

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

USO DE COLÍRIOS À BASE DE *CITRUS LEMON* NO
REPARO DE ÚLCERA DE CÓRNEA INDUZIDAS EM
COELHOS. AVALIAÇÃO CLÍNICA,
HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

CINTIA SESSO PERCHES

BOTUCATU - SP
JULHO 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

USO DE COLÍRIOS À BASE DE *CITRUS LEMON* NO
REPARO DE ÚLCERA DE CÓRNEA INDUZIDAS EM
COELHOS. AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOMORFOMÉTRICA
E IMUNO-HISTOQUÍMICA

CINTIA SESSO PERCHES

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Adj. Dra. Cláudia
Valéria Seullner Brandão

BOTUCATU - SP
JULHO 2011

Nome do autor: Cintia Sesso Perches

Título: USO DE COLÍRIOS À BASE DE *CITRUS LEMON* NO REPARO DE
ÚLCERA DE CÓRNEA INDUZIDAS EM COELHOS. AVALIAÇÃO CLÍNICA,
HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Adj. Drª Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Ass. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Adj. Dr. Alexandre Lima de Andrade

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal

FMVA – UNESP - Araçatuba

Data da Defesa: 20 de julho de 2011.

Dedico esse trabalho com carinho e gratidão, aos meus pais Paulo e Maria Aparecida, e à minha irmã Raquel, que estiverem ao meu lado desde o princípio, apoiando-me e acreditando no meu sonho.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que me deu a vida e a saúde necessária pra vivê-la; que me deu o seu amor e a força para sempre seguir em frente em busca dos meus objetivos.

À minha orientadora Profa Cláudia Valéria Seullner Brandão e ao Prof. José Joaquim Tilton Ranzani pelos ensinamentos, amizade, confiança e por terem me recebido tão bem nessa família especial que é a Oftalmo.

À Profa. Cláudia Pellizon pela ajuda indispensável durante as etapas de histomorfometria e imuno-histoquímica, além da disposição para sempre me ajudar na construção desse trabalho.

Aos professores Alexandre Lima de Andrade e Noeme Sousa Rocha, que prontamente aceitaram o convite para participar da banca e contribuir na finalização desse trabalho.

Aos amigos da família Oftalmo: Guadalupe, Joice, Natalie, Camila, Geovana, Nívea, Mayana e Priscila, pelo incentivo e contribuição na realização desse projeto.

Às professoras Carmen Hilst e Maria Isabel Mello Martins pela amizade e ensinamentos, que contribuíram muito para minha formação acadêmica. E à Angelita Zanata Reia pelas longas conversas e conselhos que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu companheiro Felipe pelo amor, incentivo e compreensão nas horas que mais precisei.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani pela análise estatística.

A todos os amigos do Hospital Veterinário, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa e Ensino do Estado de São Paulo, pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 3	
Tabela 1 – Mediana e valores mínimos e máximos da variável secreção ocular segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.....	28
Tabela 2 – Mediana e valores mínimos e máximos da variável hiperemia conjuntival segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.....	28
Tabela 3 – Mediana e valores mínimos e máximos da variável quemose segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0- ausente; 1- leve; 2-moderado; 3-grave.....	29
Tabela 4 – Mediana e valores mínimos e máximos da variável opacidade corneal segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.....	29
Tabela 5 – Mediana e valores mínimos e máximos da variável blefaroespasma segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.....	30

Tabela 6 –	Mediana e valores mínimos e máximos da variável úlcera corneal segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0- ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.....	30
CAPÍTULO 4		
Tabela 1 –	Mediana, valores mínimos e máximos da espessura (μm) das regiões do epitélio da córnea e estroma central, segundo os momentos de avaliação (em dias) e grupos.....	55
Tabela 2 –	Média e desvio padrão da celularidade segundo grupo e momento de avaliação.....	56
Tabela 3 –	Mediana e valores mínimos e máximos do número total de células epiteliais segundo grupo e momento de avaliação.....	57
Tabela 4 –	Mediana e valores mínimos e máximos da porcentagem de células marcadas para PCNA, segundo grupo e momento de avaliação.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 3	
Figura 1 – Colírios à base de óleo essencial de <i>Citrus lemon</i> , nas concentrações 1,5% (A), 3% (B) e 5% (C).....	25
Figura 2 – Procedimento de indução da úlcera corneal utilizando-se uma haste de algodão embebida em n-heptanol, aplicada de forma centrípeta a partir do limbo.....	25
Figura 3 – Aspecto macroscópico da úlcera de córnea induzida após coloração por fluoresceína, no pós-operatório imediato.....	26
Figura 4 – Representação das medianas dos escores de blefaroespasma do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 5%), GL3 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 3%) e GL1,5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias.....	27
Figura 5 – Representação das medianas dos escores de úlcera corneal do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 5%), GL3 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 3%) e GL1,5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias	27

Figura 6 –	Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo Controle nos diferentes momentos de avaliação.....	31
Figura 7 –	Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo Tween nos diferentes momentos de avaliação.....	31
Figura 8 –	Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 5% nos diferentes momentos de avaliação.....	32
Figura 9 –	Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 3% nos diferentes momentos de avaliação.....	32
Figura 10 –	Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5% nos diferentes momentos de avaliação.....	33
CAPÍTULO 4		
Figura 1 –	Representação das medianas da altura epitelial (em micrômetros) da região da periferia corneal, nos diferentes grupos e momentos (M) de avaliação em dias.....	53
Figura 2 –	Representação das medianas da altura epitelial (em micrômetros) no ponto médio, região entre a periferia corneal e o centro, do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 5%), GL3 (Grupo <i>Citrus lemon</i>	

	3%) e GL1,5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação, em dias.....	53
Figura 3 –	Representação das médias da celularidade total encontrada nos cortes histológicos do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 5%), GL3 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 3%) e GL1,5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5%), nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias.....	56
Figura 4 –	Representação das medianas da porcentagem de células marcadas para PCNA do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 5%), GL3 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 3%) e GL1,5 (Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias.	57
Figura 5 –	Corte histológico de córnea normal de coelho....	59
Figura 6 –	Corte histológico de córnea de coelho pertencente ao GL5, aos cinco dias do pós-operatório.....	59
Figura 7 –	Cortes histológicos de córnea do Grupo Controle.....	60
Figura 8 –	Cortes histológicos de córnea do Grupo Tween.	61

Figura 9 –	Corte histológico de córnea de coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 5%.....	62
Figura 10 –	Corte histológico de córnea de coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 3%.....	63
Figura 11 –	Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5%.....	64
Figura 12 –	Cortes histológicos de córnea do Grupo Controle, submetidos à imunomarcação para PCNA em diferentes momentos.....	65
Figura 13 –	Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo Tween, submetidos à imunomarcação para PCNA em diferentes momentos.....	65
Figura 14 –	Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 5%, submetidos à imunomarcação para PCNA em diferentes momentos.....	66
Figura 15 –	Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 3%, submetidos à imunomarcação para PCNA em diferentes momentos.....	66
Figura 16 –	Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo <i>Citrus lemon</i> 1,5%, submetidos à imunomarcação para PCNA em diferentes momentos.....	67

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
CAPÍTULO 3 - Uso do óleo essencial de <i>Citrus lemon</i> , sob a forma de colírio, no reparo de úlceras de córnea superficiais induzidas em coelhos. Avaliação clínica.....	14
Abstract.....	16
Resumo.....	17
CAPÍTULO 4 - Expressão de PCNA e avaliação histomorfométrica em úlceras de córnea superficiais, induzidas em coelhos, após o uso de colírio de <i>Citrus lemon</i>	41
Abstract.....	43
Resumo.....	44
CAPÍTULO 5	
CONCLUSÕES GERAIS.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
Anexos.....	85

PERCHES C.S. “Uso de colírios a base de *Citrus lemon* no reparo de úlcera de córnea induzidas em coelhos. Avaliação clínica, histomorfométrica e imuno-histoquímica”. Botucatu, 2011, 84p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar por meio de exames oftalmológicos, histopatológicos e imuno-histoquímica para PCNA, o processo de reparação corneal de úlceras superficiais induzidas em coelhos, frente à utilização de colírios de óleo essencial de *Citrus lemon*, produto até então não utilizado em oftalmologia. Foram utilizadas 50 fêmeas da espécie leporina, todas submetidas à indução da úlcera superficial, constituindo-se 5 grupos experimentais de 10 animais cada. Em três grupos foram instilados colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, em diferentes concentrações, sendo 1,5% (GL1,5), 3% (GL3) e 5% (GL5). O grupo controle (GC) recebeu substituto da lágrima, e o grupo Tween 80 8% (GT) foi tratado com o diluente utilizado na produção dos colírios de citrus. Todos os protocolos foram realizados quatro vezes ao dia. Os grupos foram divididos, aleatoriamente, em dois subgrupos, de acordo com o período final de avaliação, sendo M1, coelhos avaliados após 24 horas, e M5, após 5 dias. Não houve diferença entre os tratamentos utilizados quanto aos sinais clínicos secreção ocular, hiperemia conjuntival, quemose e opacidade corneal. O grupo tratado com colírio de óleo essencial de *Citrus lemon* na concentração 1,5%, no período final de avaliação, apresentou maior sensibilidade ocular em relação ao GC, além de aumento da celularidade corneal, representada principalmente por células inflamatórias. Nas comparações entre os momentos iniciais e finais, os grupos tratados com substituto da lágrima, Tween 80 8% e colírio à base de óleo essencial de *Citrus lemon* 5% promoveram aumento na espessura epitelial na periferia da córnea e maior percentual de proliferação celular, na avaliação final. Quanto à úlcera de córnea, houve redução significativa da extensão total para leve

ou ausente no momento final de avaliação em todos os grupos; com exceção do GL 3%, o qual apresentou menor valor de mediana quanto à extensão no primeiro dia de avaliação. Assim, o óleo essencial de *Citrus lemon* pode ser utilizado sob a forma de colírio, nas concentrações estudadas, sem causar irritações à superfície ocular, favorecendo a reepitelização corneal.

Termos de Indexação: limão siciliano, ceratite ulcerativa, PCNA, histologia

PERCHES C.S. "Use of *Citrus lemon* eyedrop in the repair of corneal ulcer induced in rabbits. Clinical, histomorphometric and immunohistochemical evaluation". Botucatu, 2011, 84p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate and compare through ophthalmic exams, histopathology and immunohistochemistry for PCNA, the repair process in superficial corneal ulcers induced in rabbits using eyedrops of *Citrus lemon* essential oil, a product not used in ophthalmology yet. Fifty female rabbits were submitted to induction of the corneal ulcer and then divided into 5 experimental groups of 10 animals each. Were instilled into three groups eyedrops of *Citrus lemon* essential oil, in different concentrations, being 1.5% (GL1, 5), 3% (GL3) and 5% (GL5). The control group (CG) received a tear substitute, and the Tween 80 8% group (GT) was treated with the diluent used in the production of eyedrops of citrus. All protocols were performed four times a day. The groups were divided randomly into two subgroups, according to the final period of evaluation, in the M1 rabbits were evaluated after 24 hours, and in the M5 after 5 days. There was no difference between treatments for clinical signs: ocular discharge, conjunctival hyperemia, chemosis and corneal opacity. In the final period of evaluation, the group treated with eyedrops of *Citrus lemon* essential oil in the concentration 1.5% showed a higher ocular sensitivity compared to the GC, and increased of corneal cellularity, represented mainly by inflammatory cells. In the comparison between the initial and final moments, the groups treated with tear substitute, Tween 80 8% and eyedrops of *Citrus lemon* essential oil 5% led to an increase in epithelial thickness at the periphery of the cornea and a higher percentage of cell proliferation, in the final evaluation. In the clinical evaluation of corneal ulcer, there was significant reduction in total length for mild or absent at the time of final evaluation in all groups; the exception was GL 3%, that showed a lower median

value of extension on the first day of evaluation. Thus, the *Citrus lemon* essential oil can be used in the form of eyedrops, in the studied concentrations, without causing conjunctiva irritation, favoring corneal reepithelialization.

Index Terms: sicilian lemon, ulcerative keratitis, PCNA, histology

1. INTRODUÇÃO

A córnea é a estrutura anterior e transparente da túnica fibrosa do bulbo ocular, sendo responsável pela refração da luz, permitindo a sua entrada no olho, com qualidade e quantidade suficientes para que a imagem possa ser formada na retina. Devido à sua exposição constante ao meio ambiente, é muito suscetível às lesões, o que justifica o fato de úlcera corneal estar entre as doenças oculares mais comuns (GILGER et al., 2007).

A córnea é constituída pelo epitélio e sua membrana basal, estroma, membrana de Descemet e células endoteliais, que juntos compõem suas camadas. O epitélio é mantido e renovado por ciclos constantes de mitose das células próximas à membrana basal. Assim, lesões epiteliais são cicatrizadas por mitose e deslizamento dessas células para o centro da ferida. Entretanto, lesões estromais requerem, além de mitose e deslizamento das células epiteliais, a transformação de ceratócitos em fibroblastos e a produção de componentes do estroma corneal, como colágenos e proteoglicanas (GILGER et al., 2007).

Quando a córnea é lesionada múltiplos sistemas são ativados, produzindo uma série de processos celulares complexos e coordenados que resultam na completa reparação corneal. Esta envolve uma série de proteinases e seus inibidores, fatores de crescimento e citocinas, produzidos por células epiteliais, ceratócitos estromais, células inflamatórias e glândulas lacrimais (OLLIVIER et al., 2007). A proliferação celular é essencial para a reparação corneal e o potencial de replicação das células corneais pode ser demonstrado por um marcador de proliferação celular denominado Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) (GAN et al. 1999).

Devido à sua estrutura relativamente simples, a resposta patológica da córnea a qualquer lesão é limitada; assim, muitas afecções podem causar a sua opacidade e consequente perda da visão (GILGER et al., 2007). Os animais domésticos são frequentemente acometidos por afecções corneais e muitos são os estudos visando à reparação das mesmas com o mínimo possível de sequelas, evitando diminuição da acuidade visual (STADES et al., 1999; GELATT, 2003).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos por organismos vivos e isolados por meios físicos (pressão ou destilação) de uma planta inteira ou parte desta, que possuem propriedades biológicas diversas (BASER e BUCHBAUER, 2009).

Uma das principais propriedades dos óleos essenciais é a sua atividade antimicrobiana comprovada em estudos *in vitro*, entretanto ainda há poucos trabalhos *in vivo* que comprovem o seu efeito, embora o uso de medicamentos naturais tópicos ou sistêmicos no tratamento de infecções seja uma prática muito difundida entre terapeutas, com aparentes bons resultados (BASER e BUCHBAUER, 2009).

O óleo essencial de *Citrus lemon* tem sido utilizado no tratamento de diversas doenças, tais como, úlcera gástrica, refluxo gastroesofágico (ROZZA et al., 2011), neoplasias (SUN, 2007) e depressão (KOMORI et al., 1995).

Medicamentos naturais tem se tornado cada vez mais populares entre as pessoas que buscam maneiras alternativas para manter a sua saúde, porém são poucas as evidências científicas das propriedades do óleo essencial de *Citrus lemon* (YANG et al., 2010).

Frente aos aspectos descritos anteriormente, ressaltando-se a necessidade de estudos que comprovem os efeitos *in vivo* do *Citrus lemon* e a ausência de estudos em oftalmologia, na literatura consultada, sobre a utilização de óleos essenciais, o presente estudo teve por objetivo geral:

- Avaliar o efeito de colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5%, 3% e 5%, no tratamento de úlceras corneais superficiais induzidas em coelhos, comparando-se resultados clínicos;
- Comparar os resultados histológicos e morfométricos, e de proliferação celular utilizando-se marcação imuno-histoquímica para PCNA, de úlceras de córnea superficiais induzidas em coelhos e tratadas com colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5%, 3% e 5%.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia e Fisiologia corneal

A túnica mais externa do olho é formada pela esclera opaca e córnea transparente. A zona de transição entre a córnea e a esclera é denominada limbo, onde vasos sanguíneos assumem papel importante nos processos inflamatórios da córnea (SLATTER, 2005). A função mais importante da córnea é a refração, além de ser uma barreira física impermeável e resistente entre as estruturas internas do olho e o meio ambiente (GILGER et al., 2007).

A córnea é composta por quatro camadas: epitélio e sua membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O epitélio corneal é simples, escamoso e não queratinizado, de espessura variável (25 a 40µm), com padrão básico de membrana basal, células epiteliais basais, células aladas e células superficiais escamosas (SAMUELSON, 2007).

Com a divisão das células basais, células filhas são forçadas em direção à superfície, tornando-se achatadas como células aladas e perdendo, gradualmente suas organelas. As células superficiais possuem projeções vilosas pequenas que ancoram a camada mucóide profunda do filme lacrimal pré-corneal (SAMUELSON, 2007; SLATTER, 2005). O estroma representa 90% da espessura corneal e é composto por fibrócitos, denominados ceratócitos, dispostos de maneira ordenada, formando camadas laminares sobrepostas. Estes ceratócitos possuem forma alongada, com largura uniforme em toda a sua longitude e encontram-se dispostos paralelamente em cada lâmina estromal, que é umas das características responsáveis pela transparência corneal (HERRERA, 2008).

Além dos ceratócitos, o estroma também é constituído por fibrilas colágenas, nervos e glicosaminoglicanas. As fibrilas colágenas estão dispostas em lamelas paralelas à superfície corneal. Também são encontrados no estroma, colágeno tipo VI e XII, que não estão na forma de fibrilas, entretanto interagem com estas e são igualmente importantes fisiologicamente (GILGER et al., 2007).

O filme lacrimal pré-corneal (FLP) é um fluido trilaminar complexo constituído por componentes lipídico, aquoso e mucoso, que recobrem toda a

superfície corneal (GELLAT, 2003; HERRERA, 2008). A fina camada lipídica superficial é secretada pelas glândulas tarsais ou meibonianas, e fornece uma cobertura oleosa fina para a camada lacrimal aquosa, que é produzida pelas glândulas lacrimais da órbita e da terceira pálpebra, e representa o componente em maior quantidade na lágrima (SLATTER, 2005). A camada mais profunda consiste de mucina, que é produzida pelas células caliciformes e preenche qualquer irregularidade da superfície corneal, promovendo uma superfície ocular opticamente lisa. As principais funções do FLP consistem em lubrificação, proteção e nutrição da córnea (HERRERA, 2008).

As funções da córnea incluem: manutenção dos componentes intra-oculares, refração (curvatura) e transmissão da luz (transparência). Apresenta intensa inervação sensorial, especialmente receptores para dor, a qual é responsável por sua proteção, auxiliando assim a manter sua transparência (GILGER et al., 2007). O epitélio é innervado principalmente por receptores para dor, enquanto o estroma apresenta mais receptores para pressão, assim, lesões superficiais da córnea geralmente são mais doloridas que as profundas (SAMUELSON, 2007).

Os fatores anatômicos que contribuem para sua transparência são: ausência de vasos e células sanguíneas, ausência de pigmento, superfície óptica lisa (fornecida pelo filme lacrimal pré-corneal), controle do conteúdo do aquoso e disposição regular e altamente organizada de fibras colágenas, a qual elimina a interferência destrutiva pela dispersão da luz (SLATTER, 2005).

O controle energia-dependente de água, ou seja, manutenção do estado de deturgescência, é importante para a transparência e são as células endoteliais que apresentam esta “bomba de fluido”, responsável pela movimentação de água do estroma para o humor aquoso, contra o gradiente de pressão intra-ocular (SLATTER, 2005). Pelo fato da córnea ser avascular, o oxigênio e outras substâncias necessárias para a nutrição corneal são disponibilizados a partir do filme lacrimal pré-corneal, do humor aquoso, plexo capilar límbico e capilares da conjuntiva palpebral (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

2.2. Lesões corneais

A ceratite ulcerativa é caracterizada por lesões erosivas superficiais ou profundas na córnea com perda de epitélio e exposição do estroma. Os principais agentes causais envolvidos são os traumas, defeitos palpebrais, desordens relacionadas com o sistema lacrimal, além de infecções por fungos, bactérias e/ou vírus. A ceratite ulcerativa pode ser classificada de diversas formas, dentre elas, pela profundidade: superficial, estromal profunda e descemetocle (GILGER et al., 2007). Pode ser ainda classificada em simples, ou complicada quando há intercorrências durante o processo de reparação tecidual, tais como infecções (GALERA et al., 2009).

Defeitos epiteliais corneais persistentes, causados por lesões exógenas como infecções e traumas ou quando associados a doenças sistêmicas, promovem prolongada inflamação da superfície ocular, lesões às células tronco e membrana basal, resultando em cicatriz corneal, vascularização e redução da acuidade visual (REVOLTELLA et al., 2007). Nestes casos mais graves, além do acometimento corneal pode existir envolvimento de conjuntiva e limbo, levando à reepitelização patológica que pode gerar uma verdadeira “conjuntivalização” corneal, queratinização, vascularização, defeitos epiteliais persistentes, necrose corneal e até perfuração (TSENG et al., 1998).

Os sinais mais evidentes nas ceratites ulcerativas são: blefaroespasma (espasmo tônico do músculo orbicular do olho), fotofobia (desconforto ocular induzido pela luz), epífora (resultante da falência de drenagem lacrimal), edema (causando opacificação corneal), infiltração celular, secreção ocular (mucopurulenta ou mucosa) e vascularização (LAUS, 1998).

Infecções oculares estão entre as principais causas de doenças oculares, podendo causar ceratite ulcerativa. Os principais organismos microbiológicos envolvidos nessa doença são as bactérias, tais como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* e bactérias entéricas (GALLE e MOORE, 2007).

2.3. Reparação da córnea

O epitélio corneal é renovado constantemente através da proliferação por mitose das células da camada basal. Quando ocorre uma lesão no epitélio, a porção aquosa do filme lacrimal penetra no estroma, promovendo tumefação, até que nova camada de epitélio recubra a área lesada e o equilíbrio de fluido seja restaurado (SLATTER, 2005). O epitélio apresenta grande capacidade de regeneração, assim, após uma lesão, o epitélio normal da borda do defeito achata-se, retrai e fica espessado, perdendo seus hemidesmossomos que estavam ligados à membrana basal. Em seguida, as células entram em mitose e deslizam em direção ao centro da lesão, preenchendo o defeito (GILGER et al., 2007). Células da camada basal do epitélio do limbo também possuem a capacidade de proliferação frente a lesões corneais e de transformarem-se em células epiteliais da córnea, contribuindo para a sua regeneração (YEW et al., 2000). Durante este processo, melanócitos presentes no limbo podem ser levados para áreas previamente transparentes. Dentro de 4 a 7 dias ou menos toda a córnea é reepitelizada (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Defeitos estromais superficiais são preenchidos por deslizamento de células epiteliais que sofrem mitose. Em defeitos profundos, o epitélio rapidamente recobre a superfície, porém o preenchimento estromal requer síntese e reticulação de colágeno, síntese de proteoglicanas e remodelamento gradual da ferida. Ocorre edema corneal, infiltração de neutrófilos provenientes do filme lacrimal, em seguida ceratócitos transformam-se em fibroblastos que sintetizam proteínas, colágeno e outros componentes da matriz extracelular, como fibronectina que tem como função estimular a adesão e migração celular (GILGER et al., 2007). Cicatrização avascular ocorre em lesões estromais descomplicadas, enquanto a vascular ocorre em lesões infectadas e destrutivas. Após uma lesão, os nervos corneais regeneram-se rapidamente e a sensibilidade retorna progressivamente na área afetada (SLATTER, 2005).

Após ser lesionado, o epitélio pode sintetizar colágeno e estimular a síntese deste por fibroblastos e ceratócitos, além de secretar collagenases. A presença de collagenases e proteinases no processo de reparação tecidual pode influenciar

negativamente a cicatrização. Outros fatores que também influenciam a reparação incluem os fatores peptídeo de crescimento, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator beta transformador do crescimento (TGF β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O EGF aumenta a síntese protéica e mitose dos fibroblastos epiteliais e estromais, enquanto o PDGF estimula a produção de fibronectina, ácido hialurônico e collagenase, e o TGF β estimula a síntese de matriz extracelular e quimiotaxia de células inflamatórias (GILGER et al., 2007).

Para o sucesso dos procedimentos terapêuticos deve-se, primordialmente, realizar a identificação e a eliminação da causa, tendo como objetivo a restauração e a preservação da córnea. Entre os procedimentos clínicos adotados, encontram-se a terapia antibiótica, os analgésicos, os agentes lubrificantes, a atropina e as drogas antiproteases, como EDTA, acetilcisteína, soro autólogo e ilomostat (NASISSE, 1996; GILGER et al., 2007).

Úlceras superficiais não complicadas são tratadas apenas com aplicação tópica de antibióticos, três a quatro vezes ao dia, para prevenir infecções bacterianas secundárias, e geralmente demoram de 2 a 6 dias para cicatrizar (GILGER et al., 2007). Enquanto ceratites associadas à grande perda tecidual necessitam, além dos procedimentos clínicos, de intervenção cirúrgica para possibilitar reparação adequada, evitando assim sua progressão até a perfuração (KERN, 1990). Utilizam-se diversas técnicas como a ceratotomia, o retalho de conjuntiva ou de terceira pálpebra, a tarsorrafia ou a aplicação de membranas biológicas (NASISSE, 1996; LAUS, 1998; SLATTER, 2005)

Os principais objetivos, do tratamento corneal, são preservar ou melhorar a quantidade e qualidade da luz que penetra no olho através da córnea, além de promover a reparação corneal por meio de terapias que visam o menor trauma possível ao tecido saudável (GILGER et al., 2007).

2.4. Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)

A descoberta do PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) ocorreu logo após o início do desenvolvimento da replicação de DNA *in vitro*. Com o avanço nos estudos com o DNA, identificou-se um fator de peso molecular de 29kDa

necessário para a reação de prolongamento do DNA, que posteriormente foi identificado como PCNA (TSURIMOTO, 1998). Essa descoberta foi feita por dois grupos de pesquisadores independentes, primeiro por Miyachi et al. (1978) durante um estudo com lúpus eritematoso sistêmico, e em seguida por Bravo e Celis (1980) que identificaram uma proteína presente durante a mitose. Posteriormente chegou-se a conclusão que a proteína identificada por esses pesquisadores era a mesma, e esta foi denominada PCNA (KELMAN, 1997).

O PCNA é uma proteína que tem o formato de um anel hexagonal com o diâmetro suficiente para acomodar a molécula de DNA. Durante a fase S da mitose, ele aparece como um trímero em volta da fita de DNA, formando uma braçadeira que desliza sobre esta (MILLER et al., 2010).

Nas células eucarióticas, o PCNA é expresso durante o final da fase G1 e na fase S da mitose celular, e tem a função de auxiliar as DNA polimerase δ e ϵ durante o processo de replicação do DNA (TSURIMOTO, 1998), além de interagir com outras proteínas intracelulares (KELMAN, 1997; MILLER et al., 2010).

A imunomarcção para PCNA tem sido utilizada em diversas pesquisas de proliferação celular em córneas humanas e de animais, e a sua especificidade é garantida por muitas evidências que certificam-no como um valioso marcador de proliferação celular (GAN et al., 1999).

Um trabalho comparou a expressão de PCNA e Ki-67, que também é um marcador de proliferação celular, após ceratectomia fotorefrativa em coelhos, com remoção do epitélio e parte do estroma, e concluiu que o PCNA foi mais eficiente para este fim, já que marca um período maior do ciclo celular, permitindo a marcação de células que apresentam um curto período de replicação, como as células do epitélio basal do limbo (GAN et al., 2001).

A expressão do PCNA após remoção do epitélio e parte do estroma por ceratectomia fotorefrativa, inicia-se após 24 horas e é observada primeiramente nas células epiteliais das bordas da lesão; passadas 48 horas, a sua expressão já pode ser observada em todo o epitélio em regeneração. Após 2 semanas, a marcação para PCNA no epitélio diminui. Entretanto, a proliferação de ceratócitos do estroma inicia-se no limbo após 48 horas decorridas da lesão, estende-se por

todo o estroma após uma semana, e continua sendo observada após um mês. Assim, concluiu-se que a atividade proliferativa do epitélio inicia-se e termina antes que a dos ceratócitos do estroma (GAN et al., 2001).

Yew et al. (2000) também observaram a presença de PCNA no epitélio do limbo, porém, decorridas apenas 12 horas do debridamento epitelial de córneas de coelhos, com o pico da sua expressão após 48 horas. Após 7 dias, o epitélio continuava a expressar o PCNA, indicando a sua presença logo no início da reparação corneal com sua persistência até a completa cicatrização.

Song e Joo (2004) removeram o epitélio corneal de ratos através da técnica de ceratectomia fotorefrativa e observaram um pico na expressão de PCNA nas células da borda de úlceras superficiais após 12 horas da lesão.

Gan et al. (1999) utilizaram a marcação imuno-histoquímica para PCNA para avaliar a diferença na proliferação celular em úlceras superficiais induzidas de coelhos, frente à utilização de facoidin (medicamento que previne a migração de leucócitos dos vasos endoteliais do limbo para a lesão corneal), e concluíram que a expressão de PCNA é maior na presença de leucócitos, e portanto o tempo de cicatrização é maior na ausência de leucócitos polimorfonucleares.

Em coelhos com úlceras de córnea provocadas por queimadura alcalina, observou-se um aumento na proliferação celular através da marcação para PCNA e melhor cicatrização corneal nos animais tratados com células tronco mesenquimais via sistêmica, quando comparado ao grupo controle (YE et al., 2006).

2.5. Óleo essencial de *Citrus lemon*

O século XIX é considerado como o início da fase moderna da aplicação industrial de óleos essenciais. No entanto, o seu uso em larga escala remonta ao Egito antigo. Em 1480 a.C., a rainha do Egito, Hatshepsut, enviou uma expedição para a Somália para coletar óleos e resinas de plantas aromáticas com o intuito de serem utilizados como ingredientes para perfumes, medicamentos, aromas e mumificação de corpos (BRUD, 2009).

Os primeiros trabalhos sobre a constituição dos óleos essenciais datam de 1833 e foram realizados pelo químico francês M. J. Dumas; desde então diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de estabelecer os constituintes dos óleos essenciais (BASER e BUCHBAUER, 2009) e suas aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (DUGO et al., 2010).

Os óleos são extraídos de várias plantas aromáticas, geralmente localizadas em países temperados a quentes e tropicais, onde eles representam parte importante da farmacopéia tradicional. São líquidos, voláteis, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos e com densidade geralmente menor que a água. Caracterizam-se por forte aroma e são formados como metabólitos secundários de plantas aromáticas. Conhecidos por sua propriedade antisséptica, ou seja, bactericida, fungicida e viricida e propriedades medicinais de sua fragrância (aromaterapia), eles são usados na preservação de alimentos, e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e agentes anestésicos locais, entre outros usos (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta e são estocados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Geralmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes incluem dois grupos de origens biosintéticas distintas (PICHESKY et al., 2006). O grupo principal é composto de terpenos e terpenóides e outro grupo, de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008).

Citrus lemon Burm. f. pertence à família Rutaceae e é popularmente conhecido no Brasil como limão-siciliano. A sua árvore atinge de 3 a 6 metros de altura, e o seu óleo essencial é extraído da casca da fruta (ALOISI et al., 2002; CECARELLI et al., 2004). É uma planta originária da região mediterrânea, que foi introduzida na Europa há milhares de anos, através da Península Ibérica e Sicília, chegando ao Brasil junto com a sua colonização (ARIAS e LACA, 2005). De acordo com Lewis & Hanson (1991), as principais classes químicas de compostos

com atividade são terpenos, triterpenos, flavonóides, compostos fenólicos, taninos, alcalóides, glicosídeos, saponinas e polissacarídeos. A análise fitoquímica do óleo essencial de *Citrus lemon* (CL) demonstrou que os seus maiores componentes são dois monoterpenos: limoneno e β -pineno, sendo o primeiro, o principal constituinte dos óleos essenciais de citrus (ROZZA et al., 2011).

O óleo essencial de *Citrus lemon* é extraído em diversos países para o uso alimentício, farmacêutico e na indústria de perfumes (BASER e BUCHBAUER, 2009). A quantidade dos seus elementos constituintes depende da genética da planta, solo em que é cultivada, práticas de cultura e do clima (LOTA et al., 2002), assim como da região e a estação do ano em que o fruto é colhido (DUGO et al., 2010). Em um trabalho coreano, observou-se o limoneno como componente majoritário (64.54%), seguido pelo triciclono (15.70%), com o β -pineno representando apenas 1.48% da composição (YANG et al., 2010). Enquanto Rozza et al. (2011), no Brasil, obtiveram o limoneno como principal componente, respondendo por 70,75% da composição, seguido pelo β -pineno na concentração 13,19%, o que demonstra a variação na porcentagem dos seus constituintes de acordo com a região em que é extraído.

O limoneno é o monoterpeno alifático de maior distribuição na natureza depois do α -pineno (BASER e BUCHBAUER, 2009), está presente em diversos óleos, principalmente nos extraídos de frutas cítricas e é muito utilizado como aromatizante em cosméticos e sabonetes (BEVILACQUA et al., 2010). Na medicina, já era utilizado por gregos e romanos, há muito tempo atrás, pelas suas propriedades antimicrobianas, e atualmente muitos pesquisadores tem demonstrado a sua atividade contra bactérias e fungos (FISHER e PHILLIPS, 2008).

Após a ingestão de limoneno, este é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal tanto de humanos como de animais; é distribuído por todos os tecidos do corpo, metabolizado e eliminado na urina (SUN, 2007). A sua utilização é considerada segura pelo Código de Regulamentos Federais dos Estados Unidos (The United States Code of the Federal Regulations, Title 21, Part 182.60).

O efeito bactericida dos ácidos presentes nos óleos essenciais é diretamente proporcional ao aumento da sua concentração (TAMBLYN et al., 1993). Fisher e Phillips (2006) demonstraram a ação inibitória do óleo essencial de *Citrus lemon* sobre o crescimento *in vitro* das bactérias *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Em um estudo com ratos, demonstrou-se que o óleo essencial extraído de *Citrus lemon* possui compostos voláteis que podem provocar mudanças em circuitos neuronais envolvidos com dor e ansiedade (CECCARELLI et al., 2004). Ele age diminuindo o estresse ambiental em ratos (TSUCHIYA et al., 1991), possui efeitos antidepressivos em humanos (KOMORI et al., 1995) e aumenta a criatividade e melhora o humor quando utilizado na aromaterapia (KNASKO et al., 1992). Komiya et al. (2006) avaliaram o efeito antiestresse dos óleos essenciais de lavanda, rosa e limão em camundongos, e concluíram que o *Citrus lemon* possui o melhor efeito antiestresse, sugerindo o seu uso como auxiliar no tratamento da ansiedade e depressão.

Observou-se também uma inibição na apoptose induzida por choque térmico em uma linha celular humana de astrócitos CCF-STTG1 e em astrócitos primários cultivados de ratos, ambos tratados previamente com óleo essencial de *Citrus lemon* (KOO et al., 2002).

Os óleos essenciais de limão são capazes de evitar a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reduzindo os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, e consequentemente a formação de placas lipídicas no interior dos vasos, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (MOLINA et al., 2010). Devido à sua ação na diluição de colesterol, um estudo utilizou o limoneno para dissolver cálculos biliares através de infusão direta, em humanos, obtendo bons resultados em 141 pacientes (IGIMI et al., 1991).

Testes em animais comprovaram a eficácia do limoneno contra alguns tipos de câncer, tais como o gástrico, mamário, hepático e adenoma pulmonar (SUN, 2007). Em um estudo epidemiológico, pesquisadores notaram que pessoas que consumiam mais cascas de citrus, ricas em limoneno, apresentaram menor

incidência de carcinoma de células epiteliais (HAKIM et al., 2000). O limoneno também tem se mostrado eficaz no alívio de refluxo gastroesofágico e azia ocasionais, mas o seu mecanismo de ação ainda não foi bem esclarecido (WILKINS JR, 2002).

Dentre as substâncias naturais encontradas na natureza, os terpenos constituem o principal composto químico com atividades antiulcerogênicas (LEWIS e HANSON, 1991). Rozza et al. (2011) induziram a formação de úlceras gástricas em ratos por meio de administração de etanol via oral e observaram os efeitos gastroprotetores do *Citrus lemon* (CL) e dos seus dois principais componentes, limoneno e β -pineno, e concluíram que apenas o CL e o seu componente majoritário, limoneno, foram capazes de evitar a formação da úlcera gástrica, através do aumento na produção de muco, e de efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Moraes et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes com o uso de limoneno como protetor da mucosa gástrica.

O tratamento de úlceras gástricas com CL, também promoveu um aumento na proliferação celular, diminuindo o tempo de cicatrização da úlcera. O aumento da celularidade na região da submucosa indica eficácia do processo de cicatrização, pois denota aumento da vascularização local e de células importantes para a secreção de proteínas específicas na resposta a injúrias locais. O aumento do número de neutrófilos é importante para a proteção local contra agentes bacterianos e posteriores infecções, além de estimular, nas células da mucosa, produção de muco e glutatona, que é um tripeptídeo que participa de várias fases do metabolismo oxidativo, incluindo remoção de hidroperóxidos e manutenção do estado fisiológico dos componentes sulfidrilas das proteínas. Assim, o óleo essencial de *Citrus lemon* mostrou-se bastante efetivo na cicatrização de úlceras gástricas em ratos, e seu mecanismo de ação envolve aumento da produção de muco e recrutamento celular para a mucosa (reepitelização) e submucosa (celularização) na região da úlcera (ROZZA et al., 2007).

Referências na página 78.

Capítulo 3

**USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LEMON*, SOB A FORMA
DE COLÍRIO, NO REPARO DE ÚLCERAS DE CÓRNEA
SUPERFICIAIS INDUZIDAS EM COELHOS. AVALIAÇÃO CLÍNICA**

**USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LEMON*, SOB A FORMA DE COLÍRIO,
NO REPARO DE ÚLCERAS DE CÓRNEA SUPERFICIAIS INDUZIDAS EM
COELHOS. AVALIAÇÃO CLÍNICA**

**Perches C.S.¹, Brandão C.V.S.², Ranzani J.J.T.³, Padovani C.R.⁴, Donatti, C.⁵,
Serenó, M.G.⁶, Angélico G.T.⁷, Fonzar J.F.⁸**

1. Pós-graduanda, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, Distrito de Rubião Junior s/n, CEP 18618-970. E-mail: ciperches@yahoo.com.br
2. Professora Adjunta, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: valeriasb@fmvz.unesp.br
3. Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: quim@fmvz.unesp.br
4. Professor Titular, Departamento de Bioestatística. Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu. E-mail: bioestatistica@ibb.unesp.br
5. Mestre, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: camila_donatti@yahoo.com.br
6. Pós-graduanda, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: lupeserenó@yahoo.com.ar
7. Mestre, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: geovanathais@yahoo.com.br
8. Pós-graduanda, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: isdruxula@uol.com.br

Trabalho a ser enviado para revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

**USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LEMON*, SOB A FORMA DE COLÍRIO,
NO REPARO DE ÚLCERAS DE CÓRNEA SUPERFICIAIS INDUZIDAS EM
COELHOS. AVALIAÇÃO CLÍNICA**

ABSTRACT - Perches C.S., Brandão C.V.S., Ranzani J.J.T., Padovani C.R., Donatti, C., Sereno, M.G., Angélico G.T., Fonzar J.F. [Use of *Citrus lemon* essential oil in the form of eyedrop in the repair of superficial corneal ulcer in rabbits. Clinical evaluation].

ABSTRACT - The ulcerative keratitis are in the most frequent diseases in ophthalmologic routine, and are potential cause of blindness if treated improperly. The *Citrus lemon* (CL) essential oil is a natural product that has anti-inflammatory and antimicrobial properties, and stimulates cell proliferation. Scientific studies demonstrated its action on the prevention and treatment of gastric ulcers, however, the use of this product has not been described in ophthalmology in the treatment of corneal ulcers. The aim of this study was to clinically evaluate and compare the repair process in superficial corneal ulcers induced in rabbits, using eyedrops of *Citrus lemon* essential oil in different concentrations. Fifty female rabbits were used and divided into 5 experimental groups of 10 animals each one. Every animal underwent induction of experimental superficial ulcer. Three groups were treated with eyedrops of *Citrus lemon* essential oil in different concentrations, being 1.5% (GL1, 5), 3% (GL3) and 5% (GL5). Another group was treated with Tween 80 8% (GT), which is the solvent used in the production of eyedrops of CL, and the control group (CG) received tear substitute. In every animal the eyedrops were applied four times daily. The experimental groups were divided into two subgroups with five animals each one, according to the final evaluation periods. The first subgroup (M1) was evaluated after 24 hours and the second (M5) after 5 days. There was no difference between treatments for clinical signs: ocular discharge, conjunctival hyperemia, chemosis and corneal opacity. In the final evaluation period, the group treated with eyedrops of *Citrus lemon* essential oil in the concentration 1.5%

showed a higher ocular sensitivity (blepharospasm) compared to the CG. In the corneal ulcer evaluation, there was significant reduction in total length for mild or absent at the time of final evaluation in all groups; the exception was GL 3%, that showed a lower median value of extension on the first day of evaluation.

Index Terms: sicilian lemon, ulcerative keratitis, Rutaceae

RESUMO

As ceratites ulcerativas estão entre as doenças de maior ocorrência na rotina oftalmológica, sendo potenciais causadoras de cegueira quando tratadas de forma inadequada. O óleo essencial de *Citrus lemon* (CL) é um produto natural que possui propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias, além de estimular a proliferação celular. Trabalhos científicos demonstram sua ação na prevenção e tratamento de úlceras gástricas, entretanto, o uso desse produto ainda não foi descrito em oftalmologia, no tratamento de úlceras de córnea. O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar clinicamente, o processo de reparação corneal de úlceras superficiais induzidas em coelhos, frente à utilização de colírios de óleo essencial de *Citrus lemon* em diversas concentrações. Foram utilizadas 50 fêmeas da espécie leporina, constituindo-se 5 grupos experimentais de 10 animais cada. Todos os animais foram submetidos ao procedimento de indução da úlcera superficial experimental. Três grupos foram tratados com colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, em diferentes concentrações, sendo 1,5% (GL1,5), 3% (GL3) e 5% (GL5). Outro grupo foi tratado com Tween 80 8% (GT), que é o diluente utilizado na produção dos colírios de CL, e o grupo controle (GC) recebeu substituto da lágrima. Em todos os animais os colírios foram instilados quatro vezes ao dia. Os grupos experimentais foram distribuídos em dois subgrupos com cinco animais cada, de acordo com os períodos finais de avaliação. O primeiro subgrupo (M1) foi avaliado após 24 horas e o segundo (M5) após 5 dias. Não houve diferença entre os tratamentos utilizados quanto aos sinais clínicos secreção ocular, hiperemia conjuntival, quemose e opacidade corneal. O grupo

tratado com colírio de óleo essencial de *Citrus lemon* na concentração 1,5%, no período final de avaliação, apresentou maior sensibilidade ocular (blefaroespasma) em relação ao GC. Quanto à úlcera de córnea, houve redução significativa da extensão total para leve ou ausente no momento final de avaliação em todos os grupos; com exceção do GL 3%, o qual apresentou menor valor de mediana quanto à extensão no primeiro dia de avaliação.

Termos de Indexação: limão siciliano, ceratite ulcerativa, Rutaceae.

INTRODUÇÃO

A função mais importante da córnea é a refração, além de ser uma barreira física, impermeável e resistente entre as estruturas internas do olho e o meio ambiente. Devido à sua exposição constante, é muito suscetível às lesões, o que justifica o fato da úlcera corneal estar entre as doenças oculares mais comuns (Gilger, Bentley & Ollivier 2007).

A córnea é constituída pelo epitélio e sua membrana basal, estroma, membrana de Descemet e células endoteliais, que juntos compõem suas camadas (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Seu epitélio é innervado principalmente por receptores para dor, responsáveis por sua proteção, enquanto o estroma apresenta mais receptores para pressão, assim, lesões superficiais da córnea geralmente são mais doloridas que as profundas (Samuelson 2007).

A ceratite ulcerativa é caracterizada por lesões erosivas superficiais ou profundas na córnea com perda de epitélio e exposição do estroma. (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Os sinais mais evidentes nas ceratites ulcerativas são: blefaroespasmo (espasmo tônico do músculo orbicular do olho), fotofobia (desconforto ocular induzido pela luz), epífora (resultante da falência de drenagem lacrimal), edema (causando opacificação corneal), infiltração celular, secreção ocular (mucopurulenta ou mucosa) e vascularização (Laus 1998, Galera, Laus & Oriá 2009).

Para o sucesso dos procedimentos terapêuticos deve-se, primordialmente, realizar a identificação e a eliminação da causa. Entre os principais procedimentos clínicos adotados, encontram-se a terapia antibiótica, os analgésicos, os agentes lubrificantes, a atropina e as drogas antiproteases, como EDTA, acetilcisteína, soro autólogo e ilomostat (Nasisse 1996, Gilger, Bentley & Ollivier 2007).

Os óleos essenciais são conhecidos por sua propriedade antisséptica e medicinais de sua fragrância (aromaterapia); são usados na preservação de alimentos, e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e agentes anestésicos locais, entre outros (Bakkali et al. 2008).

Citrus lemon Burm. f. pertence à família Rutaceae, é popularmente conhecido no Brasil como limão-siciliano e o seu óleo essencial é extraído da casca da fruta (Aloisi et al. 2002, Cecarelli et al. 2004). Os seus principais componentes são dois monoterpenos: limoneno e β -pineno, sendo o primeiro, o principal constituinte dos óleos essenciais de citrus (Rozza et al. 2011).

O efeito bactericida dos ácidos presentes nos óleos essenciais é diretamente proporcional ao aumento da sua concentração (Tamblyn et al. 1993). Fisher e Phillips (2006) demonstraram a ação inibitória do óleo essencial de *Citrus lemon* sobre o crescimento *in vitro* das bactérias *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Dentre as substâncias naturais encontradas na natureza, os terpenos constituem o principal composto químico com atividades antiulcerogênicas (Lewis & Hanson 1991). O tratamento de úlceras gástricas de ratos com *Citrus lemon* promoveu aumento na proliferação celular, vascularização e de células importantes na resposta às lesões locais, diminuindo o tempo de cicatrização da úlcera (Rozza et al. 2007). Além disso, também foi capaz de evitar a formação da úlcera gástrica, pelo estímulo à produção de muco, efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Rozza et al. 2011). Moraes et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes com o uso de limoneno como protetor da mucosa gástrica.

A ausência de trabalhos sobre o uso de *Citrus lemon* em oftalmologia e as suas propriedades antiulcerogênicas descritas, estimularam o desenvolvimento deste, com o objetivo de avaliar, por meio de exames clínico-oftalmológicos, o processo de reepitelização corneal de úlceras superficiais, induzidas experimentalmente em coelhos, frente ao uso de colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5%, 3% e 5%.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 50 fêmeas da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*) pertencentes ao grupo genético Botucatu, com idade variando entre 90 e 180 dias

e peso entre 2 e 4 Kg. Os coelhos foram fornecidos pelo biotério central da UNESP, Campus de Botucatu.

Os animais foram submetidos aos exames clínicos e oftalmológicos de rotina com auxílio de lâmpada de fenda portátil¹, bem como ao teste de Schirmer², à tonometria³ e à oftalmoscopia direta⁴. Após o procedimento cirúrgico, os coelhos foram identificados e mantidos em gaiolas individuais com água potável e ração comercial⁵ *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais desenvolvidos seguiram as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e foram submetidos à Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Protocolo número 174/2008 CEEA.

Obtenção e diluição do Tween 80

Realizou-se a diluição do Polissorbato 80, conhecido como Tween 80⁶, em solução fisiológica⁷, na proporção 1:10, obtendo-se a concentração de 8%; em seguida, a solução foi submetida à agitação por 15 minutos em temperatura ambiente para homogeneização.

Obtenção do colírio de óleo essencial de *Citrus lemon*

O óleo essencial de *Citrus lemon*⁸ foi diluído, no momento do seu uso, em solução de Tween 80 8%, a fim de se obter as concentrações de 1,5%, 3% e 5%, constituindo deste modo, os respectivos colírios. O pH da solução foi ajustado em

¹ Lâmpada de fenda portátil Kowa SL-15®

² Teste de Schirmer Ophthalmos®

³ Tonômetro de aplanção Tono Pen®- Med Tronic

⁴ Oftalmoscópio direto Welch Allyn®

⁵ Coelhil S - Socyl

⁶ Tween 80 - Labsynth

⁷ Solução Fisiológica NaCl 0,9% 250mL - Med Flex

⁸ Citrus lemon - Ferquima

7,2, adicionando-se ácido clorídrico (quando necessário a diminuição do pH) ou hidróxido de sódio (quando necessário o aumento do pH). As soluções foram preparadas em capela de fluxo lamelar unidirecional, estocadas a temperatura de 4°C, protegidas da luz e utilizadas por até 5 dias (Figura 1).

A composição do óleo essencial de *Citrus lemon* utilizado no experimento, apresentou o limoneno como seu principal componente, representando 70,75%, seguido pelo β -pineno com 13,19% e pelo γ -terpineno com 9,19%.

Grupos experimentais

Os 50 animais foram distribuídos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais, designados Grupo Controle (GC), Grupo Tween 80 8% (GT) e três grupos de colírios à base de *Citrus lemon* (GL), em diferentes concentrações, sendo 1,5% (GL1,5), 3% (GL3) e 5% (GL5). Cada grupo foi constituído por 10 animais.

No GC, foi instilado colírio substituto da lágrima⁹. No GT, as animais foram tratados com colírio de Tween 80 na concentração 8%. E nos grupos GL1,5, GL3 e GL5, foram tratados com colírio à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5%, 3% e 5%, respectivamente.

Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com quetamina¹⁰ (20mg/Kg) via intramuscular (IM), associada à xilazina¹¹ (1mg/Kg) IM e à morfina¹² (0,5mg/Kg) IM. Adicionalmente, foi feita a anestesia tópica ocular por meio de utilização de colírio anestésico¹³.

Os procedimentos operatórios foram realizados com auxílio de microscópio

⁹ Lacrima plus® (hipromelose e dextrano 70) - Alcon

¹⁰ Dopalen® - Vetbrands

¹¹ Anasedan® - Vetbrands

¹² Dimorf® - Cristália

¹³ Anestalcon® - Cloridrato do proximetacaína 0,5% - Alcon

cirúrgico¹⁴ após antissepsia utilizando solução de polivinilpirrolidona¹⁵ a 1:50 e colocação de panos fenestrados oftálmicos estéreis. A fixação mecânica das pálpebras foi feita com blefarostato Barraquer infantil. Para a indução da úlcera corneal, uma haste de algodão foi embebida em n-heptanol e aplicada sobre a córnea a partir do limbo, de forma centrípeta, mantendo o contato do álcool com a córnea durante 3 minutos (Figura 2). A remoção do epitélio foi realizada com uma haste de algodão seca e, posteriormente, a superfície ocular foi lavada com 60 ml de solução fisiológica estéril a 0,9% para a remoção dos debris e álcool remanescentes (Sampaio et al. 2006).

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de indução de úlcera de córnea experimental.

Pós-operatório

No pós-cirúrgico imediato e a cada 12 horas, foi administrado em todos os animais, o antiinflamatório à base de meloxicam¹⁶ (0,2 mg/kg), por via subcutânea (SC), além de morfina¹⁷ (2 mg/Kg) SC, durante três dias, visando maximizar o conforto pós-operatório.

Os animais foram medicados com os colírios, de acordo com o seu grupo experimental, quatro vezes ao dia, iniciando-se o tratamento logo após a recuperação anestésica. Na região ocular foram feitas limpezas diárias das pálpebras, quando necessário, com solução salina a 0,9%¹⁸, até o final do período de avaliação de cada animal.

Momentos de avaliação

Todos os grupos foram divididos em dois subgrupos constituídos por cinco

¹⁴ Microscópio Cirúrgico Karl Kaps, modelo SOM 62 Standarad, Alemanha

¹⁵ PVPI - Iodo anti-séptico aquoso/ Brasilíquidos Produtos Farmacêuticos/ Comercial Bono LTDA

¹⁶ Movatec® - Meloxicam solução injetável – Boehringer Ingelheim

¹⁷ Dimorf® - Cristália

¹⁸ Solução Fisiológica NaCl 0,9% 250mL - Med Flex

animais cada, de acordo com o seu período final de avaliação, ou seja, M1, avaliados 24 horas pós-cirurgia (dia 1) e M5, no quinto dia pós-operatório.

Avaliação clínica e oftalmológica

Os animais foram avaliados de acordo com o momento final do seu subgrupo, ou seja, após 24 horas da cirurgia no M1, e após 5 dias no subgrupo M5. Os sinais clínicos oftalmológicos avaliados foram blefaroespasma, hiperemia conjuntival, quemose, secreção ocular, opacidade corneal, vascularização e pigmentação corneal, esses foram qualificados e quantificados subjetivamente em: (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) grave. Também foi estudada a epitelização da córnea, através da realização do teste de fluoresceína¹⁹ (Figura 3) e classificação da extensão da úlcera corneal, utilizando-se os escores: (0) ausente, na coloração negativa para fluoresceína; (1) leve, coloração de até 30% da extensão; (2) moderada, tingimento por fluoresceína entre 30 e 70% da superfície corneal, e (3) grave, para extensão acima de 70% da superfície corneal.

Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se a técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, com nível de 5% de significância ($P < 0,05$) (Johnson & Wichern 2002).

¹⁹ Fluoresceína sódica 1% colírio - Allergan

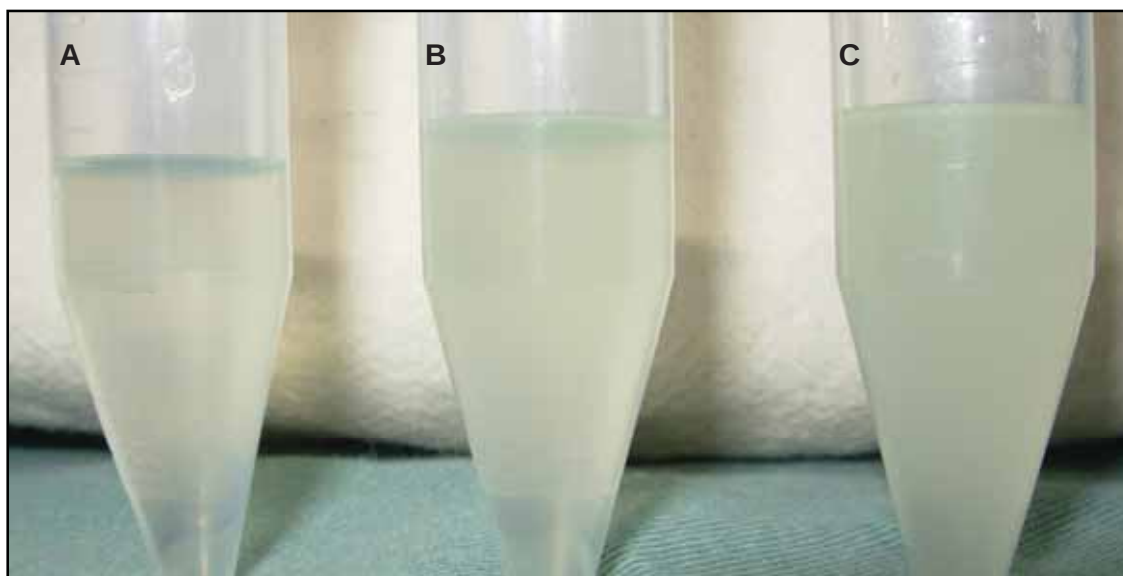


Figura 1 – Colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5% (A), 3% (B) e 5% (C).

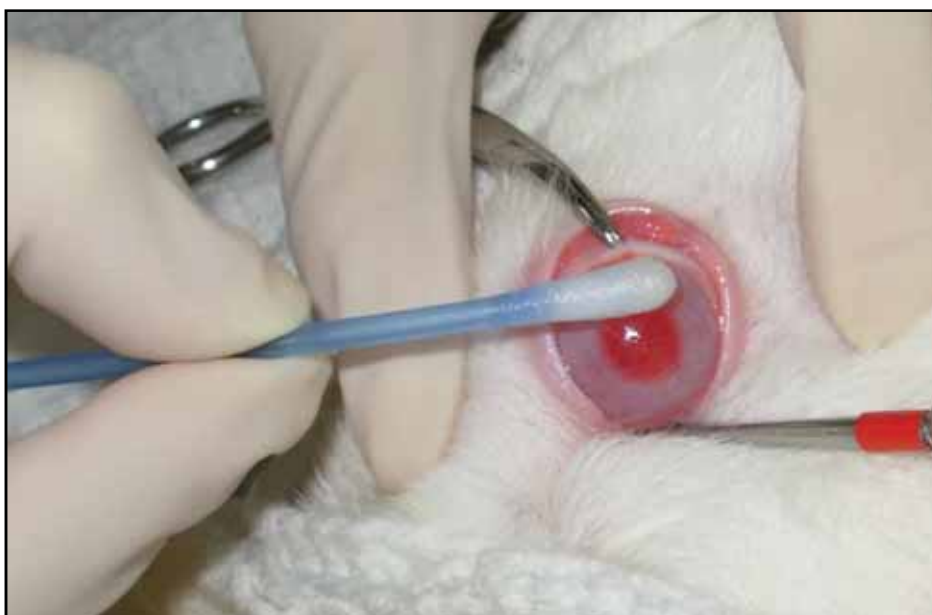


Figura 2 - Procedimento de indução da úlcera corneal utilizando-se uma haste de algodão embebida em n-heptanol, aplicada de forma centrípeta a partir do limbo.



Figura 3 – Aspecto macroscópico da úlcera de córnea induzida após coloração por fluoresceína, no pós-operatório imediato.

RESULTADOS

Avaliação Clínica Oftalmológica

Na avaliação da secreção ocular os resultados obtidos foram similares em todos os grupos, nos dois momentos de avaliação. Quase todos os animais apresentaram secreção mucóide, com exceção de um animal do GL5 e outro do GL1,5, ambos do M5, que demonstraram secreção ocular purulenta.

A hiperemia conjuntival foi observada na maioria dos animais, porém com intensidades diferentes. No primeiro momento de avaliação (M1), os grupos com as menores medianas foram o GC, GL5 e GL3, demonstrando hiperemia leve, enquanto no grupo GL1,5, a mediana foi de intensidade grave. Este grupo também apresentou quemose de intensidade grave no primeiro dia de avaliação, enquanto nos demais grupos observou-se quemose leve ou ausente.

A opacidade corneal foi observada em praticamente todos os animais, com exceção de um caso do GL3 M5. Quanto ao blefaroespasma, o GL1,5 apresentou as maiores medianas nos dois momentos de avaliação (Figura 4).

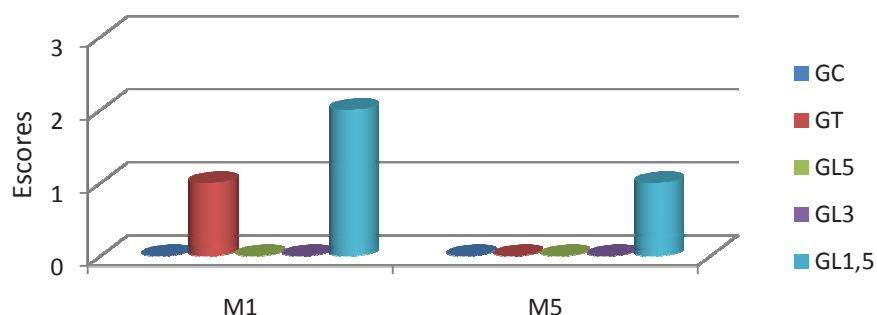


Figura 4 – Representação das medianas dos escores de blefaroespasma do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo *Citrus lemon* 5%), GL3 (Grupo *Citrus lemon* 3%) e GL1,5 (Grupo *Citrus lemon* 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias (escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave).

Todos os animais do M1 dos grupos GC e GT apresentaram úlceras corneais graves; no GL5 e GL1,5 foram quatro casos de intensidade grave e um moderado, enquanto o GL3 apresentou apenas dois animais com úlceras corneais graves e três moderadas. Após cinco dias, houve redução da gravidade da extensão da úlcera corneal em todos os grupos (Figura 5).

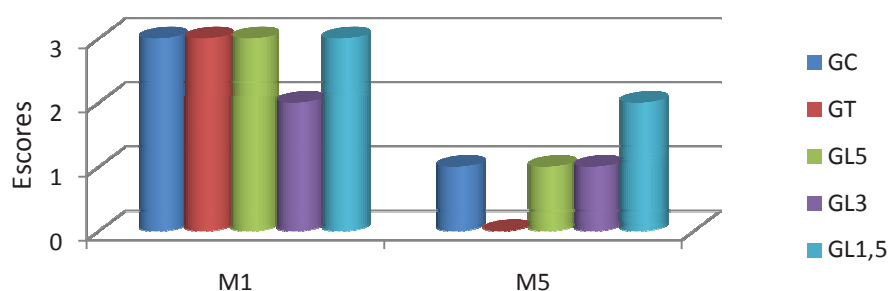


Figura 5 – Representação das medianas dos escores de úlcera corneal do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo *Citrus lemon* 5%), GL3 (Grupo *Citrus lemon* 3%) e GL1,5 (Grupo *Citrus lemon* 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias (escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave).

Análise estatística

As tabelas 1 a 6 representam a avaliação estatística das variáveis oftalmológicas. Letras iguais representam diferenças não significativas ($p>0,05$).

Não houve diferenças significativas entre os grupos em todos os momentos avaliados, bem como entre os momentos, para as variáveis: secreção ocular, hiperemia conjuntival, quemose e opacidade corneal (Tabelas 1 a 4).

Tabela 1 - Mediana e valores mínimos e máximos da variável secreção ocular segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.

Variável	Grupo	Momento de avaliação	
		1 dia (M1)	5 dias (M5)
Secreção Ocular	GC	1,0 (0,0; 1,0) aA*	0,0 (0,0; 1,0) aA
	GT	0,0 (0,0; 1,0) aA	0,0 (0,0; 2,0) aA
	GL5	1,0 (0,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 3,0) aA
	GL3	0,0 (0,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 2,0) aA
	GL1,5	1,0 (0,0; 2,0) aA	1,0 (0,0; 3,0) aA

*Letras minúsculas comparam os grupos fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo.

Tabela 2 - Mediana e valores mínimos e máximos da variável hiperemia conjuntival segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.

Variável	Grupo	Momento de avaliação	
		1 dia (M1)	5 dias (M5)
Hiperemia Conjuntival	GC	1,0 (1,0; 3,0) aA*	1,0 (0,0; 2,0) aA
	GT	2,0 (1,0; 3,0) aA	1,0 (1,0; 2,0) aA
	GL5	1,0 (1,0; 3,0) aA	1,0 (1,0; 3,0) aA
	GL3	1,0 (0,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 2,0) aA
	GL1,5	3,0 (0,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 3,0) aA

*Letras minúsculas comparam os grupos, fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo.

Tabela 3 - Mediana e valores mínimos e máximos da variável quemose segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.

Variável	Grupo	Momento de avaliação	
		1 dia (M1)	5 dias (M5)
Quemose	GC	1,0 (0,0; 2,0) aA *	0,0 (0,0; 1,0) aA
	GT	1,0 (0,0; 2,0) aA	1,0 (0,0; 2,0) aA
	GL5	1,0 (0,0; 2,0) aA	0,0 (0,0; 1,0) aA
	GL3	0,0 (0,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 1,0) aA
	GL1,5	3,0 (0,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 3,0) aA

*Letras minúsculas comparam os grupos, fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo.

Tabela 4 - Mediana e valores mínimos e máximos da variável opacidade corneal segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.

Variável	Grupo	Momento de avaliação	
		1 dia (M1)	5 dias (M5)
Opacidade Corneal	GC	1,0 (1,0; 3,0) aA *	1,0 (1,0; 2,0) aA
	GT	1,0 (1,0; 3,0) aA	1,0 (1,0; 3,0) aA
	GL5	1,0 (1,0; 3,0) aA	1,0 (1,0; 3,0) aA
	GL3	1,0 (1,0; 3,0) aA	1,0 (0,0; 2,0) aA
	GL1,5	2,0 (1,0; 3,0) aA	2,0 (1,0; 3,0) aA

*Letras minúsculas comparam os grupos fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo.

Quanto ao blefaroespasma, entre os momentos não houve diferença significativa entre os grupos. No M1, todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante. Entretanto, no M5 foi verificado maior intensidade do sinal clínico no GL1,5 quando comparado ao GC; os demais grupos apresentaram valores intermediários, não diferindo do GC e do GL1,5 (Tabela 5).

Tabela 5 - Mediana e valores mínimos e máximos da variável blefaroespasmo segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.

Variável	Grupo	Momento de avaliação	
		1 dia (M1)	5 dias (M5)
Blefaroespasmo	GC	0,0 (0,0; 3,0) aA *	0,0 (0,0; 0,0) aA
	GT	1,0 (0,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 1,0) abA
	GL5	0,0 (0,0; 2,0) aA	0,0 (0,0; 3,0) abA
	GL3	0,0 (0,0; 2,0) aA	0,0 (0,0; 1,0) abA
	GL1,5	2,0 (0,0; 3,0) aA	1,0 (0,0; 3,0) bA

*Letras minúsculas comparam os grupos fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo.

Com relação à presença de úlcera corneal, não houve diferença significativa, entre os grupos do M1 e do M5, quando fixado o momento. Porém, quando comparados os momentos, os grupos GC, GT e GL5 apresentaram diminuição da úlcera corneal significativa no M5 em relação ao M1 ($p < 0,01$); bem como o GL1,5 ($p < 0,05$); já no GL3 não houve diferença significativa entre os momentos (Tabela 6).

Tabela 6 - Mediana e valores mínimos e máximos da variável úlcera corneal segundo grupo e momentos de avaliação em dias. Escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-grave.

Variável	Grupo	Momento de avaliação	
		1 dia	5 dias
Úlcera corneal	GC	3,0 (3,0; 3,0) aA *	1,0 (0,0; 1,0) aB
	GT	3,0 (3,0; 3,0) aA	0,0 (0,0; 1,0) aB
	GL5	3,0 (2,0; 3,0) aA	1,0 (0,0; 2,0) aB
	GL3	2,0 (2,0; 3,0) aA	1,0 (0,0; 3,0) aA
	GL1,5	3,0 (2,0; 3,0) aA	2,0 (0,0; 2,0) aB

*Letras minúsculas comparam os grupos fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo.

Nas figuras 6 a 10 estão representadas, a evolução da reparação da úlcera corneal, nos diferentes grupos experimentais e momentos de avaliação.

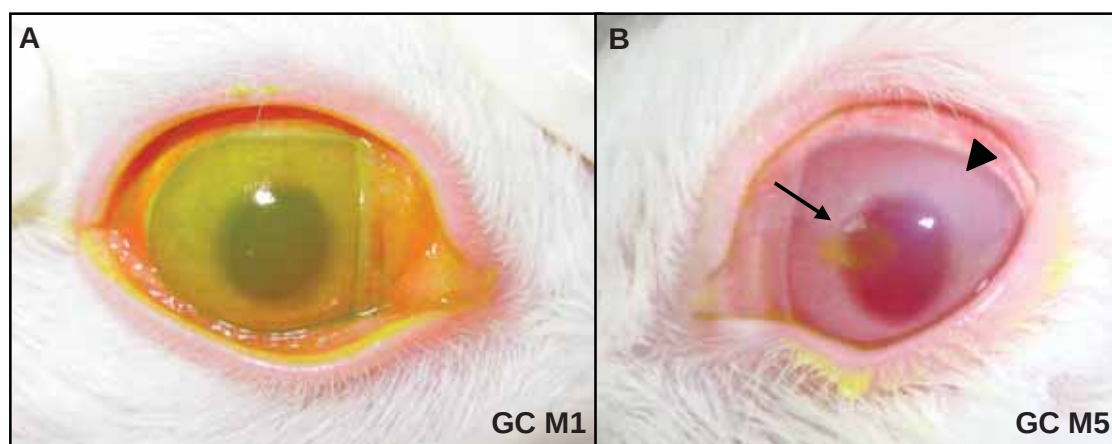


Figura 6 – Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo Controle nos diferentes momentos de avaliação. (A) Observar teste de fluoresceína positivo, evidenciando a úlcera grave no M1. (B) Notar diminuição do diâmetro da úlcera corneal (seta) e opacidade leve (cabeça de seta) em animal do M5.

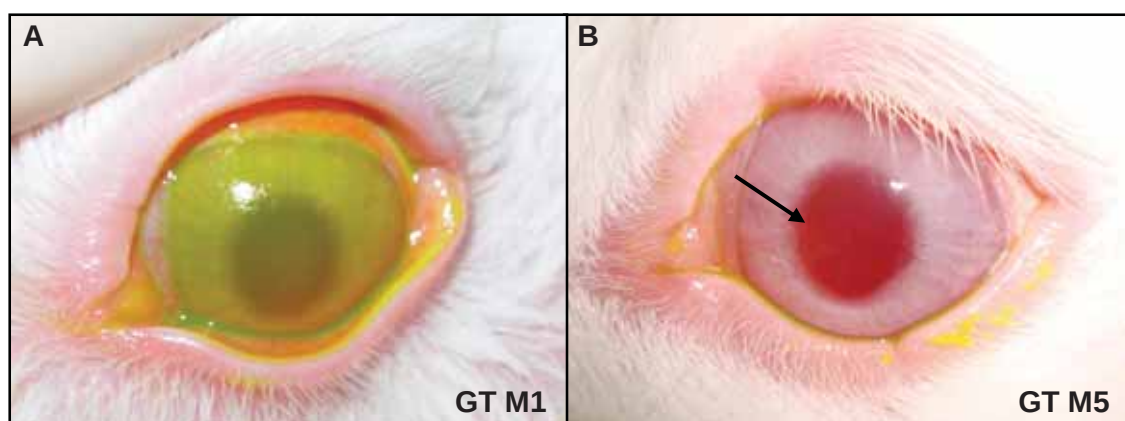


Figura 7 - Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo Tween nos diferentes momentos de avaliação. (A) Observar teste de fluoresceína positivo, evidenciando a úlcera grave no M1. (B) Notar ausência de úlcera corneal e leve opacidade (seta), no M5.

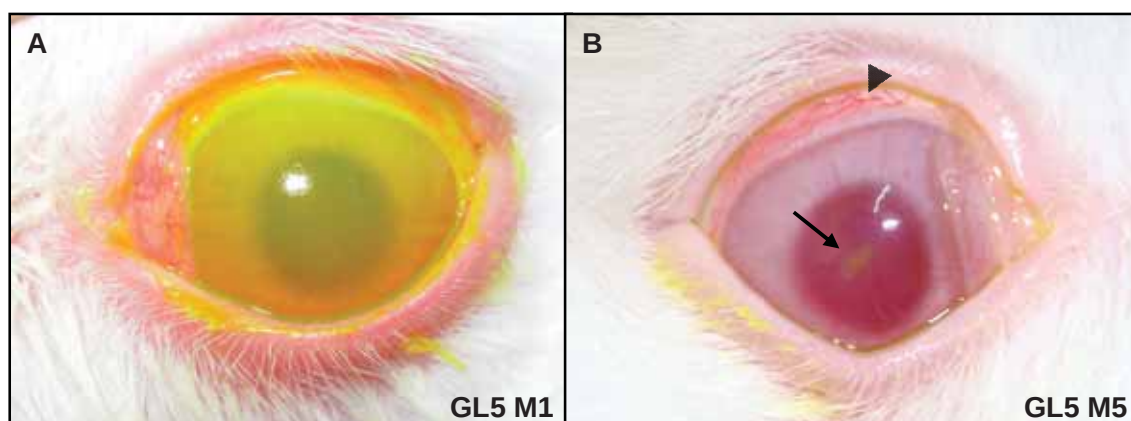


Figura 8 - Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo *Citrus lemon* 5% nos diferentes momentos de avaliação. (A) Observar teste de fluoresceína positivo, evidenciando a úlcera grave no M1. (B) No M5, observar a presença de úlcera corneal leve (seta), assim como hiperemia conjuntival moderada (cabeça de seta).

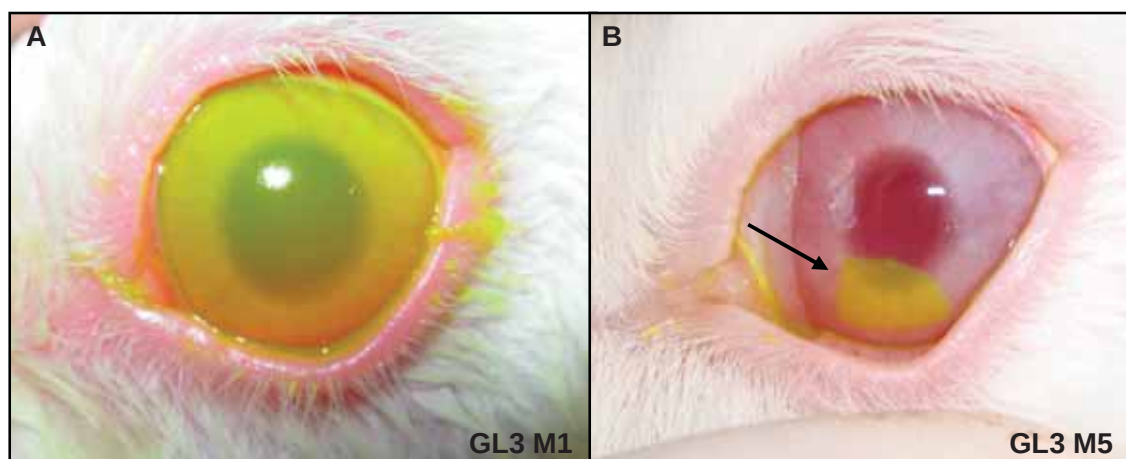


Figura 9 - Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo *Citrus lemon* 3% nos diferentes momentos de avaliação. (A) Observar teste de fluoresceína positivo, evidenciando a úlcera grave no M1. (B) Notar a úlcera corneal leve (seta) no M5.

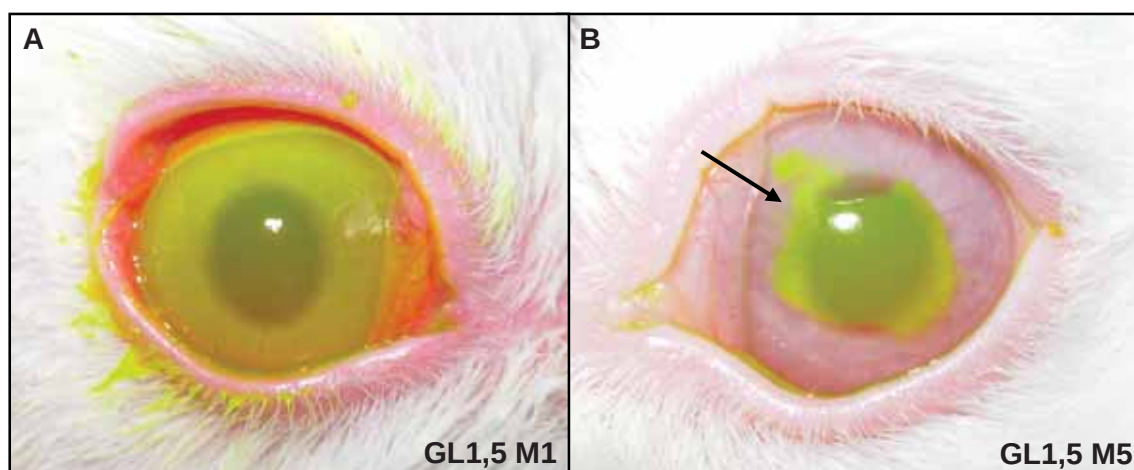


Figura 10 - Imagem fotográfica dos olhos dos coelhos do Grupo *Citrus lemon* 1,5% nos diferentes momentos de avaliação. (A) Observar teste de fluoresceína positivo, evidenciando a úlcera grave no M1. (B) Notar a úlcera corneal de intensidade moderada (seta), no M5.

DISCUSSÃO

A resposta patológica da córnea a qualquer lesão é limitada; assim, muitas afecções podem causar a sua opacidade e consequente perda da visão (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Os animais domésticos são frequentemente acometidos por afecções corneais e muitos são os estudos visando à reparação das mesmas com o mínimo possível de sequelas. Este experimento realizou indução de úlcera corneal superficial e propôs um novo tratamento à base de um produto natural de distribuição mundial, que apresenta diversas propriedades biológicas.

A ceratite ulcerativa é caracterizada por lesões corneais erosivas superficiais ou profundas, com inúmeros agentes causais, destacando-se os traumas, defeitos palpebrais, desordens relacionadas com o sistema lacrimal, além de infecções por fungos, bactérias e/ou vírus (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Apesar dessa doença ser comum na rotina oftalmológica, a realização de estudos padronizados e controlados torna-se difícil, devido à diversidade de causas relacionadas, extensão e profundidade das ceratites ulcerativas; por isso

optou-se pela indução cirúrgica de úlceras corneais em coelhos, a qual possibilitou avaliar a atuação do colírio de *Citrus lemon* na córnea em grupos homogêneos.

A utilização dos óleos essenciais no tratamento de doenças já era relatada na época do Egito antigo, no ano de 1480 a.C. (Baser & Buchbauer 2009), e estende-se até os dias atuais devido à procura por medicamentos naturais alternativos para manter a saúde. Apesar do crescente aumento no uso do óleo essencial de *Citrus lemon*, ainda são poucos os estudos científicos que comprovam as suas propriedades (Yang et al. 2010). O uso do óleo essencial de *Citrus lemon* desperta o interesse na descoberta de suas propriedades e possíveis aplicações em afecções oculares devido à ausência de relatos, na literatura consultada, considerando o seu uso em oftalmologia, além da sua ampla distribuição mundial e no Brasil, e disponibilidade à matéria-prima.

Dentre as substâncias naturais encontradas na natureza, os terpenos presentes no citrus constituem o principal composto químico com atividades antiulcerogênicas (Lewis & Hanson 1991). Além disso, pesquisas demonstraram que o principal componente presente no óleo essencial de *Citrus lemon* é eficaz na proteção da mucosa gástrica contra úlceras (Rozza et al. 2011), entretanto o seu efeito ainda não tinha sido estudado no tratamento de úlceras corneais.

Por ser um trabalho original no tratamento de ceratites ulcerativas com citrus, houve a necessidade de se estudar diferentes concentrações de colírios à base do seu óleo essencial, com o objetivo de se estabelecer a concentração com melhores resultados, proporcionando a base para estudos futuros.

O óleo essencial de *Citrus lemon* foi diluído em Tween 80 8%, que é um produto tensoativo hidrofílico, empregado para obter emulsões do tipo óleo em água. Por ser um produto oleoso, não foi possível a diluição do citrus em colírio substituto da lágrima, havendo a necessidade de um grupo para controle dos efeitos do Tween sobre a córnea.

Optou-se por instilar os colírios quatro vezes ao dia, já que o citrus possui ação antimicrobiana (Fisher & Phillips 2006) e Gilger, Bentley & Ollivier (2007) recomendam a aplicação tópica de antibióticos em úlceras superficiais não

complicadas, três a quatro vezes ao dia, apenas para prevenir infecções bacterianas secundárias.

Com a metodologia utilizada tentou-se reproduzir cirurgicamente úlceras superficiais não complicadas, que segundo Gilger, Bentley & Ollivier (2007) demoram de 2 a 6 dias para cicatrizar; enquanto Gelatt (2003) e Slatter (2005), descrevem a reepitelização corneal ocorrendo dentro de 4 a 7 dias. Para avaliar os efeitos iniciais e tardios do *Citrus lemon* no tratamento dessa doença, estabeleceu-se a avaliação dos animais em dois diferentes momentos, sendo o primeiro logo após 24 horas de tratamento e o segundo no período final de reepitelização corneal, após cinco dias de pós-operatório.

Na avaliação dos sinais clínicos oftalmológicos, que caracterizam as ceratites ulcerativas, não foram observadas diferenças estatísticas entre secreção ocular, hiperemia conjuntival, quemose e opacidade corneal, indicando um comportamento similar dos colírios de citrus e lágrima artificial. Entretanto, ao se comparar as medianas, em que os extremos são descartados, pode-se notar que tanto no primeiro momento quanto no segundo, o GL3 obteve escores mais favoráveis, de forma isolada ou junto com outros grupos. Enquanto o GL1,5 foi o grupo com pior desempenho na maioria das variáveis analisadas nos dois momentos, o que sugere que a menor concentração de *Citrus lemon* não apresentou o mesmo comportamento no alívio dos sinais clínicos causados pela ceratite ulcerativa superficial.

Ao se avaliar a quemose, o grupo tratado com óleo essencial de *Citrus lemon* a 3% foi o único que apresentou apenas um animal acometido no M1, embora a quemose tenha sido de intensidade grave, sugere-se variação individual, já que os demais grupos apresentaram de três a quatro animais com quemose de diversas intensidades. O bom resultado obtido no início do tratamento pelo GL3 demonstra a ausência de irritação conjuntival causada pelo óleo essencial de limão siciliano a 3%. Em relação à hiperemia conjuntival, outro parâmetro para se avaliar a possível irritação causada pelo citrus, os grupos GL3 e GL5 obtiveram medianas semelhantes ao GC no M1, enquanto no M5, o GL3 e GL1,5 apresentaram medianas de escore 0, já nos demais grupos foram 1,

reforçando a idéia de que esse produto natural, quando ajustado o seu pH para o neutro, pode ser utilizado de forma ocular tópica sem causar irritações.

Quanto à secreção ocular, no primeiro momento de avaliação, os grupos com melhor mediana foram o GT e o GL3, com acometimento de dois olhos cada, enquanto o GL1,5 apresentou quatro animais com secreção. No período final de avaliação, os melhores resultados foram no controle, com apenas um animal com secreção leve; os grupos GT e GL3 também obtiveram bons resultados com apenas um animal com secreção ocular moderada, e novamente o GL1,5 com três animais com secreção e a pior mediana. O fato do GT e o GL3 destacarem-se no primeiro período de avaliação e terem obtido resultados parecidos com o do GC no final, assim como a ausência de secreção purulenta nesses grupos indica um bom controle da ação microbiológica, sem que ocorra irritação da conjuntiva por parte do óleo essencial de *Citrus lemon* na concentração 3%. O que corrobora com estudos que demonstraram a ação antimicrobiana do *Citrus lemon* (Fisher & Phillips 2006, Bakkali et al. 2008).

O blefaroespasma é o espasmo tônico do músculo orbicular e avalia a sensibilidade ocular (Galera, Laus & Oriá 2009). Na avaliação desse sinal clínico, no primeiro momento, os grupos que apresentaram menos animais com blefaroespasma foram o GC, GL5 e GL3, sendo que apenas os dois últimos não apresentaram casos graves. No segundo momento de avaliação (M5), o GC foi significativamente superior ao GL1,5. Os demais grupos não diferiram significativamente, tanto do GC quanto do GL1,5. Notou-se, portanto maior sensibilidade ocular nos animais tratados com colírio de *Citrus lemon* a 1,5% em relação ao grupo controle. Entretanto, pôde-se verificar que os demais grupos não diferiram do controle, o que sugere que os colírios de limão-siciliano nas concentrações 3 e 5% não foram responsáveis pelo aumento da sensibilidade ocular, assim como o seu diluente (Tween), podendo ser utilizado no tratamento de úlceras corneais.

A extensão da lesão corneal foi outro parâmetro, importante na constatação da reepitelização da córnea após os diferentes tratamentos. No primeiro momento de avaliação não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos,

mas é interessante ressaltar que o GL3 apresentou três animais com úlcera moderada e apenas dois graves, enquanto nos grupos GC e GT, todos os animais tiveram ceratites ulcerativas graves, o que sugere um efeito positivo do colírio de *Citrus lemon* a 3% na proliferação epitelial e recobrimento do estroma, no início da reepitelização corneal. Entretanto ao se comparar os momentos, pôde-se observar úlceras de menor extensão no segundo momento, comprovadas na avaliação estatística, nos grupos GC, GT, GL5 e GL1,5; o único grupo que não demonstrou uma diminuição significativa da extensão da lesão no M5 foi o GL3, provavelmente por ter apresentado animais com úlceras menores no primeiro momento de avaliação.

Rozza et al. (2011) trataram úlceras gástricas de ratos com óleo essencial de *Citrus lemon* e observaram aumento da proliferação epitelial e celularidade da submucosa, diminuindo o tempo de cicatrização da úlcera. O bom resultado obtido pelo GL3 no início do tratamento, embora não comprovado estatisticamente, pode ser pelo efeito do *Citrus lemon* estimulando a proliferação celular.

O epitélio apresenta grande capacidade de regeneração, e consequentemente úlceras superficiais não complicadas cicatrizam rapidamente (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Já ceratites ulcerativas profundas, em que há lesão epitelial e estromal, além de maior envolvimento da flora bacteriana, apresentam mecanismos mais complexos de reparação celular (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Nesses casos, talvez o tratamento com colírio de *Citrus lemon* destaque suas propriedades, principalmente quanto ao seu efeito no estímulo da proliferação epitelial, aumento da celularidade e vascularização (Rozza et al. 2007), acelerando a cicatrização.

É importante ressaltar que se trata de um produto natural disponível no Brasil, que se mostrou bem tolerado na superfície ocular. Estudos posteriores devem ser estimulados, com modificações na metodologia; reduzindo-se o número de ensaios quanto à concentração do colírio, ampliando-se o número de animais, bem como a sua avaliação em úlceras corneais que apresentem processos de reparação mais complexos.

CONCLUSÃO

Os sinais clínicos oftalmológicos decorrentes das ceratites ulcerativas superficiais em coelhos são similares nos animais tratados com colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon* nas diferentes concentrações.

O colírio de óleo essencial de *Citrus lemon* pode ser utilizado no tratamento de ceratites ulcerativas superficiais sem induzir irritação à superfície ocular, favorecendo a reepitelização corneal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloisi A.M. Ceccarelli I., Masi F. & Scaramuzzino A. 2002. Effects of the essential oil from Citrus lemon in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. Behavioral Brain Research 136:127-135.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46:446–475.

Baser K.H.C. & Buchbauer G. 2009. Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications. Boca Raton: CRC Press. 991p.

Ceccarelli I., Lariviere W.R., Fiorenzani P., Sacerdote P. & Aloisi A.M. 2004. Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral, hormonal and neuronal parameters in male and female rats. Brain Research 1001:p.68-86.

Fisher K. & Phillips C.A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems. Journal of Applied Microbiology 101:1232-1240.

Galera P.D., Laus J.L., Oriá A.P. 2009. Afecções da túnica fibrosa, p. 69-96. In: LAUS, J.L. Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães e Gatos. 1ed. São Paulo, Roca. 248p.

Gelatt K. N. 2003. Manual de Oftalmologia Veterinária. Barueri: Manole. 594p.

Gilger B.C., Bentley E. & Ollivier F.J. 2007. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera, p. 690-752. In: Gelatt K.N. Veterinary Ophthalmology. 4.ed. Iowa, Blackwell Publishing. 1696p.

Johnson R.A. & Wichern D.W. 2002. Applied multivariate statistical analysis. 5ed. New Jersey, Prentice-Hall. 767p.

Laus J.L. 1998. Condiciones corneanas e queratoplastias. In: Congresso da Associação Mundial de Medicina Veterinária de Pequenos Animais, XXIII, Buenos Aires. Ophthalmology Presentations. Buenos Aires.

Lewis D.A. & Hanson P.J. 1991. Anti-ulcer drugs of plant origin. Progress Medicinal Chemistry 28:201-231.

Moraes T.M., Kushima H., Moleiro F.C., Santos R.C., Rocha L.R.M., Marques M.O., Vilegas W. & Hiruma-Lima C.A. 2009. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. Chemico-Biological Interactions 180:499-505.

Nasissse M.P. 1996. Canine ulcerative keratitis, p.45-57. In: Glaze M.B. The Compendium Collection: Ophthalmology in Small Animal Practice. 2. ed. New Jersey, Veterinary Learning Systems. 285p.

Rozza A.L., Moraes T.M., Kushima H., Tanimoto A., Marques M.O.M., Bauab T.M., Hiruma-Lima C.A. & Pellizzon C.H. 2011. Gastroprotective mechanisms of *Citrus*

lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions* 189:82-89.

Rozza A. L., Ortiz M., Hiruma-Lima C. A. & Pellizzon C. H. 2007. Healing activity of *Citrus lemon* (Rutaceae) fruit barks essential oil on gastric ulcer in rats: morphological and ultra-structural studies. In: XVI Congresso Italo-latinoamericano de Etnomedicina 341-342.

Sampaio R.L., Ranzani J.J.T., Júnior V.R., Stacciarini M.S., Braga E.M., Borezzi C. 2006. Aspectos clínicos e imunopatológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58(6):1077-1085.

Samuelson D.A. 2007. Ophthalmic Anatomy, p. 37-148. In: Gelatt, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 4.ed. Iowa, Blackwell Publishing. 1696p.

Slatter D. 2005. *Fundamentos de Oftalmologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo, Roca. 686p.

Tamblyn K.C., Conner D.E., Bilgili S.F. & Hall G.S. 1993. Utilization of the skin attachment model (SAM) to determine the antibacterial activity of potential carcass treatments. *Poultry Science* 72:278.

Yang S.A., Jeon S.K., Lee E.J., Shim C.H. & Lee I.S. 2010. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research* 24(2):140-151.

Formatação das referências segundo normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Capítulo 4

**EXPRESSÃO DE PCNA E AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA EM
ÚLCERAS DE CÓRNEA SUPERFICIAIS, INDUZIDAS EM
COELHOS, APÓS O USO DE COLÍRIO DE *CITRUS LEMON***

EXPRESSÃO DE PCNA E AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA EM ÚLCERAS DE Córnea Superficiais, Induzidas em Coelhos, Após o uso de Colírio de *CITRUS LEMON*.

Perches C.S.¹, Brandão C.V.S.², Ranzani J.J.T.³, Padovani C.R.⁴, Pellizzon, C.H.⁵, Donatti, C.⁶, Sereno, M.G.⁷, Fonzar J.F.⁸

1. Pós-graduanda, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, Distrito de Rubião Junior s/n, CEP 18618-970. E-mail: ciperches@yahoo.com.br
2. Professora Adjunta, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: valeriasb@fmvz.unesp.br
3. Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: quim@fmvz.unesp.br
4. Professor Titular, Departamento de Bioestatística. Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu. E-mail: bioestatistica@ibb.unesp.br
5. Professora Adjunta, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu. E-mail: claudia@ibb.unesp.br
6. Mestre, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: camila_donatti@yahoo.com.br
7. Pós-graduanda, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: lopesereno@yahoo.com.ar
8. Pós-graduanda, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, FMVZ, UNESP - Botucatu. E-mail: isdruxula@uol.com.br

Trabalho a ser enviado para revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

EXPRESSÃO DE PCNA E AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA EM ÚLCERAS DE Córnea superficiais, induzidas em coelhos, após o uso de Colírio de *CITRUS LEMON*.

ABSTRACT - Perches C.S., Brandão C.V.S., Ranzani J.J.T., Padovani C.R., Pellizzon, C.H., Donatti, C., Sereno, M.G., Fonzar J.F. [Expression of PCNA and histomorphometry evaluation in superficial corneal ulcer, induced in rabbits, after using eyedrops of *Citrus lemon*].

ABSTRACT - The ulcerative keratitis are in the most frequent diseases in ophthalmologic routine, and potentially cause blindness if treated improperly. The *Citrus lemon* (CL) essential oil is a natural product that has anti-inflammatory and antimicrobial properties, and stimulates cell proliferation. Scientific studies demonstrated its action on the prevention and treatment of gastric ulcers, however, the use of this product has not been described in ophthalmology in the treatment of corneal ulcers. The aim of this study was to evaluate and compare through histomorphometry and immunohistochemistry for PCNA, the repair process in superficial corneal ulcers induced in rabbits using eyedrops of *Citrus lemon* essential oil. Fifty female rabbits were used and divided into 5 experimental groups of 10 animals each one. Every animal underwent induction of experimental superficial ulcer. Three groups were treated with eyedrops of *Citrus lemon* essential oil in different concentrations, being 1.5% (GL1, 5), 3% (GL3) and 5% (GL5). Another group was treated with Tween 80 8% (GT), which is the solvent used in the production of eyedrops of CL; the control group (CG) received only tear substitute. All eyedrops were applied four times daily. The experimental groups were divided into two subgroups with five animals each one, according to the final evaluation periods. The first subgroup (M1) was evaluated after 24 hours and the second (M5) after 5 days. In the comparison between the initial and final moments, the groups treated with tear substitute, Tween 80 8% and eyedrops of *Citrus lemon* essential oil 5% led to an increase in epithelial thickness at the periphery of the cornea and a higher percentage of cell proliferation. However, total cellularity

increased, represented mainly by inflammatory cells, was observed in treatment with *Citrus lemon* 1.5% in the final evaluation period.

Index Terms: sicilian lemon, ulcerative keratitis, PCNA, histology

RESUMO

As ceratites ulcerativas estão entre as doenças de maior ocorrência na rotina oftalmológica, sendo potenciais causadoras de cegueira quando tratadas de forma inadequada. O óleo essencial de *Citrus lemon* (CL) é um produto natural que possui propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias, além de estimular a proliferação celular. Trabalhos científicos demonstram sua ação na prevenção e tratamento de úlceras gástricas, entretanto, seu uso ainda não foi descrito em oftalmologia. O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar por meio de histomorfometria e imuno-histoquímica para PCNA, o processo de reparação corneal de úlceras superficiais induzidas em coelhos, frente à utilização de colírios de óleo essencial de *Citrus lemon*. Foram utilizadas 50 fêmeas da espécie leporina, constituindo-se 5 grupos experimentais de 10 animais cada. Todos os animais foram submetidos à indução da úlcera superficial experimental. Em três grupos foram instilados colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, em diferentes concentrações, sendo 1,5% (GL1,5), 3% (GL3) e 5% (GL5). Outro grupo foi tratado com Tween 80 8% (GT), que é o diluente utilizado na produção dos colírios de CL; o grupo controle (GC) recebeu apenas substituto da lágrima. Todos os colírios foram aplicados quatro vezes ao dia. Os grupos experimentais foram distribuídos em dois subgrupos, com cinco animais cada, de acordo com os períodos finais de avaliação. O primeiro subgrupo (M1) foi avaliado após 24 horas e o segundo (M5) após 5 dias. Nas comparações entre os momentos iniciais e finais, os grupos tratados com substituto da lágrima, Tween 80 8% e colírio à base de óleo essencial de *Citrus lemon* 5% promoveram aumento na espessura epitelial na periferia da córnea e maior percentual de proliferação celular. Entretanto, a maior celularidade total, representada principalmente por células inflamatórias, foi observada no tratamento com *Citrus lemon* 1,5% no período final de avaliação.

Termos de Indexação: limão siciliano, ceratite ulcerativa, PCNA, histologia

INTRODUÇÃO

A córnea é composta por quatro camadas: epitélio e sua membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O epitélio corneal é simples, escamoso e não queratinizado, de espessura variável (25 a 40µm), com padrão básico de membrana basal, células epiteliais basais, células aladas e células superficiais escamosas (Samuelson 2007). O estroma representa 90% da espessura corneal e é composto por fibrócitos, denominados ceratócitos, dispostos de maneira ordenada formando camadas laminares sobrepostas (Herrera 2008).

A ceratite ulcerativa é caracterizada por lesões erosivas corneais com perda de epitélio e exposição do estroma. Os principais agentes causais são os traumas, defeitos palpebrais, desordens do sistema lacrimal, além de infecções por fungos, bactérias e/ou vírus (Gilger, Bentley & Ollivier 2007).

O epitélio apresenta grande capacidade de regeneração, assim, após uma lesão, as células epiteliais entram em mitose e deslizam em direção ao centro da lesão, preenchendo o defeito (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Dentro de 4 a 7 dias ou menos toda a córnea é reepitelizada (Gelatt 2003, Slatter 2005).

Se todo o epitélio corneal for removido, o estroma será recoberto por deslizamento de células do epitélio do limbo, sendo completamente reposto em duas semanas. Após 4 a 5 semanas, em coelhos, o epitélio conjuntival assume as características morfológicas de epitélio corneal normal (Gilger, Bentley & Ollivier 2007).

O PCNA é uma proteína expressada durante a mitose celular (Miller et al. 2010); sua imunomarcagem tem sido utilizada em diversas pesquisas de proliferação celular em córneas humanas e de animais, e a sua especificidade é garantida por muitas evidências que certificam-no como um valioso marcador (Gan, Fagerholm & Kim 1999).

A expressão do PCNA após remoção do epitélio e parte do estroma por ceratectomia fotorefrativa, inicia-se após 24 horas e é observada primeiramente nas células epiteliais das bordas da lesão; passadas 48 horas, a sua expressão já

pode ser observada em todo o epitélio em regeneração, diminuindo após duas semanas (Gan et al., 2001). Yew et al. (2000) também observaram a presença de PCNA no epitélio do limbo, porém, decorridas apenas 12 horas do debridamento epitelial de córneas de coelhos, com o pico da sua expressão após 48 horas.

Os óleos essenciais são extraídos de várias plantas e conhecidos por suas propriedades antissépticas e medicinais de sua fragrância (aromaterapia). São usados na preservação de alimentos, como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e agentes anestésicos locais, entre outros (Bakkali et al. 2008). Geralmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (Pichersky, Noel & Dudareva 2006).

Citrus lemon Burm. f. pertence à família Rutaceae e é popularmente conhecido no Brasil como limão-siciliano (Aloisi et al. 2002, Cecarelli et al. 2004). Os seus maiores componentes são dois monoterpenos: limoneno e β -pineno, sendo o primeiro, o principal constituinte dos óleos essenciais de citrus (Rozza et al. 2011). Esse produto natural possui propriedades biológicas, tais como efeito bactericida (Fisher & Phillips 2006) e atividades antiulcerogênicas (Lewis & Hanson 1991).

O tratamento de úlceras gástricas de ratos com *Citrus lemon* promoveu aumento na proliferação celular, vascularização e de células importantes na resposta às lesões locais, diminuindo o tempo de cicatrização da úlcera (Rozza et al. 2007). Adicionalmente, foi capaz de evitar a formação da úlcera gástrica, por estímulo à produção de muco, efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Rozza et al. 2011). Moraes et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes com o uso de limoneno como protetor da mucosa gástrica.

O presente estudo teve como objetivo, avaliar, por meio de histomorfometria e imuno-histoquímica para PCNA, o processo de reepitelização corneal de úlceras superficiais, induzidas experimentalmente em coelhos, frente ao uso de colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5%, 3% e 5%.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 50 fêmeas da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*) pertencentes ao grupo genético Botucatu, com idade variando entre 90 e 180 dias e peso entre 2 e 4 Kg. Os coelhos foram fornecidos pelo biotério central da UNESP, Campus de Botucatu.

Os animais foram submetidos aos exames clínicos e oftalmológicos de rotina com auxílio de lâmpada de fenda portátil²⁰, bem como ao teste de Schirmer²¹, à tonometria²² e à oftalmoscopia direta²³. Após o procedimento cirúrgico, os coelhos foram identificados e mantidos em gaiolas individuais com água potável e ração comercial²⁴ *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais desenvolvidos seguiram as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) e foram submetidos à Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Protocolo número 174/2008 CEEA.

Obtenção e diluição do Tween 80

Realizou-se a diluição do Polissorbato 80, conhecido como Tween 80²⁵, em solução fisiológica²⁶, na proporção 1:10, obtendo-se a concentração de 8%; em seguida, a solução foi submetida à agitação por 15 minutos em temperatura ambiente para homogeneização.

²⁰ Lâmpada de fenda portátil Kowa SL-15®

²¹ Teste de Schirmer Ophthalmos®

²² Tonômetro de aplanção Tono Pen®- Med Tronic

²³ Oftalmoscópio direto Welch Allyn®

²⁴ Coelhil S - Socyl

²⁵ Tween 80 - Labsynth

²⁶ Solução Fisiológica NaCl 0,9% 250mL - Med Flex

Obtenção do colírio de óleo essencial de *Citrus lemon*

O óleo essencial de *Citrus lemon*²⁷ foi diluído, no momento do seu uso, em solução de Tween 80 8%, a fim de se obter as concentrações de 1,5%, 3% e 5%, constituindo deste modo, os respectivos colírios. O pH da solução foi ajustado em 7,2, adicionando-se ácido clorídrico (quando necessário a diminuição do pH) ou hidróxido de sódio (quando necessário o aumento do pH). As soluções foram preparadas em capela de fluxo lamelar unidirecional, estocadas a temperatura de 4°C, protegidas da luz e utilizadas por até 5 dias.

A composição do óleo essencial de *Citrus lemon* utilizado no experimento, apresentou o limoneno como seu principal componente, representando 70,75%, seguido pelo β -pineno com 13,19% e pelo γ -terpineno com 9,19%.

Grupos experimentais

Os 50 animais foram distribuídos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais, designados Grupo Controle (GC), Grupo Tween 80 8% (GT) e três grupos de colírios à base de *Citrus lemon* (GL), em diferentes concentrações, sendo 1,5% (GL1,5), 3% (GL3) e 5% (GL5). Cada grupo foi constituído por 10 animais.

No GC, foi instilado colírio substituto da lágrima²⁸. No GT, as animais foram tratados com colírio de Tween 80 na concentração 8%. E os grupos GL1,5, GL3 e GL5, foram tratados com colírio à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5%, 3% e 5%, respectivamente.

Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com quetamina²⁹ (20mg/Kg) via intramuscular (IM), associada à xilazina³⁰ (1mg/Kg) IM e à morfina³¹ (0,5mg/Kg)

²⁷ Citrus lemon - Ferquima

²⁸ Lacrima plus® (hipromelose e dextrano 70) - Alcon

²⁹ Dopalen® - Vetbrands

³⁰ Anasedan® - Vetbrands

³¹ Dimorf® - Cristália

IM. Adicionalmente, foi feita a anestesia tópica ocular por meio de utilização de colírio anestésico³².

Os procedimentos operatórios foram realizados com auxílio de microscópio cirúrgico³³ após antissepsia utilizando solução de polivinilpirrolidona³⁴ a 1:50 e colocação de panos fenestrados oftálmicos estéreis. A fixação mecânica das pálpebras foi feita com blefarostato Barraquer infantil. Para a indução da úlcera corneal, uma haste de algodão foi embebida em n-heptanol e aplicada sobre a córnea a partir do limbo, de forma centrípeta, mantendo o contato do álcool com a córnea durante 3 minutos. A remoção do epitélio foi realizada com uma haste de algodão seca, e posteriormente, a superfície ocular foi lavada com 60 ml de solução fisiológica estéril a 0,9% para a remoção dos debris e álcool remanescentes (Sampaio et al. 2006).

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de indução de úlcera de córnea experimental.

Pós-operatório

No pós-cirúrgico imediato e a cada 12 horas, foi administrado em todos os animais, o antiinflamatório à base de meloxicam³⁵ (0,2 mg/kg), por via subcutânea (SC), além de morfina³⁶ (2 mg/Kg) SC, durante três dias, visando maximizar o conforto pós-operatório.

Os animais foram medicados com os colírios, de acordo com o seu grupo experimental, quatro vezes ao dia, iniciando-se o tratamento logo após a recuperação anestésica. Na região ocular foram feitas limpezas diárias das pálpebras, quando necessário, com solução salina a 0,9%³⁷, até o final do período

³² Anestalcon® - Cloridrato do proximetacaína 0,5% - Alcon

³³ Microscópio Cirúrgico Karl Kaps, modelo SOM 62 Standarad, Alemanha

³⁴ PVPI - Iodo anti-séptico aquoso/ Brasiliquidos Produtos Farmacêuticos/ Comercial Bono LTDA

³⁵ Movatec® - Meloxicam solução injetável – Boehringer Ingelheim

³⁶ Dimorf® - Cristália

³⁷ Solução Fisiológica NaCl 0,9% 250mL - Med Flex

de avaliação de cada animal.

Momentos de avaliação

Todos os grupos foram divididos em dois subgrupos constituídos por cinco animais cada, de acordo com o seu período final de avaliação, ou seja, M1, avaliados 24 horas pós-cirurgia (dia 1) e M5, no quinto dia pós-operatório.

Avaliação histomorfométrica

No final do período de avaliação de cada subgrupo, os animais foram eutanasiados, após anestesia com acepromazina³⁸ (1,5 mg/Kg) e quetamina³⁹ (20 mg/Kg) via intramuscular, seguida pela administração intravenosa de tiopental⁴⁰ (25 mg/Kg) e de cloreto de potássio 19,1%⁴¹ (2 mL/Kg). Em seguida, procedeu-se a enucleação dos olhos operados.

O bulbo ocular foi fixado em formaldeído 10%⁴² durante 48 horas, e a seguir, fixado em solução de álcool a 70%⁴³. As córneas foram isoladas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes por microtomia (4 micrômetros), aplicados sobre lâminas, corados pelo método de hematoxilina/eosina (HE)⁴⁴ e analisados ao microscópio de luz para realização da análise descritiva.

Para a análise da celularidade foi utilizado o microscópio Leica DM® acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.5.0. Foram capturadas 10 imagens de cada corte histológico, que foram posteriormente analisadas, de forma quantitativa, no programa AVSoft BioView 4®. Para se obter a celularidade, foram contadas células epiteliais, do estroma (ceratócitos) e células inflamatórias (neutrófilos, histiócitos, linfócitos e eosinófilos).

³⁸ Acepran 0,2% - Univet

³⁹ Dopalen® - Vetbrands

⁴⁰ Thiopentax 1g - Cristália

⁴¹ Cloreto de Potássio 19,1% - Farmace

⁴² Formol – solução 10%/ Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda

⁴³ Álcool Zulu absoluto 99,3º INPM/Companhia Nacional do Álcool

⁴⁴ Corantes Merck

Além disso, também foi contado manualmente o número total de células epiteliais encontradas nesses dez cortes histológicos.

A análise morfométrica também foi realizada utilizando-se o analisador de imagens Leica QWin Standard Versão 3.5.0., para medições manuais. Na análise morfométrica, avaliou-se a espessura do epitélio e do estroma corneal. O epitélio foi mensurado em três diferentes regiões, sendo a medida periférica referente ao epitélio localizado na periferia da córnea e a medida central na região central da córnea. A medida denominada ponto médio foi obtida na região entre as medidas periférica e central. A espessura do estroma foi aferida na região central da córnea. Foram realizadas dez medidas de cada região, sendo sua média considerada como a espessura final.

Avaliação da proliferação celular

Para a avaliação da proliferação celular, foi realizada imuno-histoquímica para PCNA⁴⁵ (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), marcador de divisão celular, segundo a técnica abaixo descrita.

Após a inclusão das córneas em parafina, foram realizados cortes por microtomia (3 micrômetros) e aplicados sobre lâminas. Em seguida, estas foram desparafinizadas, reidratadas e destinadas à imuno-histoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com H₂O₂ e leite desnatado à 1%; para a recuperação antigênica, utilizou-se tampão citrato aquecido. As amostras foram incubadas com anticorpo específico, anti PCNA, em solução de bloqueio (leite desnatado 1%) por duas horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubadas em anticorpo secundário⁴⁶ e revelado com o Avidina-Biotina associado com 3-3'-diaminobenzina tetrahydrochloride⁴⁷.

As lâminas foram analisadas no microscópio Leica DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.5.0.; foram

⁴⁵ Proliferating Cell Nuclear Antigen - Novocastra Laboratories Ltda

⁴⁶ Super ABC Kit Universal – Easy Path

⁴⁷ DAB – Sigma

capturadas dez imagens de cada amostra; as células epiteliais totais e as marcadas para PCNA foram contadas manualmente, obtendo-se a porcentagem de células epiteliais em divisão.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se a técnica da análise de variância não paramétrica (histomorfometria e PCNA) e paramétrica (celularidade), para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, com nível de 5% de significância ($P < 0,05$) (Johnson & Wichern 2002). Para a avaliação estatística do número total de células epiteliais foi utilizada a técnica de análise de variância não paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn, considerando o nível de 5% de significância (Zar 2009).

RESULTADOS

Histomorfometria

Na avaliação histomorfométrica da periferia da córnea, os grupos GL5 e GL3 apresentaram espessura mediana ao redor de 6 a 8 μm (Figura 1), enquanto nos grupos GC, GT e GL1,5, a maioria dos cortes histológicos da córnea apresentou ausência de epitélio na periferia; as córneas portadoras de epitélio apresentaram de uma a duas camadas, compostas por células arredondadas. Nas regiões do ponto médio (Figura 2) e central não se observou epitélio no primeiro dia de avaliação.

No subgrupo M5, verificou-se a presença de epitélio na periferia da córnea em todos os grupos, com espessura variando de 15 a 27 μm , os grupos GL3 e GL5 foram os que apresentaram os maiores valores de mediana (Tabela 1); o número de camadas celulares variou de 2 a 6, sendo que a maioria das córneas apresentou de 3 a 4 camadas de células epiteliais e células arredondadas na camada basal. No ponto médio, todos os grupos possuíam epitélio, com valores de espessura variando de 10,13 (GL1,5%) a 17,62 (GC); presença de 1 a 4

camadas de células epiteliais, com a maioria dos animais apresentando 2 a 3 camadas celulares e células arredondadas na camada basal. Na medida central da córnea, o GT apresentou espessura mediana de 9,18 μm , enquanto a maioria dos animais dos demais grupos apresentou ausência de epitélio; o número de camadas celulares epiteliais variou de 0 a 4.

O estroma encontrava-se íntegro em todos os cortes avaliados, com valores medianos entre 420 e 560 μm , tanto no M1 quanto M5.

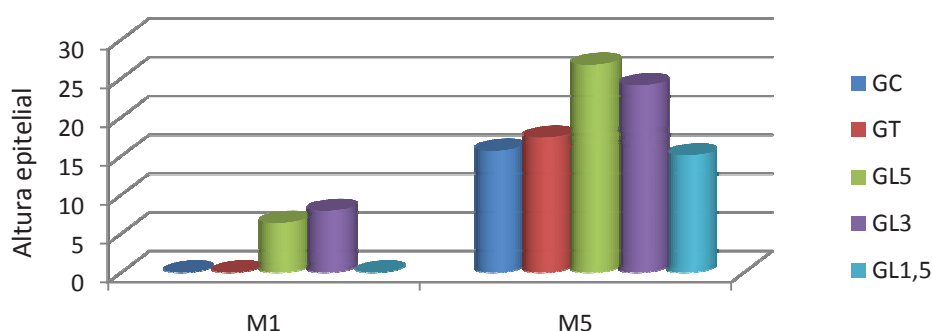


Figura 1 – Representação das medianas da altura epiteliais (em micrômetros) da região da periferia corneal, nos diferentes grupos e momentos (M) de avaliação em dias; GC - Grupo Controle, GT-Grupo Tween, GL5 - Grupo *Citrus lemon* 5%, GL3 - Grupo *Citrus lemon* 3% e GL1,5 - Grupo *Citrus lemon* 1,5%.

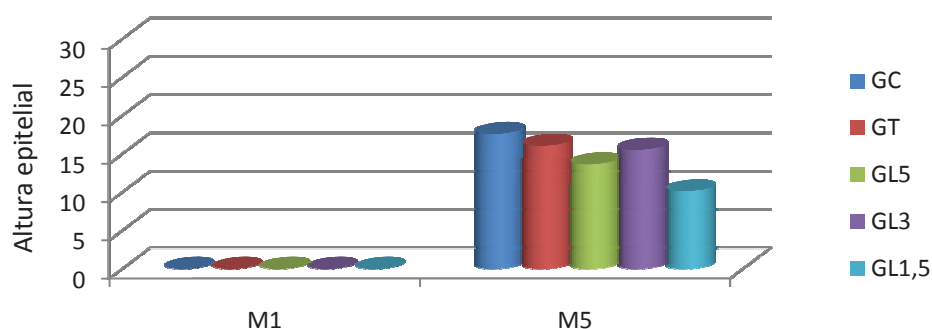


Figura 2 – Representação das medianas da altura epiteliais (em micrômetros) no ponto médio, região entre a periferia corneal e o centro, do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo *Citrus lemon* 5%), GL3 (Grupo *Citrus lemon* 3%) e GL1,5 (Grupo *Citrus lemon* 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação, em dias.

Tanto no subgrupo M1 quanto no M5, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, quando comparados os grupos dentro de uma mesma medida, e quando comparadas as medidas do epitélio (periferia, ponto médio e central) dentro do mesmo grupo; também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos relacionadas à espessura do estroma (Tabela 1).

Porém, quando comparados os grupos entre os momentos, pôde-se verificar um aumento significativo da espessura periférica do epitélio no GC, GT e GL5, com a evolução do pós-operatório (M5). No ponto médio, o epitélio corneal foi estatisticamente maior em todos os grupos do M5 em relação ao M1, diferentemente da área central da córnea, em que os valores foram similares.

Quanto ao estroma, no GT, verificou-se espessura estromal maior no M1 em relação ao M5; já os demais grupos não diferiram (Tabela 1).

Celularidade

Na celularidade corneal total, a qual evidenciou principalmente as células inflamatórias (neutrófilos, histiócitos, linfócitos e eosinófilos), não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos nos diferentes momentos de avaliação. Porém observou-se aumento significativo desta (Figura 11), no M5 do grupo GL1,5 em relação ao M1. Os demais grupos comportaram-se de maneira semelhante nos dois momentos (Tabela 2).

A avaliação da celularidade total dos cortes histológicos está apresentada na Figura 3 e Tabela 2.

Tabela 1 – Mediana, valores mínimos e máximos da espessura (μm) das regiões do epitélio da córnea e estroma central, segundo os momentos de avaliação (em dias) e grupos; GC - Grupo Controle, GT - Grupo Tween, GL5 - Grupo *Citrus lemon* 5%, GL3 - Grupo *Citrus lemon* 3% e GL1,5 - Grupo *Citrus lemon* 1,5%.

		Medida			
Momento	Grupo	Periferia	Ponto médio	Central	Estroma
M1	GC	0,00 (0,00; 12,27) a* A α	0,00 (0,00; 0,00) aA** α	0,00 (0,00; 0,00) aA α ***	561,82 (352,58; 619,38) aA β
	GT	0,00 (0,00; 14,92) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	527,41 (417,28; 622,00) aB β
	GL5	6,40 (0,00; 9,46) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	491,92 (339,11; 652,09) aA β
	GL3	7,96 (0,00; 14,41) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	509,02 (412,49; 623,19) aA β
	GL1,5	0,00 (0,00; 28,07) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	0,00 (0,00; 0,00) aA α	556,95 (378,71; 566,58) aA β
M5	GC	15,69 (11,64; 34,26) aB α	17,62 (8,88; 38,77) aB α	0,00 (0,00; 22,38) aA α	471,64 (215,02; 550,41) aA β
	GT	17,38 (10,75; 21,86) aB α	16,07 (7,56; 35,07) aB α	9,18 (0,00; 24,03) aA α	397,24 (184,78; 437,01) aA β
	GL5	26,77 (17,23; 34,35) aB α	13,63 (9,72; 22,93) aB α	0,00 (0,00; 19,99) aA α	424,85 (391,90; 559,92) aA β
	GL3	24,10 (8,64; 30,70) aA α	15,56 (5,74; 21,23) aB α	0,00 (0,00; 25,17) aA α	535,93 (264,10; 674,06) aA β
	GL1,5	15,08 (8,27; 24,54) aA α	10,13 (6,48; 13,86) aB α	0,00 (0,00; 9,41) aA α	470,58 (367,46; 549,97) aA β

* duas medianas seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem ($p>0,05$) quanto aos respectivos grupos fixados o momento de avaliação e a medida.

** duas medianas seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem ($p>0,05$) quanto aos respectivos momentos de avaliação fixados o grupo e a medida.

*** duas medianas seguidas de uma mesma letra grega não diferem ($p>0,05$) às respectivas medidas fixados o grupo e o momento de avaliação.

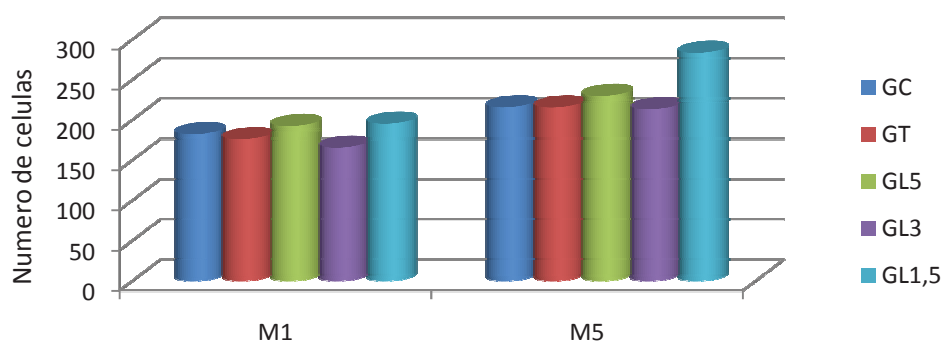


Figura 3 – Representação das médias da celularidade encontrada nos cortes histológicos do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo *Citrus lemon* 5%), GL3 (Grupo *Citrus lemon* 3%) e GL1,5 (Grupo *Citrus lemon* 1,5%), nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da celularidade segundo grupo e momento de avaliação.

Grupo	Momento de avaliação	
	(M1) 1 dia	(M5) 5 dias
GC	182,20 ± 46,28 aA	215,68 ± 40,80 aA
GT	176,00 ± 80,41 aA	215,52 ± 44,86 aA
GL5	192,30 ± 53,38 aA	229,90 ± 31,46 aA
GL3	165,34 ± 15,05 aA	213,10 ± 44,20 aA
GL1,5	195,20 ± 58,17 aA	283,12 ± 71,99 aB

*Letras minúsculas comparam os grupos fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo. Letras iguais representam diferenças não significativas ($p > 0,05$).

Na avaliação do número total de células epiteliais, obtidas em dez campos histológicos, notou-se um aumento significativo da quantidade de células epiteliais, nos grupos GC, GT, GL5 e GL1,5, do M1 em relação ao M5. Quando comparados os grupos dentro do mesmo momento não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Mediana e valores mínimos e máximos do número total de células epiteliais segundo grupo e momento de avaliação.

Grupo	Momento de avaliação	
	(M1) 1 dia	(M5) 5 dias
GC	107,5 (0,00; 268,00) aA	465,5 (328,00; 856,00) aB
GT	67,0 (0,00; 170,00) aA	728,0 (408,00; 1377,00) aB
GL5	22,5 (0,00; 124,00) aA	635,5 (507,00; 807,00) aB
GL3	118,0 (0,00; 446,00) aA	559,0 (410,00; 706,00) aA
GL1,5	0,00 (0,00; 85,00) aA	348,5 (299,00; 388,00) aB

*Letras minúsculas comparam os grupos fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo. Letras iguais representam diferenças não significativas ($p>0,05$).

Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)

A imunomarcagem celular para PCNA foi evidenciada apenas no epitélio da córnea e foi observado em todos os cortes histológicos portadores do mesmo, com variação da porcentagem de células em divisão em relação ao número total de células. A exceção foi um animal do grupo GL3 do M1 que não apresentou imunomarcagem, apesar de apresentar 18 células epiteliais.

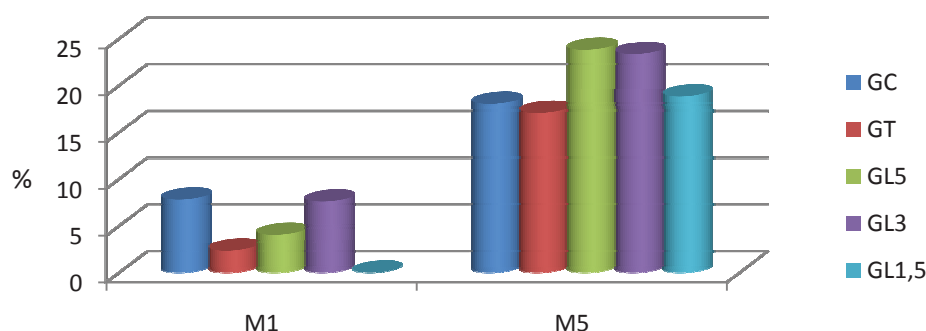


Figura 4 – Representação das medianas da porcentagem de células marcadas para PCNA do GC (Grupo Controle), GT (Grupo Tween), GL5 (Grupo *Citrus lemon* 5%), GL3 (Grupo *Citrus lemon* 3%) e GL1,5 (Grupo *Citrus lemon* 1,5%) nos diferentes momentos (M) de avaliação em dias.

Os grupos avaliados comportaram-se de maneira similar nos diferentes momentos de avaliação (Tabela 4) quanto à porcentagem de células marcadas

para PCNA, que representam as células em mitose. Os grupos que apresentaram maiores percentuais numéricos de imunomarcação foram o GC e GL3 no M1; e os grupos GL5 e GL3 no M5. Entretanto, observou-se aumento significativo da divisão e multiplicação das células epiteliais no M5 dos grupos GC, GT e G5, em relação ao M1.

Tabela 4 - Mediana e valores mínimos e máximos da porcentagem de células marcadas para PCNA, segundo grupo e momento de avaliação.

Grupo	Momento de avaliação	
	(M1) 1 dia	(M5) 5 dias
GC	7,79 (0,00; 10,00) aA	18,02 (14,33; 24,26) aB
GT	2,35 (0,00; 11,19) aA	17,06 (12,93; 22,51) aB
GL5	4,03 (0,00; 20,00) aA	23,81 (11,44; 26,15) aB
GL3	7,60 (0,00; 30,27) aA	23,36 (15,99; 41,08) aA
GL1,5	0,00 (0,00; 25,88) aA	18,82 (7,73; 25,00) aA

*Letras minúsculas comparam os grupos fixado o momento de avaliação. Letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo. Letras iguais representam diferenças não significativas ($p>0,05$).

Nas figuras 5 e 6 estão representados, respectivamente, o corte histológico de córnea normal de coelho e de um animal do GL5 (M5), submetido aos procedimentos experimentais.

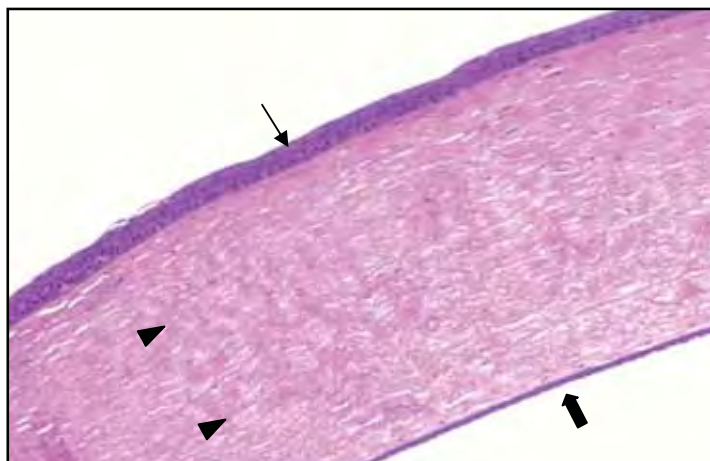


Figura 5 – Corte histológico de córnea normal de coelho. Observar epitélio simples, escamoso e não queratinizado (seta); o estroma, representando a maior espessura corneal (cabeça de seta), com baixa celularidade; membrana de Descemet e endotélio (seta larga) (Coloração HE – obj. 200x).

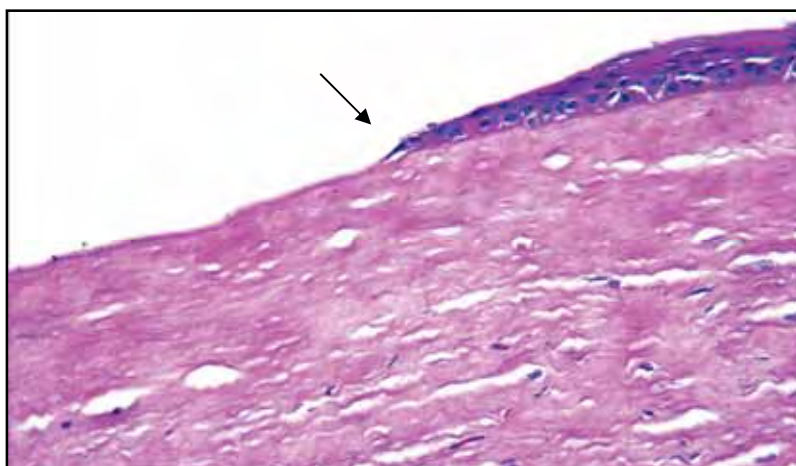


Figura 6 – Corte histológico de córnea de coelho pertencente ao GL5, aos cinco dias do pós-operatório. Notar área de transição entre a úlcera corneal superficial e a reepitelização (seta) (Coloração HE – obj. 400x).

Nas figuras 7 a 11 estão representadas regiões avaliadas por histomorfometria nos diferentes grupos experimentais e momentos de avaliação.

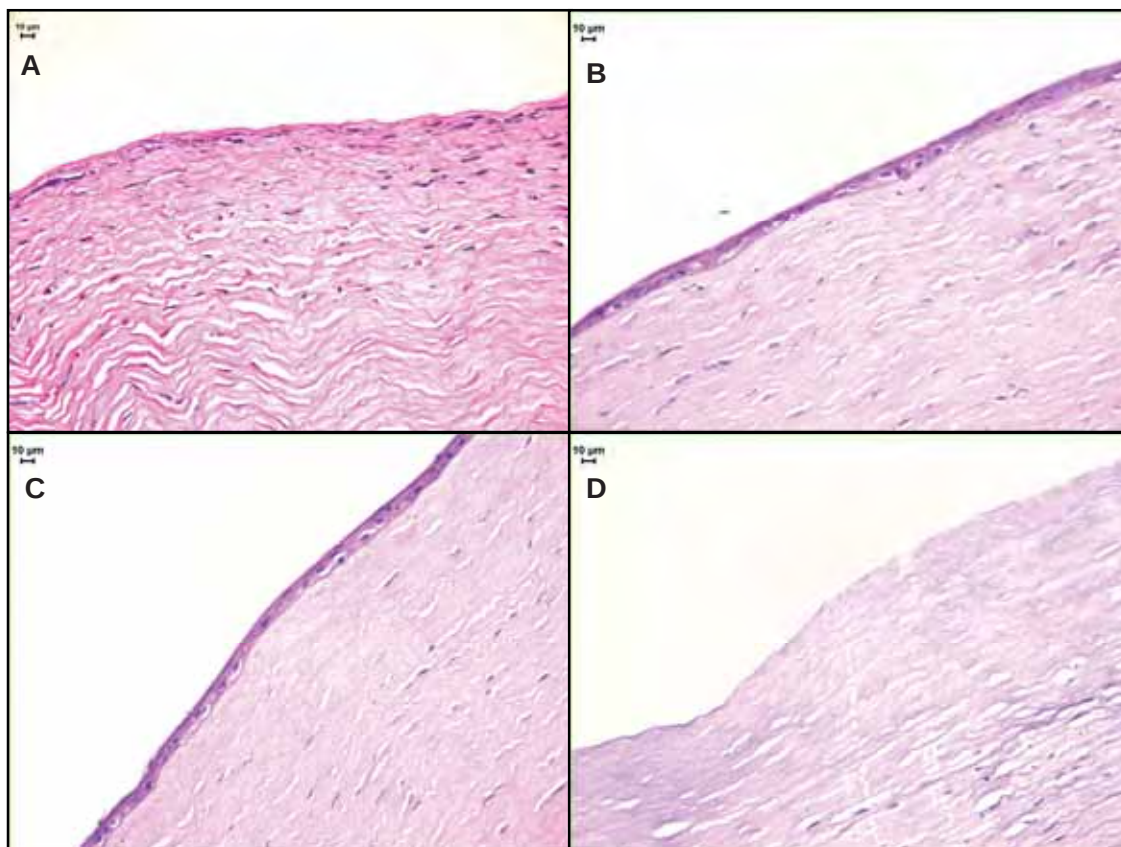


Figura 7 – Cortes histológicos de córnea do Grupo Controle. (A) Região da periferia da córnea no M1, notar ausência de epitélio e estroma íntegro, porém com a presença de moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear. (B) Região periférica no M5, observar células epiteliais dispostas em duas camadas. (C) Região do ponto médio corneal do M5, observar o epitélio recobrimdo todo o estroma. (D) Região central da córnea do M5, notar a ausência de epitélio e discreto infiltrado inflamatório (Coloração HE – obj. 400x).

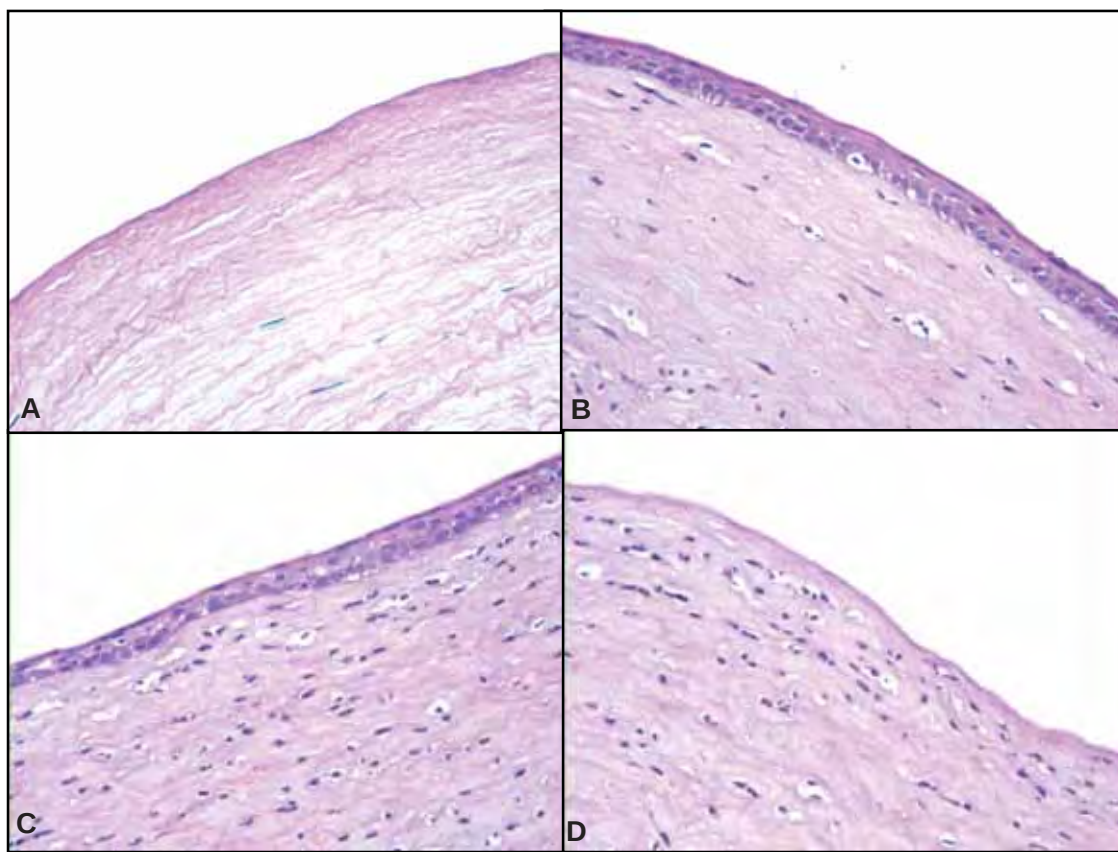


Figura 8 – Cortes histológicos de córnea do Grupo Tween. (A) Região da periferia no M1, notar ausência de epitélio, estroma íntegro com discreta celularidade. (B) Região periférica no M5, verificar células epiteliais dispostas de forma regular, recobrando a camada estromal. (C) Região do ponto médio corneal no M5, observar a reepitelização e o aumento da celularidade no estroma, em relação a A. (D) Região central da córnea no M5, observar a ausência de epitélio e maior celularidade estromal (Coloração HE – obj. 400x).

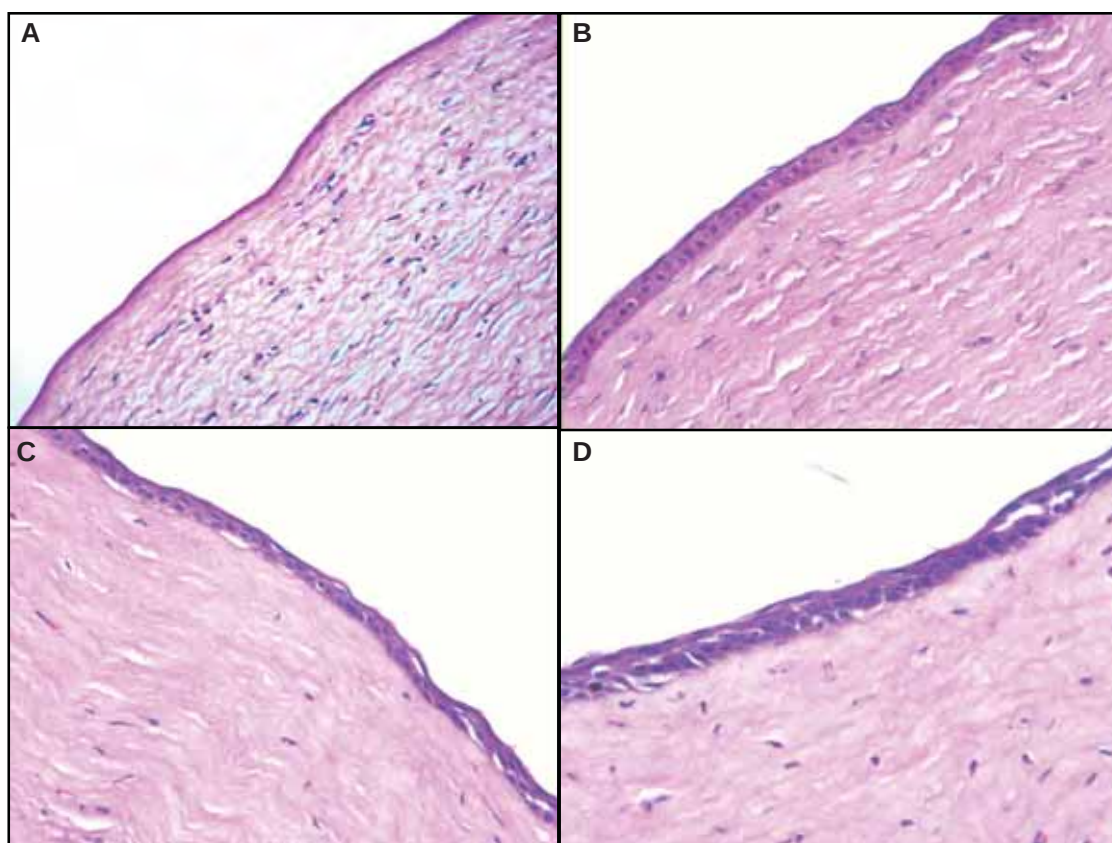


Figura 9 – Corte histológico de córnea de coelhos do Grupo *Citrus lemon* 5%. (A) Região da periferia corneal no M1, notar ausência de epitélio, estroma sem lesões e com infiltrado inflamatório. (B) Região periférica no M5, observar o epitélio recobrindo todo o estroma. (C) Região do ponto médio no M5, com a presença de células epiteliais dispostas de forma regular em três camadas. (D) Região corneal central do M5, observar a completa reepitelização e diminuição da celularidade em relação a A (Coloração HE – obj. 400x).

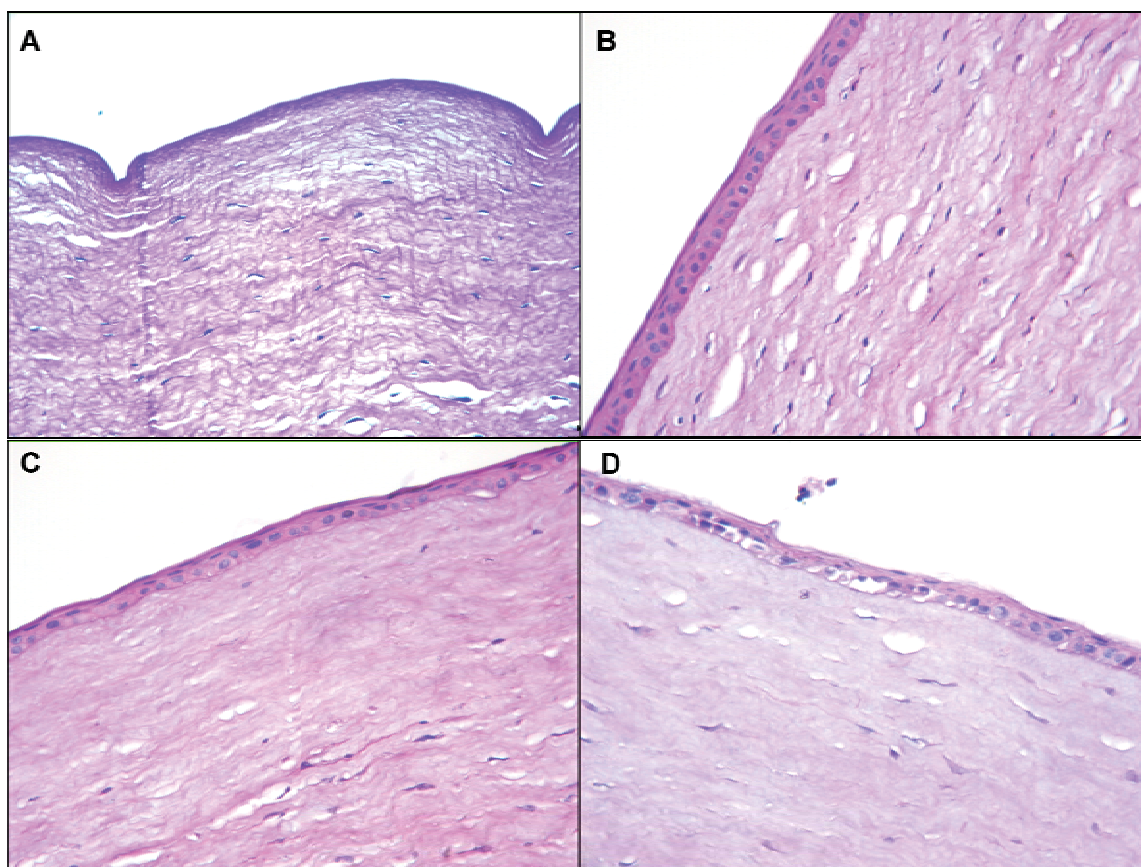


Figura 10 – Corte histológico de córnea de coelhos do Grupo *Citrus lemon* 3%. (A) Região da periferia corneal no M1, observar a ausência de reepitelização e estroma íntegro. (B) Região periférica no M5, notar a presença de células epiteliais dispostas de forma regular em três camadas. (C) Região do ponto médio da córnea no M5, com a presença de células epiteliais dispostas de forma regular, notar o núcleo arredondado da camada basal. (D) Região central da córnea do M5 reepitelizada e com discreta celularidade estromal (Coloração HE – obj. 400x).

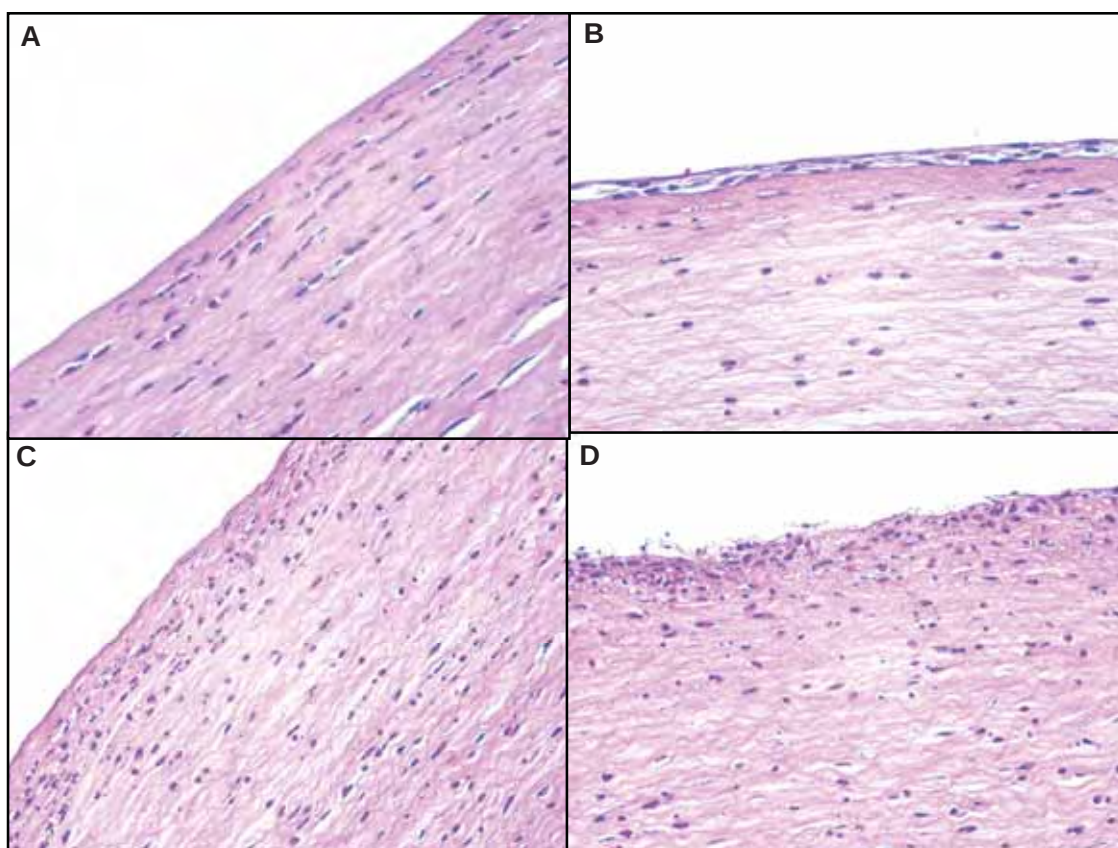


Figura 11 – Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo *Citrus lemon* 1,5%. (A) Região da periferia corneal no M1, observar a ausência de células epiteliais e a presença de células polimorfonucleares. (B) Região periférica no M5, notar a presença de epitélio recobrindo o estroma, e diminuição das células inflamatórias em relação a A. (C) Região do ponto médio da córnea no M5, com ausência de células epiteliais e presença marcante de células inflamatórias. (D) Região central da córnea, sem epitélio, notar estroma anterior irregular e com infiltrado inflamatório polimorfonuclear evidente (Coloração HE – obj. 400x).

Nas figuras 12 a 16 estão representados os cortes histológicos submetidos a imuno-histoquímica para PCNA, nos diferentes grupos experimentais e momentos de avaliação.

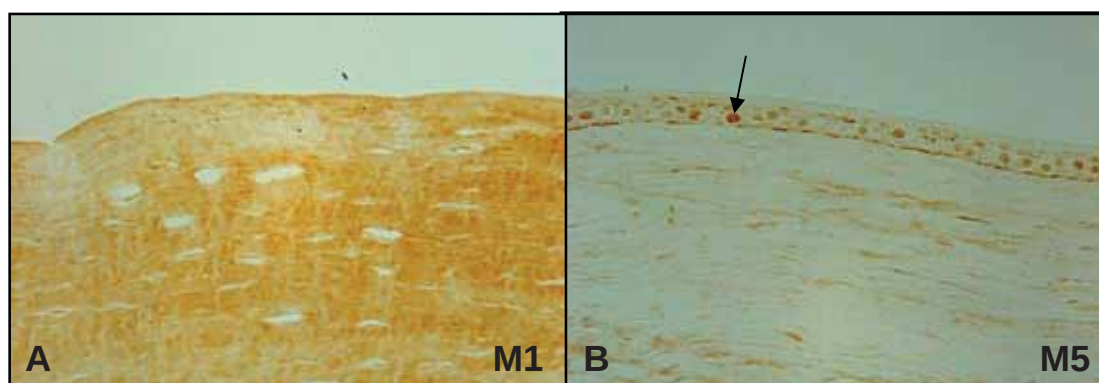


Figura 12 – Cortes histológicos de córnea do Grupo Controle, submetidos à imunomarcção para PCNA em diferentes momentos. (A) Notar ausência de epitélio, assim como de células em proliferação no estroma. (B) Observar o epitélio recobrindo o estroma e a presença de células em proliferação, imunomarcadas para PCNA (células com o núcleo marrom escuro, seta) (obj. 400x).

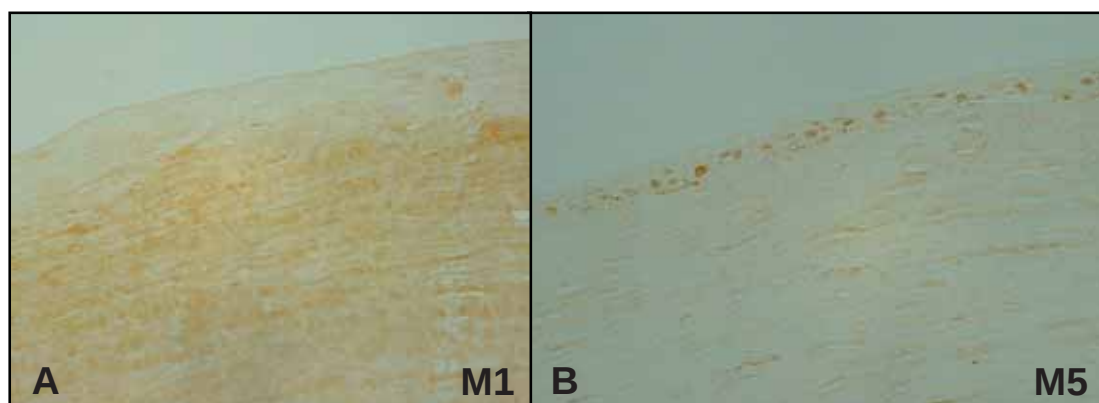


Figura 13 – Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo Tween, submetidos à imunomarcção para PCNA em diferentes momentos. (A) Notar ausência de células epiteliais, assim como de células imunomarcadas no estroma. (B) Observar a presença de células epiteliais em proliferação (células com o núcleo marrom escuro), dispostas na camada basal e recobrindo todo o estroma (obj. 400x).

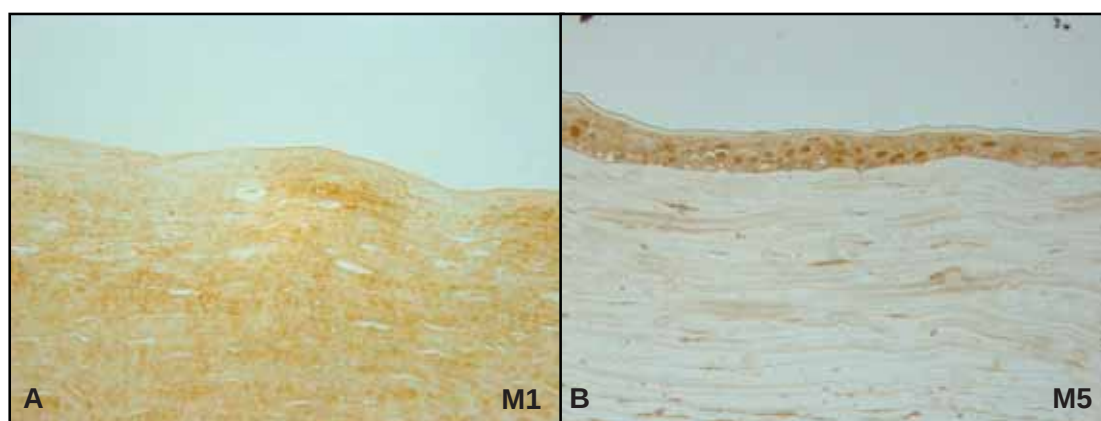


Figura 14 – Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo *Citrus lemon* 5%, submetidos à imunomarcção para PCNA em diferentes momentos. (A) Observar a ausência de reepitelização e de células imunomarcadas para PCNA. (B) Notar o epitélio com várias camadas recobrindo todo o estroma de forma regular e a presença de células imunomarcadas (células com o núcleo marrom escuro) (obj. 400x).

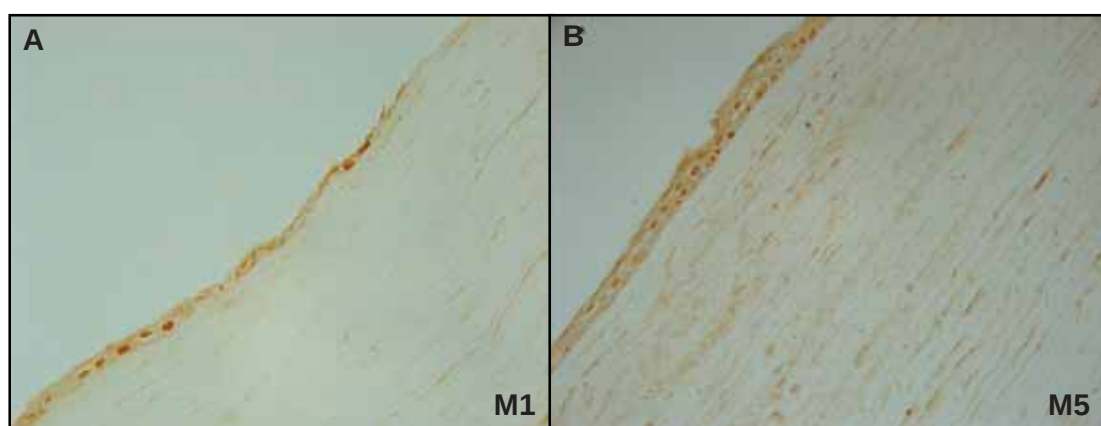


Figura 15 – Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo *Citrus lemon* 3%, submetidos à imunomarcção para PCNA em diferentes momentos. (A) Observar a presença de células epiteliais em proliferação (células com o núcleo marrom escuro), dispostas em uma camada incompleta. (B) Notar a reepitelização completa e a presença de células em proliferação (obj. 400x).

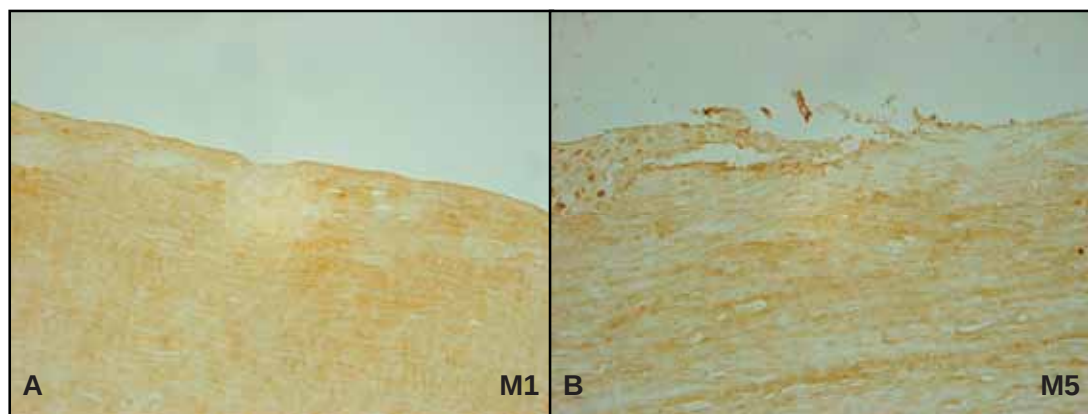


Figura 16 – Cortes histológicos de córnea de coelhos do Grupo *Citrus lemon* 1,5%, submetidos à imunomarcagem para PCNA em diferentes momentos. (A) Notar a ausência de células epiteliais e estroma sem proliferação celular. (B) Área de transição entre a úlcera e a reepitelização corneal; notar a presença de células em proliferação (células com o núcleo marrom escuro), assim como a migração celular em direção à área lesionada (obj. 400x).

DISCUSSÃO

O óleo essencial de *Citrus lemon* é uma mistura complexa de compostos voláteis (Aloisi et al. 2002, Cecarelli et al. 2004) com reconhecidas propriedades biológicas (Baser & Buchbauer 2009). Os seus principais componentes são terpenos (Bakkali et al. 2008), que dentre as substâncias encontradas na natureza, constituem o principal composto químico com atividades antiulcerogênicas (Lewis & Hanson 1991). Esse produto natural já foi utilizado com êxito em estudos com úlceras gástricas em ratos (Rozza et al. 2011), entretanto não foram encontrados relatos do seu uso na oftalmologia e mais especificamente no tratamento de úlceras de córnea, que estão entre as doenças oculares mais comuns no atendimento oftalmológico veterinário.

A córnea é composta pelo epitélio e sua membrana basal, estroma, membrana de Descemet e células endoteliais, que juntos compõem suas camadas. A ceratite ulcerativa é caracterizada por lesões erosivas superficiais ou profundas na córnea com perda de epitélio e exposição do estroma (Gilger,

Bentley & Ollivier 2007). Para a obtenção de ceratites ulcerativas superficiais, com perda apenas do epitélio, foi utilizado o n-heptanol, que associado ao debridamento mecânico, auxilia na remoção das células epiteliais, mantendo o estroma íntegro; assim todas as úlceras tratadas apresentavam a mesma profundidade e extensão, o que não seria possível se fossem utilizados animais atendidos na rotina oftalmológica.

Nos cortes histológicos avaliados, todas as córneas apresentavam o estroma íntegro, com variação apenas da sua celularidade, que era representada por ceratócitos em pequena quantidade e células inflamatórias em número variado. As células epiteliais que se apresentavam em processo de divisão e migração em direção ao centro da córnea provavelmente eram originárias da camada basal do epitélio do limbo que, na ausência do epitélio corneal, possuem capacidade de proliferação e de transformarem-se em células epiteliais da córnea, contribuindo para a sua reparação (Yew et al. 2000).

O epitélio apresenta grande capacidade de regeneração; assim, após uma lesão, as células entram em mitose e deslizam em direção ao centro da córnea, preenchendo o defeito (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Esse mesmo padrão de cicatrização pôde ser constatado no processo de reparação das córneas estudadas, já que no primeiro momento de avaliação, após um dia do procedimento cirúrgico, observou-se células epiteliais apenas na periferia corneal e somente em alguns cortes histológicos; enquanto no período final de avaliação, após cinco dias, notou-se a presença de epitélio recobrimdo todo o estroma, ou apenas a periferia e ponto médio corneal.

No M1, todos os grupos apresentaram pelo menos um animal com epitélio na periferia corneal, sendo que, o GL3 e o GL5 apresentaram os maiores valores de mediana de altura epitelial, 7,96 μ m e 6,4 μ m respectivamente; enquanto nos demais grupos observou-se mediana zero. Além disso, foram os grupos que continham maior número de animais apresentando epitélio, com quatro animais no GL5 e três no GL3. Embora não comprovada a diferença na análise estatística, esses bons resultados podem sugerir possível efeito positivo sobre a proliferação celular do óleo essencial de *Citrus lemon*, o que também foi observado por Rozza

et al. (2007), no tratamento de úlceras gástricas de ratos. Em contrapartida, no GL1,5 foi verificado apenas um animal com epitélio na periferia corneal, sugerindo que a menor concentração não foi suficiente para promover o estímulo para mitose das células epiteliais.

Nenhum grupo do M1 apresentou epitélio no ponto médio e central corneal devido às características da reparação corneal associada ao tempo de evolução, que segundo Yew et al. (2000), após a completa remoção do epitélio corneal de coelhos, as primeiras células em mitose podem ser observadas no epitélio do limbo decorridas 12 horas do debridamento epitelial. Se ocorrer a remoção do epitélio e parte do estroma por ceratectomia fotorefrativa, a divisão celular inicia-se após 24 horas e é observada primeiramente nas células epiteliais das bordas da lesão (Gan et al. 2001). Portanto, na primeira avaliação com apenas 24 horas da cirurgia é possível encontrar células epiteliais somente na região da periferia corneal.

No segundo momento de avaliação (após 5 dias), os animais de todos os grupos apresentaram epitélio na periferia e ponto médio da córnea. O GL5 e GL3, novamente foram os grupos com as maiores medianas na periferia corneal, obtendo 26,77 μ m e 24,1 μ m respectivamente, o que corresponde à altura normal do epitélio corneal, que segundo Samuelson (2007) pode variar de 25 a 40 μ m. No ponto médio corneal, os valores das medianas dos grupos, com exceção do GL1,5, foram similares, enquanto na região central, o GT foi o único grupo em que a mediana não foi nula, obtendo 9,18 μ m de altura epitelial no centro da córnea. Assim como no primeiro momento de avaliação, no M5, os grupos tratados com colírio de *Citrus lemon* nas concentrações 3 e 5% mostraram uma tendência, não significativa, ao estímulo da proliferação celular; o que talvez possa ser comprovado em estudos com um número maior de animais; além disso, o tratamento com Tween, diluente do óleo essencial de *Citrus lemon*, também demonstrou resultados similares aos do grupo controle, ou seja, ausência de reações adversas, o que permite a manutenção de sua utilização como diluente do colírio de citrus sem que ocorra comprometimento da reepitelização corneal.

Na análise estatística, ao se compararem os momentos, no M5 os grupos GC, GT e GL5 apresentaram um aumento com significância da altura epitelial na periferia da córnea. No GL3 este padrão não foi verificado, possivelmente devido a maior mediana apresentado no M1, e consequentemente menor aumento relativo da sua altura epitelial, embora a sua mediana tenha sido uma das maiores no M5 também. No ponto médio, todos os grupos apresentaram a altura epitelial significativamente maior, já que no primeiro momento nenhum animal continha células epiteliais nessa região.

Em coelhos, a espessura corneal medida através de paquímetro ultrassônico é de $407 \pm 6,2 \mu\text{m}$ (Tailai, Payor & Holden 1983), enquanto Donatti (2010) relata espessura corneal de $265,94 \mu\text{m}$ obtida em córneas que foram submetidas à histopatologia, portanto encontravam-se desidratadas, assim como as do presente estudo, em que as médias da espessura do estroma obtidas variaram de $184,78 \mu\text{m}$ a $674,06 \mu\text{m}$. Essa grande variação deve-se ao processo de preparação dos cortes histológicos, em que uma córnea pode ter ficado mais desidratada que outra, às diferenças fisiológicas individuais nos animais, mesmo padronizados as suas idades e pesos, ou ao possível edema corneal, pois quando ocorre uma lesão no epitélio, a porção aquosa do filme lacrimal penetra no estroma, promovendo a sua tumefação (Slatter 2005).

Para a avaliação da proliferação celular, foi realizada a imunomarcagem para PCNA, que tem sido utilizada em diversas pesquisas em córneas humanas e de animais, e a sua especificidade é garantida por muitas evidências que o certificam como um valioso marcador de mitose celular (Gan, Fagerholm & Kim 1999). Por meio da imuno-histoquímica pôde-se notar, no M1, que os animais com as maiores porcentagens de células em divisão pertenciam aos grupos tratados com colírios de óleo essencial de *Citrus lemon*, chegando até a 30,27% em um animal do GL3, enquanto nos grupos GC e GT, as maiores porcentagens de cada um foram, respectivamente, 10 e 11,19%. Porém considerando-se as medianas, os grupos com os melhores resultados foram o controle e o GL3. Essa alta porcentagem de células em divisão nos grupos tratados com óleo essencial de limão pode, provavelmente, ser decorrente do efeito positivo na estimulação da

proliferação celular, o que também pôde ser observado na avaliação da altura epitelial da periferia corneal no primeiro momento de avaliação.

Segundo Gan et al. (2001), após 48 horas da remoção do epitélio e parte do estroma por ceratectomia fotorefrativa, a expressão de PCNA pôde ser observada em todo o epitélio em regeneração e diminuiu após duas semanas, o que corrobora o presente trabalho, no qual cinco dias após indução à úlcera, a expressão de PCNA pôde ser visualizada em células distribuídas ao longo do epitélio em regeneração dos animais avaliados, com variação apenas da porcentagem de células que se encontravam em mitose no momento da avaliação.

No M5, os grupos GL3 e GL5 obtiveram as maiores medianas tanto na avaliação da proliferação celular, quanto na altura epitelial, o que se justifica, já que com mais células em mitose, a tendência é que um número maior de camadas celulares seja formado, aumentando a altura epitelial. Entretanto, na contagem do número total de células epiteliais, a mediana dos grupos tratados com colírios de *Citrus lemon* nas concentrações 3 e 5% ficou abaixo da mediana do GT, que apresentou 728 células contra 559 e 635, respectivamente. Isso pode ter acontecido, pois no GT as células estavam distribuídas mais uniformemente sobre o estroma enquanto no GL3 e GL5, encontravam-se mais concentradas na periferia corneal, como já observado nas medidas epiteliais do centro da córnea, em que o GT foi o único grupo com mediana positiva.

Os grupos GC, GT e GL5 mostraram aumento na taxa de mitose celular no M5 em relação ao primeiro momento de avaliação. O grupo tratado com colírio de óleo essencial de limão a 3%, embora tenha apresentado uma das maiores medianas no M5, não demonstrou um aumento com significância provavelmente por ter apresentado animais com alta taxa de divisão celular logo no primeiro dia de avaliação, conforme já apresentado anteriormente.

Após 24 horas do procedimento cirúrgico, todos os grupos apresentaram valores similares para a celularidade encontrada na córnea, sendo representada por algumas células epiteliais, ceratócitos e células inflamatórias, que infiltram-se no estroma após lesão corneal (Gilger, Bentley & Ollivier 2007). Segundo Gan,

Fagerholm & Kim (1999), a presença de leucócitos aumenta a expressão de PCNA, favorecendo a proliferação celular e diminuindo o tempo de cicatrização.

No segundo momento de avaliação, ocorreu aumento no número total de células epiteliais em todos os grupos, porém apenas no GL1,5 a celularidade apresentou um aumento significativo devido à presença de mais células inflamatórias, principalmente de neutrófilos, que são favoráveis à cicatrização corneal, porém, quando em excesso, denotam inflamação exacerbada e/ou infecção.

O óleo essencial de *Citrus lemon* é um produto natural, disponível mundialmente, com propriedades biológicas a serem exploradas no tratamento de doenças oculares. Ressalta-se que o presente estudo foi pioneiro na utilização desse produto em oftalmologia, devendo-se estimular trabalhos posteriores com maiores complexidades na metodologia que permitam a sua avaliação em um número maior de animais, assim como em úlceras profundas ou contaminadas.

CONCLUSÃO

Os colírios à base de óleo essencial de *Citrus lemon*, nas diferentes concentrações, promoveram a reepitelização corneal, sem causar lesões adicionais ao epitélio ou estroma, podendo ser utilizado na superfície corneal para o tratamento de ceratites ulcerativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloisi A.M. Ceccarelli I., Masi F. & Scaramuzzino A. 2002. Effects of the essential oil from Citrus lemon in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. Behavioral Brain Research 136:127-135.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46:446–475.

Baser K.H.C. & Buchbauer G. 2009. Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications. Boca Raton: CRC Press. 991p.

Ceccarelli I., Lariviere W.R., Fiorenzani P., Sacerdote P. & Aloisi A.M. 2004. Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral, hormonal and neuronal parameters in male and female rats. Brain Research 1001:p.68-86.

Donatti, C. 2010. Uso do plasma rico em plaquetas sob a forma de colírio ou tampão no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica. 106f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Fisher K. & Phillips C.A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. Journal of Applied Microbiology 101:1232-1240.

Gan L., Fagerholm P. & Kim H.J. 1999. Effect of leukocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. Investigative Ophthalmology & Visual Science 40:575-581.

Gan L., Hamberg-Nyström H., Fagerholm P. & Setten G.V. 2001. Cellular proliferation and leukocyte infiltration in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. Acta Ophthalmologica Scandinavica 79:488-492.

Gelatt K. N. 2003. Manual de Oftalmologia Veterinária. Barueri: Manole. 594p.

Gilger B.C., Bentley E. & Ollivier F.J. 2007. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera, p. 690-752. In: Gelatt K.N. Veterinary Ophthalmology. 4.ed. Iowa, Blackwell Publishing. 1696p.

Herrera D. 2008. Oftalmologia clínica em animais de companhia. 1 ed. São Paulo, MedVet. 300p.

Johnson R.A. & Wichern D.W. 2002. Applied multivariate statistical analysis. 5ed. New Jersey, Prentice-Hall. 767p.

Lewis D.A. & Hanson P.J. 1991. Anti-ulcer drugs of plant origin. Progress Medicinal Chemistry 28:201-231.

Miller A., Chen J., Takasuka T.E., Jacobi J.L., Kaufman P.D., Irudayaraj J.M.K. & Kirchmaier A.L. 2010. Proliferating cell nuclear antigen (pcna) is required for cell-cycle regulated silent chromatin on replicated and nonreplicated genes. JBC Papers in Press, Manuscript M110.166918. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.166918>>. Acesso em: 03 abr. 2011.

Moraes T.M., Kushima H., Moleiro F.C., Santos R.C., Rocha L.R.M., Marques M.O., Vilegas W. & Hiruma-Lima C.A. 2009. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. Chemico-Biological Interactions 180:499-505.

Pichersky E., Noel J.P. & Dudareva, N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. Science 311:808–811.

Rozza A.L., Moraes T.M., Kushima H., Tanimoto A., Marques M.O.M., Bauab T.M., Hiruma-Lima C.A. & Pellizzon C.H. 2011. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. Chemico-Biological Interactions 189:82-89.

Rozza A. L., Ortiz M., Hiruma-Lima C. A. & Pellizzon C. H. 2007. Healing activity of Citrus lemon (Rutaceae) fruit barks essential oil on gastric ulcer in rats: morphological and ultra-structural studies. In: XVI Congresso Italo-latinoamericano de Etnomedicina 341-342.

Sampaio R.L., Ranzani J.J.T., Júnior V.R., Stacciarini M.S., Braga E.M., Borezzi C. 2006. Aspectos clínicos e imunopatológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia 58(6):1077-1085.

Samuelson D.A. 2007. Ophthalmic Anatomy, p. 37-148. In: Gelatt, K.N. Veterinary Ophthalmology. 4.ed. Iowa, Blackwell Publishing. 1696p.

Slatter D. 2005. Fundamentos de Oftalmologia Veterinária. 3 ed. São Paulo, Roca. 686p.

Tailai C., Payor S., Holden, B.A. 1983. Corneal Thickness Profiles in Rabbits Using a Ultrasonic Pachimeter. Ophthalmology Vision Science 24:1408-1410.

Yew D.T., Lam T.K., Tsang D., Au Y.K., Li W.W.Y. & Tso M.O.M. 2000. Changes of cytochemical markers in the conjunctival and corneal epithelium after corneal debridement. Cellular and Molecular Neurobiology 20(4):465-482.

Zar J.H. 2009. Bioestatistical analysis. 5ed. New Jersey, Prentice Hall. 994p.

Formatação das referências segundo normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Capítulo 5

CONCLUSÕES GERAIS

E

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONCLUSÕES GERAIS

Baseado nas condições experimentais deste estudo, conclui-se:

- Não há diferença entre os tratamentos com colírios à base de *Citrus lemon*, nas concentrações 1,5%, 3% e 5%, bem como os controles, tratados com substituto da lágrima e Tween 80 8%, com relação às variáveis oftalmológicas secreção ocular, hiperemia conjuntival, quemose e opacidade corneal.

- Na variável úlcera de córnea, com a evolução pós-operatória, há redução da extensão da úlcera corneal nos tratamentos, com exceção do à base de *Citrus lemon* 3%, o qual apresentou menor extensão de úlcera no primeiro dia de avaliação.

- Os animais tratados com colírio à base de óleo essencial de *Citrus lemon* 1,5%, no período final de avaliação, apresentaram maior sensibilidade ocular em relação aos tratados com substituto da lágrima.

- Não há diferença entre os tratamentos com colírio de lágrima artificial, Tween 80 8% e à base de *Citrus lemon* quanto à espessura, celularidade total da córnea e proliferação celular, nos momentos de avaliação (M1 e M5).

- Nas comparações entre os momentos iniciais e finais, o colírio à base de óleo essencial de *Citrus lemon* 5%, assim como os controles, promoveram aumento na espessura epitelial da periferia da córnea e maior percentual de proliferação celular no segundo momento de avaliação (M5). Entretanto, a maior celularidade total, representada principalmente por células inflamatórias, foi observada no tratamento com *Citrus lemon* 1,5% no período final.

- O colírio de *Citrus lemon*, nas concentrações instituídas, não provoca irritações na conjuntiva, tampouco induz lesões adicionais ao epitélio ou estroma, podendo ser utilizado na superfície ocular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOISI, A.M.; CECCARELLI, I.; MASI, F.; SCARAMUZZINO, A. Effects of the essential oil from *Citrus lemon* in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. *Behavioral Brain Research*, v.136, n.1, p.127-135, 2002.

ARIAS, B.A.; LACA, L.R. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97, p.89-95, 2005.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p. 446–475, 2008.

BASER, K.H.C., BUCHBAUER, G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2009. 991p.

BEVILACQUA, A.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M. In Vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. *Journal of Food Protection*, v.73, n.5, 2010, p.888-894, 2010.

BRAVO, R.; CELIS, J.E. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *The Journal of Cell Biology*, v.84, n.3, p.795-802, 1980.

BRUD, W.S. Industrial Uses of Essential Oils. In: BASER, K.H.C., BUCHBAUER, G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2009, chap.16, p.843-853.

CECCARELLI, I.; LARIVIERE W.R.; FIORENZANI P.; SACERDOTE P.; ALOISI A.M. Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral,

hormonal and neuronal parameters in male and female rats. *Brain Research*, v.1001, p.68-86, 2004.

DUGO, P.; RAGONESE, C.; RUSSO, M.; SCIARRONE, D.; SANTI, L.; COTRONEO, A.; MONDELLO, L. Sicilian lemon oil: Composition of volatile and oxygen heterocyclic fractions and enantiomeric distribution of volatile components. *The Journal of Separation Science*, v.33, p.3374-3385, 2010.

FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, v.101, p.1232-1240, 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends of Food Science and Technology*, v.19, p.156-164, 2008.

GALERA, P.D.; LAUS, J.L.; ORIÁ, A.P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J.L. *Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães e Gatos*. 1ed. São Paulo: Roca, 2009, cap.4, p. 69-96.

GALLE, L.E.; MOORE, C.P. Clinical Microbiology. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 4.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, chap. 6, p. 236-270.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; KIM, H.J. Effect of leukocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.40, p.575-581, 1999.

GAN, L.; HAMBERG-NYSTRÖM, H.; FAGERHOLM, P.; SETTEN, G.V. Cellular proliferation and leukocyte infiltration in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, v.79, p.488-492, 2001.

GELATT, K. N. *Manual de Oftalmologia Veterinária*. Barueri: Manole, 2003. 594p.

GILGER, B.C.; BENTLEY, E.; OLLIVIER, F.J. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 4.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, chap. 15, p. 690-752.

HAKIM, I.A.; HARRIS, R.B.; RITENBAUGH, C. Citrus peel use is associated with reduced risk of squamous cell carcinoma of the skin. *Nutrition and Cancer*, v.37, p.161-168, 2000.

HERRERA, D. *Oftalmologia clínica em animais de companhia*. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2008. 300p.

IGIMI, H.; TAMURA, R.; TORAISHI, K.; YAMAMOTO, F.; KATAOKA, A.; IKEJIRI, Y.; HISATSUGU, T.; SHIMURA, H. Medical dissolution of gallstones. Clinical experience of d-limonene as a simple, safe, and effective solvent. *Digestive Diseases and Sciences*, v.36, n.2, p.200-208, 1991.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, v.14, 629-640, 1997.

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v.20, p.643-66, 1990.

KNASKO, S.C. Ambient odor's effects on creativity, mood and perceived health. *Chemical Senses*, v.17, p.27-35, 1992.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research*, v.172, p.240-249, 2006.

KOMORI, T.; FUJIWARA, R.; TANIDA, M.; NOMURA J. Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. *European Neuropsychopharmacology*, v.5, 477-480, 1995.

KOO, H.N.; HONG, S.H.; KIM, C.Y.; AHN, J.W.; LEE, Y.G.; KIM, J.J.; LYU, Y.S.; KIM, H.M. Inhibitory effect of apoptosis in human astrocytes CCF-STTG1 cells by lemon oil. *Pharmacological research*, v.45, p.469-73, 2002.

LAUS, J.L. Condiciones corneanas e queratoplastias. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO MUNDIAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DE PEQUENOS ANIMAIS, XXIII, 1998, Buenos Aires. *Ophthalmology Presentations*. Buenos Aires, 1998.

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. *Progress Medicinal Chemistry*, v.28, p. 201-231, 1991.

LOTA, M.L.; SERRA, D.R.; TOMI, F.L.; JACQUEMOND, C.; CASANOVA, J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.4, p.796-805, 2002.

MILLER, A.; CHEN, J.; TAKASUKA, T.E.; JACOBI, J.L.; KAUFMAN, P.D.; IRUDAYARAJ, J.M.K.; KIRCHMAIER, A.L. Proliferating cell nuclear antigen (pcna) is required for cell-cycle regulated silent chromatin on replicated and nonreplicated genes. *JBC Papers in Press*, Manuscript M110.166918, 2010. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.166918>>. Acesso em: 03 abr. 2010.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M.J.; TAN, E.M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *The Journal of Immunology*, v.121, p.2228-2234, 1978.

MOLINA, E.G.; PERLES, R.D.; MORENO, D.A.; VIGUERA, C.G. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.5, p.327-345, 2010.

MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F.C.; SANTOS, R.C.; ROCHA, L.R.M.; MARQUES, M.O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, v.180, p.499-505, 2009.

NASISSE, M.P. Canine ulcerative keratitis In: GLAZE, M.B. *The Compendium Collection: Ophthalmology in Small Animal Practice*. 2. ed. New Jersey: Veterinary Learning Systems, 1996, chap. p.45-57.

OLLIVIER, F.J.; GILGER, B.C.; BARRIE, K.P.; KALLBERG, M.E.; PLUMMER, C.E.; O'REILLY, S.; GELATT, K.N.; BROOKS, D.E. Proteinases of the cornea and precocular tear film. *Veterinary Ophthalmology*, v.10, n.4, p.199-206, 2007.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, v.311, p. 808–811, 2006.

REVOLTELLA R. P.; PAPINI, S.; ROSELLINI, A.; MICHELINI, M. Epithelial stem cells of the eye surface. *Cell Proliferation*, v. 40, p. 455-461, 2007.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.M.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions*, v.189, p. 82–89, 2011.

ROZZA, A. L.; ORTIZ, M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H.. Healing activity of Citrus lemon (Rutaceae) fruit barks essential oil on gastric ulcer in rats: morphological and ultra-structural studies. In: XVI Congresso Italo-latinoamericano de Etnomedicina, p. 341-342, 2007.

SLATTER, D. *Fundamentos de Oftalmologia Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Roca, 2005. 686p.

SAMUELSON, D.A. Ophthalmic Anatomy. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 4.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, chap. 2, p. 37-148.

SONG, I.; JOO, C. Morphological and functional changes in the rat cornea with an ethanol-mediated epithelial flap. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, February, v.45, n.2, p.423-428, 2004.

STADES, F. C.; BOEVÉ, M.H.; NEUMANN, W.; WYMANET, M. *Fundamentos de Oftalmologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 1999. 204p.

SUN, J. d-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicinal Review*, v.12, p.259-264, 2007.

TAMBLYN, K.C.; CONNER, D.E.; BILGILI, S.F.; HALL, G.S. Utilization of the skin attachment model (SAM) to determine the antibacterial activity of potential carcass treatments. *Poultry Science*, v.72, p.278, 1993.

TSENG, S.C.; PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; GRAY, T.; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Archives of Ophthalmology*, v.116, p.431-41, 1998.

TSUCHIYA, T.; TANIDA, M.; UENOYAMA, S.; NAKAYAMA, Y.; OZAWA, T. Effects of olfactory stimulation on the sleep time induced by pentobarbital administration in mice. *Brain Research Bulletin*, v.26, p.397-401, 1991.

TSURIMOTO, T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1443, p.23-39, 1998.

WILKINS JR, J. Method for treating gastrointestinal disorder. *United States Patent*, v.642, p.45, 2002.

YANG, S.A.; JEON, S.K.; LEE, E.J.; SHIM, C.H.; LEE, I.S. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, v.24, n.2, p.140-151, 2010.

YE, J.; YAO, K.; KIM, J.C. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye*, v.20, p.482-490, 2006.

YEW, D.T.; LAM, T.K.; TSANG, D.; AU, Y.K.; LI, W.W.Y.; TSO, M.O.M. Changes of cytochemical markers in the conjunctival and corneal epithelium after corneal debridement. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.20, n.4, 2000.

Formatação das referências segundo normas da ABNT.