentos basal versus pós-operatórios, dos grupos SM ($p = 0,3$) e CM ($p = 0,287$) (Figura 5).

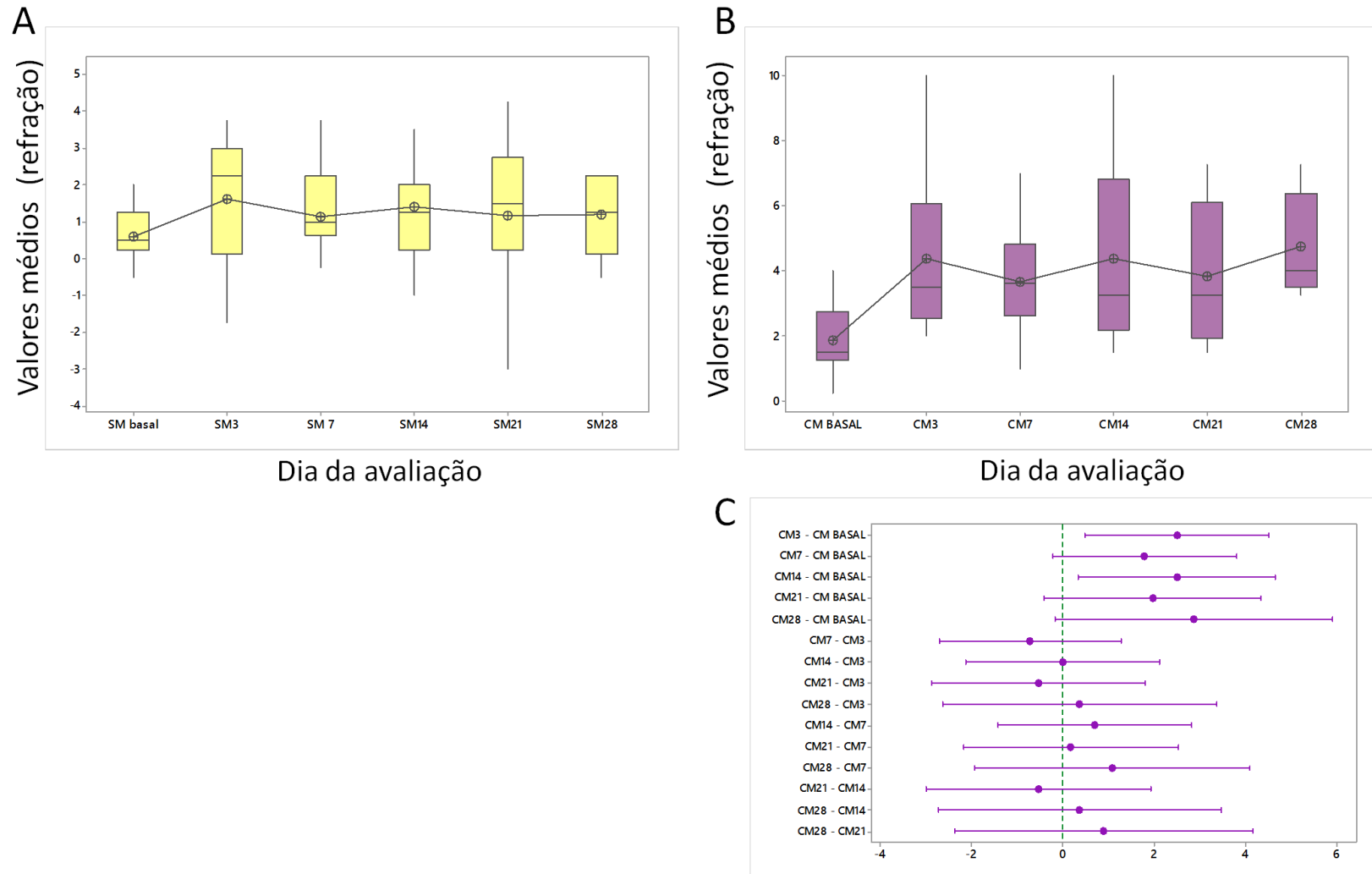


Figura 2. A e B. Gráficos *boxplots* representando mudanças temporais nos valores médios de refração, em dioptrias, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). C, Gráfico de intervalo de confiança de 95% de Tukey, mostrando as comparações estatísticas no grupo CM. Observe as linhas centrais em zero. Se um intervalo não tem um intervalo em zero, as médias das amostras comparadas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

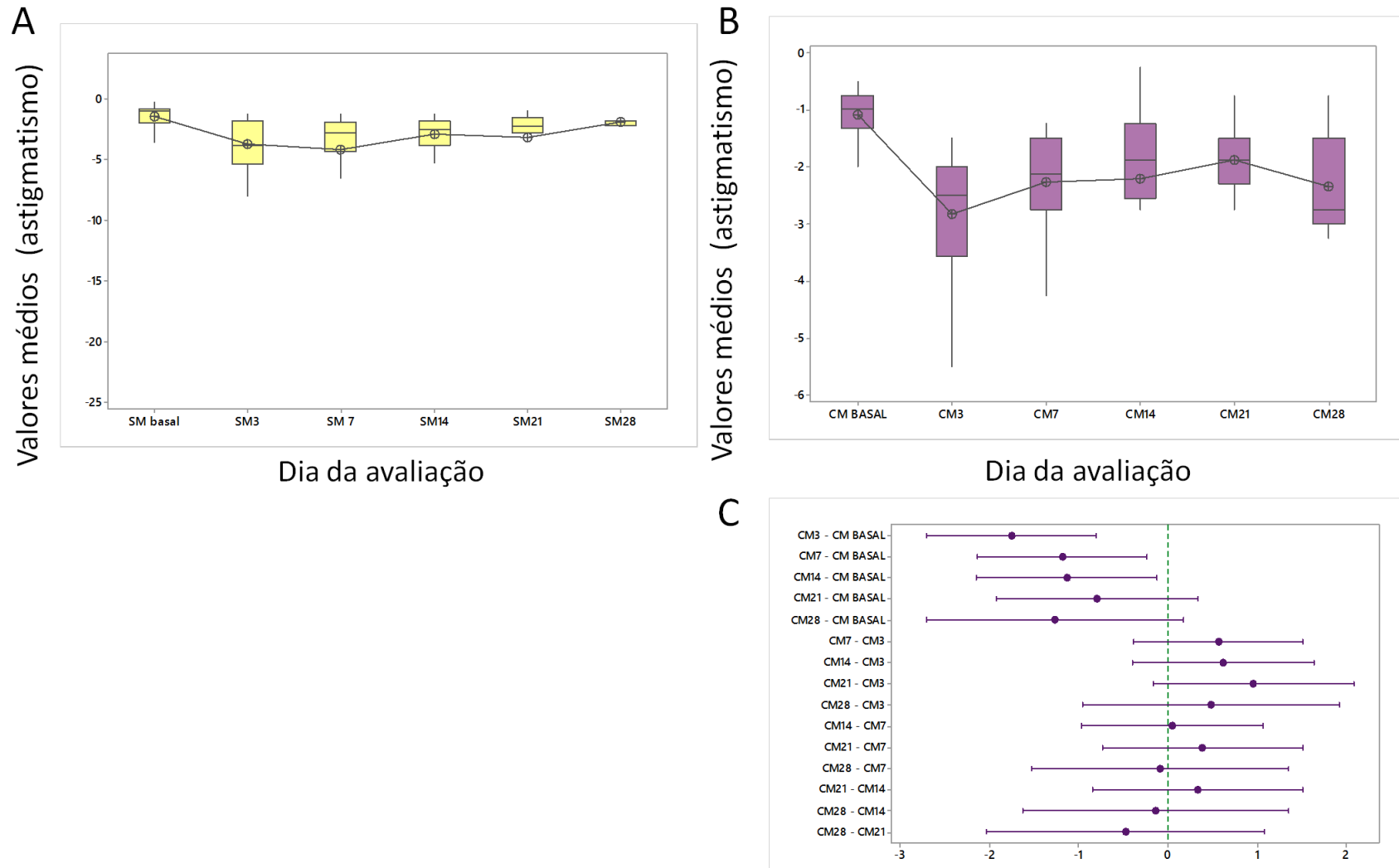


Figura 3 A e B. Gráficos *boxplots* representando mudanças temporais nos valores médios de astigmatismo, em dioptrias, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). C, Gráfico de intervalo de confiança de 95% de Tukey, mostrando as comparações estatísticas no grupo CM. Observe as linhas centrais em zero. Se um intervalo não tem um intervalo em zero, as médias das amostras comparadas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

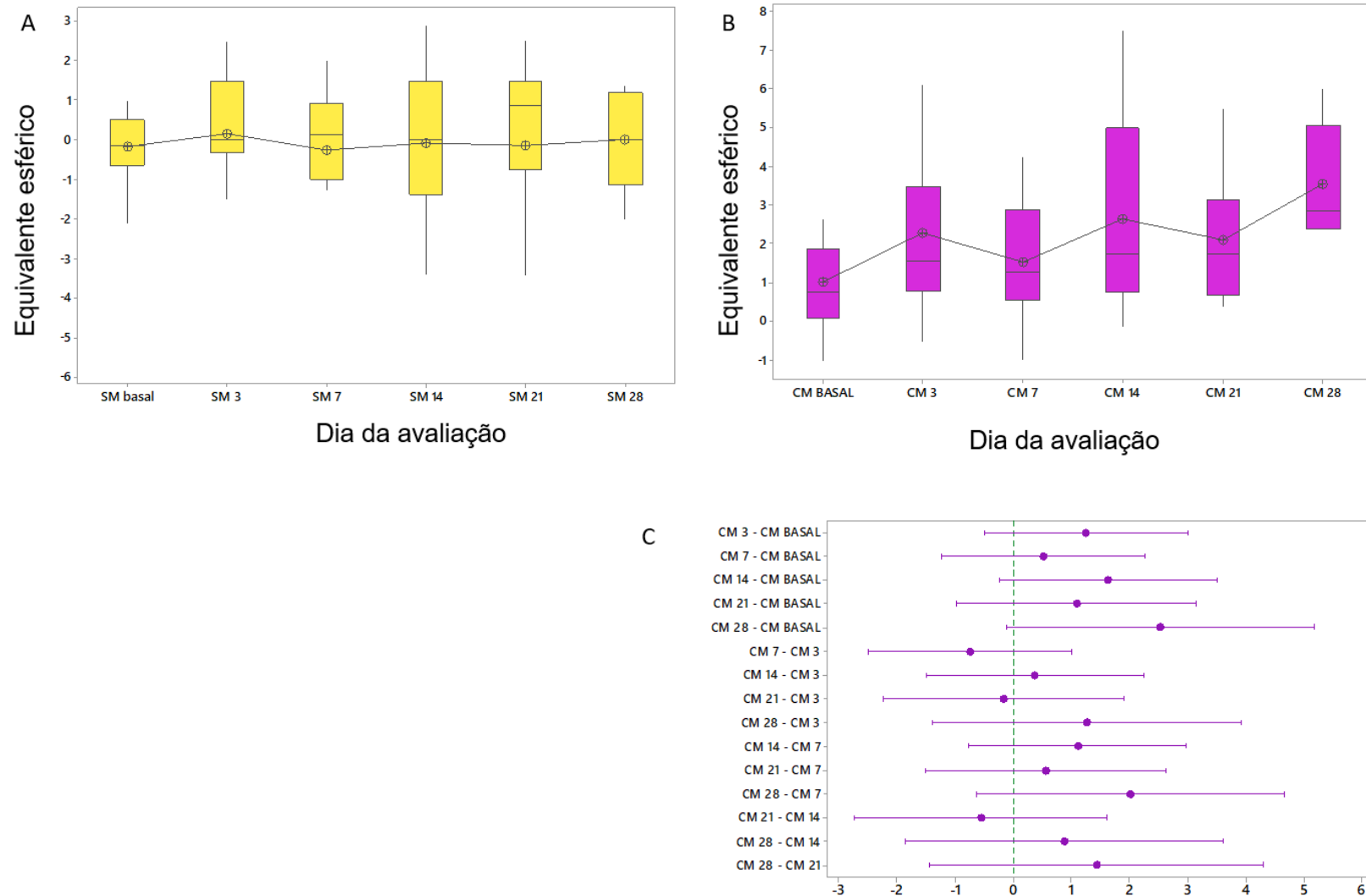


Figura 4 A e B. Gráficos *boxplots* representando mudanças temporais nos valores médios de equivalente esférico, em dioptrias, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). C, Gráfico de intervalo de confiança de 95% de Tukey, mostrando as comparações estatísticas no grupo CM. Observe as linhas centrais em zero. Se um intervalo não tem um intervalo em zero, as médias das amostras comparadas são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

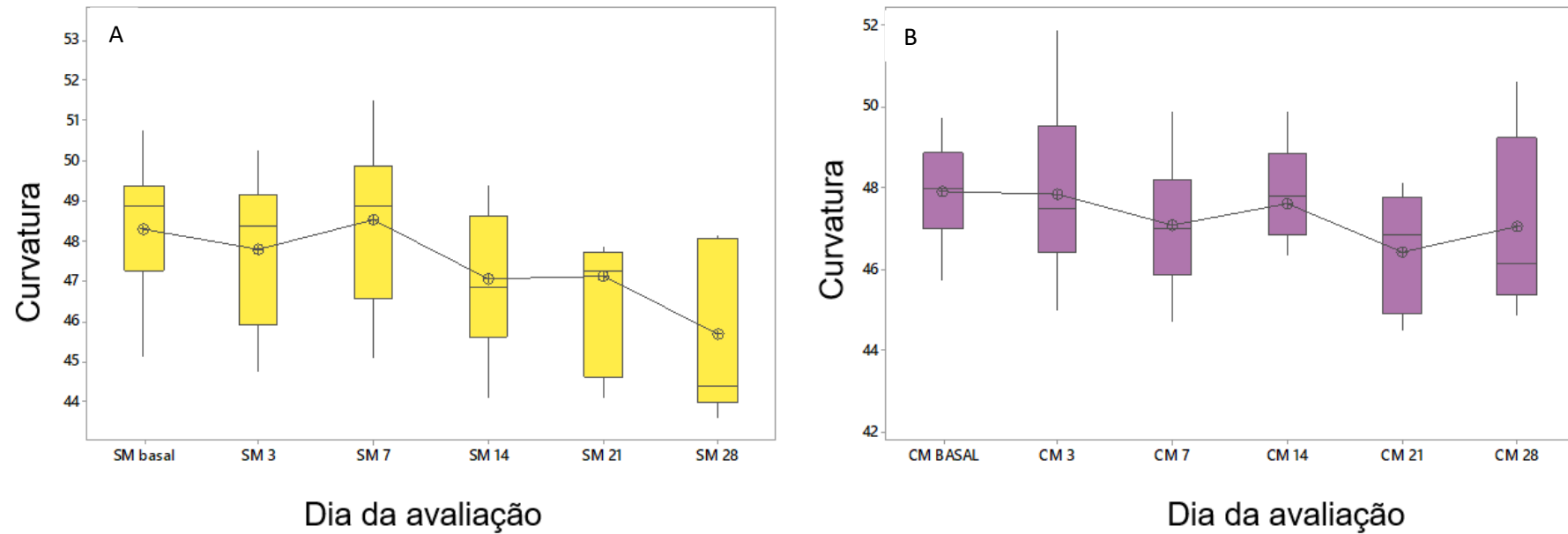
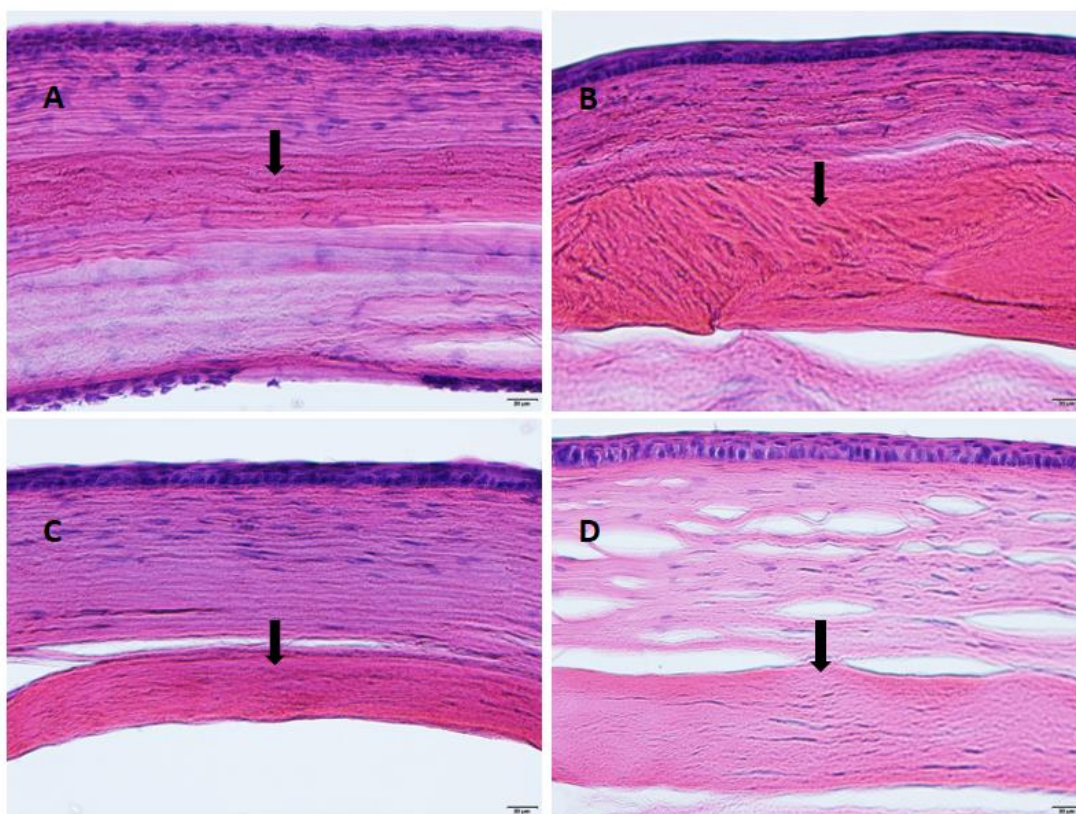


Figura 5 A e B. Gráficos *boxplots* representando mudanças temporais nos valores médios de curvatura, em milímetros, das córneas arroladas no estudo. Em A, córneas no grupo que não recebeu membrana (grupo SM). Em B, córneas no grupo que recebeu membrana (grupo CM). ($p < 0,05$).

5.3 Histopatologia

Não se encontraram alterações na celularidade estromal ou no espessamento da camada epitelial das córneas operadas (grupos CM e SM), além da ausência de células inflamatórias. No grupo CM, foi possível observar, desde a avaliação no 7º dia, que as membranas de colágeno estavam integradas ao estroma (Figura 6). No 28º dia das avaliações (Figura 6D), a membrana não havia



sido degradada.

Figura 6. Micrografias de córneas do grupo CM, no dia 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) de pós-operatório, mostrando a membrana de colágeno (seta) integrada ao estroma. Hematoxilina & Eosina.

5.4 Anisotropia óptica

5.4.1 Birrefringência

A Figura 7 corresponde à imagens representativas de cortes de córneas embebidas em água e visibilizadas em microscopia de luz polarizada com o longo eixo orientado a, aproximadamente, 45 graus do plano da luz polarizada. As córneas apresentaram brilho não homogêneo, indicando a presença de fibras colágenas dispostas em mais do que uma ou do que duas direções no plano espacial. As fibras mais brilhantes sempre foram aquelas cujo eixo longitudinal coincidia com o longo eixo da córnea. Um mesmo padrão morfológico de distribuição visual de brilho foi observado em todos os grupos, sendo que no CM e no SM, ele foi independente do tempo de avaliação no pós-operatório.

Quando posicionadas a, aproximadamente, 90 graus do plano da luz polarizada (Figura 8), as fibras colágenas apresentaram ondulações (alternância de bandas claras e escuras). Córneas do grupo SM apresentaram, visualmente, no 7º dia das avaliações, maior ondulação de fibras no estroma anterior, comparativamente às córneas controle. No 7º dia da avaliação, fibras colágenas nas córneas do grupo CM estavam mais onduladas do que as fibras das córneas controle. Nas avaliações posteriores, diferenças qualitativas não foram observadas entre os grupos CM e SM. Diferenças em estado ordenado de agregação foram reveladas pelas medidas de RO.

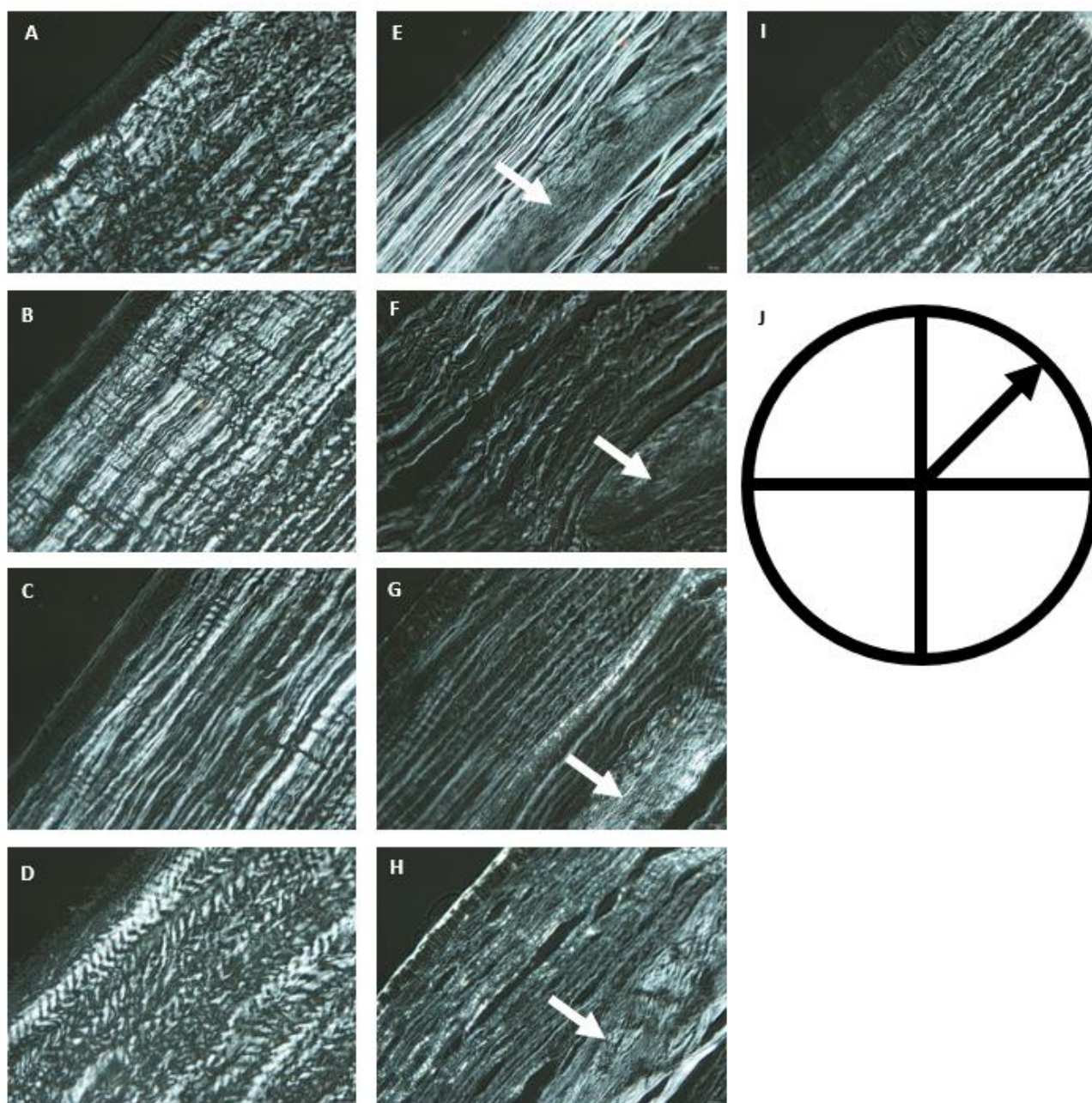


Figura 7. Imagens representativas dos brilhos de birrefringências observados nas córneas estudadas a 45 graus do plano da luz polarizada. As fibras apresentaram brilho não homogêneo. Em A, B, C e D, grupo operado que não recebeu membrana (SM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. Em E, F, G e H, grupo que recebeu membrana (CM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. As setas nas imagens E, F, G, e H correspondem ao local de implantação da membrana. Em I, grupo controle. Em J, esquema ilustrando o posicionamento dos cortes em relação ao PPL

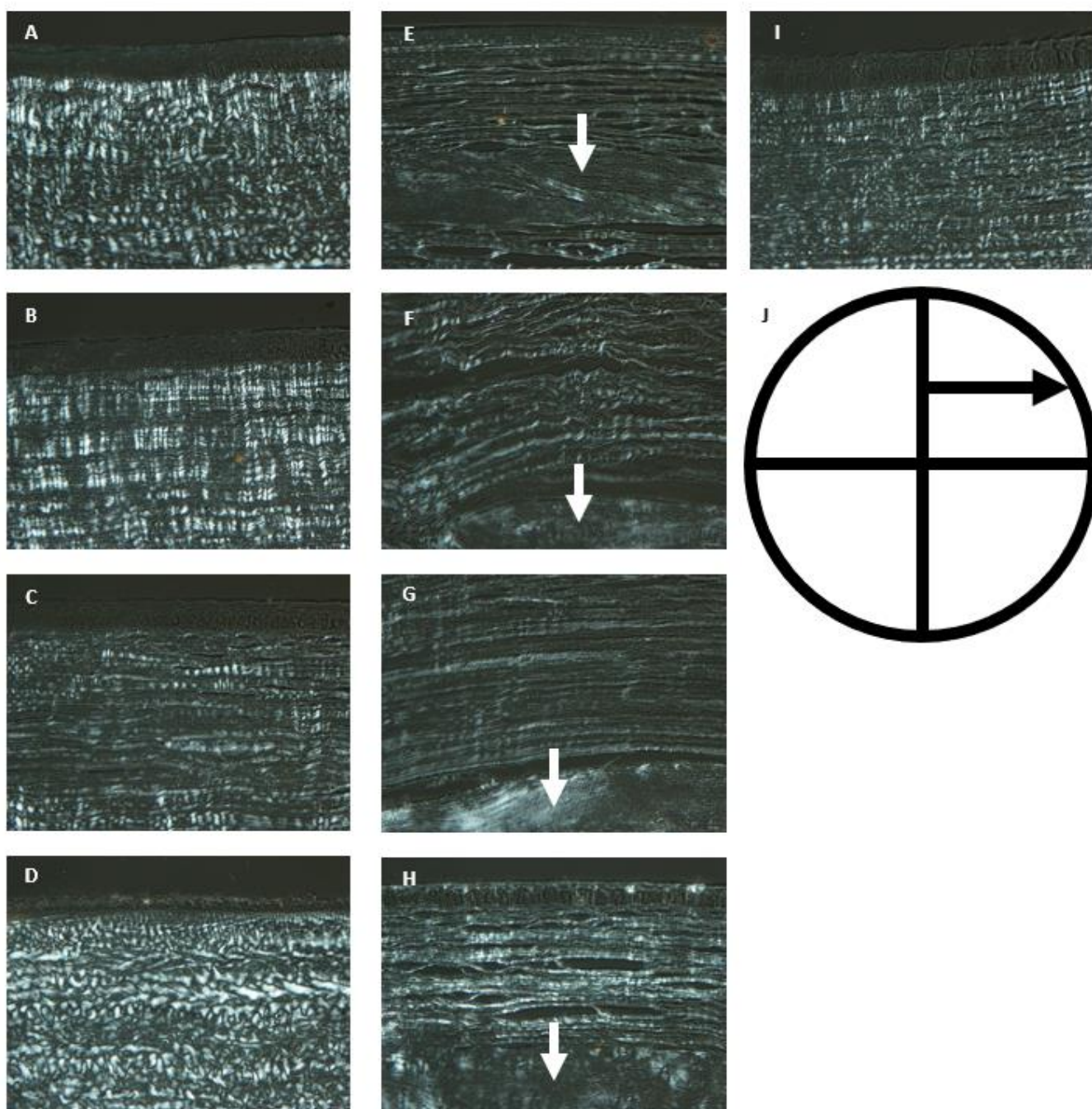


Figura 8. Imagens representativas dos brilhos de birrefringências observados nas córneas estudadas, a 90 graus do plano da luz polarizada. As fibras apresentaram brilho não homogêneo. Em A, B, C e D, grupo operado que não recebeu membrana (SM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. Em E, F, G e H, grupo que recebeu membrana (CM) nas avaliações dos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. As setas nas imagens E, F, G e H correspondem ao local de implantação da membrana. Em I, grupo controle. Em J, esquema ilustrando o posicionamento dos cortes em relação ao PPL

Os valores de RO, nos diferentes meios refrativos, estão apresentados na Tabela 1. Curvas de birrefringência de forma, construídas por plotando-se os valores médios de retardo óptico em função dos meios de embebição, estão apresentadas nas Figuras 9 A e B.

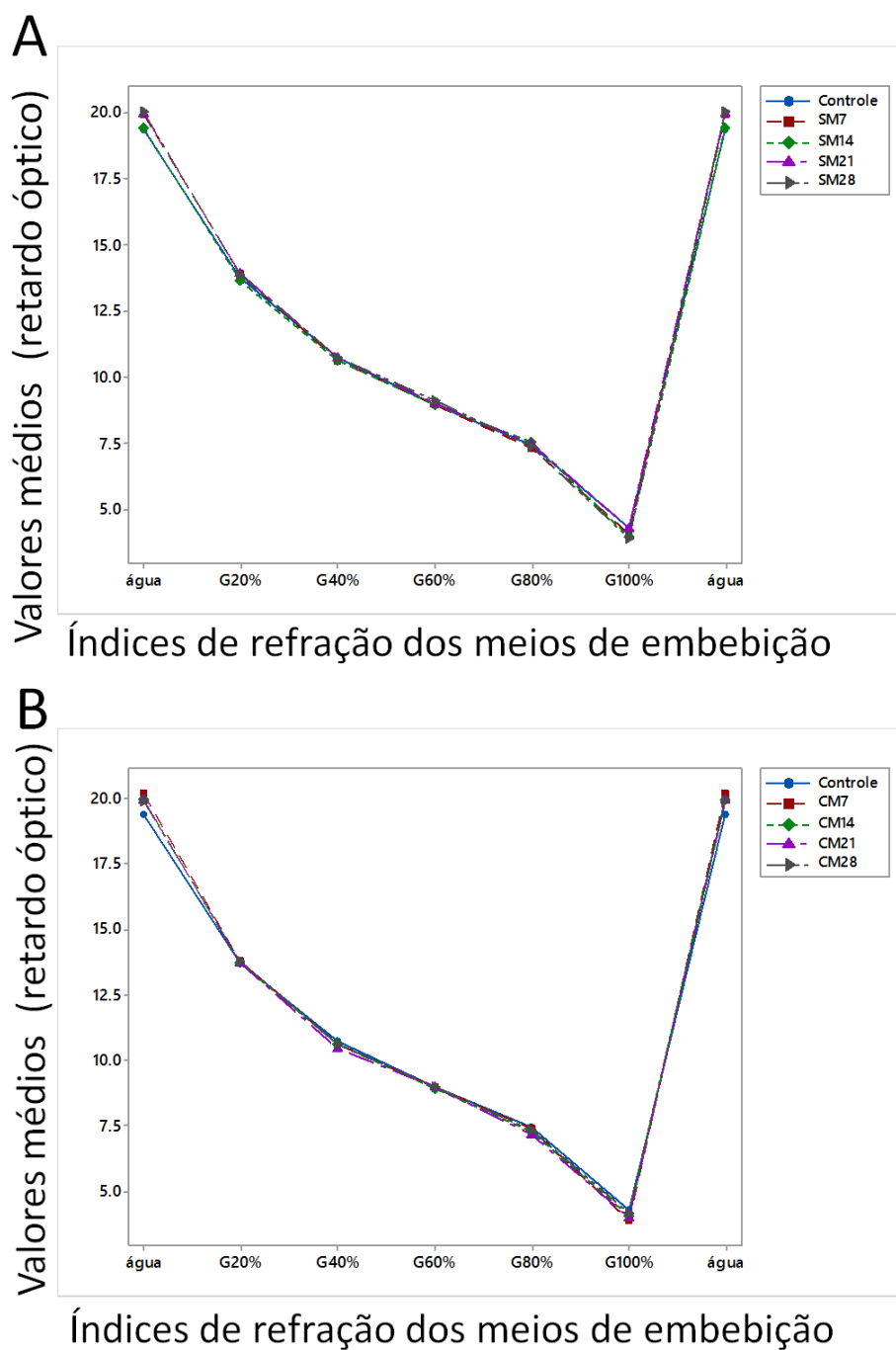


Figura 9 Curvas de birrefringência de forma comparando córneas nos grupos SM (A) e CM (B), em diferentes tempos de avaliação pós-operatória, com córneas controle.

Tabela 1. Valores de retardo óptico das córneas estudadas

Meios	Grupo SM								Grupo CM								Controle		ANOVA	
	7 dias		14 dias		21 dias		28 dias		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias		Média	DP	F	P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP				
água	19,91 ^b	0,81	19,41 ^c	0,41	19,98 ^{ab}	0,49	20,02 ^{ab}	0,46	20,18 ^a	0,42	19,95 ^b	0,44	19,95 ^b	0,45	19,95 ^b	0,41	19,37 ^c	0,81	39,51	0,00
glicerina 20%	13,91 ^{ab}	0,47	13,66 ^c	0,48	13,96 ^a	0,49	13,86 ^{ab}	0,53	13,81 ^{abc}	0,53	13,77 ^{abc}	0,47	13,73 ^{bc}	0,46	13,80 ^{abc}	0,50	13,77 ^{bc}	0,52	4,19	0,00
glicerina 40%	10,63 ^{ab}	0,50	10,65 ^{ab}	0,55	10,74 ^a	0,50	10,77 ^a	0,45	10,61 ^{ab}	0,45	10,63 ^{ab}	0,55	10,48 ^b	0,48	10,65 ^{ab}	0,44	10,74 ^a	0,59	4,27	0,00
glicerina 60%	8,96 ^{ab}	0,57	8,93 ^b	0,53	8,99 ^{ab}	0,54	9,14 ^a	0,48	9,01 ^{ab}	0,51	8,94 ^{ab}	0,53	9,00 ^{ab}	0,51	9,00 ^{ab}	0,49	8,98 ^{ab}	0,50	1,72	0,08
glicerina 80%	7,33 ^{abc}	0,47	7,53 ^a	0,49	7,48 ^{ab}	0,49	7,38 ^{ab}	0,55	7,40 ^{ab}	0,53	7,32 ^{bc}	0,41	7,19 ^c	0,55	7,33 ^{abc}	0,45	7,46 ^{ab}	0,48	5,81	0,00
glicerina 100%	4,08 ^{bc}	0,46	3,96 ^c	0,50	4,31 ^a	0,43	3,93 ^c	0,50	3,92 ^c	0,44	4,06 ^{bc}	0,53	4,04 ^{bc}	0,53	4,20 ^{ab}	0,45	4,29 ^a	0,49	12,45	0,00

DP, desvio padrão; F, grau de liberdade. Letras diferentes na mesma linha representam as diferenças estatísticas. Diferenças com $p < 0,05$ foram significativas.

Todas as córneas apresentaram os maiores valores de retardo óptico, correspondendo à birrefringência total, em água, e os menores valores, correspondendo à birrefringência intrínseca, em glicerina pura (Figura 9 A e B).

Comparadas com córneas no grupo controle, córneas nos grupos SM e CM apresentaram, em momentos da avaliação, valores elevados de retardo óptico associado à birrefringência total (Tabela 1, Figura 9). Transcorridos 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório, as elevações em birrefringência total foram de 4,15%, 2,98%, 2,99% e 2,79% no grupo CM e de 2,76%, 0,19%, 3,14% e 3,36% no grupo SM.

No grupo controle, a contribuição da birrefringência de forma, para a birrefringência corneal total, foi de 77,8%. No grupo CM, transcorridos 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório, as contribuições da birrefringência de forma, para a birrefringência total, foram de 80,55%, 79,63%, 79,73% e 78,86%, respectivamente. No grupo SM foram de 79,5%, 79,53%, 78,38% e 80,32%, respectivamente.

As birrefringências intrínsecas nas córneas dos grupos SM e CM apresentaram flutuações (aumento e decréscimo em valores, comparadas ao controle) durante os tempos da avaliação (Tabela 1).

6 DISCUSSÃO

A córnea é a camada mais externa do olho e sua principal função é fazer com que a luz chegue até a retina; a isso dá-se o nome de refração. Existem três tipos principais de erros refrativos: a hipermetropia, que é a dificuldade em focar objetos a curta distância; a miopia, que é a dificuldade em focar objetos a longa distância; e o astigmatismo, o qual produz distorção de imagens devido a irregularidades corneais (Alastrué *et al.*, 2005). Os procedimentos rotineiramente usados para corrigir erros refrativos são cirúrgicos, com destaque para a ceratectomia foto-refrativa (PRK) e o *laser assisted in situ keratomileusis* (LASIK) (Netto *et al.*, 2005; Netto *et al.*, 2013). Novas técnicas para modificar a refração corneal, objetivando-se a ampliação e o aprimoramento do arsenal terapêutico disponível para correção de erros refrativos, têm sido desenvolvidos e incluem a ceratoplastia condutiva, a

ablação multifocal da córnea e os *inlays* corneais (Whang *et al.*, 2017). As principais justificativas para o desenvolvimento de novas técnicas são a diminuição do desconforto e do tempo de recuperação pós-operatório, permitindo ao paciente retorno imediato às suas atividades laborais, e dos riscos cirúrgicos associados com procedimentos intraoculares.

Inlays são dispositivos ópticos inseridos no estroma corneal, cuja exploração clínico-cirúrgica é crescente por se tratar de método reversível, que não necessita de remoção de tecido corneal, minimizando o risco de ectasias, e que pode ser combinado com procedimentos tradicionais de fotoablação; além de estar indicado para pacientes que não são candidatos às cirurgias convencionais (Lindstrom *et al.*, 2013). Existem três categorias de *inlays* comercialmente disponíveis: o *Flexivue microlens*®, que altera o índice de refração com uma óptica bifocal; o *Kamra Inlay*®, que utiliza o princípio de óptica *pinhole* para aumentar a profundidade de foco; e o *Raindrop Nearvision Inlay*®, que altera a curvatura corneal (Lindstrom *et al.*, 2013). Todos eles são confeccionados com materiais sintéticos e não biodegradáveis, o que pode requerer procedimento cirúrgico para remoção, após ensejarem as alterações desejadas em refração ou quando falham em seus propósitos.

No presente estudo, em que uma membrana biodegradável de colágeno tipo I de tendão flexor digital superficial bovino foi implantada no estroma corneal anterior e avaliada como possível matéria prima para confecção de *inlays*, encontramos mudanças nos valores de refração corneal, de astigmatismo e de equivalente esférico de todos os coelhos. Além disso, nenhum sinal de rejeição ou complicação clínica foi observada, contrastando nossos resultados com aqueles descritos por outros autores que utilizaram *inlays* de materiais sintéticos. Por exemplo, Dexl *et al.*, (2011) reportaram aparecimento de depósitos corneais de ferro em 56% de pacientes tratados com *Kamra Inlay*®, após 18±9 meses da implantação do material. Duignam *et al.*, (2015) relataram 5 casos de ceratite infecciosa, sendo que 3 pacientes receberam *Kamra Inlay*® e 2 receberam *Flexivue microlens*®. Único problema associado à membrana é a coloração esbranquiçada; porém, tal inconveniência, considerando que o material aqui testado é um protótipo em fase inicial de avaliação, não é um fator limitante para validação dos resultados; além do que, pode ser corrigido em laboratório empregando-se métodos físicos para aumentar a transparência do biomaterial.

Relativamente a refração e ao astigmatismo, as mudanças encontradas após a implantação da membrana foram persistentes do terceiro até o vigésimo oitavo dia de pós-operatório e seguiram padrões descritos por outros autores em estudos experimentais com coelhos ou em estudos clínicos com seres humanos. Konstantopoulos *et al.*, (2017), após implantarem *Raindrop Nearvision Inlay*® em coelhos, relataram aumento significativo de astigmatismo no pós-operatório inicial, com posterior redução tempo-dependente. Whang *et al.*, (2017), também utilizando o *Raindrop Nearvision Inlay*®, reportaram que a refração média de +0,58 ($\pm 0,62$) D no pré-operatório mudou para +1,03 ($\pm 0,27$) D, após três meses de pós-operatório e para +0,99 ($\pm 0,26$) D após seis meses de pós-operatório. Verity *et al.*, (2009) encontraram mudanças na refração de quinze pacientes submetidos a implantação de lente intracorneal *PermaVision*; porém, não as consideraram clinicamente relevantes ou significativas, considerando-se o erro tipo alpha de 5%.

O equivalente esférico é um parâmetro que clinicamente informa sobre a refração e; portanto, é um dos sempre avaliados e reportados por autores que relatam experiências clínicas de longo prazo com o uso de *inlays*. Tomita *et al.*, (2012) realizaram cirurgia de LASIK, com concomitante implantação de *Kamra Inlay*® no olho não dominante, em 180 pacientes humanos, para o tratamento de presbiopia em míopes, hipermetropes e astigmáticos, relatando que a média de equivalente esférico foi de $-2,28 \pm 2,71$ D para $+1,48 \pm 0,46$ D nos hipermetropes, $+0,27 \pm 0,46$ D nos emetropes e $-3,97 \pm 1,68$ D nos míopes. Seyeddain *et al.*, (2012) observaram, três anos após a implantação do *Kamra Inlay*®, que o equivalente foi de $+0,19 \pm 0,22$ D para $+0,08 \pm 0,68$ D. Yilmaz *et al.*, (2008) reportaram que, em pacientes humanos submetidos à implantação do *Kamra Inlay*®, o equivalente foi de $+0,06 \pm 0,3$ no pré-operatório para $+0,12 \pm 0,9$ D após 12 meses de pós-operatório. Vilupuru *et al.*, (2015) reportaram, em 507 pacientes submetidos a implantação do *Kamra Inlay*®, com equivalente esférico entre -0,75D e +0,5D, que a visão de perto e intermediária melhorou, sem comprometimento da visão a distância, com média de equivalente esférico de $+0,48 \pm 0,75$ D, após 6 meses de pós-operatório. Whitman *et al.*, (2016), utilizando o *Raindrop Nearvision Inlay*®, em 373 olhos, encontraram que o equivalente esférico foi de +0,24D para $\pm 0,75$ D, no primeiro ano de pós-operatório. Verdoorn (2017), em estudo retrospectivo de pacientes submetidos ao LASIK com implantação concomitante de *Raindrop Nearvision Inlay*® para o olho

não dominante, relatou que o equivalente esférico médio foi de +0,33D, com intervalo de 0 a +0,5D, para -0,66±0,78D.

Uma diferença do material usado nesse estudo em relação aos descritos por outros autores foi que ele não modificou a curvatura da córnea, considerando-se um nível de significância de 5%. Todavia, como demonstrado graficamente, houve aumento da dispersão da variância de curvatura observada no pós-operatório dos coelhos nos grupos CM e SM. Os resultados aqui encontrados contrastam com os descritos por Konstantopoulos *et al.*, (2017). Os autores mencionados encontraram que a curvatura aumentou em 11,1±5,5D, 7,5±2,5D, 7,5±3,1D, 7,0±3,6 e 6,3±2,9D transcorridos 1 dia e 1, 2, 3 e 4 semanas de pós-operatório, respectivamente. Do mesmo modo, Moshirfar *et al.*, (2018), utilizando o *Kamra Inlay*®, reportaram aumento na curvatura corneal. Os achados do presente estudo, portanto, não suportam a hipótese inicial de que o colágeno tipo I, notadamente o extraído de tendão flexor digital superficial bovino, altera a refração suscitando mudanças em curvatura. Os resultados das análises em anisotropia óptica (birrefringência) sugerem que a refração foi alterada por mudanças no estado de polarização do estroma; achado este muito similar ao descrito para córneas tratadas com Lasik (Centofanti *et al.*, 2005).

A córnea ao ser iluminada com luz polarizada apresenta dois índices de refração, o ordinário e o extraordinário, o qual apresenta menor velocidade de propagação da onda eletromagnética (Vidal e Mello, 2010; Fesenko *et al.*, 2016). Os resultados no presente estudo, com mudanças concomitantes nas birrefringências total, de forma e intrínseca da córnea, mostraram alterações na propagação ao longo do raio extraordinário, que resultam de mudanças no empacotamento molecular, na distribuição e no número de transições eletrônicas de fibras colágenas. Com redução no número de transições eletrônicas, ocorre encurtamento do eixo de polarização da luz, o que contribuiu para mudanças na refração corneal (Centofanti *et al.*, 2005).

Relativamente as flutuações em birrefringência detectadas nas córneas dos grupos SM e CM (aumento e decréscimo em valores, comparadas ao controle), elas estão associadas com mudanças temporais em *turnover* (balanço entre a taxa de síntese e a de degradação) de colágeno e com a reparação corneal.

7 CONCLUSÕES

A membrana colagênica implantada no estroma corneal anterior de coelhos alterou a refração, o astigmatismo e o equivalente esférico das córneas. No entanto, não alterou valores médios de curvatura corneal. Mudanças em birrefringências foram observadas concomitantemente as alterações refrativas, demonstrando que a alteração no eixo de polarização corneal foi um fator associado com a alteração refrativa encontrada no presente estudo.

8 REFERÊNCIAS²⁷

Acton QA (2013) **Extracellular Matrix Proteins – Advances in research and application**, Atlanta: Scholarly Editions, p. 671.

Alastrué V, Calvo B, Peña E, Doblaré M (2005) Biomechanical Modeling of Refractive Corneal Surgery. **Journal of Biomechanical Engineering** 128: 150-160.

Aldrovani M (2004) **Anisotropias ópticas em feixes de colágeno e pesquisa de morte celular em fibroblastos de tendões durante o estabelecimento do diabetes espontâneo em camundongos não-obesos (NOD)**. 141 f. Dissertação (Mestrado em biologia celular e estrutural). UNICAMP.

Aldrovani M, Guaraldo AMA, Vidal BC (2007) Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. **Vision Research** 47: 3229–3237.

Aldrovani M, Vidal BC (2007) Application of principles of optical anisotropies and image analysis to the investigation of molecular packing, cristallinity, spatial organization and three-dimensional topography in collagen fibers from porcine cornea. In.:Sanchez PC (Eds) **Progress in Biopolymer Research** New York: Sci Publ Inc, p. 225-42.

Alió JL, Artola A, Ruiz-Moreno JM, Hassanein A, Galal A, Awadalla M (2004) Changes in Keratoconic Corneas after Intracorneal Ring Segment Explantation and Reimplantation. **Ophthalmology** 111: 747-751

An B, Lin YS, Brodsky B (2016) Collagen interactions: Drug design and delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 97: 69-84.

Andrade A, Laus JL, Figueiredo F, Batista CM (1999) The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology** 2: 79-82.

Arokiaraj MC, Palacios IF (2014) Finite Element Modeling of a Novel Self-Expanding Endovascular Stent Method in Treatment of Aortic Aneurysms. **Scientific Reports** 4: 1-11.

²⁷ Normas próprias do Programa de Cirurgia Veterinária – FCAV - UNESP

Barraquer JI (1949) Queratoplastia Refractiva. In.: Barraquer JI (ed) **Estudios e Informaciones Oftalmológicas**. Barcelona: INSTITUTO BARRAQUER, p. 1-21.

Barros Sobrinho AAF, Aldrovani M, Kobashigawa KK, Abreu TGM, Crivelaro RM, Silva PES, Laus JL (2018) What can Biophotonics tell us about the Structure and Physiology of the Cornea? **Archives of Ophthalmology and Optometry** 1: 28-30.

Bennett HS (1967) The microscopical investigation of biological materials with polarized light. In: Jones RM (ed.) **McClung's Handbook of Microscopical Technique**. New York: Hafner Publ. Co., p. 591–766.

Cassim JY, Tobias PS, Taylor EW (1968) Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. **Biochemical Biophysical Acta** 168: 463-471.

Centofanti M, Oddone F, Parravano M, Gualdi L, Bucci MG, Manni G (2005) Corneal birefringence changes after laser assisted in situ keratomileusis and their influence on retinal nerve fibre layer thickness measurement by means of scanning laser polarimetry. **British Journal of Ophthalmology** 89: 689-693.

Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, Lamantia C, Carroll H (1998) Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. **Journal Cell** :1277-1285.

Chen FA, Liu X (2016) Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science** 56: 86-168.

Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE (2015) Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. **Experimental Eye Research** 133:69-80.

Cooper LJ, Kinoshita S, German M, Koizumi N, Nakamura T, Fullwood NJ (2005) An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. **Cornea** 24: 722-9.

Dexl AK, Ruckhofer J, Riha W, Hohensinn M, Rueckl T, Messmer EM, Grabner G, Seyeddain O (2011) Central and Peripheral Corneal Iron Deposits After Implantation of a Small-aperture Corneal Inlay for Correction of Presbyopia. **Journal of Refractive Surgery** 27: 876-880.

Duignan ES, Farrell S, Treacy MP, Fulcher T, O'Brien P, Power W, Murphy CC (2015) Corneal inlay implantation complicated by infectious keratitis. **British Journal of Ophthalmology** 0: 1-5.

Fagerholm P, Lagali NS, Merret K, Bruce Jackson W, Munger R, Liu Y, Polarek JW, Söderqvist M, Griffith M (2010) A Biosynthetic Alternative to Human Donor Tissue for Inducing Corneal Regeneration: 24-Month Follow-Up of a Phase 1 Clinical Study. **Science Translational Medicine** 2: 1-8.

Fesenko P, Rolin C, Janneck R, Bommanaboyena SP, Gaethje H, Heremans P, Genoe J (2016) Determination of crystal orientation in organic thin films using optical microscopy. **Organic Electronics** 37: 100-107.

Freedman BR, Sarver JJ, Buckley MR, Voleti PB, Soslowsky LJ (2014). Biomechanical and structural response of healing achilles tendon to fatigue loading following acute injury. **Journal of Biomechanics** 47: 2028-34.

Gilger BC (2007) Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: Gelatt KN. (Ed.) **Veterinary ophthalmology**. Ames: Blackwell Publishing, p.690-753.

Giraud Guille MM, Besseau L, Martin R (2003) Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems. **Journal of Biomechanics** 36: 1571-79.

Giraud Guile MM, Mosser G, Helary C, Eglin D (2005) Bone matrix like assemblies of collagen: from liquid crystals to gels and biomimetic materials. **Micron** 36: 602-608.

Gomma A, Comyn O, Liu C (2010) Keratoprotheses in clinical practice – a review. **Clinical & Experimental Ophthalmology** 38: 211-224.

Götzinger E, Pircher M, Dejaco-Ruhswurm I, Kaminski S, Skorpik C, Hitzenberger CK (2007). Imaging of birefringent properties of keratoconus corneas by polarization-sensitive optical coherence tomography. **Investigative Ophthalmology Visual Sciences** 48: 3551-8.

Hacket JM, Sethi B, Cao X, Rafat MA, Griffith M (2009) Biomaterials for enhancing corneas and spinal cord regeneration. In: **Stem cell: Basic and applications**. New Delhi: McGraw Hill, 687p.

Hay ED (1991) **Cell biology of the extracellular matrix**. New York: Springer, 468p.

Holzer MP, Rabsilber TM, Auffarth GU (2006) Femtosecond Laser-Assisted Corneal Flap Cuts: Morphology, Accuracy, and Histopathology. **Investigative Ophthalmology and Visual Sciences** 47: 2828-2831.

Iozzo RV, Schaefer L (2015) Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology** 42:11-55.

Jacques SL (2013) Optical properties of biological tissues: a review. **Physics in Medicine and Biology** 58: 37-61.

Kiernan JA (1990) **Histological and histochemical methods: theory and practice**. Oxford: Pergamon Press, p 150.

Kim BM, Eichler J, Reiser KM, Rubenchik AM, Silva LB (2000). Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. **Lasers in Surgery and Medicine** 27: 329-35.

Konstantopoulos A, Liu YC, Teo EPW, Lwin NC, Yam GHF, Mehta JS (2017) Early wound healing and refractive response of different pocket configurations following presbyopic inlay implantation. **PLoS ONE** 12: 1-15.

Kubai MA, Bentley E, Miller PE, Mutti DO, Murphy CJ (2008) Refractive states of eyes and association between ametropia and breed in dogs. **American Journal of Veterinary Research** 69: 946-51.

Kuch IM, Scott PG (1997) Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. **Connective Tissue Research** 36: 287-296.

Lehn JM (2002) Toward self-organization and complex matter. **Science** 295: 2400-2403.

Lewis PN, Pinali C, Young RD, Meek KM, Quantock AJ, Knupp C (2010) Structural Interactions between Collagen and Proteoglycans Are Elucidated by Three-Dimensional Electron Tomography of Bovine Cornea. **Structure** 18: 239-245.

Li ST (2002) Biologic Biomaterials: tissue-derived biomaterials (collagen). In: **Biomaterials: Principles and Applications**. Florida: CRC Press, 250p.

Lindstrom RL, MacRae SM, Pepose JS, Hoopes Sr PC (2013) Corneal inlays for presbyopia correction. **Current Opinion in Ophthalmology** 24: 281-287.

Lohmander LS, De Luca S, Nilsson B, Hascall VC, Caputo CB, Kimura JH (1980) Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. **Journal of Biology Chemistry** 255: 6084-6091.

Louis-Dorr V, Naoun K, Alle P, Raspiller A (2004) Linear dichroism of the cornea. **Applied Optics** 3: 1515-21.

Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C (2003) Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials** 24: 4833-4841.

Mattia E, Otto S (2015). Supramolecular systems chemistry. **Nature Nanotechnology** 10: 111-9.

Meek KM, Knupp C (2015) Corneal structure and transparency. **Progress in Retinal and Eye Research** 49: 1-16.

Mei H, Gonzales S, Deng SX (2012) Extracellular Matrix is an Important Component of Limbal Stem Cell Niche. **FASEB Journal** 3: 879-894.

Michelacci YM (2003) Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Braz. Journal of Medical and Biological Research** 36:1037-1046.

Moshirfar M, Desautels JD, Walker BD, Birdsong OC, Skanchy DF, Quist TS, Murri MS, Linn SH, Hoopes Jr PC, Hoopes PC (2018) Long-term changes in keratometry and refraction after small aperture corneal inlay implantation. **Clinical Ophthalmology** 12: 1931-1938.

Netto MV, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE (2005) Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. **Cornea** 24: 509-522

Netto MV, Espíndola RF, Nogueira RCF, Campos M, Ambrósio R Jr, Andrade NL (2013) Censo Brasileiro de Cirurgia Refrativa. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** 76: 29-32.

Palmer LC, Velichko YS, Cruz MO, Stupp SI (2007) Supramolecular selfassembly codes for functional structures. **Philosophical Transactions A Mathematical, Physical and Engineering Sciences** 365: 1417- 33.

Quantock AJ, Young RD (2008) Development of the corneal stroma, and the collagen–proteoglycan associations that help define its structure and function. **Developmental Dynamics** 237: 2607-2621.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka S (2002) Glycation-induced matrix stability in the rabbit Achilles tendon. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 399: 174-180.

Retamoso LB, Montagner F, Camargo ES, Vitral RW, Tanaka OM (2010) Polarized light microscopic analysis of bone formation after inhibition of cyclooxygenase 1 and 2. **The Anatomical Record** 293: 195-199.

Ricard-Blum S (2011) The collagen family. **Cold Spring Harbor Perspective Biology** 3: 1-19.

Ribeiro JF, Anjos EHM, Mello MLS, Vidal BC (2013) Skin collagen fiber molecular order: a pattern of distributional fiber orientation as assessed by optical anisotropy and image analysis. **PLoS ONE** 8: e54724.

Rifes P, Thorsteinsdóttir S (2012) Extracellular matrix assembly and 3D organization during paraxial mesoderm development in the chick embryo. **Developmental Biology** 368: 370-81.

Sahu K, Verma Y, Sharma M, Rao KD, Gupta PK (2010) Non-invasive assessment of healing of bacteria infected and uninfected wounds using optical coherence tomography. **Skin Research and Technology** 16: 428-437.

Savenkov SM, Sydurov OL (2005) Conditions for polarization elements to be dichroic and birefringent. **Journal of the Optical Society of America** 7: 1447-52.

Scoot JE (1995) Extracellular matrix, supramolecular organization and shape. **Journal of Anatomy** 187: 259–269.

Sellaro LT (1999) **Effects of collagen orientation on the medium-term fatigue response of heart valve biomaterials**. 93f. Dissertação (Mestrado). University of Pittsburgh.

Seyeddain O, Hohensinn M, Riha W, Nix G, Rückl T, Grabner G, Dexl AK (2012) Small-aperture corneal inlay for the correction of presbyopia: 3-year follow-up. **Journal of Cataract and Refractive Surgery** 38: 35-45.

Silva DF, Gomes AS, Vidal CB, Ribeiro MS (2013) Birefringence and second harmonic generation on tendon collagen following red linearly polarized laser irradiation. **Annals of Biomedical Engineering** 41:752-62.

Silva DF, Vidal BC, Zezel DM, Zorn TM, Nunez SC, Ribeiro MS (2006) Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. **Journal of Biomedical Optics** 11: 024002.

Slatter D (2005) **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 686p.

Sweet MB, Thonar EJ, Immelman AR (1977) Regional distribution of water anglycosaminoglycan in immature articular cartilage. **Biochimica et Biophysica Acta** 500: 173-186.

Tomita M, Kanamori T, Waring GO, Yukawa S, Yamamoto T, Sekiya K, Tsuru T (2012) Simultaneous corneal inlay implantation and laser in situ keratomileusis for presbyopia in patients with hyperopia, myopia, or emmetropia: Six-month results. **Journal of Cataract and Refractive Surgery** 28:495-506.

Van Der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. **FASEB Journal** 5: 2814-2823.

Valdetaro GP, Aldrovani M, Padua IRM, Cristovam PC, Gomes JAP, Laus JL (2016) Supra-organization and optical anisotropies of the extracellular matrix in the amniotic membrane and limbal stroma before and after explant culture. **Biomedical Optics Express** 7: 4982-4994.

Verdoorn C (2017). Comparison of a hydrogel corneal inlay and monovision laser in situ keratomileusis in presbyopic patients: focus on visual performance and optical quality. **Clinical Ophthalmology** 11: 1727-1734.

Verity SM, McCulley JP, Wayne Bowman R, Dwight Cavanagh H, Matthew Petroll W (2009) Outcomes of PermaVision Intracorneal Implants for the Correction of Hyperopia. **American Journal of Ophthalmology** 147: 973-977.

Vidal BC (2003) Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron** 8: 423-434.

Vidal BC, Mello MLS (2006) Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye Ponceau SS to collagen fibers. **Biopolymers** 78: 121-128.

Vidal BC, Mello MLS (2010) Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochemica** 112: 5361.

Vilupuru S, Lin L, Pepose JS (2015) Comparison of Contrast Sensitivity and Through Focus in Small-Aperture Inlay, Accommodating Intraocular Lens, or Multifocal Intraocular Lens Subjects. **American Journal of Ophthalmology** 160: 150-162.

Warnke PH, Alamein M, Skabo S, Stephens S, Bourke R, Heiner P, Liu Q (2013) Primordium of an artificial Bruch's membrane made of nanofibers for engineering of retinal pigment epithelium cell monolayers. **Acta Biomaterialia** 9: 9414-9422.

Webber MJ, Kessler JA, Stupp SI (2010) Emerging peptide nanomedicine to regenerate tissues and organs. **Journal of Internal Medicine** 267: 71-88.

Wied GL (1966) In: Introduction to quantitative cytochemistry. New York: Academic Press, p.623.

Whang WJ, Yoo YS, Joo CK, Yoon G (2017) Changes in Keratometric Values and Corneal High Order Aberrations After Hydrogel Inlay Implantation. **American Journal of Ophthalmology** 173: 98-105.

Whitman J, Dougherty PJ, *et al.* (2016) Treatment of Presbyopia in Emmetropes Using a Shape-Changing Corneal Inlay. **Ophthalmology** 123: 466-475.

Wu J, Funderburgh JL, Wagner WR (2014). Biomaterials for refractive correction: corneal onlays and inlays. **Science China Chemistry** 57: 501-509.

Yilmaz OF, Bayraktar S, Agca A, Yilmaz B, Mc Donald MB, Van de Pol C (2008) Intracorneal inlay for the surgical correction of presbyopia. **Journal of Cataract and Refractive Surgery** 34: 1921-1927.

APÊNDICE A

Artigo

**Archives of Ophthalmology and Optometry
2018; 1(1):28-30**

**What can biophotonics tell us about the
structure and physiology of the cornea?**

What can Biophotonics tell us about the Structure and Physiology of the Cornea?

Alexandre Augusto Franchi de Barros Sobrinho, Marcela Aldrovani*, Karina Kamachi Kobashigawa, Thais Guimarães Morato Abreu, Roberta Martins Crivelaro, Paloma Espírito Santo da Silva, José Luiz Laus

Ophthalmology Unit, Department of Animal Medicine and Surgery, São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinary Sciences (FCAV), Jaboticabal, São Paulo, Brazil

*alexandre_sobrinho@hotmail.com; marcela.aldrovani@gmail.com; karinakamachi@gmail.com
thaismorato@yahoo.com.br; roberta.crivelaro@gmail.com; paloma_ess@yahoo.com.br; jllaus@fcav.unesp.br*

*Corresponding Author: Prof. Dr. Marcela Aldrovani. Ophthalmology Unit, Department of Animal Medicine and Surgery, São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinary Sciences (FCAV), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

KEYWORDS: collagen; corneal stroma; optical anisotropy; polarized light.

Biophotonics refers to the interplay of light with biological tissues [1]. Optical and infrared technologies based on the interaction of photons with tissues have been widely used to diagnostic and/or treat a variety of conditions in different ocular structures, including the cornea which is the major optical medium of the eye. Light interacts with ocular tissues in many diverse ways, depending on the energy or wavelength of the photon. In the cornea, light-tissue interactions have been routinely described using models proposed for crystal structures [2-7].

The cornea, like the crystals, is optically anisotropic, that is when interacting with polarized light it causes changes in the polarization state of the light [6, 8-10]. Interesting, there is no consensus over the form of anisotropy that cornea takes, probably because many authors had examined only the central area of the cornea [2-4]. For example, Stanworth and Naylor [5], based on interference figures called "isogyres" observed when excised corneal specimens were examined with a crossed polarizer-analyzer system, proposed that the human cornea behaves as an optically uniaxial crystal. In contrast, Van Blokland and Verheest [7] proposed that the human cornea behaves like an optically biaxial crystal, showing the fastest axis being normal to its surface, and the slowest axis lying in the surface being generally nasally downward. Corneal anisotropy represents a hot topic among ophthalmologists and researchers in vision sciences because it stem from the same molecular lattice

that determines transparency, refractive function or transmittance, and biomechanics of the cornea.

The source of optical anisotropy for the cornea is the supramolecular organization resulting from the highly ordered periodic arrangement of collagens fibrils/fibers into the stroma [8-10]. Compared with collagen fibrils in other structures of the body, those of the cornea are more hydrated and narrow, in addition to having a uniform diameter and being brought together to a high degree of lateral order [11, 12]. The crucial role of the stromal collagen features in controlling the corneal structure and physiology has long been known, since Maurice [13]. However, biophotonics/anisotropy has revealed new details of these features; consequently, new theories on the physical basis of the corneal transparency are also emerging, requiring that ophthalmologists and researchers keep an eye out for updates in the literature. An important finding revealed by the biophotonics is that the collagen dynamicity is governed by biocybernetic feedback mechanisms which generate spatiotemporal cellular signaling by intra- and intermolecular displacements and by piezoelectricity [14, 15]. In practical terms, the understanding that the corneal collagen can act as an "electric transducer" could be useful to develop strategies to improve corneal healing. Lasers or drugs that modulate collagen piezoelectricity, as well as wound-induced electric currents [16], can accelerate or reduce the rate of healing. Also, strategies that modulate collagen displacements and piezoelectricity can control the biosynthesis and extracellular mechanisms of self-assembly of this

What can Biophotonics tell us about the Structure and Physiology of the Cornea?

molecule, inhibiting the progression of diseases that compromise corneal stability.

At present, the most accessible biophotonic tools for in vivo or ex vivo resolution of corneal structure and physiology are polarization-resolved second harmonic microscopy, polarization-sensitive spectral domain optical coherence tomography, polarized biomicroscopy, polarimetric interferometry, and polarized light microscopy. All of these devices explore the fact that when polarized light passes through the anisotropic sample, occurs changes in the amplitude and phase of the electric vector; generating optical effects known as dichroism and birefringence [6, 8–10]. Dichroism is still little explored in the ophthalmic practice. On the other hand, birefringence is part of the daily routine of ophthalmologists, reason by which to know details on the theoretical base of this phenomenon is fundamental to improve its clinical application.

Birefringence can be defined as the ability of the cornea to decompose the light into two orthogonally polarized rays with different velocities [8, 10]. The vectors experience a phase shift relative to each other, which is expressed by the equation: $\delta = (2\pi/\lambda) \times L\Delta_n$, where δ is the phase difference between propagating orthogonal polarizations, λ is the photon wavelength, L is the thickness of the sample, and Δ_n is the difference in the refractive indices between the two optical axes of the sample. $L\Delta_n$ is known as the optical path difference or retardation [8, 10].

Corneal total retardation is composed of two fractions, the intrinsic and the form birefringence [8]. The intrinsic birefringence has its origin in each collagen fibril and results from the asymmetrical alignment of chemical bonds or ions within the collagen particles [8, 17]. Unlike, the form birefringence is an anisotropy displayed by mixed asymmetric structures wherein rod-shaped molecules of a given refractive index are dispersed into preferential orientations, depending on the refractive index of the medium [17]. Collagen fibers are considered mixed structures because they result from a close association of collagen fibrils with non-collagenic molecules, especially proteoglycans, which regulate their diameter and degree of packaging [12, 18, 19]. In the case of the cornea, the form birefringence is a non-linear optical effect that results from the stack formed by the layers of stromal collagen fibers. Corneal form birefringence depends on the sub-wave dimension, geometry, and orientation of the rod-shaped triple chain collagen

molecule, compatibility of the photon wavelength with the collagen molecule, and packaging and spatial organization of collagen fibrils/fibers [17].

Knowledge of the nature of intrinsic and form birefringence has many applications in the evaluation of corneal structure and physiology. Inevitably, changes in the supramolecular organization of the stromal fibers compromise the anisotropy of the cornea. Therefore, biophotonic monitoring of corneal birefringence is an effective strategy to establish how the cornea responds with physiological adaptation or remodeling to surgical interventions, chemical treatments, photoablation, mechanical stimuli, among others. Besides, knowledge of corneal anisotropy/birefringence is a need for the correct diagnosis of pathological conditions affecting other ocular structures. Failure to take corneal anisotropy into account may lead to erroneous results in procedures that employ polarized light as a diagnostic probe [2], including evaluation of the retinal nerve fiber layer by scanning laser polarimetry in glaucoma patients [20, 21] and polarimetric glucose monitoring in the aqueous humor of diabetic patients [22]. Assessment of birefringence through biophotonic tools has also helped in understanding the mechanisms by which the mammalian cornea, including humans, controls and maintains its curvature [23]. Under another perspective, anisotropy is also relevant for corneal bioengineering since it reports, at the nanoscale level, on the structural and molecular requirements needed to create an artificial functional stroma. Nowadays, 3D printing technology allows that an anisotropic supraorganization, such the cornea, to be reproduced in a laboratory.

REFERENCES

- [1] J€ M, Mayerh€ T, Urgan Popp J, et al. Introduction to Biophotonics. *Handb Biophotonics Basics Tech.* 1. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527643981.bphot001>.
- [2] Bone RA, Draper G. Optical anisotropy of the human cornea determined with a polarizing microscope. *Appl Opt.* 2007;46(34):8351-8357.
- [3] Bueno JM, Vargas-Martín F. Measurements of the corneal birefringence with a liquid-crystal imaging polariscope. *Appl Opt.* 2002;41(1):116-124.
- [4] Donohue DJ, Stoyanov BJ, McCally RL, Farrell RA. Numerical modeling of the cornea's lamellar structure and birefringence properties. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis.* 1995;12(7):1425-1438.

What can Biophotonics tell us about the Structure and Physiology of the Cornea?

- [5] Stanworth A, Naylor EJ. The polarization optics of the isolated cornea. *Br J Ophthalmol*. 1950;34(4):201-211.
- [6] Naylor EJ. Polarized light studies of corneal structure. *Br J Ophthalmol*. 1953;37(2):77-84.
- [7] Van Blokland GJ, Verhelst SC. Corneal polarization in the living human eye explained with a biaxial model. *J Opt Soc Am A*. 1987;4(1):82-90.
- [8] Aldrovani M, Guaraldo AMA, Vidal BC. Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. *Vision Res*. 2007;47(26):3229-3237. doi:10.1016/j.visres.2007.02.011.
- [9] Valdetaro GP, Aldrovani M, Padua IRM, Cristovam PC, Gomes JAP, Laus JL. Supra-organization and optical anisotropies of the extracellular matrix in the amniotic membrane and limbal stroma before and after explant culture. *Biomed Opt Express*. 2016;7(12):4982. doi:10.1364/BOE.7.004982.
- [10] Kobashigawa KK, Aldrovani M, Barros Sobrinho AAF, et al. Clinical features and corneal optical anisotropies in a rabbit model of limbal stem cell deficiency. *Arq Bras Oftalmol*. 2018;81(4). <http://dx.doi.org/10.5935/0004-2749.201800XX>.
- [11] Meek KM. Corneal collagen-its role in maintaining corneal shape and transparency. *Biophys Rev*. 2009;1(2):83-93. doi:10.1007/s12551-009-0011-x.
- [12] Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):503-512.
- [13] Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*. 1957;136(2):263-286.
- [14] Vidal, B., 1994. Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Rev Med Unicamp* 4,1-11.
- [15] Aldrovani M, Filezio MR, Laus JL. A supramolecular look at microenvironmental regulation of limbal epithelial stem cells and the differentiation of their progeny. *Arq Bras Oftalmol*. 2017;80(4):268-272. doi:10.5935/0004-2749.20170066.
- [16] Reid B, Song B, Mccaig CD, Zhao M. Wound healing in rat cornea: the role of electric currents. doi:10.1096/fj.04-2325com.
- [17] Vidal B. Form birefringence as applied to biopolymer and inorganic material supraorganization. *Biotech Histochem*. 2010; 85(6): 365-378. doi:10.3109/10520290903430496.
- [18] Müller LJ, Pels E, Schurmans LRHM, Vrensen GFJM. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):493-501.
- [19] Miyagawa A, Kobayashi M, Fujita Y, et al. Surface ultrastructure of collagen fibrils and their association with proteoglycans in human cornea and sclera by atomic force microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. *Cornea*. 2001;20(6):651-656.
- [20] Greenfield DS, Knighton RW, Huang XR. Effect of corneal polarization axis on assessment of retinal nerve fiber layer thickness by scanning laser polarimetry. *Am J Ophthalmol*. 2000;129(6):715-722.
- [21] Weinreb RN, Shakiba S, Zangwill L. Scanning Laser Polarimetry to Measure the Nerve Fiber Layer of Normal and Glaucomatous Eyes. *Am J Ophthalmol*. 1995;119(5):627-636. doi:10.1016/S0002-9394(14)70221-1.
- [22] Wan Q, Coté GL, Dixon JB. Dual-wavelength polarimetry for monitoring glucose in the presence of varying birefringence. *J Biomed Opt*. 2005;10(2):024029. doi:10.1117/1.1891175.
- [23] Winkler M, Shoa G, Tran ST, et al. A Comparative Study of Vertebrate Corneal Structure: The Evolution of a Refractive Lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(4):2764-2772. doi:10.1167/iov.15-16584.

Citation: Marcela Aldrovani, et al. What can Biophotonics tell us about the Structure and Physiology of the Cornea?. *Archives of Ophthalmology and Optometry*. 2018; 1(1): 28-30.

Copyright: © 2018 Marcela Aldrovani, et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

APÊNDICE B

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 010323 (25/05/2018)

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS ESTÁVEIS A PARTIR DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DE FRAGMENTOS DE TENDÃO FLEXOR DIGITAL BOVINO

Resumo: É descrito um processo de obtenção de membranas estáveis a partir da fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino tratados em soluções acídicas e com pepsina, incluindo uma sequência de etapas e tempos de tratamento que se diferem daqueles do estado da técnica por não envolver reconstituição de fibras colágenas isoladas, diálise, reticulação ou liofilização das mesmas.

INVENTORES: Marcela Aldrovani, Alexandre Augusto Franchi de Barros Sobrinho, José Luis Laus.

DEPOSITANTE: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS ESTÁVEIS A PARTIR DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DE FRAGMENTOS DE TENDÃO FLEXOR DIGITAL BOVINO

CAMPO DA INVENÇÃO

[01] A presente patente de invenção descreve um processo de obtenção de membranas estáveis a partir da fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino tratados em soluções acídicas e com pepsina, por meio de um protocolo que não envolve reconstituição de fibras colágenas isoladas, diálise, reticulação ou liofilização das mesmas, apresentando uma sequência de etapas e tempos de tratamento que se diferem daqueles do estado da técnica.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[02] Colágenos são as proteínas mais abundantes do Reino Animal. Eles estão presentes em todos os vertebrados e também em alguns animais invertebrados como a esponja-do-mar, os corais, as lulas, as medusas e as anêmonas (Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:1531-1546.; Jankangram, W., Chooluck, S. & Pomthong, B. (2016). Comparison of the properties of collagen extracted from dried jellyfish and dried squid. *African Journal of Biotechnology*, 15(16): 642-648.). Há, até o momento, 29 tipos de colágenos geneticamente distintos descritos em literatura. Todos eles são formados por cadeias de polipeptídeos (Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:1531-1546.; Chung, H. J. & Uitto, J. (2010). Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatologic Clinics*, 28(1): 93-105.). Três dos 29 tipos de colágenos são fibrilares, chamados de tipos I, II, III, e podem ser facilmente obtidos dos tecidos conjuntivos, representando importantes matérias prima para as indústrias farmacêutica, de biomateriais e alimentícias.

[03] As fibrilas de colágeno são formadas por unidades designadas de tropocolágeno, arranjadas em tripla hélice estabilizada por pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações eletrostáticas (Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2013). *Histologia básica*. Rio de Janeiro, Brasil.). Todos os colágenos fibrilares tem uma sequência repetitiva de aminoácidos, nomeada de Gly-X,Y, onde geralmente X é uma prolina e Y é uma hidroxiprolina.

[04] O colágeno fibrilar tipo I é o polímero mais abundante em mamíferos (Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. (2003). *Collagens—structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:1531-1546). Ele está presente na pele, nos ossos, na dentina, em tendões, nos vasos sanguíneos e em muitas outras estruturas. Derivados industriais de colágeno tipo I fazem parte do dia-a-dia da população, pois gelatinas alimentares e mesmo alguns tipos de colas não passam de colágeno desnaturado.

[05] Algumas propriedades tornam o colágeno tipo I atraente para aplicação industrial e uso humano (Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. (2003). *Collagens—structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:1531-1546; Hashim, P., Mohd Ridzwan, M.S., Bakar, J. & Mat Hashim, D. (2015). *Collagen in food and beverage industries. International Food Research Journal*, 22(1): 1-8.):

- 1) eles podem ser utilizados isoladamente, ou em combinação com outros polímeros, para confecção de bioprodutos;
- 2) o índice de alergenicidade do colágeno tipo I é baixo (2%) mesmo quando ele é heterólogo;
- 3) colágenos tipo I são biocompatíveis e biodegradáveis (ou reabsorvíveis)
- 4) colágenos tipo I formam fibras que resultam de processos espontâneos de auto-reconhecimento e de auto-associação molecular, os quais são preservados in vitro.
- 5) após extração de um tecido doador e solubilização in vitro, os colágenos tipo I são capazes de se organizarem estruturalmente, adquirindo formas e propriedades muito similares às que possuía in natura;
- 6) colágenos tipo I possuem alta resistência biomecânica à forças tensionais e além disso são viscoelásticos;
- 7) colágenos tipo I podem ser associar com outros elementos, como proteoglicanos, antibióticos, polissacarídeos, polímeros sintéticos, e outros;
- 8) preparações de colágenos tipo I formam matrizes ou membranas que induzem diferenciação e proliferação celular.

[06] Relativamente às membranas de colágeno, elas são maleáveis, adaptáveis, de fácil manipulação e estabilização, com vantagens próprias do colágeno, com função hemostática, semipermeáveis e quimiotáticas. Membranas de colágeno

possuem diferentes aplicações odontológicas e clínico-cirúrgicas. Elas podem ser utilizadas em cirurgias corneais de ceratoplastias lamelares; como bandagem para o revestimento e a oclusão de feridas de pele; em cirurgias ortopédicas, como substitutos de periósteos; em implantodontia, para regeneração ósseo-guiada; entre outras. Também possuem aplicações em medicina regenerativa, para promoverem expansão ex vivo e o carreamento de células, originando assim os constructos de bioengenharia. Como outra aplicação importante, membranas de colágeno podem ser utilizadas como dispositivos de liberação lenta de fármacos.

[07] Diferentes estruturas ricas em tecidos conjuntivos podem ser utilizadas como tecidos doadores (ou de extração) de colágeno para confecção de membranas ou de outros bioprodutos. As mais empregadas são a pele/derme, os ossos e os tendões de animais de produção, notadamente de porcos, de búfalos e de bovídeos e, mais recentemente, colágenos da derme e das nadadeiras de peixes também estão sendo utilizados pelas indústrias.

[08] Quanto aos tendões bovinos, são estruturas complexas e representam uma das mais importantes fontes de colágeno fibrilar tipo I para as indústrias. No entanto, o tendão flexor digital bovino, subproduto da produção animal, quando exposto a protocolos convencionais para extração de colágenos, oferece pouca quantidade de material solúvel e alta quantidade de matéria insolúvel. O material insolúvel é designado de “fração colagênica ácido-insolúvel”, e muitas vezes é descartado ou então submetido a protocolos custosos de dissolução, que podem envolver tratamentos especiais, fervura do tendão e liofilização. Ainda, a solubilidade dos colágenos dos tendões depende da idade do animal e do tipo de criação, fatores que influenciam o estado de agregação e o número de ligações cruzadas das fibras colágenas.

[09] A literatura técnica descreve diversos métodos para solubilização parcial ou total de tendões, visando a obtenção de colágenos tipo I para emprego na confecção de membranas ou de matrizes, cujas aplicações clínico-cirúrgicas são múltiplas. Em comum, muitos dos protocolos para solubilização de tendões envolvem tratamentos com soluções acídicas e com enzimas, métodos em “salting-out” e procedimentos em diálise, os quais originam géis compostos por colágenos denominados de “solúveis”.

[010] O documento US1551163 descreve um método que inclui ciclos repetitivos de solubilização do tecido doador de colágeno em solução aquosa de ácido acético 0.5 M contendo pepsina, seguidos por precipitação com NaCl, até chegar ao produto final.

[011] O documento EP0284789 descreve soluções aquosas de ácido acético, livres de pepsina, e com concentrações variando de 0,1 M até 5 M.

[012] O documento PI9404595 descreve um processo para a preparação de colágeno com auxílio de solvente orgânico em meio ácido.

[013] O documento PI9405043 descreve um processo de extração de colágeno de tecidos animais com auxílio de solvente orgânico em meio alcalino.

[014] O documento PI9701570 descreve um preparado de fibras reconstituídas de colágeno, com grau elevado de auto-agregação, cristalinas e com arranjo helicoidal símile ao natural, para múltiplos fins e para formar com hidroxiapatita óssea um complexo para implantes ósseos.

[015] O documento PCT/BR2010/000221 descreve um processo de fabricação de membrana colagênica biocompatível para aplicação médico-odontológica e produto obtido.

[016] O documento US5028695 descreve um processo de fabricação de membranas de colágeno usadas para hemostasia, curativo de feridas e para implante.

[017] O documento US4655980 descreve um processo de obtenção de membranas de colágeno para uso médico.

[018] O documento US5837278 descreve uma membrana de colágeno reabsorvível para uso na regeneração de tecidos.

[019] O documento US20030115677 descreve um método de fabricação de uma membrana de colágeno de pele porcina.

[020] O documento US3131130 descreve um método de produção de colágeno solúvel.

[021] O documento US3178301 descreve colágeno solubilizado e reconstituído de meio ácido.

[022] A literatura patentária, independente de variações não críticas nas concentrações dos componentes usados para extração de colágeno, obtém

colágeno solúvel. Todavia, nem todo colágeno exposto à extração acídica sofre solubilização. A solubilização depende das interações intermoleculares e do quantitativo de ligações cruzadas entre fibras colágenas, os quais diferem entre os tecidos conjuntivos.

[023] No entanto, o estado da técnica não descreve nem sugere um processo de fabricação de membranas estáveis utilizando a fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino, incluindo uma sequência de etapas e tempos de tratamento que se diferem daqueles do estado da técnica por não envolver reconstituição de fibras colágenas isoladas, diálise, reticulação ou liofilização das mesmas.

SUMÁRIO

[024] O processo de obtenção de membranas estáveis a partir da fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino não envolve etapas complexas e de tecnologia sofisticada e apresenta baixo custo.

[025] O processo de obtenção de membranas estáveis a partir da fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino provê um produto final (membrana) que apresenta resiliência, resistência biomecânica e biocompatibilidade.

[026] O processo de obtenção de membranas estáveis a partir da fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino provê uma membrana com fibras colágenas supra-organizadas e com elevada cristalinidade (ordem molecular).

[027] O processo de obtenção de membranas estáveis a partir da fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino provê membranas de colágeno para aplicações odontológicas e clínico-cirúrgicas; emprego como biomaterial destinado à bioengenharia tecidual; utilização como dispositivo para liberação lenta de fármacos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[028] O processo de obtenção de membranas estáveis a partir da fração insolúvel de fragmentos de tendão flexor digital bovino, objeto da presente patente de invenção, compreende uma primeira etapa de preparo dos tendões bovinos, incluindo a lavagem e o corte transversal em fragmentos de aproximadamente 5 cm x 5 cm, sendo as extremidades dos tendões desprezadas, pois se tratam de regiões que se inserem em extremidades ósseas e musculares e que, portanto, contêm considerável teor de moléculas não colagênicas.

[029] Os fragmentos de tendões são imersos em hipoclorito de sódio 1%, por cerca de 1 hora, sob refrigeração em torno de 9°C.

[030] Em seguida, em cada fragmento de tendão são feitas secções longitudinais profundas respeitando a direção dos crimps dos feixes colágenos que compõem a estrutura.

[031] Os fragmentos de tendão são imersos em hidróxido de sódio 4M, em torno de 24 horas, sob refrigeração de 9°C, sendo lavados em água destilada gelada.

[032] Em seguida, cada fragmento de tendão é imerso em uma solução aquosa de cloreto de cálcio 2 M, por cerca de 12 horas. Depois, os tendões são removidos da solução de cloreto de cálcio 2M e imersos em água destilada gelada (3 imersões em águas destiladas diferentes, de 20 minutos cada).

[033] Após lavagem em água, cada fragmento de tendão é imerso em solução aquosa de ácido clorídrico 1 M, sendo mantido por 24 horas, em temperatura ambiente de 25°C. Na sequência, cada fragmento é imerso em solução aquosa de ácido acético 0,5 M contendo 1% de pepsina, onde permanece por sete dias, em temperatura ambiente de 25°C. Transcorridos os sete dias, acrescenta-se à solução acídica contendo o fragmento de tendão 250 mL de solução de NaCl 10% (w/vol). Importante salientar que nenhuma filtração prévia é realizada. A solução é mantida em repouso por 20 dias, em laboratório climatizado para temperatura ambiente de 18 graus Celsius. Após 20 dias de repouso, os fragmentos insolúveis de colágeno de tendão tornam-se maleáveis e esbranquiçados, com aspecto que lembra algodão umedecido.

[034] O material é peneirado em filtro de malha (0,59 mm). Os fragmentos insolúveis que ficam retidos no filtro de malha são recolhidos, lavados com solução salina 0,9% gelada (2 lavagens de 30 minutos), e colocados sob placas de vidro estéreis. Devido à maleabilidade do material, uma tesoura é utilizada para dentear o “cerne ou miolo” do fragmento insolúvel, desfazendo assim um “nó” central que amarra os feixes de colágeno. Em seguida, os feixes de colágeno são manualmente puxados e distendidos como um leque aberto, adquirindo aspectos de membranas finas e semitransparentes.

[035] Para armazenamento, as membranas são estendidas manualmente em uma base estéril, sendo em seguida congelada.

[036] Para esterilização, a base de suporte das membranas pode ser submetida à radioesterização.