

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA – FMVA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DO
POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-
TEREFTALATO) (PBAT) EM CÓRNEA DE COELHOS E
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DE
CÓRNEA EM CÃES**

Aline Cardoso Pereira
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA – FMVA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DO
POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-
TEREFTALATO) (PBAT) EM CÓRNEA DE COELHOS E
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DE
CÓRNEA EM CÃES**

Aline Cardoso Pereira

Orientador: Prof. Adjunto Alexandre Lima de Andrade

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

Araçatuba – SP
2018

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Pereira, Aline Cardoso

P436a

Avaliação clínica e histopatológica do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (pbat) em córnea de coelhos e aplicação no tratamento de úlceras de córnea em cães / Aline Cardoso Pereira.
Araçatuba: [s.n], 2018.
81f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientador: Prof. Adjunto Alexandre Lima de Andrade

1. Biocompatibilidade. 2. Ceratites ulcerativas. 3.
Ceratoplastia I. T.

CDD 636.08977



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Avaliação clínica e histopatológica do polímero Poli (butileno adipato-co-tereftalato)

TÍTULO: (PBAT) em córnea de coelhos e aplicação no tratamento de úlceras de córnea em
cães.

AUTORA: ALINE CARDOSO PEREIRA

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

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

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. SÍLVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE

Curso de Medicina Veterinária / Universidade do Oeste Paulista

Araçatuba, 15 de junho de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE CARDOSO PEREIRA - nascida em 12 de novembro de 1987 na cidade de Brasília – DF. Médica Veterinária formada pela Universidade do Estado de Santa Catarina, Udesc, no ano de 2011. Ingressou em 2012 no programa de residência na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, campus de Araçatuba - SP, tendo-o concluído em 2014. Iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, campus de Araçatuba – SP, em fevereiro de 2014, sob orientação do Professor Adjunto Alexandre Lima de Andrade.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Pedro e Eliane, pelo amor, dedicação, o eterno incentivo aos estudos, e por me ensinarem o valor da perseverança.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Alexandre Lima de Andrade, por acreditar no meu potencial e me incentivar na Oftalmologia Veterinária, desde o ano que ingressei no programa de residência desta instituição. Serei sempre grata aos seus valiosos ensinamentos na clínica cirúrgica, oftalmologia e docência.

A todos os educadores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica. Cada um de vocês fez a diferença na minha construção.

À equipe de pesquisa: professoras Maria Cecília Rui Luvizotto, Sílvia Helena Venturoli Perri e Alessandra de Almeida Lucas - e equipe do Laboratório de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) -, pós-graduandas Giovanna Giuffrida Rodrigues, Juliana Tessália Wagtsuma e Joana Zafalon Ferreira, e discentes Laís Tiemi Tubone e Guilherme Henrique Poli de Oliveira. E também à CAPES pela bolsa auxílio a mim fornecida. Sem vocês o projeto não se concretizaria.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, por toda a oportunidade que me deu para crescer como médica veterinária. E à Universidade do Estado de Santa Catarina, Udesc, onde tudo começou, a minha casa.

Aos meus pais, Pedro e Eliane, por todo o apoio em absolutamente qualquer necessidade relacionada à minha formação. Sem vocês, eu não estaria onde estou. A maior herança que poderiam me deixar já está conquistada, e continuarei buscando melhorar a cada dia da minha vida. A educação e valores que vocês me ensinaram serão por mim exercidos enquanto eu viver.

Aos meus irmãos, Marcos e Mateus, por serem meus amigos, confidentes, portos-seguros, com quem sei que sempre poderei contar. E à minha prima e amiga, Laiz, que para mim é como uma irmã, e por isso a coloco nesse parágrafo – que saudades de ti!

Às minhas avós, Maria Jandira e Maria Mônica (*in memoriam*), duas mulheres tão diferentes, mas que tem a garra em comum, mulheres guerreiras, mulheres que admiro e me identifico.

Às minhas tias Jane, Rosane, Pedrinha, Ana Maria, Lourdes e Rita, minhas queridas, 'minhas segundas mães'.

Aos grandes amigos que encontrei nessa vida: da escola (Thais, Cris, Gábi, Maria, Cecé, Juli), da graduação (Cami, Fê, Mari, Dani, Kelly), e que a cidade de Araçatuba me presenteou (Fer, Breno, Xuxu, Flá, Ká, Tai, Kibi, Alê, Chris, Ju, Rafa, Daniel, Acácio - e tantos outros colegas da Unesp, da Mundo Pet e da Fundação Educacional de Andradina -, que me mostraram que a rotina de trabalho, ainda que prazerosa, pode ter um acréscimo de diversão). Quantas histórias vividas com vocês... Estiveram comigo de longe e por perto, e sempre no meu coração. Quem tem amigos, tem tudo!

Ao Jefferson, que com seu otimismo foi sempre um incentivador na minha pós-graduação, ainda que nos momentos mais difíceis.

Aos meus grandes amigos peludos, meus amores, meus filhos: Tuca, Hector e Sula. Difícil definir se eu sou o colo de vocês, ou vocês o meu.

A todos os meus pacientes. Afinal, toda a minha dedicação é por vocês!

E, não menos importante, à Deus, guiador dos meus passos.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
Referências	27
2. CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DO POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO- TEREFTALATO) EM Córnea de coelhos	34
Introdução	34
Material e Método	36
Resultado e Discussão	39
Conclusões	50
Referências	50
3. CAPÍTULO 3 – ASPECTOS CLÍNICOS DO ENXERTO CONJUNTIVAL E DO IMPLANTE DO POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO- TEREFTALATO) (PBAT) NO TRATAMENTO DE CERATITES ULCERATIVAS COMPLICADAS EM CÃES	56
Introdução	56
Material e Método	58
Resultado e Discussão	62
Conclusões	75
Referências	75

AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DO POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO) (PBAT) EM CÓRNEA DE COELHOS E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DE CÓRNEA EM CÃES

RESUMO - As ceratites ulcerativas são comuns na rotina do médico veterinário de pequenos animais, visto que a córnea é uma estrutura vulnerável devido sua exposição ao meio externo. Por compreender uma das estruturas responsáveis pela refração luminosa e participante do mecanismo de formação da imagem, é de extrema importância a integridade da anatomia e transparência da córnea para esta continuar desempenhando suas funções. Estudos ainda são realizados com o intuito de viabilizar opções terapêuticas cirúrgicas para o tratamento de úlceras de córnea complicadas, tentando alcançar uma cicatrização com um menor dano à estrutura corneal e menor opacidade cicatricial, devolvendo a transparência da córnea. Visto que os polímeros biodegradáveis tem se mostrado alvo de pesquisas atuais para aplicações médicas, com este estudo objetivou-se avaliar originalmente a biocompatibilidade da membrana do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) na córnea e posterior aplicação clínica deste material nas ceratites ulcerativas profundas. Para tal, foi realizada avaliação clínica experimental e histopatológica após enxertia interlamelar do PBAT em córnea de coelhos, ao longo de 60 dias, e acompanhamento da evolução clínica do emprego da membrana de PBAT no tratamento de ceratites ulcerativas complicadas em cães, comparando ao uso do enxerto conjuntival, ao longo de 90 dias. Devido aos baixos sinais de inflamação corneal clínicos e histopatológicos nos coelhos e a cicatrização corneal em todos os cães, sem ocorrência de déficit visual, com o presente estudo acreditamos ter viabilizado mais uma opção terapêutica para as ceratites ulcerativas na medicina veterinária.

Palavras-chave: biocompatibilidade, ceratites ulcerativas, ceratoplastia

**CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF POLY
(BUTYLENE ADIPATE-CO-TEREPHTHALATE) POLYMER (PBAT) IN
RABBIT CORNEA AND APPLICATION IN THE TREATMENT OF CORNEAL
ULCERS IN DOGS**

ABSTRACT - Ulcerative keratitis are common in the routine of a small animals veterinary doctor, given that the cornea is a vulnerable structure due to its exposure to external environment. For containing one of the structures responsible for light refraction and participant in the mechanism of formation of images, it is of extreme importance the integrity and transparency of the cornea in order for it to continue to develop its functions. Studies are still performed with the intent of making feasible surgical therapeutic options for the treatment of complicated corneal ulcers, trying to reach cicatrization with less damage to the corneal structure and less scar opacity, seeking corneal transparency. Given that biodegradable polymers have been target of current research for medical applications, the objective of this study was to evaluate originally the biocompatibility of the poly (butylene adipate-co-terephthalate) polymer (PBAT) in the cornea and posterior clinical application of this material in deep ulcerative keratitis. It was performed clinical and histopathological evaluation after interlamellar grafting of PBAT in the cornea of rabbits, over 60 days, and follow-up of the clinical evolution of PBAT membrane in the treatment of complicated ulcerative keratitis in dogs, comparing to the use of conjunctival graft, over 90 days. Due to low levels of clinical and histopathological corneal inflammation found in rabbits and corneal cicatrization in all dogs, without occurrence of visual deficit, with this study we believe it was made feasible another therapeutic option for ulcerative keratitis in veterinary medicine.

Keywords: biocompatibility, ulcerative keratitis, keratoplasty.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A túnica mais externa do bulbo do olho é constituída pela esclera, que é opaca, e pela córnea, transparente; a zona de transição entre elas é denominada limbo (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005). Cabe à túnica externa, também denominada túnica fibrosa, a manutenção da forma do bulbo do olho (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

A córnea atua ainda como barreira estrutural e infecciosa entre as estruturas intra-oculares e o meio ambiente (DELMONTE; KIM, 2011; GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GELATT, 2003), e sua transparência lhe confere ser o mais importante meio de refração do sistema ocular (DELMONTE; KIM, 2011). Esta é mantida devido à ausência de vasos, células sanguíneas e pigmentos, controle do conteúdo aquoso, disposição regular e organizada das fibras colágenas e por constituir uma superfície óptica lisa, graças ao filme lacrimal pré-corneal (SLATTER, 2005).

Nas espécies domésticas, o diâmetro horizontal da córnea é maior do que o diâmetro vertical, e sua espessura usualmente é inferior a 1 mm. Em caninos, é mais espessa no centro (SLATTER, 2005), possuindo $0,558 \pm 0,076$, e $0,617 \pm 0,073$ na periferia dorsal (GELATT, 2003).

É ricamente innervada por fibras amielínicas (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009) oriundas do nervo trigêmeo (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007), e consiste em um dos tecidos mais sensíveis do organismo (DELMONTE; KIM, 2011). Cães dolicocefálicos possuem a córnea mais sensível, quando comparado aos mesocefálicos e braquicefálicos (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

A córnea é composta por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). O epitélio corneal é simples, escamoso e não-queratinizado, com padrão básico de membrana basal, células epiteliais basais, células aladas e células superficiais escamosas (SLATTER, 2005). As células basais são aderidas à membrana

basal por hemidesmosomos (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). As células superficiais possuem projeções vilosas pequenas que ancoram a camada mucóide profunda do filme lacrimal pré-corneal (SLATTER, 2005). A membrana basal do epitélio é composta de colágeno, lamininas, hialuronato de sódio e fibronectinas (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

O estroma constitui 90% da substância corneal, e é composto por fibrócitos, ceratócitos, colágeno e substância fundamental. As fibrilas colágenas paralelas formam lamelas com espaçamento regular, com linfócitos entremeados, macrófagos e neutrófilos, e junto com os glicosaminoglicanos e as glicoproteínas formam o suporte da estrutura corneal (SLATTER, 2005).

A membrana de Descemet, localizada posteriormente ao estroma e anteriormente ao endotélio, é a membrana basal do endotélio, possui elasticidade e aumenta sua espessura com a idade (SLATTER, 2005), já que é produzida constantemente (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). É delgada, homogênea, acelular, e produzida pelo endotélio (HERRERA, 2008).

O endotélio tem a espessura de uma célula e se localiza posteriormente à membrana de Descemet, revestindo a câmara anterior (SLATTER, 2005). Suas células com formato hexagonal aumentam de tamanho e diminuem em quantidade com a idade. Cães jovens apresentam 2500 a 2800 células endoteliais por mm^2 , e injúrias endoteliais resultam em diminuição desta densidade, o que sustenta a capacidade de mitose limitada do endotélio corneal (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Devido sua alta atividade metabólica, células endoteliais contêm mitocôndrias numerosas e retículo endoplasmático liso e rugoso abundante (SLATTER, 2005).

A maioria da requisição energética dos tecidos corneais é fornecida pelo metabolismo da glicose, onde aproximadamente dois terços são metabolizados pelo caminho Embden-Meyerhof e pelo ciclo de Krebs e um terço pela derivação monofosfato hexose. O oxigênio é disponível pelo humor aquoso, filme lacrimal pré-corneal e atmosfera, plexo capilar límbico e capilares da conjuntiva palpebral, já que este órgão se trata de uma estrutura avascular (SLATTER, 2005).

A córnea é uma estrutura naturalmente circundada por meios líquidos, como é o humor aquoso e a lágrima (HERRERA, 2008); portanto, o controle energia-dependente de água ou manutenção do estado de deturgescência desta é muito importante para manter sua transparência (GELATT, 2003; HERRERA, 2008; SLATTER, 2005).

As células endoteliais e o epitélio realizam o controle de água no estroma, através de suas grandes quantidades de íons sódio e potássio ativados pela ATPase, associados à bomba de sódio (GELATT, 2003; SLATTER, 2005). A função de barreira do endotélio resulta de junções celulares apertadas (*tigh junctions*), conhecidas como *zonula occludens* e dependem de íons cálcio (GELATT, 2003).

Devido à característica avascular e construção compacta da córnea, alterações que podem ser brandas em outros tecidos podem alterar imensamente a transparência e são mais significantes neste órgão (SLATTER, 2005). A cicatrização corneal é um processo complexo envolvendo a ação integrada de múltiplas proteinases, fatores de crescimento e citocinas produzidas pelo epitélio, ceratócitos estromais, células inflamatórias e glândulas lacrimais (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

O epitélio da córnea apresenta grande capacidade de regeneração (SLATTER, 2005). Lesões no epitélio são reparadas através do deslizamento e mitose de células epiteliais (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). O deslizamento das células circunjacentes à margem da lesão inicia aproximadamente 60 minutos decorridos da agressão (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Uma vez as células tendo recoberto o defeito, o que ocorre em 4 a 7 dias ou menos, mitose ocorre e a superfície epitelial em camadas múltiplas é reconstituída (SLATTER, 2005), restaurando sua espessura original (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Em aproximadamente 2 semanas, o epitélio corneal é completamente reconstituído (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Durante este processo, melanócitos do limbo podem ser levados para o interior de áreas previamente transparentes (SLATTER, 2005).

Feridas epiteliais que envolvem toda a extensão da córnea, chegando ao limbo, podem, inicialmente, ser reparadas por conjuntivalização - nome que se dá ao recobrimento por epitélio conjuntival – e, posteriormente, remodeladas por epitélio corneal (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

Defeitos estromais superficiais são preenchidos por faces epiteliais com o deslizamento epitelial sobre o defeito e mitose local. Em defeitos profundos, o epitélio rapidamente recobre a superfície, e infiltração e regeneração ocorrem no estroma subjacente. Feridas estromais descomplicadas sofrem cicatrização avascular, porém em lesões infectadas e destrutivas, a cicatrização vascularizada ocorre, semelhante ao que acontece em outros tecidos (SLATTER, 2005).

Na cicatrização avascular, neutrófilos se infiltram e envolvem a lesão sob influências quimiotáticas, através do filme lacrimal e vasos conjuntivais. Os ceratócitos na área acometida morrem, e nas áreas circunjacentes estes se transformam em fibroblastos e migram para a lesão, onde sintetizam colágeno e mucopolissacarídeos da substância fundamental (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005). Um recobrimento epitelial auxilia esses processos e, se este está ausente, a cicatrização é mais lenta. Após aproximadamente 48 horas da lesão, macrófagos invadem o local agredido e removem os resíduos celulares e se transformam em ceratócitos em um período mais tardio (SLATTER, 2005).

O colágeno depositado será remodelado, tornando-se mais compacto, porém não há organização fibrilar uniforme (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Dentro das semanas seguintes a densidade da cicatriz diminui, porém não desaparece. Na cicatrização vascularizada de lesões destrutivas, a infiltração celular é mais extensa e há formação de uma cicatriz mais densa (SLATTER, 2005).

Lesões perfurantes na membrana de Descemet cursam com danos graves às células endoteliais (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Em decorrência de sua elasticidade, a membrana de Descemet se retrai quando danificada e enrola-se em direção à câmara anterior, expondo pequena área de estroma.

Células endoteliais adjacentes deslizam para recobrir a área e é formada uma nova membrana de Descemet (SLATTER, 2005).

A regeneração do endotélio se dá pela divisão mitótica e aumento no tamanho das células, simultaneamente (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009), ocorrendo quase sempre edema corneal e opacidade permanentes. Em lesões extensas, o endotélio não pode recobrir a área e uma região de tumefação e estroma edematoso persiste (SLATTER, 2005).

Também estão envolvidos no processo de reparação corneal as enzimas proteolíticas e os fatores de crescimento. A manutenção e reparo da matriz extracelular estromal requer um balanço entre sua síntese, degradação e remodelação. As enzimas proteolíticas têm papel importante na degradação e remodelação da matriz extracelular estromal, e sua ação excessiva é controlada por inibidores de proteinases naturais existentes no filme pré-corneal e córnea, como o inibidor de proteinase α -1, α 2-macroglobulina e inibidores de metaloproteinases (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Um desbalanço entre as enzimas proteolíticas e os inibidores de proteinases pode levar ao denominado *melting* corneal (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; ION; IONASCU; BIRTOIU, 2015) ou ser a causa da não cicatrização de úlceras superficiais (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

As enzimas proteolíticas são produzidas por microorganismos, células inflamatórias, células epiteliais corneais e fibroblastos, e as mais importantes compreendem as metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2, MMP-9) e as proteases (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Os fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador beta (TGF β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) regulam a cicatrização corneal, apresentando funções como estimular a síntese de proteína e mitose epitelial e estromal, estimular a síntese de matriz extracelular e quimiotaxia de células inflamatórias, e estimular a síntese de fibronectina, ácido hialurônico e collagenase, respectivamente (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

As principais reações corneais a doenças incluem edema, vascularização, formação cicatricial, pigmentação, infiltração celular e acúmulo de substância anormal no interior da córnea (SLATTER, 2005).

O edema resulta quando excesso de fluido se acumula no interior do estroma e força a divisão das lamelas colágenas, implicando a perda da transparência (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GELATT, 2003; SLATTER, 2005). Decorre de distúrbios no epitélio, no endotélio ou em ambos (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GELATT, 2003), já que são responsáveis por manter a deturgescência corneal, conforme já discutido. A córnea se apresenta azul-nebuloso, podendo ocorrer em áreas localizadas ou em toda a córnea (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; SLATTER, 2005).

A bomba endotelial possui maior atividade, já que deve opor-se à pressão intraocular; assim, edemas corneais evidentes e difusos são decorrentes de uma lesão endotelial (HERRERA, 2008). Se o equilíbrio de fluido for reestabelecido e a causa removida, é usualmente reversível. Quando crônico pode resultar em vascularização ou ceratopatia bolhosa (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; SLATTER, 2005).

A vascularização corneal ocorre em resposta a inúmeras condições e pode ser superficial ou profunda. A primeira ocorre no terço anterior do estroma, geralmente apresenta vasos mais vermelho-vivos e ramificados, e contínuos com a circulação conjuntival do limbo. Já na vascularização profunda, os vasos são contínuos com a circulação ciliar e desaparecem no limbo, além de se apresentarem com coloração vermelho-escuro e mais retilíneos. A profundidade dos vasos invasores indica a profundidade da lesão corneal primária (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; SLATTER, 2005); dessa forma, a vascularização superficial apresenta-se decorrente de processos irritativos na superfície corneal (ceratites superficiais), enquanto a profunda ocorre em processos estromais e uveais (ceratites profundas e uveítes) (HERRERA, 2008). Geralmente, a vascularização é benéfica, porém resulta em diminuição da transparência corneal e migração de pigmento (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; SLATTER, 2005).

As fibrilas colágenas produzidas pelos ceratócitos, fibroblastos e macrófagos invasores de uma lesão estromal não se dispõem em um padrão regular, o que resulta em redução da transparência e interfere na refratividade da córnea. Quanto mais profunda a lesão inicial, mais densa é a cicatriz formada e menor a chance de retorno da transparência (SLATTER, 2005).

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

Devido à maior exposição da córnea a condições externas e às enfermidades dos anexos oftálmicos (HERRERA, 2008), as ceratites ulcerativas encontram-se entre as afecções oculares mais frequentes em cães (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008), possuindo maior incidência nos cães de raças braquicefálicas (HERRERA, 2008). Compreendem lesões em que há perda do epitélio corneal, com exposição de porções variáveis do estroma (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005) e são consideradas uma emergência oftálmica, já que podem progredir para exposição da membrana de Descemet – denominada descemetocèle – e perfuração da córnea, com danos, por vezes, irreversíveis e com déficit visual completo (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

Podem ser classificadas quanto à sua profundidade, isto é, superficial, profunda, descemetocèle e perfurada, ou sua causa. A úlcera de córnea profunda se caracteriza por acometer 50% ou mais da espessura estromal, e a descemetocèle quando há exposição da membrana de Descemet (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Úlceras superficiais não

complicadas cicatrizam rapidamente, e com mínima formação de cicatriz (GELATT, 2003).

Todas as úlceras têm potencial para endoftalmite, se não tratada corretamente (SLATTER, 2005), e podem resultar também em glaucoma e *phthisis bulbi*, acarretando na perda do bulbo do olho (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

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

O *melting* corneal, também denominada ceratomalácia, é um fator complicador das úlceras de córnea (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009), e quando instalada apresenta-se com aspecto gelatinoso e coloração acinzentada nos bordos da lesão; perfuração pode ocorrer em 24 a 48 horas (HERRERA, 2008; SLATTER, 2005). Atualmente, vem sido descrita a técnica de *cross-linking* para tratamento de *melting corneal* (POT et al., 2014; SPIESS et al., 2014), visto que se trata de uma condição de progressão rápida e potencial perda da visão (ION; IONASCU; BIRTOIU, 2015).

O diagnóstico das ceratites ulcerativas é dado através do histórico, sinais clínicos (blefaroespasma, fotofobia, descarga ocular de consistência, aspecto e intensidade variáveis - conforme o agente envolvido - e pateamento) e o teste de tingimento com fluoresceína (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). O corante se fixa ao estroma da córnea, que é hidrofílico, porém não cora a membrana de Descemet - em casos de lesões mais profundas e sua consequente exposição - uma vez que esta é hidrofóbica (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Outros sinais clínicos que podem estar presentes são miose e *flare* do aquoso (GILGER; BENTLEY;

OLLIVIER, 2007), e menos comumente o hipópio, visto que a ulceração corneal causa uveíte secundária (SLATTER, 2005).

É essencial que a causa da úlcera seja identificada, já que se esta não for eliminada não haverá resolução do quadro (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008). Ainda, medidas terapêuticas devem ser adotadas para criar um ambiente ideal para reparação da lesão e prevenção da sua progressão (SLATTER, 2005).

O tratamento clínico deve ser instituído com o emprego de antibioticoterapia, midriáticos/cicloplégicos, inibidores de metaloproteinases e antiinflamatórios não esteroides, além do uso do colar elisabetano, a fim de evitar a automutilação (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). Os antibióticos de escolha nas úlceras estromais profundas progressivas são a tobramicina ou uma fluorquinolona, como a ciprofloxacina ou moxifloxacina, com frequência intensa (a cada 1-2 horas) (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Entretanto, quando estamos frente a uma úlcera profunda, procedimentos cirúrgicos que envolvem as técnicas de suporte também são requeridos (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; GELATT, 2003). A indicação cirúrgica parte de que a córnea sofre, no caso de uma úlcera profunda, destruição rápida do colágeno, e o processo de vascularização tem início 4 ou 5 dias após a agressão, sendo necessário alguns dias para alcançar o local da úlcera (HERRERA, 2008). Assim, técnicas cirúrgicas fornecem uma base mecânica de proteção, somada ao aporte vascular (GELATT, 2003; HERRERA, 2008).

Dentre as técnicas descritas, a mais comumente utilizada é o emprego de recobrimentos conjuntivais (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008; HOLLINGSWORTH, 2003), haja visto a variedade de técnicas para realização (pediculado, bipediculado, livre, 180° e 360°) e sua versatilidade (HOLLINGSWORTH, 2003). Além do suporte mecânico e trófico, que disponibilizam à lesão leucócitos, anticolagenases naturais como a $\alpha 2$ -macroglobulina e antibióticos sistêmicos, os enxertos conjuntivais fornecem tecido fibrovascular para preencher o defeito corneal. Estes consistem em

tecido conjuntival dissecado finamente, sem abordar a cápsula de Tenon, seguido de transposição para a córnea, recobrando o defeito epitelial (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Os recobrimentos conjuntivais são comumente realizados a partir da conjuntiva bulbar, porém a conjuntiva palpebral também pode ser utilizada. A desvantagem do segundo leito, quando não é utilizada a técnica livre, é a tensão na sutura devido à movimentação palpebral e o alto risco de deiscência do procedimento; no uso da conjuntiva bulbar, isso não ocorre porque o enxerto movimenta junto com o olho. Outra causa de deiscência é o contato do epitélio corneal e epitélio conjuntival, o que não é recomendado, visto que evita a migração epitelial abaixo do recobrimento (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

A complicação mais comum de qualquer dos procedimentos de enxertia conjuntival é a deiscência do recobrimento da lesão corneal, que pode ocorrer por progressão da lesão (GELATT, 2003), perda das suturas que sustentam o enxerto, excessiva tensão na conjuntiva e presença da cápsula de Tenon após a dissecação (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

O enxerto conjuntival pediculado é provavelmente a técnica mais útil e versátil dos recobrimentos conjuntivais. É realizado determinando a base do pedículo o mais próximo da lesão, seguido de duas incisões paralelas até a região distal que compreende a conjuntiva que vai recobrir a lesão (1-1,5 cm da base). O pedículo desenhado é então dissecado e rotacionado a fim de recobrir a lesão, e suturado com pontos interrompidos simples com poliglatina 910 ou náilon, 7-0 a 9-0, com equidistância de 1-1,5 mm. Para evitar a interrupção do aporte sanguíneo, não é realizada sutura na área da lesão corneal proximal à base do pedículo. Após 3-8 semanas, é indicado o recorte do pedículo próximo ao limbo (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

O recobrimento conjuntival livre, também denominado em ilha, é essencialmente um transplante da conjuntiva bulbar ou palpebral para a córnea, sempre com o epitélio voltado para cima, e suturado com sutura interrompida simples ou esta combinada com sutura contínua. O sucesso

dessa técnica está atrelado à vascularização corneal resultante da lesão inicial, que irá revascularizar o enxerto. O seu uso é descrito em úlceras profundas e perfuração corneal (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Técnicas de transposição corneoescleral e inserção de um aloenxerto corneal também estão disponíveis (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005). O uso de cianoacrilato também foi descrito, no tamponamento de pequenas perfurações corneais (VOTE; FRACO, 2000). Ao longo dos últimos anos, estudos são conduzidos empregando-se outros materiais alternativamente aos enxertos conjuntivais em casos de úlceras profundas e persistentes (FERREIRA et al., 2013).

Dentre as membranas descritas para uso nas desordens corneais na medicina veterinária, podem ser citadas a cápsula renal equina (ANDRADE et al., 1999), escama de sardinha (*Sardinella brasilienses*) (LAUS; FERREIRA E ANDRADE, 2000), submucosa intestinal suína (BUSSIERES et al., 2004), membrana de poliuretano vegetal derivada da mamona (MORALES et al., 2005), membrana de celulose microfibrilar (MACEDO et al., 2010), pericárdio homólogo ou heterólogo (DULAURENT et al., 2014; HÜNNING et al., 2009), submucosa de bexiga suína (CHOW; WESTERMEYER, 2015), e membrana amniótica homóloga ou heteróloga (ANDRADE et al., 2009; FERREIRA et al., 2013; ION et al., 2016; SAMPAIO et al., 2006; TSUZUKI et al., 2008; VONGSAKUL et al., 2009).

Destaque se dá à membrana amniótica, que vem sendo amplamente utilizada na aplicação em lesões corneais na medicina humana e veterinária, visto o ganho na transparência corneal e qualidade de refração pós-operatória (ION et al., 2016), devido suas propriedades antifibrótica, antiangiogênica, antiprotease e anti-inflamatórias (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Ion et al. (2016), consideraram a membrana amniótica a melhor opção terapêutica após ceratectomia em felinos com sequestro corneal até o momento, observando reepitelização, inibição da vascularização corneal e da formação de tecido fibroso, com bom resultado cosmético. Resultados semelhantes quanto à qualidade da cicatriz corneal foram observados em um

estudo com o uso da membrana amniótica homóloga em úlceras corneais profundas em cães (VONGSAKUL et al., 2009).

Ferreira et al. (2013) realizaram um estudo comparativo em cães com o emprego de enxerto conjuntival 360º e implante de membrana amniótica na reparação corneal em úlceras profundas, e foi observado maior taxa de sucesso, com menos complicações, na utilização da membrana amniótica. Na avaliação do uso da membrana amniótica humana na deficiência induzida de células do limbo em coelhos, foi observado um epitélio corneal neoformado mais organizado quando comparado ao grupo em que a membrana amniótica não foi aplicada, porém não houve retorno da transparência corneal no tempo de trinta dias de estudo (ANDRADE et al., 2009).

O uso das membranas de cápsula renal equina, escama de sardinha, submucosa intestinal suína, poliuretana vegetal derivada da mamona e pericárdio homólogo ou heterólogo em lesões corneais na espécie canina, promoveram suporte mecânico e cicatrização corneal, se tornando opções viáveis no tratamento de afecções da córnea; entretanto, de uma forma geral, foi observado opacidade corneal evidente no local da lesão com o uso dos materiais acima citados (ANDRADE et al., 1999; BUSSIERES et al., 2004; DULARENT et al., 2014; HÜNNING et al., 2009; LAUS; FERREIRA E ANDRADE, 2000; MORALES et al., 2005).

Macedo et al. (2010) realizaram ceratoplastia lamelar em trinta coelhos com o uso da membrana de celulose microfibrilar, e posterior avaliação clínica e histopatológica ao longo de sessenta dias. Houve incorporação do implante à córnea entre o sétimo e décimo dias pós-operatório, e discretos sinais de inflamação corneal, com boa transparência corneal aos sessenta dias, fatos que permitiram aos autores concluir que a membrana de celulose microfibrilar é um material promissor para ser utilizado na córnea.

Um recente estudo avaliou 82 olhos de cães e gatos tratados com submucosa de bexiga suína, comercialmente disponível (ACellVet™), cursando com ceratites ulcerativas graves ou após ceratectomia para excisão de sequestro corneal, concluindo que este implante é uma boa alternativa de

tratamento, com mínimas complicações e discreta cicatriz final em gatos, e opacidade cicatricial mais pronunciada em cães, com maiores taxas de deiscência nessa espécie quando comparado ao uso de técnicas convencionais (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

Os polímeros biodegradáveis são excelentes opções para reparar órgãos ou tecidos, visto que degradam enquanto o novo tecido é formado, sem deixar resíduos estranhos ao organismo (MA, 2004). Os biopolímeros sintéticos mais utilizados para este fim são o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico ácido co-glicólico) (PLGA) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (OKAMOTO; JOHN, 2013).

O PLA, PGA e PLGA são amplamente utilizados em fios de suturas aprovados pela FDA (*US Food and Drug Administration*), por apresentarem biocompatibilidade e produção de componentes de degradação não tóxicos (OKAMOTO; JOHN, 2013). Peng et al. (2011) testaram a biocompatibilidade e degradação do PLGA subconjuntival em coelhos, e não observaram reação inflamatória significativa. O PLGA também tem sido estudado no cultivo de células do limbo, se mostrando um excelente meio reservatório de células para reparação corneal (ORTEGA et al., 2013).

O PCL também tem sido utilizado na medicina humana, como em dispositivos de liberação controlada de fármacos (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009) e, atualmente, vem se mostrando um material promissor na engenharia de tecidos para aplicação na córnea (SALEHI et al., 2014; SALEHI et al., 2017; STAFIEJ et al., 2017). O copolímero PLGA-poli(etileno glicol)PEG-PLGA em termogel também já foi testado em lesões corneais em coelhos (PRATOOMSOOT et al., 2008), e tem sido estudado para uso em liberação de drogas, por via local/tópica (GAO et al., 2010) e subconjuntival (CUMING et al., 2017).

O polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) é um copoliéster alifático-aromático com base nos monômeros de 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico (HERRERA et al., 2002; FUKUSHIMA et al., 2012), que embora seja biodegradável, é um polímero sintético adquirido a partir de

derivados do petróleo. É altamente flexível, com elevado alongamento à ruptura (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009), semicristalino e termoplástico (SIGNORI; COLTELLI; BRONCO, 2009).

As propriedades do PBAT *in vivo* ainda são pouco estudadas. Poucos relatos aventam a possibilidade de sua utilização para aplicações clínicas (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013; JAO et al., 2010), e concluíram que este material não tem toxicidade celular (FUKUSHIMA et al., 2012; FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013; GOES et al., 2012; JAO et al., 2010). Recentemente, próteses de PBAT com nanohidroxiapatita sintética foram implantadas em fraturas de tíbia induzidas em ratos, com resultados incentivadores no estudo da regeneração óssea (SANTANA-MELO et al., 2017).

Com base no exposto, objetivando verificar a biocompatibilidade do PBAT na córnea e posterior aplicação clínica deste polímero nas ceratites ulcerativas profundas, optou-se por realizar dois estudos distintos, os quais compreenderão os capítulos 2 e 3 da presente dissertação de Mestrado.

No capítulo 2, se encontra exposto o artigo que avaliou a biocompatibilidade da membrana de PBAT na córnea de coelhos, por meio de estudo clínico experimental e histopatológico após enxertia interlamelar do PBAT, ao longo de 60 dias.

No capítulo 3, é apresentado o artigo que estudou a evolução clínica do emprego da membrana de PBAT no tratamento de ceratites ulcerativas complicadas em cães, comparando ao uso do enxerto conjuntival, ao longo de 90 dias.

Referências

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

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

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 2, p.125-155, 2009.

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

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

CUMING, R. S.; ABARCA, E. M.; DURAN, S.; WOOLDRIDGE, A. A.; STEWART, A. J.; RAVIS, W.; BABU, R. J.; LIN, Y.; HATHCOCK, T. Development of a Sustained-Release Voriconazole-Containing Thermogel for Subconjunctival Injection in Horses. **Investigative Ophthalmology; Visual Science**, v. 58, n. 5, p. 2746-2754, 2017.

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

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

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

FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 80, n. 81, p. 291-298, 2013.

FUKUSHIMA, K.; WU, M. H.; BOCCHINI, S.; RASYDA, A.; YANG, M. C. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. **Materials Science Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1331-1351, 2012.

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

GAO, Y.; SUN, Y.; REN, F.; GAO, S. PLGA-PEG-PLGA hydrogel for ocular drug delivery of dexamethasone acetate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 10, p. 1131-1138, 2010.

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

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

GOES, A. M.; CARVALHO, S.; ORÉFICE, R. L.; AVÉROUS, L.; CUSTÓDIO, T. A.; PIMENTA, J. G.; SOUZA, M. B.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S.;

Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, vol. 22, n. 1, p. 34-40, 2012.

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

HERRERA, R.; FRANCO, L.; RODRÍGUEZ-GALÁN, A.; PUIGGALÍ, J. Characterization and degradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)s. **Polymer Chemistry**, v. 40, n. 23, p. 4141-4147, 2002.

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

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

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

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

JAO, W.; LIN, C.; HSIEH, J.; YEH, Y.; LIU, C.; YANG, M. Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly(butyleneadipate-co-terephthalate) films. **Polymers Advanced Technologies**, v. 21, p. 543-553, 2010.

LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; ANDRADE, A. L. The use of the sardine scale (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), preserved in glicerine, in experimental lamellar keratoplasties in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2000.

MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, p. 30–40, 2004.

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

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

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487-1503, 2013.

ORTEGA, Í.; RYAN, A. J.; DESHPAND, P.; MACNEIL, S.; CLAEYSSSENS, F. Combined microfabrication and electrospinning to produce 3-D architectures for corneal repair. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 5511-5520, 2013.

PENG, Y.; ANG, M.; FOO, S.; LEE, W. S.; MA, Z.; VENKATRAMAN, S. S.; WONG, T. T. Biocompatibility and biodegradation studies of subconjunctival implants in rabbit eyes. **Plos One**, v. 6, n. 7, p. 1-11, 2011.

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

PRATOOMSOOT, C.; TANIOKA, H.; HORI, K.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S.; TIGHE, P. J.; DUA, H.; SHAKESHEFF, K. M.; ROSAMARI, F.; ROSE, A. J. A thermoreversible hydrogel as a biosynthetic bandage for corneal wound repair. **Biomaterials**, v. 29, p. 272-181, 2008.

SALEHI, S.; CZUGALA, M.; STAFIEJ, P.; FATHI, M.; BAHNERS, T.; GUTMANN, J. S.; SINGER, B. B.; FUCHSLUGER, T. Poly (glycerol sebacate)-Poly (ϵ - caprolactone) blend nanofibrous scaffold as intrinsic bio- and immunocompatible system for corneal repair. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 370-380, 2017.

SALEHI S.; GRÜNERT A. K.; BAHNERS T.; GUTMANN J. S.; STEUHL K. P.; CZUGALA M.; SINGER B. B.; FUCHSLUGER T. New nanofibrous scaffold for corneal tissue engineering. **Acta Ophthalmologica**, v. 231, p. 626-630, 2014.

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

SANTANA-MELO, G. F.; RODRIGUES, B. V. M.; SILVA, E.; RICCI, R.; MARCIANO, F. R.; WEBSTER, T. J.; VASCONCELLOS, L. M. R.; LOBO, A. O. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo

osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 544-552, 2017.

SIGNORI, F.; COLTELLI, M.; BRONCO, S. Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 74-82, 2009.

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

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

STAFIEJ, P.; KÜNG, F.; THIEME, D.; CZUGALA, M.; KRUSE, F. E.; SCHUBERT, D. W.; FUCHSLUGER, T. A. Adhesion and metabolic activity of human corneal cells on PCL based nanofiber matrices. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 764-770, 2017.

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

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

VOTE, B. J. T.; FRACO, M. J. E. Cyanoacrylate glue for corneal perforations: a description of a surgical technique and a review of the literature. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 28, p. 437-442, 2000.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DO POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO) EM CÓRNEA DE COELHOS

Resumo

A biocompatibilidade da membrana do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) na córnea de coelhos foi estudada por meio de avaliação clínica e histopatológica. Foram utilizados 12 coelhos Nova Zelândia, que receberam a membrana de PBAT por enxertia interlamelar. Os aspectos clínicos oftalmológicos foram avaliados aos 1, 3, 7, 15, 30, 45 e 60 dias pós-operatórios e os histopatológicos aos 30 e 60 dias. Clinicamente, foi observada baixa frequência de sinais de inflamação corneal, o que foi confirmado pelo exame histopatológico. Concluiu-se que a membrana de PBAT pode ser empregada em córnea de animais, pois não foram observados sinais inflamatórios importantes, bem como sinais de rejeição dos enxertos, na maioria dos animais. Trata-se de mais uma opção protética que pode estar indicada no tratamento cirúrgico de úlceras profundas de córnea nesta e, possivelmente, em outras espécies.

Palavras-chave: biocompatibilidade, ceratites ulcerativas, ceratoplastia.

Introdução

O polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) é um copoliéster alifático-aromático com base nos monômeros de 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico (FUKUSHIMA et al., 2012; HERRERA et al., 2002), que embora seja biodegradável, é um polímero sintético adquirido a partir de derivados do petróleo. É altamente flexível, com elevado alongamento à ruptura (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009), semicristalino e termoplástico (SIGNORI; COLTELLI; BRONCO, 2009).

Os polímeros biodegradáveis são excelentes opções para reparar órgãos ou tecidos, visto que degradam enquanto o novo tecido é formado, sem

deixar resíduos estranhos ao organismo (MA, 2004). Os biopolímeros sintéticos mais utilizados para este fim são o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico ácido co-glicólico) (PLGA) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (OKAMOTO; JOHN, 2013).

O PLA, PGA e PLGA são amplamente utilizados em fios de suturas aprovados pela FDA (*US Food and Drug Administration*), por apresentarem biocompatibilidade e produção de componentes de degradação não tóxicos (OKAMOTO; JOHN, 2013). Peng et al. (2011) testaram a biocompatibilidade e degradação do PLGA subconjuntival em coelhos, e não observaram reação inflamatória significativa. O PLGA também tem sido estudado no cultivo de células do limbo, se mostrando um excelente meio reservatório de células para reparação corneal (ORTEGA et al., 2013).

O PCL também tem sido utilizado na medicina humana, como em dispositivos de liberação controlada de fármacos (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009) e, atualmente, vem se mostrando um material promissor na engenharia de tecidos para aplicação na córnea (SALEHI et al., 2017; SALEHI et al., 2014; STAFIEJ et al., 2017). O copolímero PLGA-poli(etileno glicol)PEG-PLGA em termogel também já foi testado em lesões corneais em coelhos (PRATOOMSOOT et al., 2008), e tem sido estudado para uso em liberação de drogas, por via local/tópica (GAO et al., 2010) e subconjuntival (CUMING et al., 2017).

As propriedades do PBAT *in vivo* ainda são pouco estudadas. Poucos relatos aventam a possibilidade de sua utilização para aplicações clínicas (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013; JAO et al., 2010), e concluíram que este material não tem toxicidade celular (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013; FUKUSHIMA et al., 2012; GOES et al., 2012; JAO et al., 2010). Recentemente, próteses de PBAT com nanohidroxiapatita sintética foram implantadas em fraturas de tíbia induzidas em ratos, com resultados promissores na regeneração óssea (SANTANA-MELO et al., 2017).

Na córnea de animais, outros materiais já foram testados, constituindo-se em alternativas terapêuticas no tratamento de úlceras de córnea profundas,

as quais requerem procedimentos cirúrgicos de ceratoplastia que envolvem as técnicas de suporte mecânico para o sucesso terapêutico (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; MORALES et al., 2005). Com o objetivo de verificar a biocompatibilidade do PBAT e posterior aplicação clínica, estudos experimentais são necessários, pois podem permitir a descoberta de mais uma opção de tratamento aplicável às ceratites ulcerativas.

Dentre os polímeros biodegradáveis, a membrana de PBAT foi estudada no presente trabalho devido sua transparência e maleabilidade consideradas, segundo nosso julgamento, adequadas para aplicação no tecido corneal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a biocompatibilidade da membrana de PBAT na córnea, por meio de estudo clínico experimental e histopatológico em córnea de coelhos.

Material e Método

O estudo foi realizado nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, campus de Araçatuba. O referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da mesma instituição (protocolo número: FOA-1103-2015).

Foram utilizados 12 coelhos fêmeas, da raça Nova Zelândia, com idade de 120 dias, saudáveis e sem alterações oftálmicas prévias, adquiridos aleatoriamente do biotério da Fazenda Lageado da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Botucatu. Os animais foram mantidos confinados individualmente em gaiolas, com água e ração *ad libitum*, e foi respeitado o tempo de ambientação de 14 dias prévios, antes do início do procedimento experimental, conforme recomendado para a espécie (PEREIRA, 2002).

Todos os animais foram submetidos a exame físico geral e oftálmico, que se constituiu do teste da lágrima de Schirmer I (teste de Schirmer Ophthalmos®), tonometria de aplanção (Tono-pen XL®), teste de tingimento com fluoresceína (fluoresceína strips Ophthalmos®), biomicroscopia por

lâmpada de fenda (Kowa SL-14®) e oftalmoscopia indireta (EyeteC FOH-5.0®), previamente aos procedimentos cirúrgicos de enxertia interlamelar.

A membrana de PBAT foi desenvolvida pela equipe do Laboratório de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e empresa BASF®, sob o nome comercial de Ecoflex® F Blend C1200. As membranas foram recortadas em discos de 3,0 mm de diâmetro com auxílio de um “punch”, seguido de higienização com água destilada e acondicionamento individual em envelopes, para posterior esterilização. Todas foram esterilizadas por radiação gama na empresa CBE Tecnologia (CBE, Cotia-SP). Utilizou-se a irradiação a partir de 10Gy até 30Gy. Ato contínuo e, em laboratório de microbiologia, as membranas esterilizadas foram incluídas em placas de semeadura de Ágar sangue, para se verificar a eficiência da esterilização em diferentes doses de radiação. Na dose mínima (10 Grays) não houve crescimento bacteriano. Optou-se por tal método de esterilização, pois a membrana utilizada apresenta propriedades hidrofílicas e é degradável em temperaturas acima de 140° C, sendo contraindicado outros métodos por aquecimento e/ou químicos.

Sob efeito de anestesia dissociativa balanceada (medicação pré-anestésica com acepromazina 0,2 mg/kg por via intramuscular e indução com quetamina 15 mg/kg e midazolan 2,5 mg/kg, por via intravenosa) e bloqueio anestésico do nervo trigêmeo (lidocaína e ropivacaína, 0,4 ml totais) associado à instilação de colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5%, foram tomados os cuidados de preparação rotineira para cirurgia oftálmica, segundo Slatter (2005).

Ato contínuo, e com a utilização de microscópio cirúrgico para magnificação (DF Vasconcellos®), ambos os olhos foram submetidos à tuneilização interlamelar estromal com auxílio de espátula cortante oftálmica de 3,0 mm, que fora iniciada na região perilímbica da córnea, na localização das “doze horas”, estendendo-se à região axial da mesma (figura 1a). No olho esquerdo, discos de 3 mm da membrana de PBAT (olho tratado=OT) foram introduzidas no fundo da bolsa estromal (figura 1b e 1c). O olho contralateral

(olho direito) foi submetido ao mesmo procedimento sem introdução da membrana (olho controle=OC). Após o procedimento cirúrgico, os coelhos receberam colírios a base de tobramicina, a cada seis horas, durante sete dias; e analgesia com cloridrato de tramadol por via intramuscular na dose de 4,0 mg/kg, a cada doze horas, por três dias. O procedimento cirúrgico de todos os animais foi realizado pelo mesmo cirurgião com experiência cirúrgica.

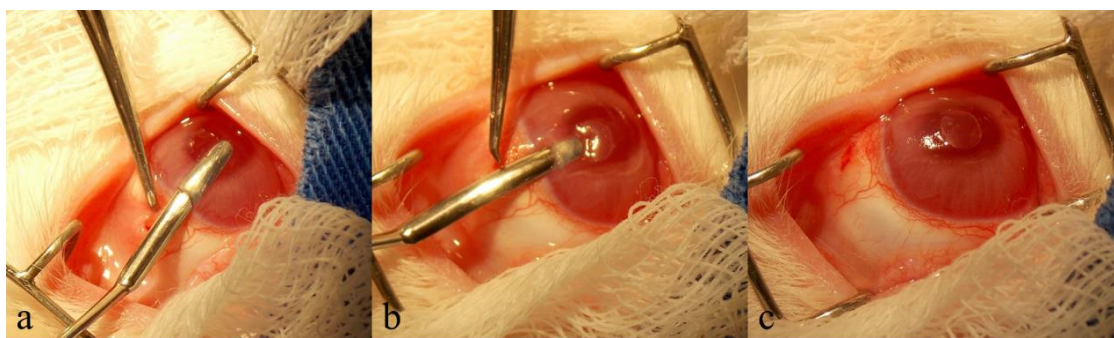


Figura 1. Imagens fotográficas do procedimento de enxertia interlamelar da membrana de PBAT. (a) Tuneilização interlamelar estromal, com auxílio de uma espátula cortante oftálmica, realizada em ambos os olhos; (b) acomodação da membrana de PBAT no fundo da bolsa estromal, realizado no OT; (c) aspecto final do procedimento.

Os olhos foram avaliados clinicamente antes do procedimento (Momento Basal=MB) e aos 1, 3, 7, 15, 30, 45 e 60 dias pós-operatório (M1, M3, M7, M15, M30, M45 e M60). Nos momentos de avaliação, foram estudadas as seguintes variáveis, com preenchimento de ficha individual e categorizadas em escores: blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival (0-ausente; 1-discreto; 2-moderado; 3-intenso), vascularização corneal (0-ausente, 2-proliferação vascular até 2,0 mm distante do limbo; 4- até 4,0 mm; 6- até 6,0 mm; 8- até 8,0 mm), defeito epitelial, quemose, conjuntivalização, descemetocel, perfuração corneal, sinéquia anterior (0-ausente; 1-presente) e opacidade corneal (0-sem dificuldade de observação dos detalhes da íris; 1-discreta, com borramento dos detalhes da íris; 2-moderada, com dificuldade de definir os detalhes da íris; 3-severa, não é possível observar detalhes da íris), com modificações a partir de Andrade et al. (2009). As avaliações foram realizadas por dois avaliadores que computavam, individualmente, os escores dos parâmetros estudados.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos de seis animais cada e submetidos à eutanásia humanitária após 30 (M30) e 60 (M60) dias pós-operatório. A eutanásia foi realizada com quetamina 20 mg/kg e xilazina 3 mg/kg por via intramuscular e, após aproximadamente 5 minutos, propofol por via intravenosa, seguido de cloreto de potássio (10 mL totais cada).

Ambos os olhos foram colhidos por meio de enucleação subconjuntival, e preservados em solução de Davidson por 24 horas, quando foram realizados os cortes sagitais da região contemplando a área referente à tuneilização interlamelar estromal (sentido “doze-seis horas”). As peças cirúrgicas foram mantidas em formol tamponado 10% por mais 24 horas, e acondicionadas em cassetes histológicos identificados e armazenadas em álcool 70% até o momento do processamento histológico rotineiro. Cortes histológicos em lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e avaliadas em microscópio de luz.

Foram estudadas as seguintes variáveis histopatológicas: presença de vasos na córnea, infiltrado polimorfonuclear, infiltrado mononuclear, presença de granuloma (macrófago/célula epitelióide/célula multinucleada), proliferação de fibroblasto, defeito epitelial, cicatriz corneal (fibrila conjuntiva), bactérias, inflamação supurativa, necrose, edema, fragmentação do colágeno, adelgaçamento epitelial, descontinuidade epitelial e perda do paralelismo entre as fibras colágenas (0-ausente; 1-discreto; 2-moderado; 3-intenso).

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

Resultado e Discussão

O estudo clínico possibilitou acompanhar a evolução posoperatória da enxertia interlamelar com a membrana de PBAT e, observou-se pouca variação entre o olho controle e olho tratado (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1 - Frequência das variáveis clínicas observadas no olho controle e olho tratado ao longo de 60 dias.

Variáveis clínicas	OC	OT
Blefarospasmo	0/12	4/12 (33,33%) – discreto
Secreção ocular	0/12	2/12 (16,67%) – discreta
Hiperemia conjuntival	0/12	6/12 (50%) – discreta a moderada
Vascularização corneal	7/12 (58,33%) – até 2 mm	10/12 (83,3%) – até 6 mm
Opacidade corneal	0/12	12/12 (100%) – discreta em todos os momentos e severa no M30 em um animal
Sinéquia anterior	1/12 (8,33%)	1/12 (8,33%)

Legenda: OC: olho controle; OT: olho tratado.

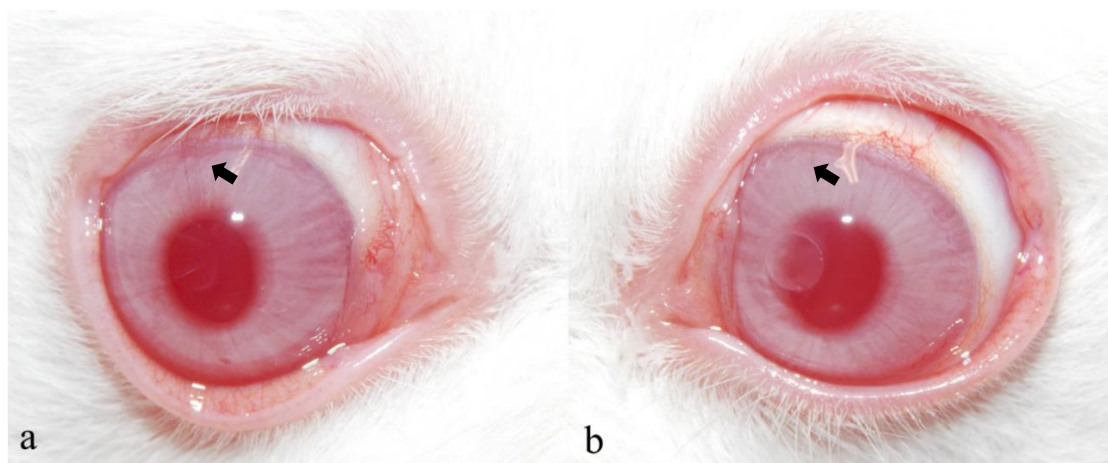


Figura 2. Imagens fotográficas do aspecto clínico oftálmico no OC (a) e OT (b). Notar vascularização corneal de até 2,0 mm bilateral “às doze horas” (setas) e opacidade corneal discreta no OT (b), na localização do implante, aos 7 dias pós-operatório.

Como complicações observadas, elencam-se: migração superficial do implante em dois animais, nos momentos mais tardios (M45 e M60) (Figura 3), e em outros dois houve extrusão total da membrana de PBAT entre o M15 e M30 (Figura 4), totalizando 4 animais ($4/12=33,33\%$). Neles, observou-se a presença de blefarospasmo, secreção ocular e hiperemia conjuntival.

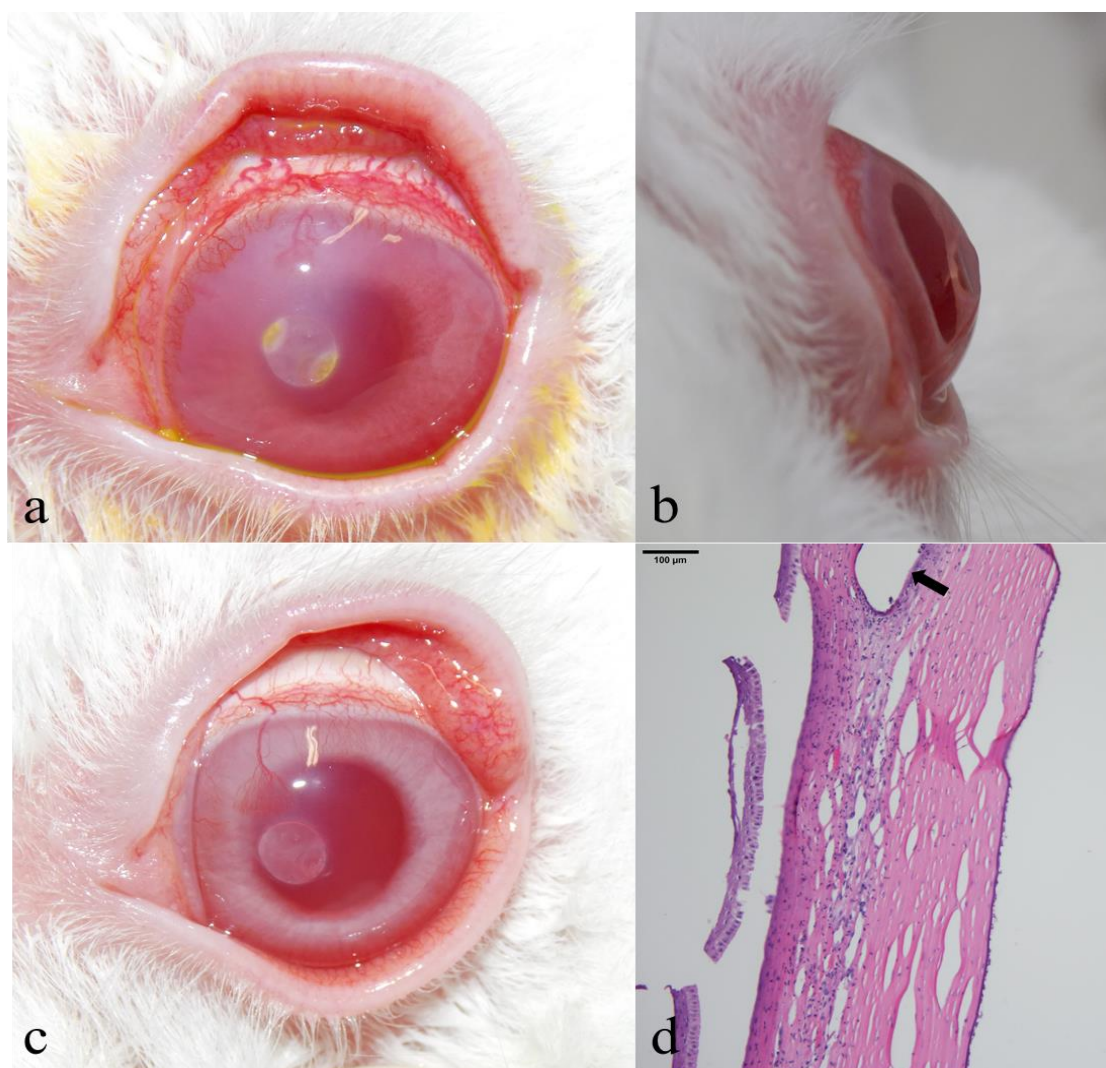


Figura 3. Imagens fotográficas do olho do animal número 11, que apresentou superficialização da membrana de PBAT e seus aspectos histopatológicos. (a) Positividade ao teste de tingimento com fluoresceína, indicando áreas de exposição do implante, além de edema corneal, vascularização do tipo arborizada, hiperemia conjuntival e congestão dos vasos episclerais, aos 56 dias pós-operatório; (b) vista lateral da superficialização da membrana de PBAT aos 42 dias pós-operatório; (c) secreção ocular e hiperemia conjuntival discretas e vascularização corneal de até 6,0 mm, aos 60 dias pós-operatório, já com reincorporação do implante na córnea; (d) fotomicrografia em que observa-se presença moderada de vasos, infiltrado inflamatório polimorfonuclear moderado e mononuclear discreto, proliferação de fibroblasto moderada, edema moderado e defeito epitelial discreto, aos 60 dias; a seta indica a localização da membrana de PBAT. HE.

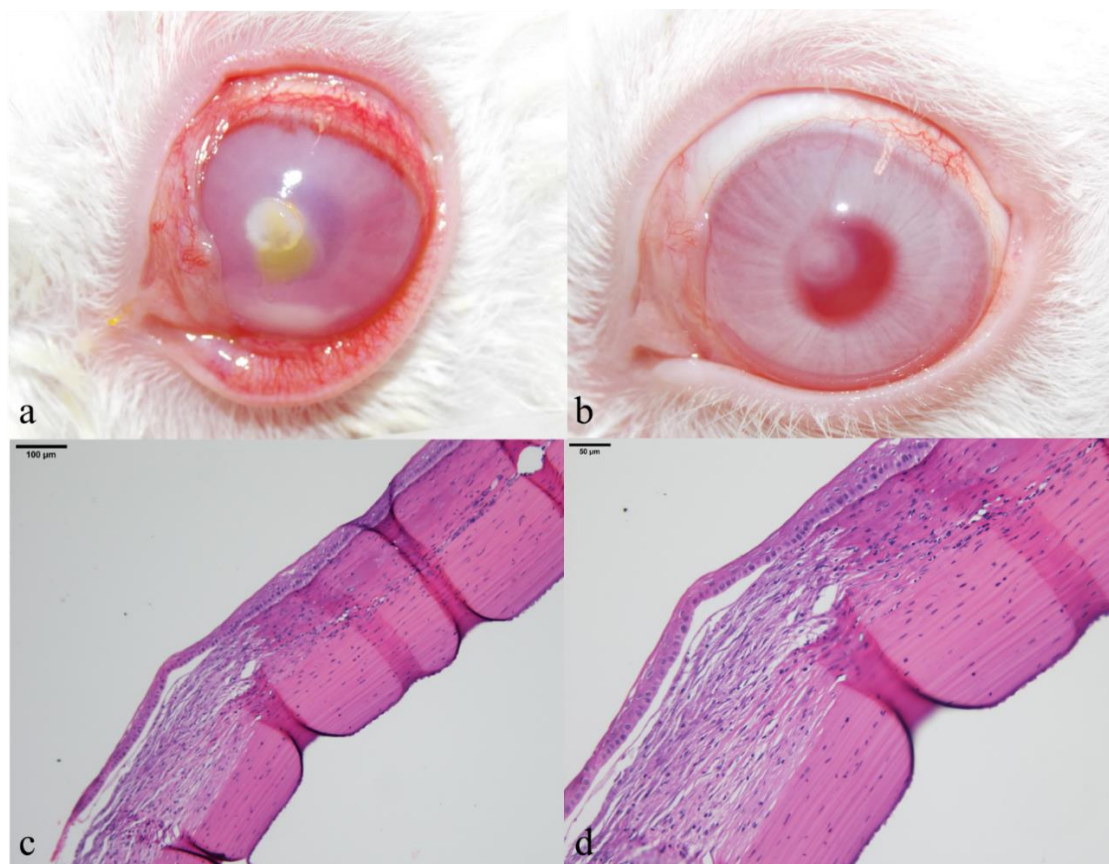


Figura 4. Imagens fotográficas do olho do animal número 4, que apresentou extrusão da membrana de PBAT e seus aspectos histopatológicos. (a) Positividade ao teste de tingimento com fluoresceína, indicando exposição do implante, além de edema corneal, vascularização do tipo “brush like”, hiperemia conjuntival, congestão dos vasos episclerais, e hipópio, aos 19 dias pós-operatório; (b) vascularização corneal de até 6,0 mm e opacidade corneal severa, já com a membrana de PBAT ausente, aos 30 dias pós-operatório; (c) fotomicrografia em que observa-se vasos e edema discreto, infiltrado mono e polimorfonuclear associado à proliferação fibroblástica constituindo a cicatriz corneal com as descontinuidade pontual do epitélio aos 30 dias; (d) detalhe. HE.

Observou-se blefarospasmo discreto (2/12) e hiperemia conjuntival discreta a moderada (4/12) no OT nos momentos iniciais (M3 e M7). Ainda, o blefarospasmo discreto, hiperemia conjuntival discreta a moderada e secreção ocular mucoide discreta foram observadas no M45 e M60, de forma isolada em dois animais, em que houve o deslocamento superficial do implante. Não houve diferença estatística entre o OC e OT em cada momento para o grau de blefarospasmo, secreção ocular e hiperemia conjuntival ($p>0,05$).

A metodologia empregada e avaliação clínica dos animais no presente trabalho foi inspirada em estudos anteriores realizados com a mesma espécie

animal (ANDRADE et al., 2009; BINOTTO et al., 2009; COSTA et al., 2006). De uma forma geral, imputa-se que a apresentação clínica de ambos os grupos estudados foram semelhantes, com baixa frequência de sinais de inflamação corneal e uveal, exceto nos primeiros dias pós-operatório (até M7), alterações que podem ser atribuídas à ocorrência de ceratite e uveíte reflexa, inerentes ao trauma cirúrgico (MAGGS, 2008).

A exceção esteve atrelada aos quatro animais em que houveram as complicações de extrusão da membrana de PBAT ou seu deslocamento para planos mais superficiais da córnea. Essa intercorrência foi atribuída à variação de profundidade do túnel interlamelar estromal, que mesmo tendo sido realizada pelo mesmo cirurgião, e com o auxílio de microscópio cirúrgico, diferiu minimamente na localização da acomodação do implante no estroma anterior ou intermediário. Acreditamos que os implantes localizados no estroma anterior sejam mais susceptíveis a esta intercorrência e que neste caso, não caracterizam um fenômeno de rejeição da membrana implantada, pois na análise histopatológica não foram visualizadas alterações dessa natureza.

A técnica cirúrgica escolhida, de enxertia interlamelar estromal, diminui a possibilidade de extrusão do implante, uma vez que este não está exposto ao ambiente (BARBER; FEASTER; PRIOR, 1980). A membrana de PBAT parece não se incorporar à córnea dentro do período avaliado, por se tratar de um polímero que não se degrada antes de oito semanas em condições de hidrólise *in vitro* semelhantes aos compartimentos biológicos (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013). Talvez, as taxas de extrusão do enxerto fossem maiores se técnicas de enxertia lamelar ou penetrante fossem adotadas, como Morales et al. (2005) observaram em seu estudo com a membrana de poliuretano vegetal derivada de óleo de mamona em córneas de coelhos. Os autores não observaram sinais oftálmicos de desconforto ou inflamação, com exceção da ocorrência de vascularização corneal em alguns animais.

A vascularização corneal foi observada na maioria dos animais em ambos os grupos (7/12 no OC e 10/12 no OT) porém não progrediu além de 2,0 mm no OC. Neste grupo, houve persistência da vascularização em apenas

dois animais no M30 (2/12) e em um no M60 (1/6). No OT a mesma progrediu até 4,0 mm em um animal (1/12) e até 6,0 mm em dois animais (2/12). Nos períodos tardios (M30, M45 e M60), ainda foi observada em quatro animais (4/12), dois (2/6) e em três deles (3/6), respectivamente. Na análise estatística, não houve diferença entre os grupos em cada momento para a vascularização corneal ($p>0,05$).

Na maioria dos animais e em ambos os grupos, a vascularização corneal observada era do tipo “arborizada”, visualizada somente no pólo superior da córnea (às “doze horas”) e restrita ao local do trauma cirúrgico corneal de tuneilização, característico de vascularização superficial localizada no terço anterior do estroma e contíguos à circulação conjuntival do limbo, que ocorre secundário às lesões corneais superficiais (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Sendo assim, houve progressão vascular a partir da circulação conjuntival denotando, apenas, um evento benigno como resposta inflamatória.

As membranas de colágeno utilizadas por Binotto et al. (2009) induziram vascularização corneal quando aplicadas neste órgão, porém em apenas cinco animais (5/16) foi observado persistência da vascularização aos 30 dias de avaliação, e este fenômeno foi atribuído à contaminação do implante. Isso também pode ter ocorrido no presente estudo, visto que nos animais em que houve a progressão da vascularização de 4,00 ou 6,00 mm distantes do limbo, foram observadas as complicações de extrusão ou superficialização da membrana de PBAT, predispondo à infecção devido sua exposição ao ambiente (BARBER; FEASTER; PRIOR, 1980). Isto nos permite admitir que a membrana deste polímero estudado induz angiogênese corneal discreta, a qual, talvez, esteja mais relacionada ao trauma cirúrgico do que à sua presença, já que este fenômeno foi observado em ambos os grupos e na maioria dos animais. Costa et al. (2006) observaram vascularização do tipo “*brush like*” somente nos olhos com a membrana de quitosana, concluindo que a angiogênese foi induzida exclusivamente pela presença do implante.

Optamos, no presente estudo, por não realizar analgesia com anti-inflamatório não esteroide por via local/oftálmica ou sistêmica, a fim de não

comprometer as variáveis estudadas, como sugerido em estudos anteriores (ANDRADE et al., 2009; BINOTTO et al., 2009; COSTA et al., 2006). Por esse motivo, foi escolhido o cloridrato de tramadol como princípio farmacológico para promover conforto pós-operatório aos animais.

A opacidade corneal não foi observada nos OCs, todavia foi observada no OT em todos os animais e nos diferentes momentos de avaliação. Em todos os casos esta variável foi considerada discreta, com exceção de um animal que, no M30, ela se apresentou de forma severa. Neste caso particular, a opacidade corneal severa ocorreu em um dos animais em que foi observada a extrusão da membrana. Para o grau de opacidade corneal, não houve diferença estatística entre o OC e OT em cada momento ($p>0,05$).

A opacidade corneal discreta, na avaliação clínica, foi constatada apenas no segmento onde se encontrava a membrana de PBAT, o que sugere estar associada ao material do implante, que apesar de transparente, em meio ao estroma, apresentou-se um pouco opaco, provavelmente pela sua permeabilidade à água (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009). Admite-se, também, a hipótese de que a membrana de PBAT pode alterar a manutenção do estado de deturgescência fisiológica corneal (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007), visto que o edema discreto a moderado, observado ao exame histopatológico, estava restrito às adjacências da membrana em todos os animais.

Houve sinéquia anterior em um animal de cada grupo (1/12), que se resolveu após o M3 no OC e após 15 dias no OT ($p>0,05$). Não foram observadas outras intercorrências como defeito epitelial, quemose, conjuntivalização, descemetocle e perfuração corneal em ambos os grupos e em nenhum dos momentos estudados.

O tecido histopatológico da córnea dos OCs não apresentou alterações nos momentos estudados (M30 e M60). Observou-se neste grupo integridade da córnea, com manutenção de suas camadas e organização fibrilar estromal (Figura 5a). Nos OTs foram documentadas alterações de intensidade discreta a moderada (Tabela 2 e Figuras 5b, 5c, 5d), porém não houve formação de

granuloma e inflamação supurativa acompanhada por colonização bacteriana e/ou necrose.

Tabela 2 - Frequência das variáveis histopatológicas observadas no olho controle e olho tratado, aos 30 (M30) e 60 dias (M60).

Variáveis histopatológicas	OC		OT	
	M30	M60	M30	M60
Vasos corneais	0/6	0/6	1/6 (16,67%) – discreto	2/6 (33,33%) - discreto a moderado
Infiltrado polimorfonuclear	0/6	0/6	2/6 (33,33%) – discreto	3/6 (50%) - discreto a moderado
Infiltrado mononuclear	0/6	0/6	5/6 (83,33%) - discreto	6/6 (100%) - discreto a moderado
Proliferação de fibroblasto	0/6	0/6	5/6 (83,33%) - discreto a moderado	5/6 (83,33%) - discreto a moderado
Defeito epitelial	0/6	0/6	0/6	1/6 (16,67%) - discreto
Cicatriz corneal	0/6	0/6	1/6 (16,67%) - moderada	0/6
Edema	0/6	0/6	5/6 (83,33%) - discreto a moderado	6/6 (100%) - discreto a moderado
Fragmentação do colágeno	0/6	0/6	3/6 (50%) - discreto	0/6
Adelgaçamento epitelial	0/6	0/6	3/6 (50%) - discreto	2/6 (33,33%) - discreto
Descontinuidade epitelial	0/6	0/6	1/6 (16,67%) - discreto	0/6
Perda do paralelismo entre as fibras colágenas	0/6	0/6	1/6 (16,67%) - discreto	0/6

Legenda: OC: olho controle; OT: olho tratado.

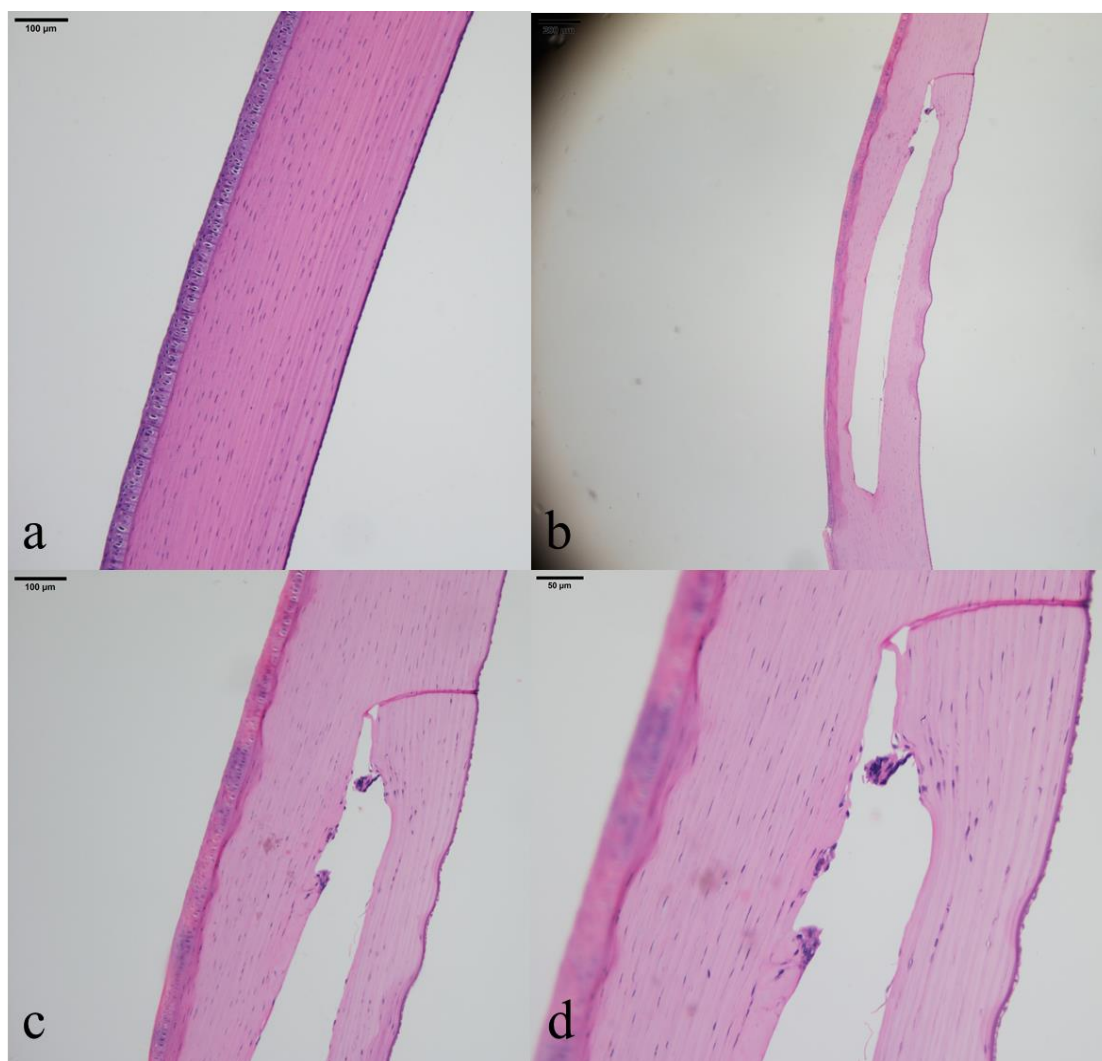


Figura 5. Fotomicrografia da integridade da córnea, com manutenção das camadas e organização fisiológica estromal no OC (a). Corte histológico demonstrando toda a extensão da membrana de PBAT interlamelar estromal (b). Infiltrado mononuclear, proliferação de fibroblasto, edema e adelgaçamento epitelial discretos, aos 30 dias pós-operatório (c,d). HE.

Não houve diferença estatística significativa entre os momentos no OT para as variáveis estudadas.

Para aplicações médicas, a biocompatibilidade dos materiais é imperativa, isto é, o material não deve provocar uma resposta inflamatória ou demonstrar imunogenicidade e citotoxicidade (OKAMOTO; JOHN, 2013). A toxicidade celular do PBAT foi avaliada por Jao et al. (2010), *in vitro*, baseado na porcentagem de inibição do crescimento celular, que esteve em torno de 13,4%. Os autores afirmaram que uma citotoxicidade significativa apresenta

uma inibição do crescimento celular em mais de 30%, e somente acima desse valor, a amostra é considerada citotóxica. Fukushima, Rasyida e Yang (2013) obtiveram resultados semelhantes e concluíram que a membrana de PBAT possui boa segurança biológica. Em nosso estudo, o exame histopatológico permitiu confirmar o que fora observado clinicamente, pois foi visualizado um infiltrado inflamatório pouco significativo nos OTs na maioria dos animais, corroborando com trabalhos semelhantes realizados *in vivo* com outros materiais (MORALES et al., 2005).

A biodegradação do PBAT se dá pela degradação microbiana e hidrólise, e é fortemente influenciada pela atividade microbiana do ambiente (KIJCHAVENGKUL et al., 2010). Alguns estudos foram realizados para avaliar a degradação deste polímero em diferentes ambientes e população microbiana (KIJCHAVENGKUL et al., 2010; WENG et al., 2013; WITT et al., 2001). Fukushima, Rasyida e Yang (2013) avaliaram o tempo de degradação do PBAT (Ecoflex®) *in vitro*, em condições de hidrólise semelhante ao corpo humano, e concluíram que não houve mudança significativa no peso do implante em um período de oito semanas. Porém, nesse período foi constatada uma perda de aproximadamente 40% de sua viscosidade. O tempo de avaliação pós-operatória (60 dias) por nós adotado se aproximou ao de oito semanas (=56 dias). Entretanto, um período de observação mais prolongado poderá fornecer maiores informações quanto às consequências do processo de degradação junto à córnea.

Destacamos, que ao se utilizar biopolímeros na rotina médica, é importante prevenir a infecção do implante, bem como, os cuidados cirúrgicos a serem adotados. O PBAT não tem propriedades bactericidas ou bacteriostáticas (JAO et al., 2010), e para tanto, medidas quanto a esterilização da membrana empregando a radiação, foram adotadas. Os cuidados de antisepsia e assepsia cirúrgica (SLATTER, 2005), bem como a prescrição de colírio antibiótico no período pós-operatório de sete dias, foram instituídos, também, na tentativa de minimizar os riscos de infecção. Porém, a extrusão da membrana ocorreu entre o M15 e M30 em dois OTs, e em um deles os sinais

oftálmicos observados remeteram à contaminação do implante trans ou poscirúrgica. Neste sentido, os achados histopatológicos (figura 4c e 4d) foram fundamentais no descarte destas hipóteses, visto que o infiltrado inflamatório poli e mononuclear foi considerado discreto, e particularmente pobre em neutrófilos, ao contrário do esperado neste tipo de reação inflamatória, ou seja, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares (YANOFF; FINE, 1991). Uma explicação para este fato poderia estar no tempo entre a expulsão da membrana e a avaliação histopatológica, que foi de no mínimo cinco dias e no máximo nove dias (baseado nas avaliações adicionais entre o M15 e M30); no momento da avaliação histopatológica, a ceratite estava resolvida clinicamente. A outra ocorrência de extrusão parcial da membrana não cursou com sinais clínicos oftálmicos de desconforto ou contaminação, apesar da exposição da borda ventral do implante ter sido observada no M15.

Morales et al. (2005) referiram, na avaliação histopatológica, deformação corneal causada pela espessura do implante e adelgaçamento epitelial desde o segundo dia pós-operatório ao 120º dia. Foram observadas, ainda, ulceração corneal com exposição da membrana em alguns animais, e extrusão do implante em três animais (3/18), sugerindo que novos estudos fossem realizados com uma membrana mais delgada. No presente estudo a espessura da membrana de PBAT não se constituiu em um fator complicador, porém pode explicar o adelgaçamento epitelial observado no exame histopatológico em três animais do M30 e, dois do M60, já que a sua espessura, de 0,075 mm, corresponde à 20,8% da espessura total da córnea do coelho (0,36 mm) (HOLMBERG, 2008).

Vale lembrar que utilizamos a membrana de PBAT pura (Ecoflex® F Blend C1200) devido à natureza inédita do presente estudo, e portanto não foram adicionados outros componentes que pudessem melhorar sua biocompatibilidade. Estudos semelhantes podem ser realizados com esta membrana adicionada de componentes como a heparina ou ácido hialurônico, melhorando a biocompatibilidade, fornecendo ação bactericida e bacteriostática, e melhor efeito sobre a proliferação celular (JAO et al., 2010).

Wei et al. (2016) obtiveram excelente atividade antimicrobiana em filmes de PBAT acrescidos de amido termoplástico. Outra opção viável, refere-se à adição de nanomateriais e/ou nanopartículas conforme estudaram Fukushima et al. (2012).

Admite-se a necessidade de novas e originais investigações clínicas em pacientes que estejam cursando um quadro de ceratite ulcerativa complexa. E, outro ponto a se ressaltar, é que a membrana aqui utilizada, ainda não se encontra disponível em escala comercial para fins médicos, sendo sua produção ainda restrita às indústrias de embalagens.

Conclusões

Visto os resultados clínicos e histopatológicos observados com baixa frequência de sinais de inflamação corneal sob as condições aqui adotadas, conclui-se que o material objeto deste estudo pode ser empregado na córnea de animais. Salientamos que os sinais inflamatórios de caráter benigno, sem sinais de rejeição do implante confirmam esta proposição, e nos permite inferir que a membrana se trata de mais uma opção protética que pode estar indicada no tratamento cirúrgico de úlceras profundas de córnea nesta e, possivelmente, em outras espécies.

Referências

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

BARBER, J. C.; FEASTER, F.; PRIOUR, D. The acceptance of a vitreous carbon alloplastic material, proplastic, in the rabbit eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 19, n. 2, p.182-191, 1980.

BINOTTO, T. E.; ANDRADE, A. L.; COSTA, T. A. C.; PLEPIS, A. M. G.; LOPES, R. A.; SOUZA, W. M. Clinical evaluation and induced corneal vascularization study by native and anionic collagen membranes in rabbits corneas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72, n. 6, p. 760-765, 2009.

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 2, p.125-155, 2009.

COSTA, T. A. C.; ANDRADE, A. L.; BINOTTO, T. E.; PLEPIS, A. M. G.; BELILACQUA, L.; SOUZA, W. M. Avaliações clínicas e morfológicas da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córnea de coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 6, p. 817-821, 2006.

CUMING, R. S.; ABARCA, E. M.; DURAN, S.; WOOLDRIDGE, A. A.; STEWART, A. J.; RAVIS, W.; BABU, R. J.; LIN, Y.; HATHCOCK, T. Development of a sustained-release voriconazole-containing thermogel for subconjunctival injection in horses. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 5, p. 2746-2754, 2017.

FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 80, n. 81, p. 291-298, 2013.

FUKUSHIMA, K.; WU, M. H.; BOCCHINI, S.; RASYDA, A.; YANG, M. C. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. **Materials Science Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1331-1351, 2012.

GAO, Y.; SUN, Y.; REN, F.; GAO, S. PLGA-PEG-PLGA hydrogel for ocular drug delivery of dexamethasone acetate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 10, p. 1131-1138, 2010.

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

GOES, A. M.; CARVALHO, S.; ORÉFICE, R. L.; AVÉROUS, L.; CUSTÓDIO, T. A.; PIMENTA, J. G.; SOUZA, M. B.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S.; Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 34-40, 2012.

HERRERA, R.; FRANCO, L.; RODRÍGUEZ-GALÁN, A.; PUIGGALÍ, J. Characterization and degradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)s. **Polymer Chemistry**, v. 40, n. 23, p. 4141-4147, 2002.

HOLMBERG, B. J. Ophthalmology of exotic pets. In: SLLATER D. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4^a ed. St. Louis: Elsevier, 2008. p. 427-441.

JAO, W.; LIN, C.; HSIEH, J.; YEH, Y.; LIU, C.; YANG, M. Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. **Polymers Advanced Technologies**, v. 21, p. 543-553, 2010.

KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; SELKE, S.; NGOUAJIO, M.; FERNANDEZ, R. T. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2641-2647, 2010.

MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, p. 30–40, 2004.

MAGGS, D. J. Cornea and sclera. In: SLATTER D. **Fundamentals of veterinary ophtalmology**. 4 ed. St. Louis: Elsevier, 2008. p.175-202.

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

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487-1503, 2013.

ORTEGA, Í.; RYAN, A. J.; DESHPAND, P.; MACNEIL, S.; CLAEYSSSENS, F. Combined microfabrication and electrospinning to produce 3-D architectures for corneal repair. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 5511-5520, 2013.

PENG, Y.; ANG, M.; FOO, S.; LEE, W. S.; MA, Z.; VENKATRAMAN, S. S.; WONG, T. T. Biocompatibility and biodegradation studies of subconjunctival implants in rabbit eyes. **Plos One**, v. 6, n. 7, p. 1-11, 2011.

PEREIRA, A. M. Principais doenças dos coelhos. In: __. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fio Cruz, 2002. p. 105-114.

PRATOOMSOOT, C.; TANIOKA, H.; HORI, K.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S.; TIGHE, P. J.; DUA, H.; SHAKESHEFF, K. M.; ROSAMARI, F.; ROSE, A. J. A thermoreversible hydrogel as a biosynthetic bandage for corneal wound repair. **Biomaterials**, v. 29, p. 272-181, 2008.

SALEHI, S.; CZUGALA, M.; STAFIEJ, P.; FATHI, M.; BAHNERS, T.; GUTMANN, J. S.; SINGER, B. B.; FUCHSLUGER, T. Poly (glycerol sebacate)-Poly (ϵ - caprolactone) blend nanofibrous scaffold as intrinsic bio- and immunocompatible system for corneal repair. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 370-380, 2017.

SALEHI, S.; GRÜNERT, A. K.; BAHNERS, T.; GUTMANN, J. S.; STEUHL, K. P.; CZUGALA, M.; SINGER, B. B.; FUCHSLUGER, T. New nanofibrous scaffold for corneal tissue engineering. **Acta Ophtalmologica**, v. 231, p. 626-630, 2014.

SANTANA-MELO, G. F.; RODRIGUES, B. V. M.; SILVA, E.; RICCI, R.; MARCIANO, F. R.; WEBSTER, T. J.; VASCONCELLOS, L. M. R.; LOBO, A. O. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 544-552, 2017.

SIGNORI, F.; COLTELLI, M.; BRONCO, S. Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 74-82, 2009.

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

STAFIEJ, P.; KÜNG, F.; THIEME, D.; CZUGALA, M.; KRUSE, F. E.; SCHUBERT, D. W.; FUCHSLUGER, T. A. Adhesion and metabolic activity of human corneal cells on PCL based nanofiber matrices. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 764-770, 2017.

WEI, D.; WANG, H.; ZIAEE, Z.; CHIBANTE, F.; ZHEG, A.; XIAO, H. Non-leaching antimicrobial biodegradable PBAT films through a facile and novel approach. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 986-991, 2016.

WENG, Y.-X.; JIN, Y.-J.; MENG, Q.-Y.; WANG, L.; ZHANG, M.; WANG, Y.-V. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA) and their blend under soil conditions. **Polymer Testing**, v. 32, n. 5, p. 918-926, 2013.

WITT, U.; EINIG, T.; YAMAMOTO, M.; KLEEGERG, I.; DECKWER, W.-D.; MÜLLER, R.-J. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. **Chemosphere**, v. 44, n. 2, p. 289-299, 2001.

YANOFF, M.; FINE, B. S. **Princípios básicos da patologia**. In: __. Patologia ocular. 1ª ed. São Paulo: Ed. Santos, 1991. p. 1-6.

CAPÍTULO 3 – ASPECTOS CLÍNICOS DO ENXERTO CONJUNTIVAL E DO IMPLANTE DO POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-COTEREFTALATO) (PBAT) NO TRATAMENTO DE CERATITES ULCERATIVAS COMPLICADAS EM CÃES

Resumo

A utilização da membrana do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) no tratamento cirúrgico de úlceras de córnea profundas, descemetocle e perfuração corneal em cães foi comparada ao uso convencional do enxerto conjuntival, por meio de avaliação clínica ao longo de 90 dias. Os aspectos clínicos oftalmológicos foram avaliados no momento basal e aos 3, 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Em todos os pacientes houve cicatrização corneal e resolução do quadro clínico-cirúrgico, e não foi constatada perda funcional do bulbo do olho, ou seja, a visão foi preservada. Ainda, não houve ocorrência de extrusão do implante de PBAT. Conclui-se que a membrana deste polímero exerceu um suporte mecânico excelente para a cicatrização corneal de lesões profundas em cães, e pode ser empregado na terapêutica cirúrgica de ceratites ulcerativas nesta e, possivelmente, em outras espécies.

Palavras-chave: biocompatibilidade, úlcera de córnea, ceratoplastia.

Introdução

Devido à maior exposição da córnea a traumas e às enfermidades dos anexos oftálmicos (HERRERA, 2008), as ceratites ulcerativas encontram-se entre as afecções oculares mais frequentes em cães (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008). Estas compreendem lesões em que há perda do epitélio corneal, com exposição de porções variáveis do estroma (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005).

Quando estamos frente a uma úlcera profunda, procedimentos cirúrgicos que envolvem as técnicas de suporte são requeridos (GELATT, 2003). Dentre as técnicas descritas, a mais comumente utilizada é o emprego de

recobrimentos conjuntivais (GELATT, 2003; GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; HERRERA, 2008; HOLLINGSWORTH, 2003), haja vista a variedade de técnicas para realização (pediculado, bipediculado, livre, 180° e 360°) e sua versatilidade (HOLLINGSWORTH, 2003). Estes, consistem em tecido conjuntival dissecado finamente, sem abordar a cápsula de Tenon, seguido de transposição para a córnea, recobrando o defeito epitelial (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Entretanto, os enxertos conjuntivais fornecem suporte tectônico mínimo, e como a conjuntiva é inerentemente opaca, a técnica prejudica a visão. Para evitar essas desvantagens, outros materiais têm sido estudados (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

Dentre as membranas descritas para uso nas desordens corneais na medicina veterinária, podem ser citadas a cápsula renal equina (ANDRADE et al., 1999), escama de sardinha (*Sardinella brasilienses*) (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000), submucosa intestinal suína (BUSSIERES et al., 2004), membrana de poliuretano vegetal derivada da mamona (MORALES et al., 2005), membrana de celulose microfibrilar (MACEDO et al., 2010), pericárdio homólogo ou heterólogo (DULAURENT et al., 2014; HÜNNING et al., 2009), submucosa de bexiga suína (CHOW; WESTERMEYER, 2015), e membrana amniótica homóloga ou heteróloga (ANDRADE et al., 2009; FERREIRA et al., 2013; ION et al., 2016; SAMPAIO et al., 2006; TSUZUKI et al., 2008; VONGSAKUL et al., 2009).

Mais recentemente, diferentes polímeros biodegradáveis têm sido estudados para emprego na oftalmologia, *in vitro* (ORTEGA et al., 2013; SALEHI et al., 2017; SALEHI et al., 2014; STAFIEJ et al., 2017) e *in vivo* (CUMING et al., 2017; GAO et al., 2010; PENG et al., 2011; PRATOOMSOOT et al., 2008;).

O polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) é um copoliéster alifático-aromático com base nos monômeros de 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico (FUKUSHIMA et al., 2012; HERRERA et al., 2002), que embora seja biodegradável, é um polímero sintético adquirido a partir de

derivados do petróleo. É altamente flexível, com elevado alongamento à ruptura (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009), semicristalino e termoplástico (SIGNORI; COLTELLI; BRONCO, 2009).

As propriedades do PBAT *in vivo* ainda são pouco estudadas. Poucos relatos aventam a possibilidade de sua utilização para aplicações clínicas (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013; JAO et al., 2010), e concluíram que este material não tem toxicidade celular (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013; FUKUSHIMA et al., 2012; GOES et al., 2012; JAO et al., 2010). Recentemente, próteses de PBAT com nanohidroxiapatita sintética foram implantadas em fraturas de tíbia induzidas em ratos, com resultados promissores na regeneração óssea (SANTANA-MELO et al., 2017).

Antes de realizar o presente estudo, nós desenvolvemos uma pesquisa semelhante, utilizando a membrana de PBAT em córnea de coelhos através de enxertia interestromal, para avaliar a biocompatibilidade desse polímero na córnea, através de estudo clínico e histopatológico ao longo de 60 dias. Foram observados mínimos sinais de inflamação corneal, e concluímos que o PBAT pode ser utilizado na córnea de animais.

Dentre os polímeros biodegradáveis, a membrana de PBAT foi estudada no presente trabalho devido sua transparência e maleabilidade consideradas, segundo nosso julgamento, adequadas para aplicação no tecido corneal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi comparar clinicamente a cicatrização e opacidade cicatricial corneal da técnica de enxerto conjuntival com a ceratoplastia com a membrana de PBAT, em córnea de cães cursando com um quadro de ceratite ulcerativa complicada.

Material e Método

O estudo foi realizado no Hospital Veterinário (HV) “Luiz Quintiliano de Oliveira”, nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, campus de Araçatuba. O referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da mesma instituição (protocolo número: FOA-1103-2015).

Foram utilizados 18 cães machos e fêmeas, de diferentes raças, peso e idade, pacientes do HV que estavam cursando com ceratite ulcerativa. Foram incluídos no estudo cães com ulcerações corneais profundas, descemetoceloses e perfurações corneais, e que tiveram consentimento prévio do proprietário, mediante assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os animais foram submetidos a exame físico geral e oftálmico, que se constituiu do teste da lágrima de Schirmer I (teste de Schirmer Ophthalmos®), tonometria de aplanção (Tono-pen XL®), teste de tingimento com fluoresceína (fluoresceína strips Ophthalmos®), biomicroscopia por lâmpada de fenda (Kowa SL-14®) e oftalmoscopia indireta (Eyetec FOH-5.0®), previamente aos procedimentos cirúrgicos de ceratoplastia.

Foram realizados, ainda, exames complementares (sorologia ELISA para leishmaniose, hemograma e dosagem sérica de albumina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinina e ureia) para exclusão de doenças concomitantes e avaliações pré-anestésicas e cirúrgicas. Em pacientes com cinco anos de idade ou mais, foi realizada também avaliação cardiológica (eletrocardiograma e, se necessário, radiografia torácica). Os cães que apresentaram positividade na sorologia para leishmaniose foram excluídos do estudo.

A membrana de PBAT foi desenvolvida pela equipe do Laboratório de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e empresa BASF®, sob o nome comercial de Ecoflex® F Blend C1200. As membranas, de espessura de 0,075 mm, foram recortadas em quadrados de 7,0 mm de lado, seguido de higienização com água destilada e acondicionamento individual em envelopes, para posterior esterilização. Todas foram esterilizadas por radiação gama na empresa CBE Tecnologia (CBE, Cotia-SP). Utilizou-se a irradiação a partir de 10Gy até 30Gy. Ato contínuo e, em laboratório de microbiologia, as membranas esterilizadas foram incluídas em placas de semeadura de Ágar sangue, para se verificar a eficiência da esterilização em diferentes doses de radiação. Na dose mínima (10 Grays) não houve crescimento bacteriano. Optou-se por tal método de esterilização, pois a

membrana utilizada apresenta propriedades hidrofílicas e é degradável em temperaturas acima de 140° C, sendo contraindicado outros métodos por aquecimento e/ou químicos.

Visto que os animais utilizados no presente estudo se trataram de pacientes da rotina hospitalar do HV e tinham diferentes dados de resenha e classificação ASA, não foi possível unificar o protocolo anestésico. Sob efeito de protocolo anestésico composto por medicações pré-anestésicas por via intramuscular (fenotiazínicos e opioides), indução com propofol por via intravenosa e manutenção com isoflurano por via inalatória, além de bloqueio anestésico peribulbar com lidocaína, os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião, e com a utilização de microscópio cirúrgico para magnificação (DF Vasconcellos®).

Os pacientes foram divididos conforme sua entrada no HV, em dois grupos de nove animais, e os primeiros nove receberam tratamento convencional com enxerto conjuntival pediculado ou livre (grupo controle=GC), e os outros nove a membrana de PBAT (grupo tratado=GT). Após tomados os cuidados de preparação rotineira para cirurgia oftálmica, segundo Slatter (2005), no GT a membrana foi recortada de acordo com o tamanho do defeito corneal e suturada utilizando padrão simples interrompido não penetrante, a uma equidistância aproximada de 1,0 mm, com nylon 8-0 (Figura 1). A mesma técnica de sutura e fio foi utilizada no GC, porém na técnica de enxerto conjuntival pediculado ou livre, conforme bem descritos (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

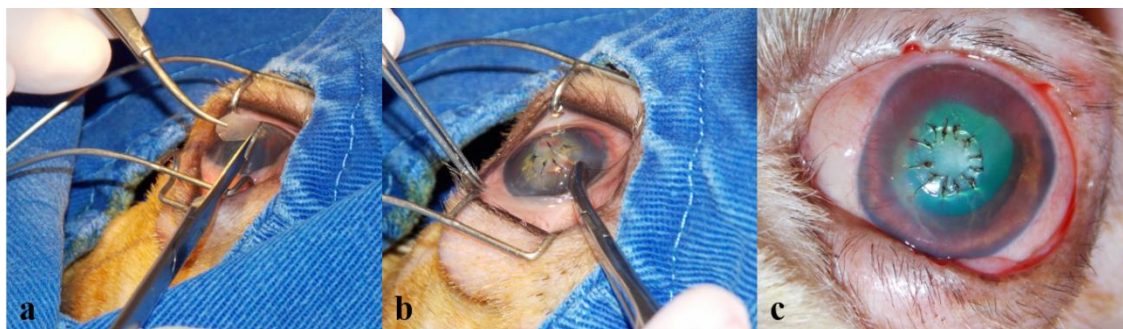


Figura 1. Imagens fotográficas do trans-operatório e pós-operatório imediato no GT. (a) Recorte da membrana de PBAT conforme o tamanho da ceratite ulcerativa, (b) a aplicação dos pontos equidistantes com nylon 8-0 e (c) a apresentação pós-operatória imediata.

Foi preconizado, em ambos os grupos, a retirada dos pontos aos sessenta dias pós-operatório, com exceção de três animais do GT, nos quais fora retirados entre o M30 e M60. Nos pacientes do GC em que foi realizado enxerto conjuntival pediculado, o mesmo foi recortado aos vinte e um dias pós-operatório. No GC, foi realizado a técnica de enxerto conjuntival livre em um paciente, e pediculado nos outros oito.

Todos os cães receberam o mesmo protocolo de tratamento clínico a partir do primeiro dia de atendimento. Foram prescritos colírios a base de tobramicina a cada duas horas durante quinze dias, e a cada seis horas até a retirada dos pontos, EDTA 0,03 % a cada quatro horas durante quinze dias, cetorolaco de trometamina a cada oito horas durante quinze dias e atropina 0,5% a cada doze horas por cinco dias, além de colar elisabetano para prevenção ao auto traumatismo. Nos pacientes com diagnóstico de ceratoconjuntivite seca quantitativa concomitante, foi prescrito colírio a base de tacrolimus 0,03% ou ciclosporina 0,05% com frequência variável de acordo com a gravidade, além de colírio lacrimomimético.

O procedimento cirúrgico ocorreu em até vinte e quatro horas após estabelecido o diagnóstico e iniciado o tratamento clínico. No período pós-operatório foi prescrito também cloridrato de tramadol (4,0 mg/kg a cada oito horas durante cinco dias) para todos os pacientes, e amoxicilina com clavulanato de potássio nos casos de perfuração ocular (22,0 mg/kg a cada doze horas durante dez dias).

Os olhos foram avaliados clinicamente antes do procedimento (Momento Basal=MB) e aos 3, 7, 15, 30, 60 e 90 dias posperatório (M3, M7, M15, M30, M60 e M90). Nos momentos de avaliação, foram estudadas as seguintes variáveis, com preenchimento de ficha individual e categorizadas em escores: blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival (0-ausente; 1-discreto; 2-moderado; 3-intenso), vascularização corneal (0-ausente, 2-proliferação vascular até 2,0 mm distante do limbo; 4- até 4,0 mm; 6- até 6,0 mm; 8- até 8,0 mm), opacidade corneal, defeito epitelial, quemose, conjuntivalização, descemetocèle, perfuração corneal, sinéquia anterior, resposta à ameaça (0-

ausente; 1-presente), grau de opacidade corneal (0-sem dificuldade de observação dos detalhes da íris; 1-discreta, com borramento dos detalhes da íris; 2-moderada, com dificuldade de definir os detalhes da íris; 3-severa, não é possível observar detalhes da íris) e área de vascularização (0-ausência de vasos; 1-até 1/4 da superfície da córnea; 2-até 2/4 da superfície da córnea; 3-até 3/4 da superfície da córnea; 4- 4/4 da superfície da córnea), com modificações a partir de Andrade et al. (2009).

Ainda, foram avaliados a área de opacidade corneal (em cm²), área da úlcera ou enxerto/implante (em cm²), teste da lágrima de Schirmer I (mm/min) e pressão ocular, sempre ao lado do enxerto/implante (média de três aferições, em mmHg, por tonometria de aplanção - Tono-pen XL®). Com exceção das variáveis numéricas, as avaliações foram realizadas por dois avaliadores que computavam, individualmente, os escores dos parâmetros estudados. Em todos os momentos de avaliação, a opacidade corneal foi medida com paquímetro digital em seu maior diâmetro horizontal e vertical e os valores computados; ainda, foi realizado imagem fotográfica da córnea com distância focal semelhante (aproximadamente 15 cm), para então posteriormente realizar o estudo por meio do programa ImageJ 1.49v®, onde os valores de diâmetro são registrados e é obtida a área em cm² dos defeitos corneais existentes.

A análise estatística foi realizada empregando-se o teste de *Man-Whitney* para comparar as variáveis qualitativas ordinais (escore) entre os grupos em cada momento, teste de *Fisher* para comparar as variáveis qualitativas nominais (presente e ausente) entre os grupos em cada momento e teste de *Tukey* para comparar as variáveis numéricas entre os grupos em cada momento. Foi adotado nível de significância de 5%, e utilizado o programa SAS (*Statistical Analysis System*).

Resultado e Discussão

Os dezoito pacientes do presente estudo possuíam entre um e cinco anos de idade (média de 2,8 anos), 66,7% eram machos (12/18) e 33,3% fêmeas (6/18), e 77,85% eram da raça Shihtzu (14/18), 11,15% Lhasa apso

(2/18), 5,5% Poodle (1/18) e 5,5% sem raça definida (1/18). A maior incidência das ceratites ulcerativas nos cães de raças braquicefálicas, encontrada no presente estudo (no caso, o Shihtzu) corrobora com os dados da literatura (HERRERA, 2008).

O olho acometido foi o direito em 66,7% dos animais (12/18) e o esquerdo em 33,3% (6/18). A causa atribuída ao desenvolvimento da ceratite ulcerativa foi distiquíase em 50% dos cães (9/18), ceratoconjuntivite seca quantitativa em 27,9% (5/18), trauma em 11,1% (2/18), cílio ectópico em 5,5% (1/18) e tricomégalia facial em 5,5% (1/18).

Dentre os animais em que foi realizado o tratamento com enxerto conjuntival (GC), 44,5% apresentavam úlcera de córnea profunda (4/9), 22,2% descemetocelose (2/9) e 33,3% perfuração corneal (3/9). No GT, 44,5% apresentavam úlcera de córnea profunda (4/9), 44,5% descemetocelose (4/9) e 11,0% perfuração corneal (1/9).

Somente um dos cães do GT recebeu enxertia conjuntival livre, devido à ocorrência de perfuração corneal significativa no trans-operatório, e melhor tamponamento da câmara anterior nessa técnica, quando comparada à técnica pediculada. Nos demais animais com diagnóstico de perfuração corneal (3/9), foi optado pela enxertia conjuntival pediculada porque o ponto de perfuração era de pequena dimensão em todos os casos, e já havia um tampão de fibrina do humor aquoso eficiente na manutenção da câmara anterior, conforme esperado na primeira fase da cicatrização de uma perfuração corneal (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007), o que não resultou em extravasamento de humor aquoso no período pós-operatório inicial na localização da base do pedículo, onde não há ponto de sutura.

Sabe-se que o enxerto pediculado fornece suporte trófico à lesão, e por isso tem maior taxa de sucesso quando comparado ao livre, o qual depende da vascularização corneal oriunda da lesão inicial para promover sua revascularização e assim evitar a perda do recobrimento (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). Este fato justifica a preferência pela técnica pediculada no presente estudo.

O estudo clínico possibilitou acompanhar e comparar a evolução pós-operatória do enxerto conjuntival (GC) e implante da membrana de PBAT (GT). Em todos os pacientes houve cicatrização corneal e resolução do quadro clínico-cirúrgico, e não foi constatada perda funcional do bulbo do olho, ou seja, a visão foi preservada. A frequência das variáveis clínicas observadas em ambos os grupos está listada na Tabela 1.

Tabela 1 - Frequência das variáveis clínicas observadas no grupo controle e grupo tratado ao longo de 90 dias.

Variáveis clínicas	GC	GT
Blefarospasmo	9/9 (100%) – discreto a moderado	9/9 (100%) – discreto a moderado
Secreção ocular	9/9 (100%) – discreto a intenso	9/9 (100%) – discreto a intenso
Hiperemia conjuntival	9/9 (100%) – discreto a moderado	9/9 (100%) – discreto a moderado
Vascularização corneal	9/9 (100%) – até 8 mm	9/9 (100%) – até 8 mm
Opacidade corneal	9/9 (100%) – presente	9/9 (100%) – presente
Defeito epitelial	9/9 (100%) – presente	9/9 (100%) – presente
Quemose	1/9 (5,5%) - presente	1/9 (5,5%) - presente
Conjuntivalização	0/9	0/9
Descemetocèle	2/9 (22,2%) – presente	4/9 (44,5%) - presente
Perfuração corneal	3/9 (33,3%) – presente	2/9 (22,2%) - presente
Sinéquia anterior	7/9 (77,8%) - presente	1/9 (5,5%) - presente
Resposta à ameaça	9/9 (100%) – presente	9/9 (100%) – presente

Legenda: GC: grupo controle; GT: grupo tratado.

A ocorrência de blefarospasmo discreto a moderado se limitou aos primeiros momentos de avaliação, sendo observado em 100% dos animais de ambos os grupos apenas no MB, reduzindo gradualmente até o M3 no GC (presente em 4/9 animais) e até o M15 no GT (em 1/10 animal), quando não foi mais documentada. No MB, a intensidade do blefarospasmo observada foi estatisticamente maior no GC, com mediana (Md) 2 (=moderado), quando comparado ao GT, com Md 1 (=discreto) ($p=0,0042$). Nos outros momentos não houve diferença estatística entre os grupos estudados ($p>0,05$).

Visto que o diagnóstico de perfuração corneal no MB foi mais frequente no GC (3/9), quando comparado ao GT (1/9), é esperado uma maior ocorrência de blefarospasmo no escore moderado no primeiro grupo estudado, o que explica a diferença estatística observada nesse momento. Diante do exposto, acreditamos que o suporte corneal mecânico promovido por ambas as técnicas de ceratoplastia foi suficiente para diminuir o desconforto oftálmico esperado nas ceratites ulcerativas graves.

A secreção ocular discreta a intensa também foi observada em todos os animais do GC e GT, em todos os momentos de estudo, com exceção de três (3/9) animais no M90 do GC, e dois (2/9) no M60 e cinco (5/9) no M90 do GT, cães em que não foi observada descarga ocular. Em todas as observações a secreção ocular foi classificada como mucoide. Observação semelhante ocorreu, quando nos referimos à hiperemia conjuntival discreta a moderada, também observada em todos os animais do GC e GT, em todos os momentos de estudo, com exceção de dois (2/9) animais no M60 e seis (6/9) no M90 do GC, e um (1/9) no M30, três (3/9) no M60 e seis (6/9) no M90 do GT, cães em que não foi observada conjuntiva hiperêmica. Na análise estatística, não houve diferença entre os grupos em cada momento para a secreção ocular e hiperemia conjuntival ($p>0,05$).

Sinais clínicos oftálmicos comuns em afecções de anexos oculares são descarga ocular, podendo variar de epífora a secreção mucoide ou mucopurulenta, e hiperemia conjuntival (SLATTER, 2005). Dentre os animais do presente estudo, 50% (9/18) foram diagnosticados também com

ceratoconjuntivite seca, e 27,9% (5/18) com triquíase medial ou pelos na carúncula, o que pode justificar a persistência dessas variáveis em períodos tardios de avaliação na maioria dos animais. Ainda, lembrando que os pontos de córnea foram retirados aos sessenta dias pós-operatório, com exceção de três animais do GT que foi retirado entre trinta e sessenta dias, uma causa provável somatória de secreção ocular e hiperemia conjuntival é a presença do fio de sutura.

A vascularização corneal se desenvolveu em todas as córneas, e foi observada em 100% dos animais em todos os momentos de avaliação. No M90, esta variável ainda foi observada na extensão de até 8 mm do limbo em um (1/9) animal no GC e em cinco (5/9) no GT. Houve diferença estatística entre os grupos no M3, M15, M30, M60 e M90, conforme consta na Tabela 2.

Tabela 2 - Mediana, mínimo e máximo da vascularização corneal no grupo controle e grupo tratado, ao longo de 90 dias; p valor da comparação entre os grupos, em cada momento, obtido através do teste Man-Whitney.

Variável	Momento	GC		GT		p
		Md	Min-Max	Md	Min-Max	
Vascularização corneal	MB	4	2-8	6	2-8	0,0829
	M3	4	2-8	6	4-8	0,0363
	M7	4	2-8	6	4-8	0,0729
	M15	4	2-8	8	6-8	0,0059
	M30	6	4-8	8	6-8	0,0258
	M60	6	4-8	8	6-8	0,0258
	M90	6	4-8	8	6-8	0,0156

Legenda: GC: grupo controle; GT: grupo tratado; Md: mediana; Min: mínimo; Max: máximo; MB: momento basal; M3: 3 dias posoperatorio; M7: 7 dias posoperatorio; M15: 15 dias posoperatorio; M30: 30 dias posoperatorio; M60: 60 dias posoperatorio; M90: 90 dias posoperatorio.

Ainda quanto à vascularização corneal, foi quantificada subjetivamente a área vascularizada, dividindo a córnea em quadrantes (0-ausência de vasos; 1-até 1/4 da superfície da córnea; 2-até 2/4 da superfície da córnea; 3-até 3/4 da

superfície da córnea; 4- 4/4 da superfície da córnea). Isso foi proposto devido à possibilidade do desenvolvimento de uma vascularização 360° no GT, podendo denotar rejeição à membrana de PBAT, conforme observado no estudo de Costa et al. (2006) com a membrana de quitosana em córnea de coelhos. De fato, foi observado clinicamente maior área corneal vascularizada no GT, quando comparado ao GC, porém essa diferença foi mais evidente somente até o M15, a qual atribuímos ao processo cicatricial corneal após uma ceratoplastia em que não há suporte trófico. No M90, a mediana da área de vascularização corneal foi estatisticamente maior no GT, quando comparado ao GC (MdGC=1 e MdGT=2; $p=0,0114$), e nos demais momentos não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$).

Todos os cães do presente estudo apresentaram opacidade corneal em todos os momentos. Não houve diferença estatística entre os grupos em cada momento para a presença ou ausência de opacidade corneal ($p>0,05$).

A opacidade corneal ainda foi avaliada conforme o grau (0-sem dificuldade de observação dos detalhes da íris; 1-discreta, com borramento dos detalhes da íris; 2-moderada, com dificuldade de definir os detalhes da íris; 3-severa, não é possível observar detalhes da íris), que variou entre moderada a severa, e discreta a severa no GC e GT, respectivamente. Esta foi considerada severa em 100% (9/9) dos animais no M90 no GC, e moderada em 3 animais (3/9) e severa no restante (6/9) no mesmo momento no GT. No M3, a mediana no GC foi estatisticamente maior quando comparado ao GT (MdGC=3 e MdGT=2; $p=0,0042$), e nos demais momentos não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). Essa diferença encontrada no M3 se deve provavelmente à semitransparência da membrana de PBAT, que permitiu visualizar a íris, ainda que sem detalhes, o que não é possível através do enxerto conjuntival. Ao longo dos dias e da cicatrização corneal, e assim desenvolvimento da opacidade cicatricial (SLATTER, 2005), somado à característica do PBAT de ser permeável à água (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009), o grau de opacidade se assemelhou em ambos os grupos.

Afim de avaliar a extensão da área de opacidade em ambos os grupos, foram medidos os diâmetros horizontal e vertical, com auxílio de paquímetro digital, da opacidade observada em cada paciente e em cada momento estudado, para posteriormente trabalhar a foto de cada momento no programa ImageJ 1.49v®, e obter a área de opacidade corneal. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados em nenhum dos momentos, porém foram observadas algumas diferenças entre os momentos no mesmo grupo, o que é esperado visto que a área de opacidade diminui conforme ocorre a cicatrização corneal (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007). As médias e desvio padrão desta variável, em cada momento estudado, estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Média, desvio padrão e comparação estatística (teste de Tukey) entre o grupo controle e grupo tratado em cada momento, e entre os momentos do mesmo grupo referente à área de opacidade corneal, ao longo de 90 dias.

Variável	Momento	GC			GT		
		Média	Desvio padrão	Teste de Tukey	Média	Desvio padrão	Teste de Tukey
Área de opacidade corneal (cm ²)	MB	0,821	0,598	Aab	0,864	0,565	Aa
	M3	1,051	0,656	Aa	0,929	0,629	Aa
	M7	1,043	0,769	Aa	0,915	0,672	Aa
	M15	0,928	0,433	Aab	0,840	0,639	Aa
	M30	0,673	0,414	Aabc	0,598	0,458	Aab
	M60	0,462	0,442	Abc	0,450	0,349	Aab
	M90	0,276	0,208	Ac	0,275	0,182	Ab

Legenda: GC: grupo controle; GT: grupo tratado; MB: momento basal; M3: 3 dias posoperatorio; M7: 7 dias posoperatorio; M15: 15 dias posoperatorio; M30: 30 dias posoperatorio; M60: 60 dias posoperatorio; M90: 90 dias posoperatorio; médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar dos resultados não diferirem estatisticamente de uma forma geral quanto às três variáveis referentes à opacidade corneal, o aspecto

estético final notável quanto à transparência corneal foi por nós considerado melhor no GT, quando comparado ao GC (Figuras 2, 3 e 4).



Figura 2. Imagens fotográficas da apresentação clínica nos diferentes momentos de avaliação do animal número 4, do GC. (a) Descemetocoele no momento basal, com hiperemia conjuntival moderada, vascularização corneal 360°, edema corneal difuso e hipópio. (b) Aspecto aos 3 dias pós-operatório do enxerto conjuntival pediculado, (c) sete dias, (d) quinze, (e) trinta, (f) sessenta e (g) noventa. Notar a opacidade severa no locão da enxertia como resultado final.

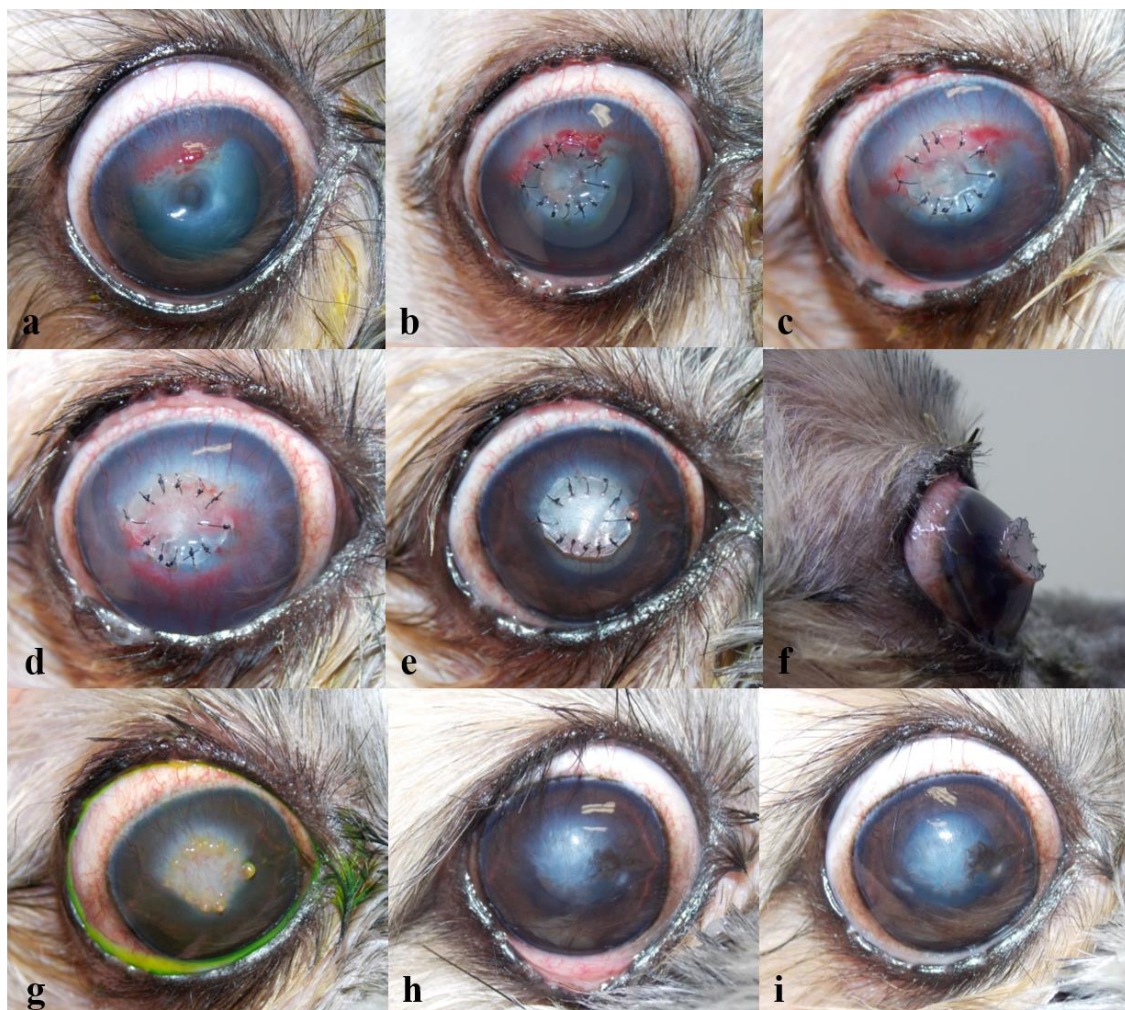


Figura 3. Imagens fotográficas da apresentação clínica nos diferentes momentos de avaliação do animal número 7, do GT. (a) Descemetocel no momento basal, com hiperemia conjuntival discreta, vascularização corneal restrita à periferia dorsal da lesão (10-12 horas) e edema corneal ao redor da úlcera. (b) Aspecto aos 3 dias pós-operatório do implante da membrana de PBAT, (c) sete dias, (d) quinze, (e) trinta, (f,g) trinta e sete, (h) sessenta e (i) noventa. Notar vascularização corneal 360° evidente aos 7 dias pós-operatório (c) e 15 dias (d), com remissão significativa aos 30 dias (e). Notar, ainda, aos 37 dias pós-operatório (f, g) tecido de granulação exuberante encontrado abaixo da membrana de PBAT na região dos pontos (g), imediatamente após sua retirada, e superficialização evidente da mesma (f), que se apresentou clinicamente com blefarospasmo, hiperemia conjuntival e secreção ocular discretos. Aos 90 dias pós-operatório (i), observa-se opacidade corneal severa, porém com resultado cosmético superior quando comparado ao enxerto conjuntival.

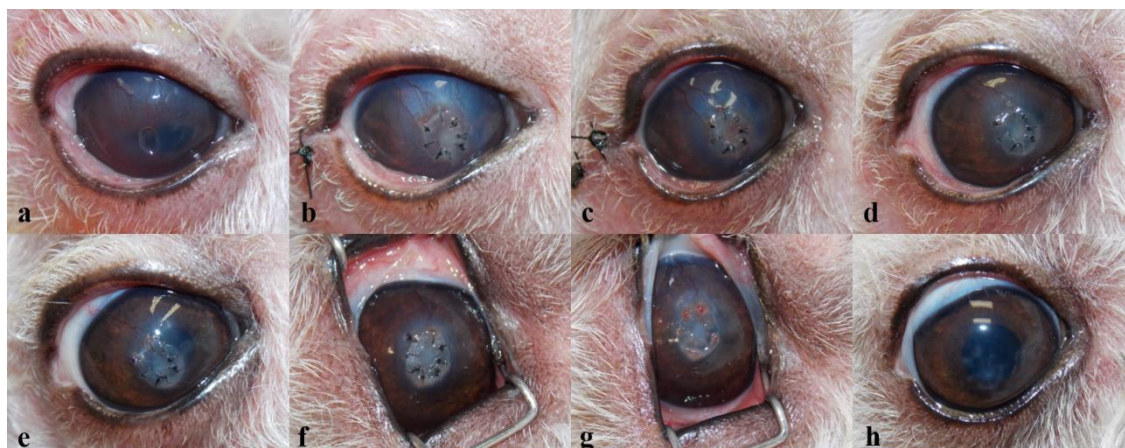


Figura 4. Imagens fotográficas da apresentação clínica nos diferentes momentos de avaliação do animal número 3, do GT. (a) Úlcera profunda no momento basal, com hiperemia conjuntival discreta, vascularização corneal 360° e edema corneal difuso. (b) Aspecto aos três dias pós-operatório do implante da membrana de PBAT, (c) sete dias, (d) quinze, (e) trinta, (f, g) sessenta e (h) noventa. Notar o tecido de graulação exuberante na região dos pontos, observado ao retirar a membrana de PBAT aos 60 dias pós-operatório (g), e opacidade moderada como resultado final (h).

Todos os pacientes apresentaram defeito epitelial no MB, que persistiu até o M7 em um (1/9) animal no GC e dois (2/9) no GT, e até o M15 em um (1/9) animal do GT. A quemose foi observada em um cão do GC no M7 e um do GT no MB. Não foi observado conjuntivalização em nenhum dos pacientes do presente estudo, em nenhum momento de avaliação. Não houve diferença estatística entre os grupos em cada momento para o defeito epitelial, quemose e conjuntivalização.

A presença de descemetocle foi observada somente no momento do diagnóstico (MB), em dois (2/9) animais no GC e quatro (4/9) no GT, assim como a perfuração corneal no GC (3/9); no GT, uma das ocorrências de perfuração foi diagnóstica (MB) e a outra no M3 de um paciente com diagnóstico de descemetocle, que realizou auto traumatismo nos primeiros dias pós-operatório, resultando em um pequeno ponto de extravasamento de humor aquoso confirmado através do teste de Seidel positivo. Nesse caso, foi necessária nova intervenção cirúrgica para refazer os pontos de sutura rompidos após o trauma. Não houve diferença estatística entre os grupos em cada momento para a descemetocle.

No GC, em sete (7/9) pacientes foi documentada a presença de sinéquia anterior, sendo em quatro animais a partir do MB, e em três animais somente a partir do M3; esta observação persistiu até o M90 em quatro animais. No GT, apenas um apresentou sinéquia anterior desde o MB, que não foi mais documentada a partir do M60. No M3 e M7, houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,0498$ em ambos os momentos). Nos demais momentos não houve diferença estatística entre os grupos estudados ($p>0,05$). Essa diferença considerável entre os grupos referente à ocorrência de sinéquia anterior pode estar relacionada à destreza cirúrgica do cirurgião, que possivelmente era menor quando realizados os primeiros procedimentos cirúrgicos da pesquisa, os quais justamente compuseram o GC, ainda que tenha havido uma longa curva de aprendizado na microcirurgia corneal antes de iniciar o presente estudo. Essa hipótese é reforçada pelo fato da aderência da íris com a córnea ter se desenvolvido após o procedimento cirúrgico (M3) em três animais do GC, o que pode estar relacionado a pontos de sutura mais profundos que o ideal e extravasamento de humor aquoso no período pós-operatório, visto que a conjuntiva não oferece uma integridade estrutural ideal para tamponar a câmara anterior imediatamente, levando a um aumento da inflamação intraocular e formação de sinéquia (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007).

Todos os pacientes de ambos os grupos apresentaram resposta à ameaça em todos os momentos estudados, não havendo diferença estatística entre os grupos em cada momento ($p>0,05$). Em alguns casos de ceratites ulcerativas complicadas, não é possível a preservação da visão do paciente (GILGER; BENTLEY; OLLIVIER, 2007; SLATTER, 2005), e o procedimento cirúrgico de ceratoplastia é realizado com intuito apenas tectônico. Felizmente, no presente estudo, foi possível manter a função do bulbo do olho em todos os pacientes de ambos os grupos.

As médias de valores do teste da lágrima de Schirmer I e pressão ocular se mantiveram dentro do valor de referência para a espécie canina em todos os momentos estudados, e não houve diferença estatística entre os grupos em cada momento ou entre os momentos em cada grupo ($p>0,05$).

Como complicações no presente estudo, podemos citar o desconforto que dois animais do GT apresentaram entre trinta e sessenta dias pós-operatório, o que justificou a decisão de retirar a membrana de PBAT antes do tempo por nós preconizado (sessenta dias). Nesses pacientes, foi observado tecido de granulação exuberante abaixo do implante, principalmente nos pontos de sutura, grave o suficiente para projetar superficialmente a membrana de PBAT (Figura 3 f,g). Ainda, um terceiro animal ficou sem o colar elisabetano, relatado pelo tutor, a partir do M30, e quando retornou para a avaliação no M60, se encontrava sem o implante de PBAT e sem os pontos de sutura, porém livre de maiores consequências e apresentando integridade corneal.

Além do exposto, quando na retirada dos pontos no GT, em todos os pacientes a membrana de PBAT também foi destacada da superfície corneal, sem ser necessário qualquer esforço por parte do cirurgião. Inicialmente, esperávamos que pudesse haver incorporação deste polímero à córnea, o que não ocorreu no período avaliado. Isso provavelmente se deve ao fato do PBAT não se degradar antes de oito semanas em condições de hidrólise *in vitro* semelhantes aos compartimentos biológicos (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013). Apesar do observado, não foi documentado extrusão do implante ou sinais clínicos de rejeição do mesmo, no período por nós estudado, diferente do relatado por Morales et al. (2005) nas técnicas de enxertia lamelar e penetrante com a membrana de poliuretano vegetal derivada de óleo de mamona em córneas de coelhos.

O tempo de avaliação pós-operatória por nós adotado (90 dias) poderia fornecer maiores informações quanto às consequências do processo de degradação junto à córnea, caso houvesse incorporação da membrana de PBAT ao tecido corneal. Apesar disso, o objetivo terapêutico de suporte mecânico para cicatrização corneal nas ceratites ulcerativas foi alcançado com sucesso em todos os pacientes do GT, e sugerimos que este polímero seja utilizado na rotina médica para este fim, de fato como um recobrimento temporário. Ainda, acreditamos que a cicatrização corneal ocorra antes dos sessenta dias pós-operatório na maioria dos animais, e conforme a avaliação

do oftalmologista em cada caso, os pontos de sutura e implante já poderiam ser retirados a partir de trinta dias após a ceratoplastia.

Para aplicações médicas, a biocompatibilidade dos materiais é imperativa, isto é, o material não deve provocar uma resposta inflamatória ou demonstrar imunogenicidade e citotoxicidade (OKAMOTO; JOHN, 2013). A toxicidade celular do PBAT foi avaliada por Jao et al. (2010), *in vitro*, baseado na porcentagem de inibição do crescimento celular, que esteve em torno de 13,4%. Os autores afirmaram que uma citotoxicidade significativa apresenta uma inibição do crescimento celular em mais de 30%, e somente acima desse valor, a amostra é considerada citotóxica. Fukushima, Rasyida e Yang (2013) obtiveram resultados semelhantes e concluíram que a membrana de PBAT possui boa segurança biológica.

Até o nosso presente conhecimento, os dados disponíveis quanto à biocompatibilidade deste polímero se limitam à estudos *in vitro* (FUKUSHIMA; RASYIDA; YANG, 2013; FUKUSHIMA et al., 2012; GOES et al., 2012; JAO et al., 2010), com exceção de um estudo com próteses de PBAT com nanohidroxiapatita sintética implantadas em fraturas de tíbia induzidas em ratos (SANTANA-MELO et al., 2017). Visto isso, realizamos uma pesquisa semelhante antes do presente estudo, utilizando a membrana de PBAT em córnea de coelhos através de enxertia interestromal, com posterior acompanhamento clínico ao longo de sessenta dias, e estudo histopatológico aos trinta e sessenta dias, a fim de avaliar a biocompatibilidade desse polímero na córnea. Foram observados mínimos sinais de inflamação corneal, e concluímos que o PBAT pode ser utilizado na córnea de animais. Esse estudo piloto prévio nos encorajou a aplicar a membrana deste polímero em cães da rotina do HV.

Vale lembrar que utilizamos a membrana de PBAT pura (Ecoflex® F Blend C1200) devido à natureza inédita do presente estudo, e portanto não foram adicionados outros componentes que pudessem melhorar sua biocompatibilidade. Estudos semelhantes podem ser realizados com esta membrana adicionada de componentes como a heparina ou ácido hialurônico,

melhorando a biocompatibilidade, fornecendo ação bactericida e bacteriostática, e melhor efeito sobre a proliferação celular (JAO et al., 2010). Wei et al. (2016) obtiveram excelente atividade antimicrobiana em filmes de PBAT acrescidos de amido termoplástico. Outra opção viável, refere-se à adição de nanomateriais e/ou nanopartículas conforme estudaram Fukushima et al. (2012).

Admite-se que a membrana aqui utilizada, ainda não se encontra disponível em escala comercial para fins médicos, sendo sua produção ainda restrita às indústrias de embalagens.

Por fim, observamos que a aceitação estética pós-operatória pelos tutores dos cães do GT foi muito satisfatória, que de uma forma geral verbalizaram isso à nossa equipe. Em contrapartida, no GC, houve repudia estética ao primeiro contato com o paciente por parte da maioria dos proprietários.

Conclusões

Visto que a membrana de PBAT exerceu um excelente suporte mecânico para a cicatrização corneal de lesões profundas em cães, sob as condições aqui adotadas, conclui-se que este polímero pode ser empregado na terapêutica cirúrgica de ceratites ulcerativas nesta e, possivelmente, em outras espécies. Salientamos que tal membrana pode ser uma alternativa viável de auxílio à reparação da córnea de cães, quando houver contraindicação do uso de enxerto pediculado de conjuntiva, já que a aplicação da membrana de polímero não necessita de trauma adicional à superficial ocular.

Referências

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

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

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 2, p.125-155, 2009.

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

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

COSTA, T. A. C.; ANDRADE, A. L.; BINOTTO, T. E.; PLEPIS, A. M. G.; BELILACQUA, L.; SOUZA, W. M. Avaliações clínicas e morfométricas da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córnea de coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 6, p. 817-821, 2006.

CUMING, R. S.; ABARCA, E. M.; DURAN, S.; WOOLDRIDGE, A. A.; STEWART, A. J.; RAVIS, W.; BABU, R. J.; LIN, Y.; HATHCOCK, T. Development of a sustained-release voriconazole-containing thermogel for subconjunctival injection in horses. **Investigative Ophtalmology & Visual Science**, v. 58, n. 5, p. 2746-2754, 2017.

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

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

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

FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 80, n. 81, p. 291-298, 2013.

FUKUSHIMA, K.; WU, M. H.; BOCCHINI, S.; RASYDA, A.; YANG, M. C. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. **Materials Science Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1331-1351, 2012.

GAO, Y.; SUN, Y.; REN, F.; GAO, S. PLGA-PEG-PLGA hydrogel for ocular drug delivery of dexamethasone acetate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 10, p. 1131-1138, 2010.

GELATT, K. N. Doenças e cirurgias da córnea e esclera do cão. In: __. **Manual de oftalmologia veterinária**. 1ª ed. Barueri: Manole, 2003. p. 125-164.

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

GOES, A. M.; CARVALHO, S.; ORÉFICE, R. L.; AVÉROUS, L.; CUSTÓDIO, T. A.; PIMENTA, J. G.; SOUZA, M. B.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S.; Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus

nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**. vol. 22, n. 1, p. 34-40, 2012.

HERRERA, D. Afecções da córnea. In: __. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**. 1^a ed. São Paulo: MedVet, 2008. p. 111-140.

HERRERA, R.; FRANCO, L.; RODRÍGUEZ-GALÁN, A.; PUIGGALÍ, J. Characterization and degradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)s. **Polymer Chemistry**, v. 40, n. 23, p. 4141-4147, 2002.

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

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

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

JAO, W.; LIN, C.; HSIEH, J.; YEH, Y.; LIU, C.; YANG, M. Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. **Polymers Advanced Technologies**, v. 21, p. 543-553, 2010.

LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; ANDRADE, A. L. The use of the sardine scale (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), preserved in glicerine, in

experimental lamellar keratoplasties in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2000.

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

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

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487-1503, 2013.

ORTEGA, Í.; RYAN, A. J.; DESHPAND, P.; MACNEIL, S.; CLAEYSSSENS, F. Combined microfabrication and electrospinning to produce 3-D architectures for corneal repair. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 5511-5520, 2013.

PENG, Y.; ANG, M.; FOO, S.; LEE, W. S.; MA, Z.; VENKATRAMAN, S. S.; WONG, T. T. Biocompatibility and biodegradation studies of subconjunctival implants in rabbit eyes. **Plos One**, v. 6, n. 7, p. 1-11, 2011.

PRATOOMSOOT, C.; TANIOKA, H.; HORI, K.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S.; TIGHE, P. J.; DUA, H.; SHAKESHEFF, K. M.; ROSAMARI, F.; ROSE, A. J. A thermoreversible hydrogel as a biosynthetic bandage for corneal wound repair. **Biomaterials**, v. 29, p. 272-181, 2008.

SALEHI, S.; CZUGALA, M.; STAFIEJ, P.; FATHI, M.; BAHNERS, T.; GUTMANN, J. S.; SINGER, B. B.; FUCHSLUGER, T. Poly (glycerol sebacate)-Poly (ϵ - caprolactone) blend nanofibrous scaffold as intrinsic bio- and immunocompatible system for corneal repair. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 370-380, 2017.

SALEHI, S.; GRÜNERT, A. K.; BAHNERS, T.; GUTMANN, J. S.; STEUHL, K. P.; CZUGALA, M.; SINGER, B. B.; FUCHSLUGER, T. New nanofibrous scaffold for corneal tissue engineering. **Acta Ophtalmologica**, v. 231, p. 626-630, 2014.

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

SANTANA-MELO, G. F., RODRIGUES, B. V. M., SILVA, E., RICCI, R., MARCIANO, F. R., WEBSTER, T. J., VASCONCELLOS, L. M. R., LOBO, A. O. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 544-552, 2017.

SIGNORI, F.; COLTELLI, M.; BRONCO, S. Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 74-82, 2009.

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

STAFIEJ, P., KÜNG, F., THIEME, D., CZUGALA, M., KRUSE, F. E., SCHUBERT, D. W., FUCHSLUGER, T. A. Adhesion and metabolic activity of human corneal cells on PCL based nanofiber matrices. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 764-770, 2017.

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

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

WEI, D.; WANG, H.; ZIAEE, Z.; CHIBANTE, F.; ZHEG, A.; XIAO, H. Non-leaching antimicrobial biodegradable PBAT films through a facile and novel approach. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 986-991, 2016.