

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

**IMPLANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA
CRIOPRESERVADA EM ASSOCIAÇÃO OU NÃO COM
TRANSPLANTE DE LIMBO NO TRATAMENTO DE
ÚLCERAS PROFUNDAS DE CÓRNEA EM CÃES**

Gabriel Thadeu Nogueira Martins Ferreira
Médico Veterinário

Araçatuba – SP
2012

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

**IMPLANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA
CRIOPRESERVADA EM ASSOCIAÇÃO OU NÃO COM
TRANSPLANTE DE LIMBO NO TRATAMENTO DE
ÚLCERAS PROFUNDAS DE CÓRNEA EM CÃES**

Gabriel Thadeu Nogueira Martins Ferreira

Orientador: Prof. Adj. Alexandre Lima de Andrade

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Araçatuba – SP
2012

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

	Ferreira, Gabriel Thadeu Nogueira Martins
F383i	Implante da membrana amniótica criopreservada em associação ou não com transplante de limbo no tratamento de úlceras profundas de córnea em cães/Gabriel Thadeu Nogueira Martins Ferreira. Araçatuba: [s.n], 2012 85f. il.; CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012 Orientador: Prof. Adj. Alexandre Lima de Andrade 1. Córnea. 2. Âmnio. 3. Transplante de tecidos. 4. Limbo da córnea. CDD 636.08977

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL THADEU NOGUEIRA MARTINS FERREIRA – nascido em Santos em 12 de maio de 1985 iniciou e concluiu o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araçatuba (2003 – 2007), sendo premiado pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo pela primeira colocação no Curso de Medicina Veterinária 2007, Turma XIV da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Araçatuba. Durante o período acadêmico, desenvolveu atividades relacionadas à pesquisa como participação em projetos, estágios extracurriculares e curriculares. Realizou o programa de Residência na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária na UNESP - Campus Araçatuba de 2008 a 2010. Iniciou o Curso de Mestrado pela Universidade Estadual Paulista no ano de 2010 junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - UNESP - Campus Araçatuba, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica. Foi bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Durante o período de pós-graduação, o aluno continuou a desenvolver projetos em colaboração com seu orientador, que resultaram em trabalhos científicos, além de participar como co-autor de projetos de outros discentes. Colaborou como parte de iniciação à docência, nas aulas práticas e teóricas da disciplina de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais. Integralizou os créditos em 2011, tendo desenvolvido seu projeto de pesquisa durante os anos de 2010 e 2012, que resultou na presente dissertação.

EPÍGRAFE

“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de
sucesso”.
(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação...

...às pessoas a quem devo tudo o que tenho na vida: meus pais, Valter e Maria Aparecida, minha esposa Talita e ao meu filho Guilherme, vocês são meus amores. Ao meu irmão Thiago e minha irmã de coração Luana e as minhas avós Deolinda e Isaura. Dedico com todo amor, respeito e gratidão, pelo apoio incondicional na trajetória da realização deste trabalho, pelo amor, carinho que sempre tiveram por mim e por tudo que representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida e privilégio de ter me tornado um Médico Veterinário e pela sua companhia e apoio neste trabalho.

À minha família em especial ao meu pai Valter, minha mãe Maria Aparecida e meu irmão Thiago e minha cunhada Luana por acreditarem na educação, me darem todo apoio e conforto necessários, serem os maiores exemplos de vida e pelo amor incondicional que me deu força todo esse tempo. À minhas avós Deolinda e Isaura por dedicarem e proporcionarem todos os predicados que representam às avós. Aos meus sogros José Domingos e Sônia, minha cunhada Lívia e ao Gustavo Henrique pelo suporte, ajuda e carinho. Obrigado por fazerem parte dessa trajetória de minha vida.

À Talita, minha esposa, amor, exemplo e porto seguro; pelo amor, companheirismo, paciência e dedicação em todos os momentos e por me proporcionar a experiência mais feliz e bela da minha vida com a chegada de nosso filho (Guilherme).

Ao meu orientador Prof. Adj. Alexandre Lima de Andrade pela orientação, pela oportunidade de realizar este projeto e do meu crescimento profissional na oftalmologia veterinária acreditando que seria capaz e sobretudo pela paciência durante esta trajetória.

À Silmara pela amizade, companheirismo, por ajudar nos momentos de dificuldades, nas aulas práticas e ajuda para a realização deste trabalho. Tenho muito orgulho de ser seu amigo.

Ao Acácio, Juliana Tessália e sua cadela (filha) Duda por além de sua amizade por permitir a colheita da membrana amniótica e por todo trabalho por ela gerado.

À todos os professores do Hospital Veterinário, em especial a professora Flávia Eugênio pelos ensinamentos, conselhos, orientações, oportunidade de participação na rotina hospitalar e na colaboração em aulas, e sobretudo pelo apoio, amizade e incentivo neta fase difícil.

Aos animais que participaram desse trabalho: Narcizo, Pietra, Riana, Julie, Mel, Riana, Cherry, Pupi, Suri, Belinha, Todinho, Luke, Pingo, Pita e Sol; e aos seus proprietários pelo carinho, dedicação e pela possibilidade de realização deste projeto, sem vocês nada seria possível.

Aos professores Valéria Oliva e Paulo Sérgio Patto pelo apoio, amizade, ensinamentos e por permitir que seus residentes e pós-graduandos realizassem os procedimentos anestésicos.

À professora Tereza Cristina pela ajuda, paciência e por ceder seu laboratório, equipamentos e os materiais para a preparação e acondicionamento da membrana amniótica e a realização dos ELISAs.

Aos meus amigos Acácio, Caio, Diogo, Marcelo Augusto, Mariana, Juliana Tessália, Juliana Pelói, João Henrique, Silmara, Tatianna, Verônica pelas palavras de apoio, pela ajuda com os coelhos, pelo companheirismo e dedicação, principalmente nos momentos mais difíceis. Levarei vocês sempre em meu coração.

A todos os residentes e pós-graduandos: Camila, Valéria, Fernanda, Aline, Celina, Juliana Tessália, Acácio, Fernando, Karina, Thomas, Breno, Barbara, Juliana Peloi, João Henrique, Caio, Beatriz, Joana, Tatianna, Livia pela boa vontade de nunca negarem ajuda quando precisei.

À todos os funcionários do Hospital Veterinário que direta ou indiretamente ajudaram-me no decorrer deste projeto, facilitando a sua execução ; em especial Beatriz, Lucila, Valéria, Andréia, Marilda, Jamil pela paciência e dedicação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo pela bolsa de mestrado concedida.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos que por algum motivo deixaram de ser citados mas que também contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

Assunto	Página
I - INTRODUÇÃO	15
II - REVISÃO DE LITERATURA.....	20
II.I Aspectos anatomofisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal.....	21
II.II Cicatrização corneal.....	27
II.II.I Cicatrização epitelial.....	27
II.II.II Cicatrização estromal.....	30
II.II.III Citocinas e fatores de crescimento na cicatrização corneal ..	33
II.III Ceratites ulcerativas.....	36
II.IV Recobrimento conjuntival 360°.....	38
II.V Membrana amniótica.....	39
II.VI Transplante de limbo esclero-corneal.....	42
III – MATERIAL E MÉTODO.....	45
III.I Animais.....	46
III.II Grupos experimentais	46
III.III Obtenção e preservação da membrana amniótica canina.....	47
III.IV Tratamento clínico.....	47
III.V Avaliação clínica.....	49
III.VI Procedimentos cirúrgicos.....	50
III.VI.I Recobrimento conjuntival 360°.....	51
III.VI.II Implante da membrana amniótica.....	52
III.VI.II Transplante de limbo córneo-escleral autólogo contralateral associado ao implante da membrana amniótica.....	52
III.VII Análise estatística.....	54
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
V – CONCLUSÕES.....	68
VI – REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Mediana, valores mínimo e máximo do escore para defeito epitelial, segundo os grupos em cada momento de avaliação.....**61**

Tabela 2- Mediana, valores mínimo e máximo do escore para qualidade cicatricial, segundo os grupos em cada momento de avaliação.....**64**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Imagens fotográficas da cesariana para obtenção e acondicionamento das membranas amnióticas.....	48
FIGURA 2 - Imagens fotográficas da cirurgia para a realização do recobrimento conjuntival 360°.....	51
FIGURA 3 - Imagens fotográficas da cirurgia para a realização do implante da membrana amniótica canina criopreservada associada ao recobrimento com a terceira pálpebra.....	53
FIGURA 4 - Imagens fotográficas da cirurgia para a realização do transplante de limbo córneo-escleral contralateral associado ao implante da membrana amniótica canina criopreservada e recobrimento com a terceira pálpebra.....	55
FIGURA 5 - Imagens fotográficas de olhos de cães. Imagens A, B, C e D pré-operatório (úlceras de córnea profunda crônica) e 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 1 do Grupo G1 (recobrimento conjuntival 360°). Imagens E, F, G e H pré-operatório (descemetocle com sinéquia anterior) e 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 5 do Grupo G2 (implante da membrana amniótica). Imagens I, J, K e L pré-operatório (úlceras de córnea profunda) e 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 2 do Grupo G3 (transplante de limbo córneo-escleral associado ao implante da membrana amniótica).....	65

**IMPLANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA CRIOPRESERVADA EM
ASSOCIAÇÃO OU NÃO COM TRANSPLANTE DE LIMBO NO
TRATAMENTO DE ÚLCERAS PROFUNDAS DE CÓRNEA EM CÃES**

Resumo - Objetivo: avaliar a aplicação clínica do implante da membrana amniótica canina criopreservada associada ou não ao transplante de limbo e do recobrimento conjuntival 360° no tratamento de úlceras de córnea profundas.

Métodos: quinze cães com ulceração corneal clínica profunda foram alocados em três grupos: GI= recobrimento conjuntival 360° (n=5); GII= implante no bordo da úlcera de membrana amniótica associada ao recobrimento com a terceira pálpebra (n=5) e GIII= implante de membrana amniótica associado ao transplante de limbo córneo-escleral autólogo e ao recobrimento com a terceira pálpebra (n=5). Os parâmetros clínicos avaliados foram: blefarospasmo, secreção ocular, vascularização corneal, defeito epitelial, opacificação corneal e qualidade cicatricial em seis momentos (inicial, 1, 3, 7, 15 e 30 dias de posoperatório).

Resultados: no GI, não se observou aderência do recobrimento conjuntival 360° na úlcera (n=2), deiscência da sutura do recobrimento conjuntival (n=2), sinéquia anterior (n=2) e intensa quemose (n=1). Nos GII e GIII não foram observadas estas complicações. Os animais do GII e GIII apresentaram cicatrização epitelial no M15 e o GI somente M30 ($p<0,05$). Com relação aos outros parâmetros oftálmicos, a diferença foi significativa entre momentos inicial e final no mesmo grupo (blefarospasmo, secreção ocular, vascularização). A cicatriz corneal apresentou-se de maneira mais intensa, densa e desorganizada no GI.

Conclusão: o implante da membrana amniótica associada ou não ao transplante de limbo demonstrou ser mais eficaz no tratamento de úlceras profunda de córnea, quando comparado ao recobrimento conjuntival 360°.

Palavras-chave: córnea, úlcera da córnea, âmnio, transplante de tecidos, transplante homólogo, limbo da córnea.

TRANSPLANTATION OF CRYOPRESERVED AMNIOTIC MEMBRANE OR NOT IN ASSOCIATION WITH TRANSPLANTATION OF LIMBO IN DEEP CORNEAL ULCERS IN DOGS

Abstract - Purpose: to evaluate the clinical application of implant of the canine cryopreserved amniotic membrane (DMEM plus DMSO 1:1) with or without limbal transplantation and 360° conjunctival flap in the treatment of progressive corneal ulceration. **Methods:** 15 dogs of the different breeds, males and females, aging four months to four years old with deep corneal ulceration and different clinical progression were divided in two groups: GI=360° conjunctival graft (n=5); GII=implant of amniotic membrane, sutured at the edge of the ulcer with epithelial side facing up, associated with the third eyelid flap (n=5) and GIII=implant of amniotic membrane associated with the transplantation of autologous limbal corneal-scleral and covering with the third eyelid flap (n=5). The comparative analysis between groups was: complications of the technique used, blepharospasm, ocular secretion, corneal vascularization, epithelial defect and corneal opacification in six moments (first emergency care, surgery and 3, 7, 15 and 30 days of postoperative). It was used a score scale for subjective quantified of the ocular signs. **Results:** in GI, it was observed the non-adherence of the conjunctival graft to the ulcer (n=2), dehiscence of the suture (n=2), anterior synechia (n=2) and intense chemosis (n=1). In GII and GIII, it was not observed these complications. GII and GIII showed epithelial healing in M15 and GI only M30 ($p<0,05$). The other ophthalmic parameters, the difference was significant between initial and final in the same group (blepharospasm, ocular discharge, vascularization). The corneal scar presented in a more intense, dense and disorganized in GI. **Conclusions:** According to the clinical results, the cryopreserved amniotic membrane implant or not in association with transplantation of limbo showed to be more effective in the treatment of deep corneal ulcers compared to the 360° conjunctival flap.

Key words: cornea, corneal ulcer, amnion, tissue transplantation, transplantation, homologous, limbus corneae.

INTRODUÇÃO

I INTRODUÇÃO

A córnea é o componente refrativo mais poderoso dos olhos dos animais domésticos. Sua transparência é resultante da ausência de vasos e células sanguíneas, ausência de pigmentos, epitélio com superfície não queratinizada, superfície óptica lisa conferida pelo filme lacrimal, organização em malha das fibrilas de colágeno de diâmetro e espaço uniforme que elimina a dispersão da luz por interferência destrutiva e controle do conteúdo aquoso pela barreira epitelial e pela bomba endotelial (SLATTER; DIETRICH, 2007). Boa parte dessas propriedades conferidas à córnea é mantida através de uma renovação epitelial contínua suportada pelas células tronco localizadas no limbo e pela alta resistência das junções intercelulares epiteliais (AGRAWAL; TSAI, 2003; LU et al., 2001).

A ceratite ulcerativa é uma das afecções oftálmicas mais comuns em cães devido à localização externa e exposta da córnea sujeita a traumas (GELATT, 2003; SLATTER, 2005). Geralmente, úlceras de córnea superficiais resolvem-se rapidamente, sem complicações. A reparação deste tipo de lesão envolve respostas epiteliais de migração, promovendo mínima cicatriz (MILLER, 2001; PONTES et al., 2011). Entretanto, úlceras profundas acometendo o estroma requerem respostas celulares complexas (proliferação, diferenciação, migração, apoptose e comunicação intercelular) (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; PONTES et al., 2011). Nesses casos, o processo cicatricial pode promover perda da transparência local e déficit visual. Além disso, sem a manutenção do ambiente biológico propício para a cicatrização, todas as úlceras têm progressão potencial para perfuração de córnea podendo levar ao prolapso de íris, endoftalmite e *Pthisis bulbi* (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Assim, a classificação clínica mais importante das úlceras de córnea leva em consideração a profundidade do tecido atingido, sendo caracterizada por: ulceração superficial, ulceração superficial persistente, ulceração profunda,

ulceração profunda progressiva e descemetocèle (MILLER, 2001). As condutas são indicadas de acordo com a apresentação da lesão, podendo ser clínicas (úlceras superficiais), cirúrgicas ou associadas (principalmente em úlceras profundas, na descemetocèle e nas perfuradas) (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Com isso, o tratamento ideal além de promover a cicatrização do tecido, deve favorecer um ambiente propício para que as características que mantêm a córnea como estrutura refrativa não sejam alteradas, devolvendo à transparência semelhante à observada antes da lesão.

Dentre os tratamentos cirúrgicos tradicionais, os recobrimentos conjuntivais são os mais comumente usados. Estes são realizados com o objetivo de reparar a úlcera e prevenir sua progressão, proteger a superfície da córnea durante a reparação e retardar a degeneração do estroma (HOLLINGSWORTH, 2003; MILLER, 2001). Além disso, o suprimento vascular fornecido por tais recobrimentos é benéfico, principalmente, em processos infecciosos envolvidos (HOLLINGSWORTH, 2003). Porém, tais procedimentos não promovem o retorno funcional da córnea no local da úlcera por reparar o tecido através de uma cicatrização fibrótica. Este fato fica evidenciado pela perda da transparência e, em alguns casos, em déficit visual observado após o período de remodelação do estroma (HOLLINGSWORTH, 2003; SLATTER; DIETRICH, 2007).

Alguns estudos foram conduzidos utilizando membranas biológicas em alternativa às enxertias tradicionais no tratamento de úlceras de córnea profundas e persistentes. Atualmente, a membrana amniótica apresenta-se em destaque por conferir, além do suporte tectônico, fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal - EGF, fator de crescimento dos hepatócitos - HGF, fator de crescimento dos ceratócitos - KGF), citocinas (receptor antagonista da interleucina 1 - IL-1ra, interleucina 4 - IL-4, interleucina 10 - IL-10), inibidores de proteases e estimuladores da epitelização (HAO et al., 2000; KOIZUMI et al., 2000; PENA et al., 2007; PONTES et al., 2011; YAM et al., 2002;). A membrana amniótica quando suturada com sua face epitelial voltada para

cima, apresenta denominação de implante. Neste caso, por suas características histológicas semelhantes à membrana basal do epitélio corneal ocorreria à incorporação ao tecido receptor (córnea) (MELLER et al., 2011; RAHMAN et al., 2009). Além disso, a membrana amniótica pode atuar como um substrato ideal para o crescimento, desenvolvimento, facilitando a migração, manutenção das células germinativas e prevenindo apoptose (ESPANA et al., 2003; PONTES, et al., 2011; SANGWAN et al., 2003; YAM et al., 2002). Outras características conferidas à membrana amniótica são a ação antiangiogênica e anti-inflamatória muito importantes na regeneração da função corneal, minimizando a opacidade cicatricial (ANDRADE et al., 2009; HAO et al., 2000; MELLER et al., 2011; PONTES et al., 2011; SHIMMURA et al., 2001).

Alguns estudos experimentais com cultivo de células germinativas do limbo esclero-corneal *in vitro* utilizam a membrana amniótica como substrato para o suporte, migração, crescimento e evitando a morte celular, permitindo assim sua aplicação *in vivo* no tratamento de lesões corneais (ESPANA et al., 2003; JANG et al., 2006; MELLER et al., 2002; QU et al., 2009; SANGWAN et al., 2003). Os transplantes de limbo, de maneira geral, são indicados em pacientes com deficiência de células germinativas para restabelecer a integridade da superfície ocular. O transplante promove, nestes casos, o retorno do fenótipo normal e função óptica, uma vez que tal recobrimento representa fonte de células germinativas do epitélio corneal (BRUNELLI et al., 2007; MELLER et al., 2002; NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001; RYMER, 2000; RYMER et al., 2002). A associação da técnica com a membrana amniótica pode representar uma alternativa às técnicas de cultivo celular sendo clinicamente aplicável e com o potencial de promover uma regeneração do tecido corneal sem cicatriz.

Há carência de estudos clínicos utilizando a membrana amniótica associada ou não ao transplante de limbo em casos de úlcera de córnea profunda em cães com intuito de se obter o retorno do fenótipo corneal próximo do normal. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação clínica do implante com membrana amniótica isolado ou associado

ao transplante de limbo esclero-corneal autólogo contra-lateral em úlceras profundas de córnea em comparação com a técnica de recobrimento conjuntival 360°.

REVISÃO DE LITERATURA

II REVISÃO DA LITERATURA

II.1 Aspectos anatomofisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal

A córnea, em conjunto com a esclera, compõe a túnica fibrosa do bulbo do olho sendo a região de transição entre elas, denominada limbo. São atribuídos, basicamente, duas funções a córnea: uma barreira mecânica protegendo estruturas intraoculares e óptica permitindo a refração da luz até a retina para formação da imagem (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

A córnea é o componente refrativo mais poderoso dos olhos dos animais domésticos. Sua claridade e transparência são resultantes da ausência de vasos e células sanguíneas, ausência de pigmentos, epitélio com superfície não queratinizada, superfície óptica lisa conferida pelo filme lacrimal, organização em malha das fibrilas de colágeno de diâmetro e espaço uniforme que elimina a dispersão da luz por interferência destrutiva e controle do conteúdo aquoso (SLATTER; DIETRICH, 2007). Segundo Slatter e Dietrich (2007), a córnea canina apresenta cinco camadas: filme lacrimal pré-corneal, epitélio e membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio. A espessura da córnea central no cão é de $0,558 \pm 0,076$ mm e a periférica dorsal é $0,617 \pm 0,073$ mm, do que se conclui que a mesma é mais delgada na porção axial e mais espessa na periferia (GELATT, 2003).

A estrutura do filme lacrimal pré-corneal atualmente vem sendo motivo de muitas pesquisas (MURUBE, 2011). Anteriormente, o filme lacrimal era descrito como um fluido trilaminar complexo dividido em partes lipídica, aquosa e mucosa. Porém, estudos da década de 90 sugerem uma revisão da teoria, uma vez que não existem argumentos científicos que sustentem a presença separada das três camadas de forma laminar (CHEN, 1997). A estrutura do filme lacrimal passou a ser considerada como composta por duas camadas: uma fina camada lipídica superficial e uma camada mais interna e espessa mucoaquosa apresentando-se mais concentrada em direção ao epitélio

(CHEN, 1997; FONSECA et al., 2010). Mas, o conceito ainda gera discussão, onde alguns autores consideram quatro camadas (lipídica, seroaquosa anterior, posterior e mucoide) ou cinco camadas (adiciona-se a lipídica anterior ou apolar e lipídica posterior ou polar) (MURUBE, 2011).

Cher (2012) propõe, desde 2007, uma nova expressão denominada “dacruon” ou “dracryon” para caracterizar o conjunto de fluidos que preenche o compartimento da superfície ocular. Sua estrutura seria de um filme lipídico selante e de uma camada mucoaquosa isolada da superfície atmosférica o que, conceitualmente, coloca o saco da superfície ocular (saco conjuntival) como um compartimento. O saco conjuntival e seu revestimento e o epitélio da córnea são denominados como núcleo da superfície ocular. Com isso, a definição de superfície ocular incluiu córnea, conjuntiva, glândulas lacrimais e estruturas palpebrais. Outras derivações importantes são o conceito de unidade funcional lacrimal e do sistema da superfície ocular. A unidade funcional lacrimal compreende o sistema lacrimal, a superfície ocular com suas glândulas acessórias e suas interconexões nervosas que são responsáveis de forma integrada pela manutenção da lágrima, proteção da transparência da córnea e da saúde da superfície ocular. Este conceito de unidade funcional integrada facilita a explicação de muitas doenças da superfície ocular. E o sistema da superfície ocular consiste no epitélio contínuo observado em ductos, acinar das glândulas lacrimais, das glândulas de Meibômio e o sistema nasolacrimal (CHER, 2012).

Independente do nome (filme lacrimal precorneal ou “dacruon”), as funções de seus componentes são mantidas. Sua camada lipídica externa é formada por lipídeos apolares superficiais (ésteres, colesterol e triglicerídeos) e por lipídeos polares posteriores (glicolipídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídeos). Este filme é principalmente produzido pelas glândulas tarsais sebáceas com função de aumentar a tensão superficial da lágrima, limitando a evaporação precoce da camada seroaquosa ou mucoaquosa e selando o compartimento da superfície ocular (CHEN, 1997; CHER, 2012; GELATT, 2003; MURUBE, 2011; SLATTER; DIETRICH, 2007).

A parte seroaquosa ou mucoaquosa da lágrima é secretada pelas glândulas lacrimais principal, acessória e glândula da terceira pálpebra. Além da água, esta camada contém eletrólitos, glicose, ureia, glicoproteínas e proteínas, incluindo imunoglobulina A e G, albumina, beta-lisina, lisozima e lactoferrina (GELATT, 2003; MURUBE, 2011; SLATTER; DIETRICH, 2007). Adicionalmente, apresenta em sua composição, mucina secretada pelas células caliciformes conjuntivais. Próximo ao selante lipídico, o muco está diluído concentrando-se em direção à córnea, chegando a formar, neste local, um gel mucinoso (CHEN, 1997; CHER, 2012).

A mucina (glicoproteína solúvel) derivada de células caliciformes conjuntivais, é intimamente ligada às glicoproteínas transmembranas expressas pelas células apicais da superfície ocular (glicocálice). Assim, realizam a ancoragem da base da camada mucoaquosa às microvilosidades da superfície ocular (córnea e conjuntiva) (CHEN, 1997; CHER, 2012). Esta complexa ancoragem também denominada de complexo “dacruon”/ superfície. A os tornam fisicamente unidas sendo conceitualmente incorporada como parte do bulbo do olho ao invés de uma interface simples como antigamente descrita (CHER, 2012).

As funções das camadas seroaquosa e mucosa ou, simplesmente, mucoaquosa são: limpar o material estranho do saco conjuntival, contribuir para a defesa física e química da superfície ocular, lubrificar a passagem das pálpebras e terceira pálpebra sobre o epitélio e conjuntiva, servir como meio para passagem de nutrientes, oxigênio, células inflamatórias, substâncias bactericidas, fatores de crescimento e imunoglobulinas. Em associação, sua interação estrita com o glicocálice do epitélio corneal atenua microirregularidades da superfície assegurando a manutenção da transparência e criando uma superfície refrativa importante (CHEN, 1997; CHER, 2012; GELATT, 2003; MURUBE, 2011; SLATTER; DIETRICH, 2007).

O epitélio corneal é do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, uniforme sendo composto de seis a oito camadas celulares que se renovam a cada sete a dez dias, graças a um ciclo biológico de morte celular programada

chamado de apoptose. Ele é altamente innervado por nervos sensoriais, sendo um dos tecidos mais sensíveis do organismo, servindo como função protetora (DELMONTE; KIM, 2011). Os nervos ciliares longos (derivados da divisão oftálmica do nervo trigêmeo) ramificam-se dentro do estroma anterior e do epitélio, onde as terminações nervosas ficam desmielinizadas. A densa innervação além de causar intensa dor em lesões superficiais, também deflagra o reflexo do axônio quando estimulados, resultando em miose, hiperemia ocular, lacrimejamento e blefarospasmo (SLATTER; DIETRICH, 2007). Apresenta padrão básico de células superficiais escamosas, células aladas e células epiteliais basais aderidas à membrana basal por hemidesmossomos (DELMONTE; KIM, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SLATTER, 2005). A membrana basal secretada pelas células basais é composta por colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos e heparina (DELMONTE; KIM, 2011).

Com a divisão das células basais, as “células-filhas” são forçadas em direção à superfície, tornando-se achatadas como células aladas e perdendo, gradualmente, suas organelas, diferenciando-se em células superficiais escamosas (SLATTER, 2005). A presença de microvilosidades cobertas por glicocálice nas células superficiais escamosas, além de promover a aderência da mucina ao epitélio, aumenta a superfície de contato entre as mesmas. As células epiteliais apresentam complexos juncionais intercelulares firmes com função de barreira impedindo a entrada de fluido e agentes infecciosos do meio (DELMONTE; KIM, 2011).

As células-tronco epiteliais encontradas no limbo basal são responsáveis pela substituição e regeneração teciduais. São indispensáveis à manutenção da integridade da superfície corneal, promovendo sua renovação em condições normais e a reepitelização em processos reparatórios (DANIELS et al., 2001; RYMER, 2000). As únicas células epiteliais corneais com capacidade mitogênica são as células-tronco, basais e as amplificadoras transitória. Estas células são resultado da divisão das células tronco do limbo onde, à medida que ocorre a migração no sentido axial da córnea, apresentam a diferenciação.

Sua capacidade de divisão é limitada e normalmente se diferenciam em células basais (DANIELS et al., 2001; DELMONTE; KIM, 2011).

O estroma representa 90% da espessura da córnea e é formado por ceratócitos, fibroblastos, matriz de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, e por lamelas de fibras de colágeno do tipo I e V (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O estroma difere de outros colágenos teciduais por sua transparência, resultado da organização precisa das fibras do estroma e matriz extracelular (DELMONTE; KIM, 2011). O colágeno é disposto em feixes paralelos chamados de fibrilas, envoltas em camadas ou lamelas uniformemente dispostas. O espaçamento perfeito entre as fibrilas de colágeno é determinado pela disposição ao seu redor de proteoglicanos especializados (queratan e dermatan sulfatos) e pelo grau de hidratação da córnea. A ruptura no arranjo regular das lamelas ou alterações quanto ao tipo de colágeno induzirão à opacidade e perda de transparência da córnea (SLATTER; DIETRICH, 2007).

Os ceratócitos são as principais células envolvidas na manutenção da matriz extracelular (SLATTER; DIETRICH, 2007). Estão localizados no estroma anterior e contêm proteínas celulares solúveis cristalinas que minimizam a dispersão da luz mantendo a transparência do estroma (DELMONTE; KIM, 2011). Apresentam a capacidade de sintetizar colágeno, glicosaminoglicanos, metaloproteinases e mucoproteínas cruciais na homeostase do estroma (SLATTER; DIETRICH, 2007). Quando ativados, após uma lesão, têm a capacidade de se diferenciar em fibroblastos, produzindo matriz extracelular provisória e colágeno imaturo não transparente. No processo de diferenciação, também ocorre a substituição das proteínas cristalinas, contribuindo para a opacidade (DELMONTE; KIM, 2011). O período de substituição do colágeno pode se estender por anos (SLATTER; DIETRICH, 2007).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio composta por finas fibrilas de colágeno com propriedades elásticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Esta elasticidade promove a exposição da membrana de Descemet em feridas corneais profundas com perda total do estroma. Na macroscopia, a descemetocèle apresenta-se escura em reflexo ao conteúdo

ocular, porém transparente, salientada para fora no centro, não se corando com a fluoresceína por ser lipofílico, ao contrário do estroma. Essas lesões sinalizam o rompimento iminente da córnea. Pequenos defeitos produzidos por feridas penetrantes podem ser preenchidos por nova membrana secretada pelas células endoteliais, porém, em defeitos extensos, isto não ocorre (SLATTER, 2005).

O endotélio é uma monocamada com aspecto semelhante a um mosaico de “favos de mel” revestindo a câmara anterior. Sua adesão à membrana de Descemet é realizada por hemidesmossomas. (GELATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SLATTER, 2005). Apresenta extensas interdigitações laterais entre as células adjacentes com junções tipo “gap” e “tight” contendo numerosas bombas de sódio-potássio ATPase. As junções criam uma barreira endotelial semipermeável responsável pela manutenção de um estroma hiposmótico e relativamente desidratado (DELMONTE; KIM, 2011). Em razão da alta atividade metabólica, células endoteliais contêm numerosas mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e rugoso abundante. Apresenta capacidade mínima de replicação dependendo da idade e espécie. Com a perda de células, as adjacentes migram e assumem sua função (SLATTER; DIETRICH, 2007). Mas esta capacidade é limitada até uma certa densidade celular endotelial (por volta de 500 células/mm²) sem causar edema (DELMONTE; KIM, 2011).

A entrada de água na córnea ocorre sob influência da pressão intra-ocular, da osmolaridade tecidual, do caráter hidrofílico do colágeno e dos mucopolissacarídeos do estroma (GELATT, 2003; SLATTER, 2005). A barreira epitelial impede a entrada de água na córnea devido aos complexos juncionais intercelulares firmes. A barreira endotelial, devido à grande quantidade de bombas de sódio-potássio ATPase, mantém, de forma ativa, o egresso de eletrólitos do estroma, deixando-o hiposmótico. Neste caso, ocorre a saída de água do estroma corneal para o humor aquoso hiperosmótico, contra a influência da pressão intra-ocular (DELMONTE; KIM, 2011). O estado corneal de desidratação relativa é importante para manutenção da transparência da

córnea. Quando o conteúdo de água aumenta, ocorre separação da malha de colágeno estromal, causando opacidade pela dispersão da luz (AGRAWAL; TSAI, 2003). Isso pode ocorrer pelo aumento da pressão intra-ocular, nos casos de glaucoma, lesão endotelial e lesões epiteliais (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

O metabolismo da glicose é a fonte mais importante de energia para as camadas da córnea. São metabolizados 2/3 de glicose pela via Embden-Meyerhof produzindo piruvato, seguida pelo ciclo de Krebs na presença de oxigênio; e 1/3 pelo desvio hexose-monofosfato. O endotélio recebe a maior parte do seu oxigênio do humor aquoso, ao passo que as outras camadas corneais recebem principalmente da atmosfera através do filme lacrimal pré-corneal, dos capilares do limbo e conjuntiva (SLATTER, 2005).

II.II Cicatrização corneal

A cicatrização na córnea ocorre de maneira variada na dependência da profundidade do tecido atingido e do tipo de lesão envolvida (PONTES et al., 2011). Geralmente, danos superficiais à córnea cicatrizam de forma simples, deixando pouca ou nenhuma cicatriz permanente, com resolução envolvendo, principalmente, respostas epiteliais. Ferimentos profundos, atingindo o estroma, requerem respostas e interações celulares complexas do epitélio e dos ceratinócitos. Normalmente, úlceras profundas promovem cicatrização fibrosa evoluindo para opacidade permanente local (DELMONTE; KIM, 2011; MILLER, 2001).

II.II.I Cicatrização epitelial

O epitélio corneal apresenta grande capacidade de regeneração que se dá por uma sequência sistematizada de eventos (SLATTER, 2005). Em uma lesão epitelial com a manutenção de sua membrana basal, as células epiteliais adjacentes podem utilizá-la para sua adesão ao estroma (PONTES et al., 2011). Assim, a cicatrização epitelial pode ser dividida em três fases: migração, proliferação e adesão epitelial (AGRAWAL; TSAI, 2003; LU et al., 2001).

Imediatamente após a lesão, existe um período curto de latência onde as células epiteliais preparam-se para a migração. Neste momento, ocorre uma reorganização celular, uma grande síntese proteica envolvendo proteínas do citoesqueleto, fibrina, fibronectina, fibrinogênio e a expressão de receptores na superfície celular (LU et al., 2001; PONTES et al., 2011). Para a clivagem das proteínas da matriz, são secretadas proteinases, como a plasmina, pelas células epiteliais. Assim, as integrinas de adesão das células basais à membrana dissociam-se dos hemidesmossomos e são distribuídas em toda a superfície celular (AGRAWAL; TSAI, 2003). Posteriormente, servirão de receptores para laminina, fibronectina e alguns colágenos da matriz extracelular durante a migração celular. Leucócitos polimorfonucleares chegam até a área através do filme lacrimal e realizam o debridamento dos restos celulares e da membrana basal (PONTES et al., 2011). As proteases do filme lacrimal, do epitélio e dos neutrófilos promovem a degradação de componentes da membrana basal expondo a lâmina densa, induzindo à expressão de integrinas para a migração epitelial (AGRAWAL; TSAI, 2003).

Células circunjacentes à margem da lesão estão reorganizadas, tornam-se achatadas, emitem prolongamentos digitiformes (filopódios) e iniciam a migração (LU et al., 2001). Existem indícios que a re-epitelização não ocorra em uma camada de cada vez. Foram observados prolongamentos em células suprabasais em contato com a membrana basal, indicando uma migração em múltiplas camadas. Além disso, compreende-se que exista um gradiente de células de direções opostas que se encontram no centro da ferida. Após cinco horas de lesão, as células migram em uma constante de 60 - 80µm/h até o recobrimento total da área. Através da síntese de uma complexa matriz de fibras de “stress” ricas em actina, o processo de migração pode ser realizado (AGRAWAL; TSAI, 2003).

Após 24 – 30h, mitoses começam a restaurar a população de células epiteliais (DELMONTE; KIM, 2011). A proliferação celular ocorre por uma resposta compartilhada da periferia da lesão, por células basais, células amplificadoras transitórias e células tronco do limbo. As células do epitélio na

liderança da migração não realizam mitose. Para um rápido restabelecimento da camada epitelial, três estratégias de expansão da população celular podem ser adotadas. Até 50% das células tronco do limbo podem ser induzidas a proliferar em ciclos celulares rápidos gerando mais células amplificadoras transitórias. Células amplificadoras transitórias jovens da periferia estimuladas a exercer o máximo de seu potencial de replicação gerando mais células maduras. Finalmente, aumentando a eficiência da replicação celular das células amplificadoras transitória encurtando o tempo do ciclo celular. Assim, ocorre uma grande produção de células pós-mitose terminalmente diferenciadas. Toda a proliferação e diferenciação celular neste ponto seguem, similarmente, o processo de renovação celular contínua que mantém a homeostase corneal (AGRAWAL; TSAI, 2003).

Durante a migração epitelial, a membrana basal sofre remodelação com deposição de colágeno e laminina, anteriormente degradados. Este processo também serve de andaime para a movimentação epitelial e regula o processo de proliferação, diferenciação e adesão celulares (AGRAWAL; TSAI, 2003; SAIKA et al., 2002). O restabelecimento da membrana basal coincide com a formação de moléculas de adesão (AGRAWAL; TSAI, 2003). A laminina-5 secretada por células epiteliais migratórias, liga-se a moléculas de plasminogênio. Posteriormente, ocorre a ação pelo ativador de plasminogênio tecidual, clivando uma subunidade da laminina, promovendo a adesão por hemidesmossomas e impedindo a mobilidade celular (AGRAWAL; TSAI, 2003; SAIKA et al., 2002).

Pequenas lesões epiteliais podem ser reparadas rapidamente nas primeiras 24 horas, pela simples migração celular. Uma vez que as células reparam o defeito, elas restabelecem mecanismos de adesão e ocorre intensa atividade mitótica com reconstrução epitelial em múltiplas camadas. Uma vez recoberta a área lesada, a migração celular cessa e a resposta mitótica diminui consideravelmente. Uma córnea totalmente desnuda pode ser reepitelizada em um período entre quatro e sete dias (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

II.II.II Cicatrização estromal

Defeitos estromais superficiais são preenchidos por faces epiteliais com o deslizamento epitelial sobre o defeito. Assim, ocorrem mitoses e o defeito é preenchido com células epiteliais. Em defeitos profundos, observa-se uma deposição de fibrose preenchendo e selando as feridas, mas com uma pobre regeneração fenotípica tecidual. Feridas estromais descomplicadas sofrem cicatrização avascular fibrótica mas, em lesões crônicas, infectadas e/ou destrutivas, podem promover estímulo à angiogenese e a cicatrização fibrovascular ocorre como em outros lugares do corpo (GELATT, 2003; MILLER, 2001; SLATTER, 2005).

Pode-se dividir a cicatrização avascular fibrótica em três fases: inflamatória, de cicatrização ativa e de remodelação. Estas fases não são temporalmente divididas, acontecendo, muitas vezes, de forma sobreposta. Semelhante ao processo de cicatrização de feridas na pele, o reparo estromal envolve uma complexa interação de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas para a dinâmica de sinalização intercelular. Esta pode ocorrer entre epitélio-estroma, células inflamatórias-estroma, humor aquoso-estroma ou por mecanotransduções estromais (FINI; STRAMER, 2005).

A fase inflamatória inicia-se logo após a injúria, onde células danificadas e células residentes secretam citocinas e fatores de crescimento na lesão. A ativação destas moléculas promove mudanças morfológicas nas células envolvidas no processo (PONTES et al., 2011). Os ceratócitos de dentro e da margem adjacente da ferida sofrem apoptose criando uma zona acelular (FINI; STRAMER, 2005). O processo segue com a chegada de células inflamatórias, primeiramente os neutrófilos, seguido dos macrófagos na tentativa de combater o acesso de agentes infecciosos, degradar e remover o tecido danificado. Proteases, collagenases e metaloproteinases expressas na lágrima, por ceratócitos e pelo epitélio corneal também auxiliam este processo (DAWSON, 2010). Os neutrófilos e macrófagos também são capazes de expressar citocinas e fatores de crescimento, amplificando a resposta de reparo e a angiogênese (DAWSON, 2010; PONTES et al., 2011). Células linfóides

chegam à lesão, liberam fatores de crescimento e mediadores inflamatórios na tentativa de minimizar a fibrose do tecido. A resposta inflamatória descontrolada, normalmente, amplifica a cascata de eventos, resultando em adicional proliferação e migração de ceratócitos e diferenciação de ceratócitos para um dos vários fenótipos de reparação fibróticas, incluindo a fase de miofibroblástico. Assim, a inflamação tem consequências positivas e negativas de prevenção da infecção e amplificando a resposta reparação fibrótica, respectivamente (DAWSON, 2010).

Durante a fase de cicatrização ativa ocorre a ativação, proliferação e a migração de ceratócitos sobreviventes para reconstituir a celularidade da lesão (DAWSON, 2010). A ativação dos ceratócitos promove aumento celular e de suas organelas diferenciando-se, morfológicamente, à semelhança de fibroblastos (PONTES et al., 2011; WATSKY et al., 2010). O processo de diferenciação completa-se com a sua chegada no local de lesão, expressando moléculas do citoesqueleto, codificando os genes de reparação de componentes da matriz extracelular (fibronectina, metaloproteinases e integrinas) e perdendo proteínas cristalinas (FINI; STRAMER, 2005; WATSKY et al., 2010). Fibroblastos ativados sintetizam e depositam uma matriz provisória de fibronectina, moléculas de preenchimento (ácido hialurônico e moléculas da matriz extracelular de sinalização (tenascina). Posteriormente, a matriz extracelular provisória é substituída por colágeno tipo III e, por fim, por colágeno tipo I e proteoglicanos sulfatados, promovendo uma matriz extracelular fibrótica madura (DAWSON, 2010). Próximo à superfície epitelial lesada, promovem a deposição da membrana basal para seguir à cicatrização epitelial. Com a progressão da cicatrização, alguns fibroblastos podem se diferenciar, assumindo características de miofibroblastos (células maiores, com maior expressão de fibras de actina de estresse e de moléculas novas de α actina de músculo liso insolúveis e opacas) (DAWSON, 2010; FINI; STRAMER, 2005; WATSKY et al., 2010). Os miofibroblastos são promotores de cicatriz com fenótipo fibrótico caracterizada por deposição exagerada e desorganizada de matriz de reparação, hipercelularidade significativa e por contração extensa

do tecido. Na córnea, os miofibroblastos estão associados com tecido de reparação opaco. As variações na proporção de células de reparação (fibroblastos ou miofibroblastos) determinam o resultado clínico final. Estas são influenciadas pelo grau e a duração do ambiente de citocinas promotoras da diferenciação dessas células (DAWSON, 2010; FINI; STRAMER, 2005).

A fase de remodelação do tecido permite uma oportunidade para a melhora na qualidade da regeneração podendo, assim, resultar no retorno da transparência corneal (FINI; STRAMER, 2005). Durante esta fase (seis meses a quatro anos) ocorre uma diminuição na celularidade próximo ao normal. As células de reparação (fibroblastos e miofibroblastos) também retornam ao fenótipo não fibrótico (ceratócito) perdendo fibrilas de actina de estresse e moléculas insolúveis. Aos poucos, ocorre a reorganização da matriz extracelular tornando-se mais madura, ordenada, regular e com maior deposição de fibras de colágeno tipo I de diâmetro maior. Além disso, o ácido hialurônico provisório é substituído por proteoglicanos sulfatados ajudando no espaçamento paralelo das fibras de colágeno (DAWSON, 2010). Durante o período de remodelação, a taxa de renovação do colágeno é muito maior que a normal. Os membros da família das metaloproteinases da matriz são os principais mediadores envolvidos no processo (DELMONTE; KIM, 2011; OLLIVIER et al., 2007; PONTES et al., 2011).

Em lesões corneais crônicas causadas por agentes químicos e infecciosos há um processo inflamatório exagerado com expressão de citocinas pró-angiogênicas. A vascularização do estroma, ao chegar ao leito da úlcera, permite o extravasamento de plasma com formação de um coágulo. Posteriormente, plaquetas, ao chegarem, à lesão degranulam liberando fatores de crescimento (grande quantidade de fator de crescimento derivado de plaquetas e pequena quantidade de fator de crescimento transformador β). Inicia-se uma resposta fibrovascular, como ocorre na cicatrização dos tecidos vascularizados como pele e conjuntiva. Assim, há a formação de um tecido de granulação caracterizado por um maior infiltrado celular inflamatório (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), densa deposição de matriz extracelular,

maior quantidade de fibroblastos/miofibroblastos e vasos neoformados exsudativos. As fases do processo cicatricial vascular são as mesmas de uma cicatrização avascular. Macroscopicamente, tem aspecto róseo granuloso e sangra com facilidade. Da mesma forma, a epitelização ocorre sobre a matriz extracelular neoformada. Por fim, o processo leva à deposição de uma cicatriz fibrovascular de característica mais opaca e com remodelação mais difícil do que a cicatrização fibrosa avascular (DAWSON, 2010; SLATTER; DIETRICH, 2007).

II.II.III Citocinas e fatores de crescimento na cicatrização corneal

Como não existem vasos no epitélio da córnea, o mecanismo de cicatrização é conduzido pela ação combinada de mediadores inflamatórios e de fatores do crescimento gerados posteriormente à injúria. Dentre os fatores de crescimento, apontam-se o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF β), fator de crescimento de ceratinócitos (KGF); além de neurotrofinas (exemplo: fator de crescimento neuronal - NGF), interleucinas (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (IMANISHI et al., 2000; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; REINACH; POKORNY, 2008). Fatores de crescimento são produzidos constantemente por células da córnea e a presença no filme lacrimal e no humor aquoso são essenciais para a manutenção e renovação natural da córnea, assim como prevenir reações imunes ou angiogênicas indesejáveis. Desequilíbrios na complexa interação entre essas substâncias podem levar a alterações oculares incluindo edema e angiogênese. Tais fatores podem ser alvo da terapia oftálmica, através da aplicação exógena ou inibição seletiva, podendo ser usado para extrair respostas celulares específicas diante de determinados materiais oftálmicos. (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004).

O EGF está presente na lágrima sendo principalmente produzido pelas glândulas lacrimais e células do epitélio corneal. Entre as suas funções, citam-se a participação na renovação, proliferação e migração das células epiteliais.

Há baixa concentração de receptores na superfície dos ceratócitos estromais apresentando algum efeito na diferenciação e migração celular. A ativação de seu receptor induz à produção de moléculas da matriz extracelular (fibronectina, ácido hialurônico) e rearranjo da actina do citoesqueleto para a motilidade celular. Grande quantidade de receptores é encontrada em células epiteliais do limbo. Sua potência mitogênica é dependente do intervalo de concentração específica, ao passo que esta propriedade é suprimida pela inibição por contacto, em concentrações mais elevadas. Em concentrações adequadas, o EGF inibe a diferenciação terminais das células epiteliais promovendo aumento na taxa de proliferação (IMANISHI et al., 2000; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; REINACH; POKORNY, 2008; YU et al., 2010).

O PDGF é liberado ou secretado por diferentes tipos celulares, como plaquetas, epitélio, macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa e por células endoteliais vasculares. Ele atua aumentando a força de tensão na ferida e, de forma sinérgica, com outros fatores de crescimento ($TGF\beta$), na reparação fibrótica cicatricial. O PDGF melhora o crescimento das células epiteliais e atua como quimiotático para fibroblastos e células inflamatórias. Nos queratinócitos e fibroblastos, promove potente mitogênese e estímulo para o aumento na produção de matriz extracelular desorganizada. É o principal fator de crescimento envolvido na reparação fibrovascular da córnea, sendo secretado por plaquetas degranuladas no tecido (IMANISHI et al., 2000; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; REINACH; POKORNY, 2008).

A interação entre o epitélio-estroma é o principal caminho da resposta fibrótica de reparação avascular da córnea, sendo o $TGF\beta$ seu mediador de destaque. Esta interação só ocorre com a perda da membrana basal epitelial. O fator de crescimento transformador beta é referido como o maior causador da cicatriz fibrótica opaca na córnea. O $TGF\beta$ induz proliferação, migração, diferenciação dos ceratócitos (em fibroblastos e miofibroblastos) e induz à alteração da síntese de matriz extracelular. Ele é sintetizado nas células epiteliais e em fibroblastos estromais, mas pode ser expresso por qualquer

célula nucleada (incluindo células inflamatórias), sendo encontrado também na lágrima. TGF β é secretado em sua forma inativa, sendo convertido na forma ativa por algumas proteases do filme lacrimal durante o processo de cicatrização da córnea. Um aumento desregulado nos níveis de TGF β pode promover uma retroalimentação positiva levando a uma maior proporção de miofibroblastos, infiltrado inflamatório grave levando a uma cicatrização fibrótica excessiva de difícil remodelação. Bloquear ou prevenir aumentos do TGF β pró-fibrótico aumenta a chance de uma fibrose tecidual aceitável (DAWSON, 2010; IMANISHI et al., 2000; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; REINACH; POKORNY, 2008).

O Fator de Crescimento do Ceratócitos, como o próprio nome, é produzido por estas células atuando nas células epiteliais. Possui atividade mitogênica restrita ao epitélio. A aplicação tópica do KGF pode ser eficiente na regeneração epitelial e efetivo no tratamento de úlceras de córnea com perda estromal (PONTES et al., 2011).

Existem evidências que as neurotropinas (como o NGF) apresentam receptores presentes na córnea e promovem a proliferação das células epiteliais, principalmente, no limbo (GRUETERICH et al., 2003). Alteração neuronal da córnea como ocorre no *diabetes mellitus* no homem, promove alteração no metabolismo e viabilidade epitelial levando à ulceração. Em concentrações elevadas, o NGF promoveu proliferação epitelial menos significativa que o EGF. Além disso, o NGF também atua no crescimento de fibroblastos estromais em cultura. Este fator também está envolvido na liberação de outros neuropeptídeos, fatores de crescimento (como o TGF- β) e induzem à inflamação e vascularização do tecido (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004).

A IL-1 e o TNF- α são produzidos ou liberados por células epiteliais das glândulas lacrimais e da corneal após uma lesão, além das células inflamatórias mononucleares. Estas citocinas orientam e mantêm a resposta inflamatória após uma injúria corneal, apresentando-se aumentadas na lágrima. Elas atuam nos ceratócitos, leva à apoptose inicial destas células no leito da

ferida. A IL-1 é um fator chave na regulação do processo de cicatrização de feridas levando a um aumento na expressão de fatores de crescimento no epitélio e estroma. A inflamação desencadeada pode promover de forma indireta, estímulo à angiogenese (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; WICHAYACOOOP et al., 2009).

II.III Ceratites ulcerativas

Ceratite ulcerativa ou úlcera de córnea é uma condição comum e importante em animais domésticos. Ocorre quando o epitélio e uma quantidade variável de estroma são perdidos. Tais lesões normalmente são crônicas e cicatrizam vagarosamente (GELATT, 2003; MILLER, 2001; SLATTER, 2005).

No tratamento da úlcera de córnea, o passo mais importante é a determinação da causa e sua remoção. As causas de ulceração são numerosas, sendo as mais comuns: trauma, corpo estranho perfurante, distiquíase, triquíase, entrópio, ceratoconjuntivite seca, edema corneal crônico (glaucoma), cílio ectópico, hiperadrenocorticism, tumores nas margens palpebrais, ceratite herpética (gatos) e ceratopatia senil (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Assim, a classificação clínica mais importante das úlceras de córnea leva em consideração a profundidade do tecido atingido, sendo caracterizada por: ulceração superficial, ulceração superficial persistente, ulceração profunda, ulceração profunda progressiva, descemetocelose e perfuração corneal (MILLER, 2001). Sem a manutenção do ambiente biológico propício para a cicatrização, todas as úlceras têm progressão potencial para perfuração de córnea podendo levar ao prolapso de íris, endoftalmite e *Pthisis bulbi* (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Os sinais clínicos que trazem a suspeita de úlcera são: dor e blefarospasmo (comumente de início agudo), epífora, secreção ocular mucoide ou purulenta, fotofobia, edema corneal perilesional, hiperemia conjuntival, vascularização corneal e miose, em casos de uveíte reflexa (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Úlceras de córnea não são, com frequência, visíveis a olho sem auxílio de meios de magnificação, mesmo com boa iluminação. A fluoresceína é um corante solúvel em água que não cora a córnea normal, pois não transpassa o epitélio hidrofóbico. Se o epitélio está incompleto ou rompido, a fluoresceína penetra o estroma corneal hidrofílico, corando-o de verde brilhante. Em lesões corneais profundas, o centro da lesão pode falhar em absorver o corante, apresentando coloração enegrecida e indicando que a membrana de Descemet, que não se cora com a fluoresceína, está se protraindo, ou seja, descemetocèle está presente. Se não tratada, a membrana se rompe, com o extravasamento de humor aquoso. (GELATT, 2003; MILLER, 2001; SLATTER, 2005).

Células epiteliais, fibroblastos, polimorfonucleares e algumas bactérias, como *Pseudomonas sp.*, produzem metaloproteinases da matriz (GELATT, 2003). Ceratites ulcerativas estão associadas a níveis iniciais elevados de atividade proteolítica no filme lacrimal, com decréscimo durante a cicatrização da úlcera. Em contra partida, úlceras em “melting,” com progressiva dissolução estromal, mantêm níveis elevados de atividade proteolítica no filme lacrimal com retardo na cicatrização (COUTURE et al., 2006; OLLIVIER et al., 2007; WILLEFORD et al., 1998). O sucesso do tratamento clínico ou cirúrgico em úlceras de córnea é refletido na redução da atividade proteolítica do filme lacrimal, podendo esta ser utilizada como parâmetro do sucesso do tratamento instituído (OLLIVIER et al., 2007).

Conduas terapêuticas tendem a aliviar a dor, prevenir progressão das úlceras (descemetocèles, perfurações) e restaurar a anatomia da córnea. As conduas terapêuticas são empreitadas de acordo com a apresentação clínica da lesão, podendo ser clínicas (úlceras superficiais), cirúrgicas ou associadas (principalmente em úlceras profundas, na descemetocèle e nas perfuradas) (GELATT, 2003; MILLER, 2001; SLATTER, 2005). Geralmente, úlceras de córnea superficiais resolvem-se rapidamente, sem complicações. A reparação deste tipo de lesão envolve respostas epiteliais de migração, promovendo mínima cicatriz (MILLER, 2001; PONTES et al., 2011). Entretanto, úlceras

profundas acometendo o estroma requerem respostas celulares complexas (proliferação, diferenciação, migração, apoptose e comunicação intercelular) (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; PONTES et al., 2011). Nesses casos, o processo cicatricial pode promover perda da transparência local e déficit visual (GELATT, 2003; SLATTER, 2005). Com isso, o tratamento ideal além de promover a cicatrização do tecido, deve favorecer um ambiente propício para que essas características não sejam alteradas, devolvendo à córnea transparência semelhante à observada antes da lesão.

II.IV Recobrimento conjuntival 360°

Dentre os tratamentos cirúrgicos tradicionais, os recobrimentos conjuntivais são os mais comumente utilizados por serem aplicados em grande número de alterações corneais. A facilidade de obtenção do recobrimento também faz esta técnica facilmente aplicável em cães e gatos. As úlceras profundas são a indicação mais comum para os recobrimentos conjuntivais. Estes são realizados com o objetivo de reparar a úlcera e prevenir sua progressão, proteger a superfície da córnea durante a reparação e retardar a degeneração do estroma (HOLLINGSWORTH, 2003; MILLER, 2001). Além disso, o suprimento vascular fornecido por tais recobrimentos é benéfico, principalmente, em processos infecciosos envolvidos (HOLLINGSWORTH, 2003). Assim, nos recobrimentos conjuntivais vascularizados, a cicatrização corneal ocorre como em outros tecidos com a formação de tecido de granulação, levando a uma cicatriz fibrovascular densa de difícil remodelação (DAWSON, 2010; SLATTER; DIETRICH, 2007).

O recobrimento conjuntival 360° é principalmente indicado em úlceras de córnea extensa. Na comparação com os outros recobrimento, o recobrimento conjuntival 360° é o mais facilmente realizado, não necessitando de instrumentos ou técnicas cirúrgicas avançadas. Uma incisão e divulsão romba é realizada 360° na conjuntiva bulbar ao redor do limbo. Após completar a divulsão, realiza-se a sutura no sentido vertical ao fechamento das pálpebras podendo ser utilizado padrão simples ou contínuo, não permitindo que a sutura

encoste na superfície da córnea. A principal desvantagem do recobrimento completo é o impedimento da visualização direta da córnea, prejudicando o acompanhamento do processo cicatricial. A complicação mais comum observada é a deiscência que pode interferir na aderência do recobrimento no leito da úlcera e conseqüentemente, sua cicatrização. Este recobrimento deve ser visto como um procedimento de resgate, não promove o retorno funcional da córnea no local da úlcera, evidenciada por perda da transparência e, em alguns casos, em déficit visual (HOLLINGSWORTH, 2003; SLATTER; DIETRICH, 2007).

II.V Membrana amniótica

Os enxertos de membranas biológicas são alternativas utilizadas, principalmente, nos casos severos de deficiência das células germinativas. A cápsula renal equina, testada primeiramente por Andrade et al. (1999), foi utilizada em comparação ao retalho conjuntival pedunculado em descemetocle, apresentando retorno precoce da transparência com cicatrização semelhante, facilidade na aplicação e indicação principalmente quando o recobrimento conjuntival é contra-indicado (infecção bacteriana conjuntival) (LAUS et al., 1999). A escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) mostrou-se útil para fins tectônicos após ceratectomias superficiais (LAUS et al., 2000). O emprego da membrana de celulose microfibrilar na ceratoplastia lamelar em coelhos apresentou bons resultados, ocorrendo assimilação do implante sem rejeição, maior rapidez na regeneração epitelial com mínima vascularização e infiltração de polimorfonucleares (MACEDO, 2008).

A membrana amniótica tem sido utilizada por alguns autores como opção terapêutica cirúrgica nos casos mais graves de defeitos epiteliais persistentes, além do suporte tectônico, por possuir fatores de crescimento (EGF, TGF- β , HGF, KGF) e estimuladores da epitelização (CHOI et al., 2009; GUO et al., 2011; KOIZUMI et al., 2000; PENA et al., 2007; SATO et al., 1998). O mecanismo de reepitelização corneal parece ser predominantemente mediado por HGF e EGF (CHOI et al., 2009; MELLER et al., 2011). Por não expressar a

maioria dos antígenos de histocompatibilidade, não induz à rejeição após o transplante, causando mínima resposta inflamatória e migração de leucócitos para o local (GUO et al., 2011; HOULIHAN et al., 1995; MELLER et al., 2011; SAMPAIO et al., 2006). A membrana amniótica, quando aplicada na córnea, permite a restauração do estroma, produzindo uma membrana basal epitelial saudável para a proliferação e diferenciação epitelial (FAIRBANKS et al., 2003; GODOY et al., 2002; GUO et al., 2011; MELLER et al., 2011; PRABHASAWAT et al., 2001), não interferindo na velocidade de cicatrização (MONTEIRO et al., 2000). Além disso, promove um melhor alinhamento, compactação e regularidade das fibras de colágeno, estando mais próximas da estrutura normal com mínima cicatriz quando comparada ao grupo controle, sem estímulo à angiogênese (GUO et al., 2011). Outra propriedade atribuída à membrana amniótica, seria um efeito antibacteriano, podendo ser utilizada como adjuvante em casos de ceratite bacteriana grave (CHOI et al., 2009).

A membrana basal amniótica serve de substrato ideal para o crescimento, desenvolvimento, facilitando a migração, prevenindo apoptose e manutenção das células germinativas (clonogenicidade). Este fenômeno explica o crescimento de células epiteliais do limbo *ex vivo* e posterior transplante na superfície corneal afetada, obtendo-se excelentes resultados (ESPANA et al., 2003; JANG et al., 2006; ONO et al., 2007; SANGWAN et al., 2003). Em estudo semelhante, Yam et al. (2002) observaram, em células epiteliais do limbo cultivadas, decréscimo na expressão de TGF- β , aumento na expressão do inibidor de metaloproteinase tipo 1 (que promove aumento no número de receptores EGF), favorecendo o crescimento e diferenciação do epitélio. A inibição da transdução do sinal TGF- β na córnea e em fibroblastos conjuntivais *in vitro* explica também o efeito anti-cicatriz almejado no tratamento de várias doenças da superfície ocular (MELLER et al., 2011). Associado, as interações epitélio-estroma são os principais componentes da resposta fibrótica de reparação avascular da córnea. O epitélio com a ausência de sua membrana basal expressa o TGF- β agindo nos ceratócitos promovendo sua diferenciação (em fibroblastos e miofibroblastos) e migração para depositar uma matriz

extracelular fibrótica. Em defeitos epiteliais persistentes, além do aumento da síntese por estas células, as glândulas lacrimais também tornam-se fonte de TGF- β . Assim, a membrana amniótica, ao fornecer uma membrana basal saudável ao epitélio, evita a reparação fibrótica descontrolada por diminuir as interações epitélio-estroma e regular a biodisponibilidade de TGF- β para o estroma (DELMONTE; KIM, 2011).

Dentre as principais indicações da utilização do implante com membrana amniótica na reconstrução da superfície corneal em humanos destacam-se: defeito epitelial persistente com ulceração da córnea, queimaduras químicas agudas, remoção de lesão epitelial ou subepitelial (ex. cicatrizes, tumores), ceratopatia bolhosa dolorosa e parcial ou total deficiência de células-tronco do limbo (com enxerto de células-tronco) (MELLER et al., 2011).

Em deficiência induzida de células germinativas em coelhos, a membrana amniótica apresentou, clinicamente, redução no defeito epitelial persistente, sendo que nestes animais o epitélio corneal neoformado foi mais organizado. No entanto, não foi observado retorno da transparência corneal no tempo do estudo, compreendeu 30 dias (ANDRADE et al., 2009).

Na reconstrução da superfície ocular existem basicamente três formas de utilização da membrana amniótica. A primeira forma seria com substrato para o crescimento celular epitelial sendo incorporado ao tecido receptor (córnea ou conjuntiva). Também, pode ser utilizado como bandagem ou curativo biológico protegendo a cicatrização da superfície epitelial subjacente. E a terceira forma de utilização da membrana amniótica seria em camadas onde vários fragmentos seriam colocados sobre a úlcera preenchendo toda sua profundidade (MELLER et al., 2011; RAHMAN et al., 2009). Existem, atualmente, técnicas que utilizam a membrana como substrato para a expansão *ex vivo* do epitélio corneal e posterior colocação na superfície ocular. Esta é aplicada em casos com deficiência de células-tronco do limbo (MELLER et al., 2011; ONO et al., 2007; RAHMAN et al., 2009).

As membranas são conservadas congeladas à -80°C, porém pode haver diferença na solução utilizada. Na comparação entre solução de

dimetilsulfóxido (DMSO) puro e solução de glicerol em meio de cultura MEM (Mineral Essential Medium) (proporção 1:1) não houve redução no número de fatores de crescimento e citocinas, entretanto houve maior integridade tecidual na conservação com glicerol/MEM (PENA et al., 2007).

II.VI Transplante de limbo esclero-corneal

Células germinativas presentes no limbo são consideradas precursoras do epitélio corneal e responsáveis pela re-população do mesmo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Após uma lesão corneal, a recuperação depende do movimento centrípeto do epitélio viável mais próximo. No entanto, um defeito epitelial completo ou grave requer o epitélio do limbo. Em ferimentos extensos da córnea e limbo induzindo à escassez de células tronco, o epitélio conjuntival representa a única fonte de regeneração epitelial. O crescimento de epitélio conjuntival na superfície corneal (conjuntivalização) está associado ao retardo de epitelização, vascularização e erosões epiteliais recorrentes que ocorrem na falta de células germinativas do limbo (FERNÁNDEZ et al., 2008; RYMER, 2000).

O transplante autólogo de limbo pode ser realizado ipsilateral em defeitos corneais pequenos, próximos ao limbo e com comprometimento em menos de 50% de sua circunferência, podendo ser utilizado bilateralmente. A técnica baseia-se no avanço do limbo pela realização de divulsão romba, incisões paralelas em direção ao fórnix e sutura no leito receptor. Este tipo de transplante não aumenta a população de células germinativas, mas redistribui para áreas deficientes (NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001; SLATTER, 2005).

Em doenças da superfície ocular como queimaduras térmicas, químicas e após múltiplos procedimentos cirúrgicos levando à falência da superfície ocular, pode ocorrer deficiência total de células germinativas do limbo. Nestes casos, existe a indicação do transplante autólogo de limbo contralateral (havendo necessidade do leito doador íntegro) (FERNÁNDEZ et al., 2008; RYMER, 2000). A retirada do limbo doador não é isenta de complicações (NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001; RYMER, 2000). No entanto, Brunelli et al. (2007), em

estudo experimental em cães, não observaram complicações nos olhos doadores do transplante de limbo esclero-corneal após retirada de 30% de sua circunferência dividido em dois pontos. Os mesmos apresentaram teste de fluoresceína negativo aos sete dias de pós-operatório. Em estudo em coelhos, Rymer et al. (2002) não observaram diferenças entre o transplante autógeno de limbo esclero-corneal e do limbo conjuntival, observando mesmos resultados clínicos e fenotípicos epiteliais. No mesmo estudo, aos 90 dias de pós transplante os olhos apresentavam um fenótipo predominantemente epitelial corneal. Estudos humanos utilizando o alotransplante de limbo com cola de fibrina, apresentaram resultados promissores, principalmente, em reduzir a vascularização causada pela sutura que aumenta as chances de rejeição desse tipo de transplante (NASSIRI et al., 2011; SONMEZ; BEDEN, 2011).

Torres et al. (2008), em estudo retrospectivo comparando a taxa de sucesso entre auto (81%) e alotransplantes (7%), concluíram que o transplante de limbo contralateral apresenta-se como uma alternativa segura e eficaz nos casos de doenças traumáticas (térmica ou química) mas não sendo viável em casos imunes e deficiência de células tronco bilateral.

Em estudos experimentais, induzindo deficiência de células germinativas, os transplantes de limbo, de maneira geral, promoveram completa reepitelização, progressiva regressão do edema corneal com consequente transparência, controlaram a inflamação estromal exagerada e a neovascularização. São indicados para restabelecer a integridade da superfície ocular com retorno do fenótipo normal e função óptica (BRUNELLI et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2008; NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001; RYMER et al., 2002).

Alguns estudos experimentais com cultivo de células germinativas do limbo esclero-corneal *in vitro* utilizam a membrana amniótica como substrato para o suporte, migração, crescimento e evitando a morte celular permitindo, assim, sua aplicação *in vivo* no tratamento de lesões corneais (ESPANA et al., 2003; JANG et al., 2006; MELLER et al., 2002; QU et al., 2009; SANGWAN et al., 2003). A associação da técnica com a membrana amniótica pode

representar uma alternativa às técnicas de cultivo celular, sendo clinicamente aplicável e com o potencial de promover uma regeneração do tecido corneal sem cicatriz. Além disso, a redistribuição e o aumento da população de células germinativas do limbo no leito da úlcera podem diminuir a distância da migração epitelial promovendo, assim, um reparo mais precoce.

MATERIAL E MÉTODO

III MATERIAL E MÉTODO

III.I Animais

Foram utilizados quinze cães entre machos e fêmeas, de diferentes raças, pesos e idades, alocados em três grupos experimentais, com cinco animais cada. Os pacientes foram atendidos no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” (FMVA – UNESP Araçatuba) com queixas oftálmicas de ceratite ulcerativa. Os critérios de inclusão no estudo compreenderam cães com ulcerações graves e/ou complicadas, profundas, unilaterais, com teste do corante de fluoresceína positivo, teste da lágrima de Schirmer tipo 1 dentro dos valores de referência para a espécie e em que se obteve consentimento prévio do proprietário para participarem do estudo.

Todos os cães foram submetidos ao exame físico geral, exames complementares (sorologia para leishmaniose, hemograma completo, contagem total de plaquetas, eletrocardiograma, bioquímicos renal e hepático) para exclusão de doenças concomitantes, conforme as avaliações pré-anestésicas e cirúrgicas locais. Foi realizado um exame oftalmológico que avaliou a superfície externa do bulbo e anexos, o teste lacrimal de Schirmer tipo 1 e o teste com fluoresceína, com auxílio de uma lâmpada de fenda (KOWA, modelo SL-15). Na ausência de risco de perfuração corneal, a pressão ocular foi mensurada por tonômetro de aplanção (Tonopen®).

III.II Grupos experimentais

Foram constituídos três grupos experimentais de forma aleatória, levando-se em consideração o tipo de tratamento cirúrgico empregado: Grupo I: tratados com recobrimento conjuntival 360° por 15 dias; Grupo II: com colocação de implante da membrana amniótica canina criopreservada suturada no bordo da úlcera com a face epitelial voltada para cima associada ao recobrimento com terceira pálpebra por sete dias; Grupo III: com transplante de limbo autólogo contralateral associado ao implante da membrana amniótica

(com a face epitelial voltada para cima) suturadas no bordo da úlcera e associada ao recobrimento com terceira pálpebra por sete dias.

III.III Obtenção e preservação da membrana amniótica canina

As membranas amnióticas foram obtidas, de forma asséptica, a partir de placentas de uma cadela submetida ao parto cesariana. A preparação pré-parto consistiu de exame físico geral, exame obstétrico e exames complementares (hemograma, sorologia para leishmaniose, ultrassonografia abdominal). Durante a cesariana, após a retirada do neonato, procedeu-se a abertura asséptica do saco amniótico, duplo pinçamento e ligadura do cordão umbilical, entrega dos neonatos para equipe de reanimação, separação da membrana amniótica do córion e acondicionamento da mesma em compressas umedecidas com solução estéril de NaCl 0,9% para transporte até a capela de fluxo laminar. Na capela, a membrana foi lavada por duas vezes com solução de NaCl 0,9% sendo a última contendo penicilina (1000UI/ml), estreptomicina (20mcg/ml) e anfotericina B (2,5mcg/ml), permanecendo cinco minutos em imersão. Em seguida, a membrana amniótica foi esticada em papel de nitrocelulose estéril com a face epitelial voltada para cima. A membrana aderida foi cortada em fragmentos de 3,0 por 3,0 cm, colocados em tubos falcon estéreis contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) e DMSO₄ (dimetilsulfóxido) na proporção 1:1 e congelados a -80°C até o seu uso (FIGURA 1). O intervalo mínimo entre o preparo e o uso das membranas amnióticas criopreservadas foi de 15 dias.

III.IV Tratamento clínico

Independente do grupo, todos os cães receberam o mesmo protocolo de tratamento clínico a partir do primeiro atendimento. Foram prescritos colírios de antibiótico (tobramicina) a cada quatro horas, suscedâneo lacrimal (hipromelose) a cada seis horas, anti-inflamatório não-esteroidal (cetorolaco de trometamina) a cada seis horas, durante 15 dias e cicloplégico (atropina 0,5%) a cada 12 horas por cinco dias. No pós-operatório ocorreu a administração de

cloridrato de tramadol (4,0 mg/kg por via oral a cada oito horas durante cinco dias) e meloxicam (0,15 mg/kg por via subcutânea no pós-operatório imediato) com vistas a promover analgesia pós-operatória. Como forma de prevenção à automutilação, todos os animais utilizaram colares do tipo “Elizabetano” desde primeiro atendimento.



FIGURA 1 - Imagens fotográficas da cesariana para obtenção e acondicionamento das membranas amnióticas. Em **A**, a retirada do neonato com os anexos fetais. Em **B**, o duplo pinçamento e ligadura do cordão umbilical. Em **C**, a separação da membrana amniótica das outras estruturas placentárias. Em **D**, o acondicionamento da membrana amniótica em compressa umedecida com face epitelial para cima. **E** após a lavagem a membrana amniótica esticada em papel de nitrocelulose com face epitelial voltada para cima. Em **F**, a membrana amniótica aderida ao papel é cortada em fragmentos de 3,0 x 3,0 cm e os fragmentos cortados colocados em tubo tipo falcon contendo DMEM e DMSO₄ (1:1) para posterior congelamento a - 80°C.

III.V Avaliação clínica

Os pacientes passaram por exames físico e oftálmico completos com auxílio de uma lâmpada de fenda (KOWA, modelo SL-15) e com o preenchimento de ficha específica modificada segundo Andrade et al. (2009).

O primeiro momento de avaliação ocorreu na primeira consulta com queixa principal de ceratite ulcerativa (Mi - inicial). O procedimento cirúrgico executado dentro de um a três dias constituiu o M0. As avaliações realizadas nos dias 3, 7, 15 e 30 de pós-operatório foram descritas como M3, M7, M15 e M30, respectivamente. Nos animais dos Grupos II e III até o M7 os olhos apresentavam-se recobertos, sendo realizada a retirada do flap de terceira pálpebra neste momento. No Grupo I este período se estendeu até o M15 onde realizava-se o recorte do recobrimento conjuntival 360°. Assim, no Grupo I algumas avaliações não foram realizadas no M3 e M7 devido a não visualização da córnea. Nos Grupos II e III isto ocorreu no M3. Em todos os momentos, a cicatrização corneal foi avaliada por análise das fotografias das alterações corneais existentes (úlceras, opacidade, vascularização). Somente a qualidade cicatricial foi avaliada no M15 e M30.

A seguir estão descritos os parâmetros oftalmológicos e escores adotados para as avaliações modificados segundo Andrade et al. (2009): **blefarospasmo:** (0): ausência; (1): leve; (2): moderado; (3): intenso; **secreção ocular:** (0): ausência; (1): leve; (2): moderado; (3): moderado; **quemose:** (0): ausência; (p): presença; **vascularização corneal:** (2): proliferação vascular até 2 mm do limbo; (4): proliferação vascular até 4 mm do limbo; (6): proliferação vascular até 6 mm do limbo; (8): proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual); **defeito epitelial** (realizado teste de fluoresceína com auxílio de lâmpada de fenda com filtro azul cobalto): (0): ausência de defeito epitelial; (1): puntiforme; (2): defeito epitelial em parte da córnea; (3): defeito epitelial de toda a córnea; **opacidade corneal:** (0): não há dificuldade de observar detalhes da íris; (1): discreta - há borramento dos detalhes da íris; (2): moderada - há dificuldade em definir detalhes da íris; (3): severa - não é possível observar detalhes da íris; **qualidade cicatricial:** (0): restituição do

epitélio com características corneais preservadas (regular, transparente, avascular e defeito epitelial ausente); (1): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio mas com características corneais alteradas (irregular, opacidade cicatricial, vascularização remanescente); (2): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio pela deposição de tecido de granulação e fibrose local (tecido róseo/branco, denso, profundo, vascularizado); (3): reconstrução da superfície ocular mal sucedida com recorrência do defeito epitelial; **descemetocèle:** (0): ausência; (p): presença; **perfuração corneal:** (0): ausência; (p): presença.

III.VI Procedimentos cirúrgicos

Independente do grupo nos quais os animais foram incluídos, observaram-se os cuidados relativos ao jejum hídrico e alimentar. Os animais foram anestesiados seguindo os critérios da rotina do serviço de Anestesiologia do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” (FMVA – UNESP Araçatuba. Na maioria dos animais foi utilizado como medicação pré-anestésica o Cloridrato de Tramadol (4mg/Kg) e Acepromazina (0,05mg/Kg) por via intramuscular; seguida da indução anestésica intravenosa com Propofol (4mg/Kg, dose resposta) associado ao Midazolan (0,2mg/Kg), e foram mantidos sob anestesia geral inalatória com Isoflurano com vaporização inicial de 3V%, que variou ao longo do procedimento de acordo com o requerimento anestésico individual. Ato contínuo, foi realizado bloqueio peribulbar por dupla punção com Ropivacaína (0,3ml/kg). Caso o bloqueio não pudesse ser realizado a centralização do bulbo do olho foi obtido por bloqueador neuromuscular ou por plano anestésico profundo pela anestesia inalatória.

III.VI.I Recobrimento conjuntival 360°

Após preparação rotineira para a cirurgia oftálmica, segundo Slatter (2005), os animais do Grupo I foram submetidos ao recobrimento conjuntival fórnice-baseado de 360°, no olho com úlcera de córnea. A técnica cirúrgica consistiu na cantotomia para posterior colocação do blefarostato seguida de dissecação romba ao redor do limbo 360° (peritomia) estendendo-se por cinco a dez milímetros e aplicação de sutura “U” horizontal contínua utilizando mononylon 5-0. A sutura foi realizada no sentido vertical ao fechamento das pálpebras, seguida de cantorrafia (FIGURA 2). Após 15 dias, a sutura foi retirada e o recobrimento recortado 360° em sua base aderida à córnea.

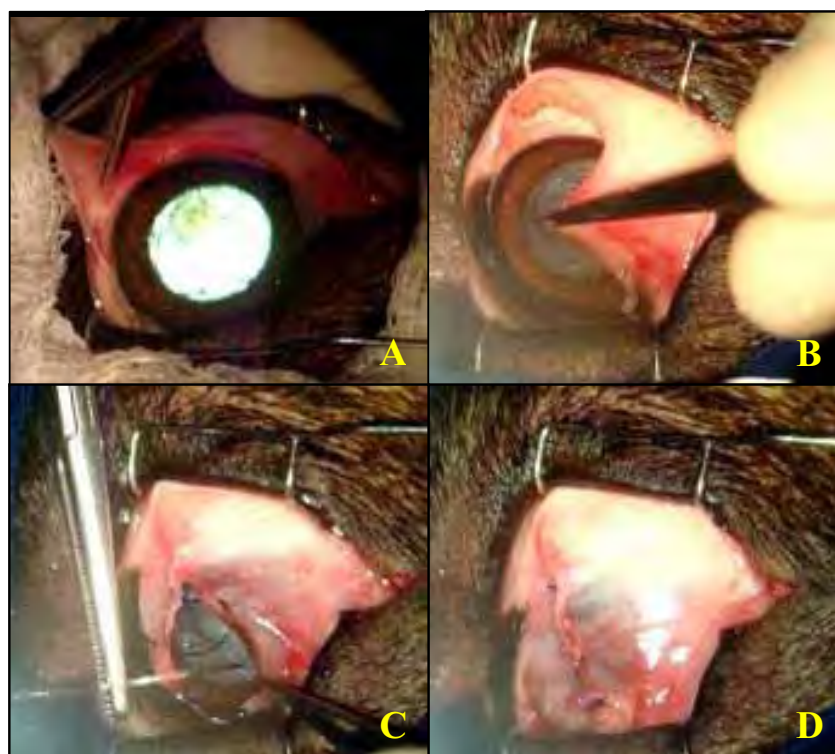


FIGURA 2 - Imagens fotográficas da cirurgia para a realização do recobrimento conjuntival 360°. Em **A**, após periotomia, continuidade da dissecação ao redor do limbo contemplando 360°. Em **B**, pode-se visualizar a tensão da conjuntiva fórnice-baseada sendo testada. Em **C**, a realização da sutura no padrão “U” horizontal contínua com mononylon 5-0 no sentido vertical ao fechamento das pálpebras. Em **D**, o aspecto final do recobrimento conjuntival 360° após o término da sutura.

III.VI.II Implante da membrana amniótica

Os pacientes foram submetidos à preparação rotineira para cirurgia oftálmica, segundo Slatter (2005). As cirurgias foram realizadas com auxílio de microscópio cirúrgico para magnificação (DF Vasconcellos). Após ser descongelada em temperatura ambiente e retirada do meio de criopreservação, a membrana amniótica foi hidratada em solução de cloreto de sódio 0,9% em cuba rim permanecendo por dez minutos. Posteriormente, a mesma era recortada ainda sobre o papel de nitrocelulose de acordo com o tamanho do defeito corneal. Após cantotomia e desbridamento da úlcera, seguiu-se seu delicado posicionamento. O papel era retirado e a face estromal da membrana esticada voltada sobre a superfície ocular, onde foi realizado um segundo recorte para adequar o tamanho da membrana ao leito da úlcera. Iniciava-se a sutura utilizando padrão simples contínuo não penetrante total com distância de 1,0mm entre pontos com mononylon 9-0, contemplando o bordo da úlcera e a membrana amniótica. Ao finalizar a sutura, realizou-se recobrimento com a terceira pálpebra que consistiu na aplicação de sutura “captionada”, utilizando sonda uretral nº 6, com padrão “U” horizontal entre a pálpebra superior e a terceira pálpebra, não transpassando a terceira pálpebra com mononylon 3-0, seguida de cantorráfia (FIGURA 3). O mesmo foi mantido por sete dias. A sutura da membrana amniótica foi retirada aos 15 dias de pós-operatório, sob anestesia geral.

III.VI.II Transplante de limbo córneo-escleral autólogo contralateral associado ao implante da membrana amniótica

Seguindo à preparação rotineira para cirurgia oftálmica segundo Slatter (2005), os cães foram submetidos à colheita do transplante de limbo córneo-escleral autólogo contralateral em relação ao olho com úlcera de córnea. As cirurgias foram realizadas com auxílio de microscópio cirúrgico para magnificação (DF Vasconcellos). Foi realizada, no olho doador, peritomia das 10 às 14 horas na conjuntiva bulbar perilimbo, seguida de uma dissecação

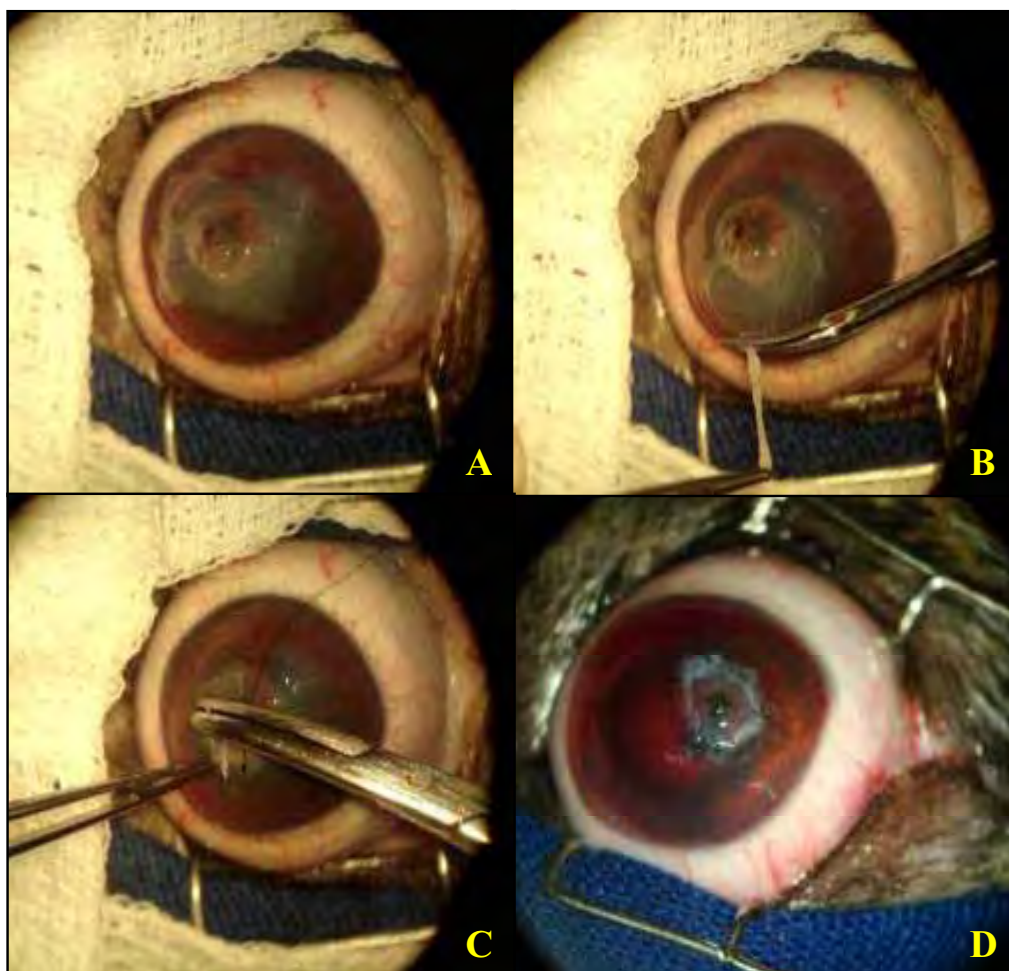


FIGURA 3 - Imagens fotográficas da cirurgia para a realização do implante da membrana amniótica canina criopreservada associada ao recobrimento com a terceira pálpebra. Em **A** observa-se o posicionamento da membrana amniótica canina com a face epitelial voltada para cima sobre a úlcera de córnea. Em **B**, a realização do segundo recorte para adequar a membrana ao tamanho da úlcera. Em **C**, pode-se visualizar o início da sutura em padrão simples contínuo não penetrante total utilizando mononylon 9-0 contemplando o bordo da úlcera e a membrana amniótica. Em **D**, o aspecto final do implante da membrana amniótica após o término da sutura.

lamelar superficial perilimbo de 2,0mm da córnea periférica até contemplar 2,0mm esclera adjacente, com lamina de bisturi nº 15. Nos dois sentidos (córneo-escleral e esclero-corneal) a dissecação lamelar foi realizada em forma

de cunha a fim de obter uma maior quantidade de células tronco basais epiteliais, com profundidade aproximada de 2,0mm. O fragmento obtido foi dividido em duas metades iguais e acondicionado em temperatura ambiente em recipiente estéril contendo soro autólogo previamente colhido.

No olho receptor, após cantotomia e desbridamento do leito da úlcera, o transplante de limbo foi retirado do soro e as metades rapidamente posicionadas na úlcera (entre 11 às 13 horas e de 17 às 19 horas). O posicionamento do transplante de limbo obedeceu à extensão de 2,0mm da córnea dentro da úlcera e 2,0mm da esclera a margem da úlcera. Posteriormente, a membrana amniótica canina criopreservada era colocada, com sua face epitelial voltada para cima, sobre o transplante de limbo, como descrito no tópico acima (implante da membrana amniótica). A sutura foi delicadamente realizada, utilizando padrão simples contínuo não penetrante total com distância de 1,0mm entre pontos com mononylon 9-0, contemplando o bordo da úlcera, o transplante de limbo córneo-escleral e a membrana amniótica entre 11 às 13 horas e de 17 às 19 horas e somente o bordo da úlcera e a membrana amniótica no restante da lesão. Ao finalizar a sutura, realizou-se recobrimento com a terceira pálpebra que consistiu na aplicação de sutura “captonada” com padrão “U” horizontal entre a pálpebra superior e a terceira pálpebra, não transpassando a terceira pálpebra com mononylon 3-0 (FIGURA 4). O mesmo foi mantido por sete dias. A sutura do transplante de limbo associado à membrana amniótica foi retirada aos 15 dias de pós-operatório, sob anestesia geral.

III.VII Análise estatística

A análise estatística foi realizada com Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas, teste de Friedman com pós-teste Dunn para comparar os momentos para cada grupo, e o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos em cada momento, para variáveis qualitativas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$), empregando-se o programa InStat3.



FIGURA 4 - Imagens fotográficas da cirurgia para a realização do transplante de limbo córneo-escleral contralateral associado ao implante da membrana amniótica canina criopreservada e recobrimento com a terceira pálpebra. Em **A** observa-se no olho doador o início da dissecação lamelar superficial perilimbo de 2,0mm da córnea periférica até contemplar 2,0mm esclera adjacente para a retirada do transplante de limbo córneo-escleral entre 10 e 14 horas (entre as setas). Em **B**, o início da retirada do transplante de limbo do olho doador. Em **C**, pode-se visualizar o posicionamento das metades do transplante de limbo no olho receptor e o início da sutura em padrão simples contínuo não penetrante total utilizando mononylon 9-0 contemplando o bordo da úlcera e a primeira metade do transplante. Em **D**, a continuidade da sutura incluindo a membrana amniótica previamente posicionada. Em **E**, o aspecto final do transplante de limbo associado ao implante da membrana amniótica após o término da sutura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raças dos quinze animais incluídos estão distribuídas em shih tzu (8), poodles (3), boxer (1), sharpei (1), pinscher (1) e sem raça definida (SRD) (1). Os animais atendidos tinham uma idade média de dois anos e dez meses (intervalo entre quatro meses e quatro anos). As úlceras foram causadas em nove casos por trauma, quatro por distiquíase e dois por entrópio. As causas de base, quando cirúrgicas, foram corrigidas conjuntamente ao tratamento da úlcera.

Quadro 1 - Dados dos pacientes incluídos no estudo.

	Número paciente	Idade	Sexo	Raça	Causa de úlcera	Olho da cirurgia	Profundidade da úlcera
Grupo I							
	A1	3anos	M	Poodle	Traumática	Direito	Profunda Crônica
	A2	1 ano	F	Shih-tzu	Distiquíase	Esquerdo	Descemetoccele
	A3	4 meses	F	Shih-tzu	Distiquíase	Direito	Profunda
	A4	4 meses	F	Shar-pei	Entrópio	Esquerdo	Profunda
	A5	6 anos	F	Boxer	Traumática	Esquerdo	Profunda Crônica
Grupo II							
	A1	6 meses	F	Shih-tzu	Distiquíase	Esquerdo	Descemetoccele
	A2	3 anos	F	Shih-tzu	Traumática	Direito	Profunda
	A3	4 anos	M	Poodle	Traumática	Direito	Descemetoccele
	A4	9 meses	F	Shih-tzu	Traumática	Direito	Descemetoccele
	A5	4 anos	F	Shih-tzu	Distiquíase	Esquerdo	Descemetoccele
Grupo III							
	A1	1 ano	M	Poodle	Traumática	Esquerdo	Descemetoccele
	A2	8 meses	M	Shih-tzu	Traumática	Esquerdo	Profunda crônica
	A3	10 meses	M	Shih-tzu	Traumática	Esquerdo	Descemetoccele
	A4	4 anos	F	Pinscher	Entrópio	Esquerdo	Profunda crônica
	A5	2 anos	F	SRD	Traumática	Direito	Profunda

A classificação clínica das úlceras quanto à profundidade no Grupo I (recobrimento conjuntival 360°) foi: quatro úlceras profundas, sendo duas crônicas (úlceras persistentes evoluindo mesmo com o tratamento prévio para uma úlcera profunda) e uma descemetocelose. No Grupo II (implante da membrana amniótica), um dos animais apresentava úlcera profunda e quatro deles apresentavam descemetocelose. O Grupo III (transplante de limbo) apresentou: três úlceras profundas, sendo duas crônicas e duas descemetocelose (Quadro 1). O tempo médio de evolução das úlceras, até o primeiro atendimento, foi de 11 dias (intervalo entre dois e 21 dias).

Dentre as intercorrências observadas no Grupo I, dois animais apresentaram deiscência da sutura, sendo esta a complicação mais comumente observada (HOLLINGSWORTH, 2003). Em dois pacientes, o recobrimento não aderiu ao leito da úlcera, sendo que um deles apresentou deiscência da sutura e o outro ocorreu por uma provável elevada atividade de enzimas proteolíticas da córnea, que fora observada após o recorte do recobrimento conjuntival. Associado a este fato, dois animais apresentaram sinéquia anterior que fora observada somente no momento do recorte. Tais complicações exemplificam uma das principais desvantagens do recobrimento conjuntival 360° que se refere ao impedimento da visualização da córnea e da evolução do processo cicatricial (HOLLINGSWORTH, 2003; SLATTER; DIETRICH, 2007). Um animal apresentou quemose intensa 360° cobrindo parcialmente a superfície da córnea após a retirada do recobrimento, sendo persistente até M30. O animal em questão era da raça shar pei, que apresentava entrópio congênito (superior e inferior), fatos que podem justificar tal intercorrência.

No Grupo II tratado com membrana amniótica, um animal apresentou pequena área de deiscência da sutura observada no momento da retirada do recobrimento com a terceira pálpebra, aos sete dias de pós-operatório. Devido à membrana amniótica estar aderida ao leito da úlcera, a sutura também foi removida, não comprometendo os resultados clínicos observados. Não foram observadas intercorrências nos animais do Grupo III (olhos doadores e

receptores). Brunelli et al. (2007), em estudo experimental em cães, também não observaram complicações nos olhos doadores do transplante de limbo esclero-corneal após retirada de 30% de sua circunferência. Como o presente trabalho, os olhos doadores apresentaram teste de fluoresceína negativo no M7 (BRUNELLI et al., 2007). Dois animais do Grupo II e um animal do Grupo III apresentavam sinéquia anterior desde o primeiro atendimento, não sendo correlacionada ao tratamento cirúrgico adotado.

Em relação aos parâmetros clínicos avaliados por escores, nenhum animal apresentou perfuração corneal. No que se refere ao blefarospasmo, não foi observada diferença estatística entre grupos. No entanto, na comparação entre momentos, esta diferença estatística foi observada entre o M1 e o M30 em todos os grupos ($p=0,0007$, $p=0,0008$ e $p=0,005$, respectivamente). Todos os animais apresentaram melhora clínica, baseada na quantificação por escores adotados para o blefarospasmo. Este esteve ausente ao final do período de avaliação proposto. Tal resultado já era esperado conforme estudos conduzidos anteriormente onde a cicatrização das úlceras corneais promove diminuição do estímulo das terminações nervosas do epitélio e estroma (ANDRADE et al., 2009; BRUNELLI et al., 2007; PONTES et al., 2008).

Os tratamentos realizados neste trabalho promoveram melhora clínica do quadro com repercussão na quantidade de secreção ocular observada em todos os animais. Esta diminuiu temporalmente até o final do período de avaliação clínica em todos os grupos, não havendo diferença significativa. Porém, nos Grupos II e III houve diferença estatística entre os momentos M1 e M30 ($p=0,018$ e $p=0,0075$, respectivamente), provavelmente evidenciada pelo fato de alguns animais incluídos apresentarem um escore inicial maior do que o que fora observado no Grupo I e por propriedades bacteriostáticas adjetivadas à membrana amniótica (AZUARA-BLANCO et al., 1999).

Não houve diferença significativa entre grupos quanto à vascularização corneal. No Grupo I foi observada piora na vascularização com diferença estatística entre os momentos iniciais (M1 e M0) e os momentos finais (M15 e M30) ($p=0,0293$). Apesar de não ser detectada diferença estatística entre

grupos, observou-se que tal evento clínico apresentou uma evolução distinta entre eles. No Grupo I, a vascularização progrediu ao longo do tempo no sentido axial da córnea, quando comparado aos Grupos II e III. Nestes, a vascularização manteve-se, praticamente, inalterada. Este achado é esperado e necessário em situações crônicas e graves. Nos processos cicatriciais da córnea, no entanto, ele deve ocorrer de maneira controlada para que não resulte em opacidade corneal permanente (GODOY et al., 2002). O escore inicial mais alto observado nos Grupos II e III reflete a gravidade da perda do estroma levando-se em conta a maior ocorrência de úlceras profundas crônicas e descemetoceloses nos animais incluídos nesses grupos (SLATTER; DIETRICH, 2007). Os recobrimentos conjuntivais vasculares (Grupo I) permitem de maneira mais fácil a chegada de células sanguíneas. Dentre elas, as células inflamatórias e as plaquetas estão diretamente envolvidas no processo angiogênico. Estas células expressam citocinas e fatores de crescimento de crescimento pró-inflamatórios (IL-1, TGF- β , PDGF e óxido nítrico) e promotores da vascularização corneal (TNF- α , VEGF: fator de crescimento vascular endotelial, FGF: fator de crescimento fibroblástico) (KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; WICHAYACOOOP et al., 2009).

Mesmo com lesões mais severas, não foi observada piora na vascularização do Grupo II e do Grupo III, corroborando os estudos experimentais anteriores em coelhos (ANDRADE et al., 2009; MONTEIRO et al., 2000), em cães (GODOY et al., 2002; WICHAYACOOOP et al., 2009) e estudos clínicos humanos (FAIRBANKS et al., 2003; MEALLET et al., 2003; PRABHASAWAT et al., 2001). Esses autores observaram uma menor vascularização das córneas em que a membrana amniótica foi aplicada em pacientes com deficiência de células germinativas. Sua atuação no controle da vascularização é explicada pela expressão de proteínas antiangiogênicas, como a trombospondina 1 e IL-1ra (receptor antagonista IL-1) (HAO et al., 2000), a restauração de um ambiente estromal sem inflamação (FAIRBANKS et al., 2003; MONTEIRO et al. 2000), por atrair, apreender e induzir apoptose as células inflamatórias (SHIMMURA et al., 2001) e por inibir fatores pró-

inflamatórios (HAO et al., 2000; PENA et al., 2007; YAM et al., 2002). Não são identificadas ao transplante de limbo propriedades antiangiogênicas ou anti-inflamatórias, sendo neste grupo, atribuídas à membrana amniótica associada.

Referente ao defeito epitelial houve diferença estatística entre os Grupos I e II e entre I e III no M15, como observado na tabela 1. A reparação epitelial nos Grupos II e III ocorreu em todos os animais no M15. No Grupo I, somente um animal apresentou reparação epitelial neste momento, sendo três animais ocorrendo no M30 e um animal com defeito epitelial persistente. Ao serem comparados os momentos iniciais (MI e M0) e os momentos finais (M15 e M30) em cada grupo, também foi observada diferença estatística em todos os grupos ($p=0,0083$, $0,0007$ e $0,0068$, respectivamente). Este fato já era esperado pelo processo cicatricial promovido pelos tratamentos. Entretanto, como referido anteriormente, ao final dos 30 dias de observação, um dos pacientes do Grupo I apresentou teste de fluoresceína positivo observado em lâmpada de fenda em filtro azul cobalto. Neste, um segundo procedimento cirúrgico foi realizado (ceratotomia em grade e recobrimento com terceira pálpebra), aliado ao tratamento clínico empregando-se antibiótico, lubrificante ocular e soro autólogo. Essa conduta fora empregada, pois se observou ausência de aderência do recobrimento conjuntival aos 15 dias, como medida auxiliar na promoção da cicatrização.

A membrana amniótica isolada e associada ao transplante de limbo promoveu reparação epitelial precoce, com diferença estatística, em comparação ao recobrimento conjuntival 360°, interferindo na velocidade de reparação corneal. Monteiro et al. (2000), em estudo experimental em coelhos, referem que a membrana amniótica não interfere na velocidade de reparação. Porém, este estudo induziu úlceras superficiais ao contrário do presente trabalho que utilizou úlceras clínicas e profundas.

Tabela 1 - Mediana, valores mínimo e máximo do escore para defeito epitelial, segundo os grupos em cada momento de avaliação.

Momento	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	Md	Min – Máx	Md	Min – Máx	Md	Min-Máx
Mi	2 a	2 – 2	2 a	2 - 2	2 a	2 - 2
M0	2 a	2 – 2	2 a	2 - 2	2 a	2 - 2
M15	1 A	0 – 2	0 B	0 - 0	0 B	0 - 0
M30	0 b	0 – 2	0 b	0 - 0	0 b	0 - 0

Medianas seguidas de letra diferente maiúscula na linha e minúscula na coluna diferem entre si ($p \leq 0,05$). Escores de avaliação - (0): ausência de defeito epitelial; (1): puntiforme; (2): defeito epitelial em parte da córnea; (3): defeito epitelial de toda a córnea.

A cicatrização de defeitos epiteliais depende do movimento centrípeto do epitélio viável adjacente e, em casos mais graves, requer células tronco do limbo (AGRAWAL; TSAI, 2003; DANIELS et al., 2001; RYMER, 2000). O emprego do transplante de limbo associado à membrana amniótica teve como objetivo principal redistribuir e aumentar a população de células germinativas próximo à lesão (NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001). Porém, na comparação entre os Grupos II e III não foi observada diferença estatística. Os momentos de avaliações podem ter influenciado nesses resultados, uma vez que exames diários poderiam detectar diferenças no momento da reparação epitelial, conforme descreveram Andrade et al. (2009), embora utilizaram indução da deficiência de células germinativas do limbo. Porém, por não se tratar de um estudo experimental, tal periodicidade nas avaliações não foi possível porque foram empregados animais da rotina hospitalar.

Outros fatores a serem considerados são o ambiente ao qual o transplante de limbo foi submetido e a forma em que ele foi realizado. Uma das diferenças marcantes entre o ambiente do limbo e o da córnea é a presença de um fornecimento de sangue ao limbo. A aproximação dos vasos ao epitélio do limbo aumenta os níveis de nutrição e de citocinas para as células. A ausência dos fatores de sobrevivência no centro da córnea poderia induzir à apoptose

das células-tronco do limbo (DANIELS et al., 2001). Os estudos realizando o transplante de limbo mantêm a sua localização no olho receptor não alterando de forma brusca seu ambiente vascularizado (BRUNELLI et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2008; NISHIWAKI-DANTAS et al., 2001; RYMER et al., 2002).

No presente estudo, a face estromal da membrana amniótica colocada sobre o transplante de limbo objetivou proteger e expressar fatores que auxiliassem na sobrevivência das células-tronco do limbo. Além da sua ação anti-inflamatória, importante na sobrevivência das células germinativas, o estroma da membrana amniótica expressa elevada quantidade do fator de crescimento neuronal. Acredita-se que este fator tenha papel chave na sobrevivência e integridade das células-tronco epiteliais (GRUETERICH et al., 2003). Porém, a estratégia de acomodar a membrana amniótica sobre o transplante de limbo não promoveu diferença quanto à reparação epitelial. Uma alternativa seria a realização do transplante de limbo suturado sobre a face epitelial da membrana amniótica. Esta poderia fornecer uma membrana basal como descrito em alguns estudos experimentais com cultivo *ex vivo* de células germinativas do limbo. Nestes casos, a membrana amniótica atua como substrato para o suporte, migração, crescimento e evitando apoptose (ESPANA et al., 2003; JANG et al., 2006; MELLER et al., 2002; QU et al., 2009; SANGWAN et al., 2003).

Estudos clínicos conduzidos no homem referem que a aplicação da membrana amniótica em multicamadas promove o restabelecimento do fenótipo corneal mais rápido em comparação à aplicação em camada única (PRABHASAWAT et al., 2001; SEITZ et al., 2009). Assim, em úlceras corneais profundas, o restabelecimento da espessura estromal talvez seja mais importante para abreviar o tempo de reparo epitelial do que um maior aporte celular epitelial. Fato este demonstrado pela não observação de diferença significativa entre os Grupos II e III. Provavelmente, nestes casos a membrana amniótica foi o fator principal para a observação de uma cicatrização do defeito epitelial mais precoce em relação ao Grupo I.

Ao refazer a espessura estromal, a membrana amniótica fornece uma membrana basal saudável que sustenta o epitélio neoformado, servindo de substrato para adesão e migração epitelial (colágeno tipo IV, lamininas 1 e 5 e fibronectina) (AZUARA-BLANCO et al., 1999; FAIRBANKS et al., 2003; SHIMMURA et al., 2001). Facilita, ainda, a proliferação e diferenciação celulares, além de reduzir a apoptose das células epiteliais (MEALLET et al., 2003; MELLER et al., 2002; MONTEIRO et al., 2000; KIM et al., 2009). Ainda, a membrana permite a liberação de fatores de crescimento (EGF, bFGF, KGF) e inibidores de metaloproteinases 1, que aumentam a expressão de receptores de EGF nas células epiteliais (KOIZUMI et al., 2000; YAM et al., 2002). Quando aplicada em camada única, a membrana amniótica permite a ocorrência desses eventos celulares e moleculares que aumentam a velocidade de reparação.

A área de opacidade corneal não apresentou diferença estatística entre grupos nem entre os momentos em cada grupo. Apesar disso, a qualidade cicatricial avaliada aos 15 dias de posoperatório apresentou diferença significativa entre Grupos I e II e aos 30 dias entre os Grupos I e III (Tabela 2). A qualidade cicatricial observada no Grupo II e III apresentou-se de menor intensidade, mais organizada e apesar de opaco, sendo visualmente semelhante ao tecido corneal em comparação ao Grupo I (FIGURA 5). Aparentemente, o transplante de limbo pode ter influenciado na reorganização estromal mais tardia observada no Grupo III em relação ao Grupo II.

O recobrimento conjuntival 360° (Grupo I) promoveu uma cicatrização basicamente vascular levando à deposição de um tecido de granulação e posterior cicatriz fibrovascular local, com ocorrência de leucoma cicatricial denso, irregular e vascularizado. O recobrimento conjuntival deve ser visto como um procedimento de resgate, oferecendo uma pequena chance de retorno ao fenótipo corneal normal em longo prazo (HOLLINGSWORTH, 2003; PUMPHREY et al., 2011). Ao fornecer e estimular um aporte vascular a cicatrização corneal passa a ter componentes da cicatrização fibrovascular. Assim, além das citocinas e fatores de crescimento normalmente expressos,

outras fontes promovem uma fibrose estromal excessiva. Dentre eles, o aumento do TGF- β e o PDGF expressos por plaquetas e células inflamatórias têm papel importante. Estes fatores promovem um ambiente favorável ao aumento na proporção de miofibroblastos no estroma corneal. (DAWSON, 2010; IMANISHI et al., 2000; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; REINACH; POKORNY, 2008). Essas células seriam as principais responsáveis pela deposição de uma matriz extracelular desorganizada, densa e por não permitirem uma remodelação completa do estroma levando a uma cicatriz corneal opacificada (DAWSON, 2010; ESPANA et al., 2003; REINACH; POKORNY, 2008).

Tabela 2 - Mediana, valores mínimo e máximo do escore para qualidade cicatricial, segundo os grupos em cada momento de avaliação.

Momento	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	Md	Min – Máx	Md	Min – Máx	Md	Min-Máx
M15	2 A	1 – 3	1 B	1 – 1	1	1 – 2
M30	2 A	1 – 3	1	1 - 1	1 B	0 – 1

Medianas seguidas de letra diferente maiúscula na linha e minúscula na coluna diferem entre si ($p \leq 0,05$). Escores de avaliação - (0): restituição do epitélio com características corneais preservadas (regular, transparente, avascular e defeito epitelial ausente); (1): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio mas com características corneais alteradas (irregular, opacidade cicatricial, vascularização remanescente); (2): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio pela deposição de tecido de granulação e fibrose local (tecido róseo/branco, denso, profundo, vascularizado); (3): reconstrução da superfície ocular mal sucedida com recorrência do defeito epitelial.

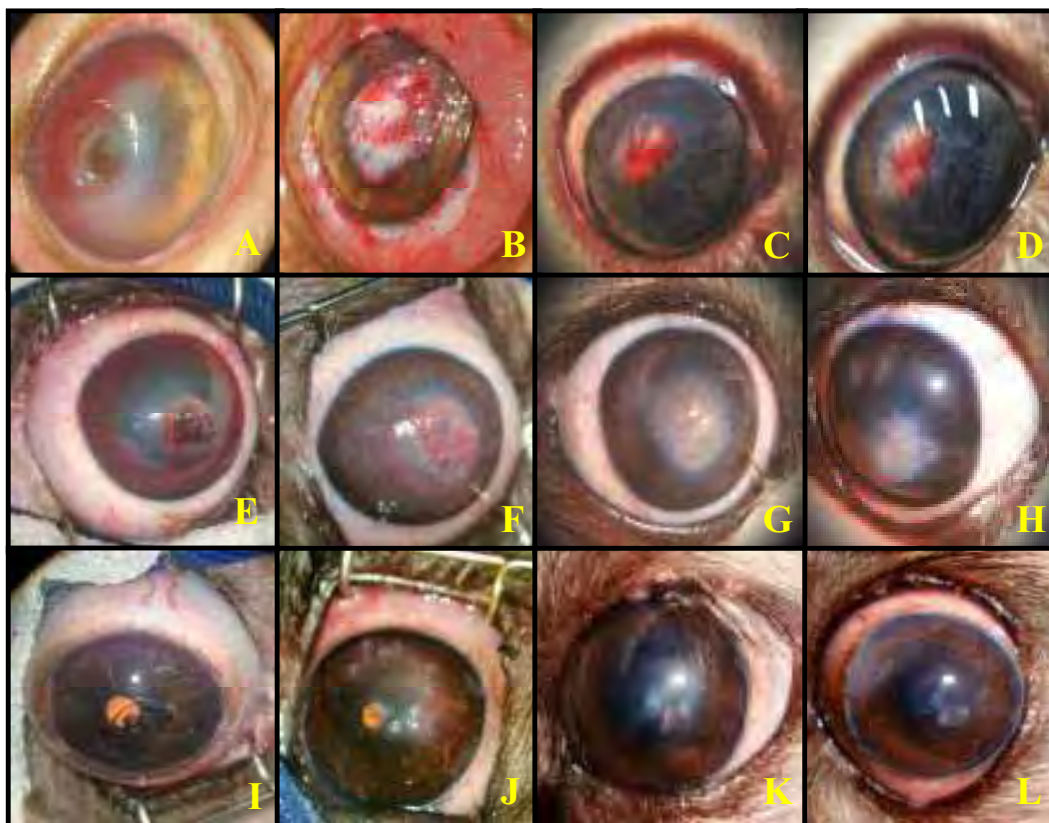


FIGURA 5 - Imagens fotográficas de olhos de cães. Imagens **A, B, C e D** pré-operatório (úlceras de córnea profunda crônica) e 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 1 do Grupo G1 (recobrimento conjuntival 360°). Imagens **E, F, G e H** pré-operatório (descemetocelose com sinéquia anterior) e 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 5 do Grupo G2 (implante da membrana amniótica). Imagens **I, J, K e L** pré-operatório (úlceras de córnea profunda) e 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do animal 2 do Grupo G3 (transplante de limbo córneo-escleral associado ao implante da membrana amniótica).

As prováveis explicações para uma cicatriz corneal mais organizada nos Grupos II e III levam em consideração propriedades atribuídas ao implante da membrana amniótica. Ao controlar a inflamação estromal por expressar inibidores pró-inflamatórios e apreender células inflamatórias (PENA et al., 2007; SHIMMURA et al., 2001; YAM et al., 2002), a membrana amniótica reduz a liberação de TGF- β por esta fonte (DAWSON, 2010). Associado, promoveria

uma proteção à exposição do estroma ao TGF- β que o levaria à diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (ANDRADE et al., 2009; KIM et al., 2009; KLENKLER; SHEARDOWN, 2004; YAM et al., 2002). Neste caso, a membrana amniótica assumiria a função da membrana basal do epitélio, diminuindo as interações epitélio-estroma e células inflamatórias-estroma, com isso regulando a biodisponibilidade do TGF- β ao estroma (DAWSON, 2010; DELMONTE; KIM, 2011).

Outro ponto a ser considerado reporta à vascularização corneal. Mesmo não havendo diferença significativa entre grupos e o escore de vascularização dos Grupos II e III mantendo-se alto, o processo de reparação nestes não promoveu uma cicatriz fibrovascular semelhante ao Grupo I. Provavelmente, a membrana amniótica minimizou os efeitos da vascularização estabelecida (DAWSON, 2010), modificando o ambiente estromal a favor de uma cicatrização fibrosa aceitável (HAO et al., 2000). Portanto, a membrana amniótica permitiu uma reparação mais organizada e com maior chance de uma remodelação próxima ao fenótipo normal, quando comparada ao recobrimento conjuntival.

CONCLUSÃO

V CONCLUSÕES

Com base no que fora exposto, e nas condições aqui adotadas, a aplicação clínica do implante de membrana amniótica canina criopreservada em úlceras profundas promoveu reparação corneal mais rápida e com melhor qualidade cicatricial quando comparada ao recobrimento conjuntival 360°. A associação com o transplante de limbo não promoveu vantagens em relação ao implante isolado da membrana amniótica sendo necessários estudos posteriores com ajustes na técnica descrita.

REFERÊNCIAS

VI REFERÊNCIAS

1. AGRAWAL, V. B.; TSAI, R. J. F. Corneal epithelial wound healing. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.51, p.5-15, 2003.
2. ANDRADE, A. L.; LAUS, J. L.; FIGUEIREDO-FLORENCIO, B. 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.
3. 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.
4. AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **British Journal of Ophthalmology**, v.83, p.399-402, 1999.
5. BRUNELLI, A.T.J.; VICENTE, F.A.M.; CHAHUD, F.; ORIÁ, A.P.; BOLZAN, A.A.; CAMPOS, C.F.; DORIA, F.A.; LAUS, J.L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p. 1194-1204, 2007.
6. CHEN, H-B.; YAMABAYASHI, S.; OU, B.; TANAKA, Y.; OHNO, S.; TSUKAHARA, S. Structure and composition of rat precorneal tear film: a study by an in vivo cryofixation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 2, p. 381-387, 1997.
7. CHER, I. F. Fluids of the ocular surface: concepts, functions and physics. **Clinical and Experimental Ophthalmology**; doi:10.1111/j.1442-9071.2012.02758.x, 2012.
8. CHOI, J. A.; JIN, H.-J.; JUNG, S. et al. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing in vitro. **Molecular Vision**, v.15, p. 2230-2238, 2009.

9. COUTURE, S.; DOUCET, M.; MOREAU, M.; CARRIER, M. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.3, p.157–164, 2006.
10. DANIELS J. T.; DART, J. K. G.; TUFT, S. J.; KHAW, P. T. Corneal stem cells in review. **Wound Repair and Regeneration**, n.9, p.483–494, 2001.
11. DAWSON, D. G. Corneal scars. In: DARTT, D. A.; BEX, P.; D'AMORE, P.; DANA, R.; MCLOON, L.K.; NIEDERKORN, J.Y. **Ocular periphery and disorders**. 1. ed. United Kingdom: Elsevier, 2010. p. 499-515.
12. DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract Refract Surgery**, v.37, p.588–598, 2011.
13. ESPANA, E. M.; TI, S-E.; GRUETERICH, M.; TOUHAMI, TSENG, A.; S. C. G. Corneal stromal changes following reconstruction by ex vivo expanded limbal epithelial cells in rabbits with total limbal stem cell deficiency. **British Journal of Ophthalmology**, v.87, p.1509–1514, 2003.
14. FAIRBANKS, D.; VIEIRA, L. A.; SANTOS, W. D.; ATTIE, G. C. G.; GOMES, J. A. P.; FREITAS, D. Membrana amniótica no tratamento dos afinamentos corneais e esclerais. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.71-76, 2003.
15. FERNÁNDEZ, A.; MORENO, J.; PRÓSPER, F.; GARCÍA, M.; ECHEVESTE, J. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v.31, n.1, p.53-69, 2008.
16. FINI, M. E.; STRAMER, B. M. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. **Córnea**, v.24, supl1, p.S2–S11, 2005.
17. FONSECA, E. C.; ARRUDA, G. V.; ROCHA, E. M. Olho seco: etiopatogenia e tratamento. **Arquivo Brasileiro Oftalmologia**, v.73, n.2, p.197-203, 2010.
18. GELATT, K. N. **Manual de oftalmologia veterinária**. Barueri: Manole, 2003. 594p.

19. GODOY, C. A. L.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal equina como enxerto. Estudo experimental. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.65, p. 545-549, 2002.
20. GUO, Q.; HAO, J.; YANG, Q.; et al. A comparison of the effectiveness between amniotic membrane homogenate and transplanted amniotic membrane in healing corneal damage in a rabbit model. **Acta Ophthalmology**, v.89, p.315-319, 2011.
21. GRUETERICH, M.; ESPANA, E. M.; TSENG, S. C. G. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. **Survey of ophthalmology**, v.48, n.6, p.631-646, 2003.
22. HAO, Y.; MA, D. H.-K.; HWANG, D. G.; KIM, W.-S.; ZHANG F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. **Cornea**, v.19, n.3, p.348–352, 2000.
23. HOLLINGSWORTH, S. R. Corneal surgical techniques. **Clinical techniques in small animal practice**, v.18, n.3, p. 161-167, 2003.
24. HOULIHAN, J.M.; BIRO, P.A.; HARPER, H.M.; et al. The human amnion is a site of MHC class 1b expression evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. **The Journal of Immunology**, v.154, p.5665-5674, 1995.
25. IMANISHI, J.; KAMIYAMA, K.; IGUCHI, I.; KITA, M.; SOTOZONO C.; KINOSHITA, S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.19, n.1, p. 113-129, 2000.
26. JANG, I.-K.; AHN, J.-I.; SHIN, J.-S.; KWON, Y.-S.; RYU, Y.-H.; LEE, J.-K.; PARK, J.-K.; SONG, K.-Y.; YANG, E.-K.; KIM, J.-C. Transplantation of reconstructed corneal layer composed of corneal epithelium and fibroblasts on a lyophilized amniotic membrane to severely alkali-burned cornea. **Journal Artificial Organs and Transplantation**, v.30, n.6, p.424-431, 2006.
27. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 487p.

28. KIM, J. Y.; CHOI, Y. M.; JEONG, S. W.; WILLIAMS, D. L. Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BATM) on uncomplicated canine corneal erosion. **Veterinary Ophthalmology**, v.12, n.1, p.36-42, 2009.
29. KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. **Experimental Eye Research**, v.79, p.677–688, 2004.
30. KOIZUMI, N. J.; INATOMI, T. J.; SOTOZONO, C. J.; FULLWOOD, N. J.; QUANTOCK, A.J.; KINOSHITA, S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. **Current Eye Research**, v.20, n.3, p. 173-177, 2000.
31. LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; ANDRADE, A. L. The use of the sardine scale (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), preserved in glicerine, in experimental lamellar keratoplasties in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 1, 2000.
[http:// www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=s1413-95962000000100007.](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=s1413-95962000000100007)
32. LAUS, J. L.; GALERA, P. D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; et al. Bilateral lamellar keratoplasty in descemetocoele treatment in dog with botulism by use of equine renal capsule and conjunctival pedicle graft. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.355-359, 1999.
33. LU, L.; REINACH, P. S.; KAO W. W.-Y. Corneal Epithelial Wound Healing. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n.7, p.653–664, 2001.
34. MACEDO, L. R. **Emprego de membrana de celulose microfibrilar na ceratoplastia lamelar em coelhos (*O. cuniculus*, Linnaeus, 1758): aspectos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
35. MEALLET, M. A.; ESPANA, E. M.; GRUETERICH, M.; TI, S.; GOTO, E.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation with conjunctival limbal autograft for total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v.110, n.8, p.1585-1592, 2003.

36. MELLER, D.; PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G. *Ex vivo* preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures **British Journal Ophthalmology**, v.86, p.463–471, 2002.
37. MELLER, D.; PAUKLIN, M.; THOMASEN, H.; WESTEKEMPER, H.; STEUHL, K-P. Amniotic membrane transplantation in the human eye. **Deutsches Ärzteblatt International**, v.108, n.14, p.243–248, 2011.
38. MILLER, W. W. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.16, n.1, p. 51-57, 2001.
39. MONTEIRO, E. C. L.; SCHELLINI, S. A.; MARQUES, M. E. A.; KAMEGASAWA, A.; PADOVANI, C. R. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.63, n.1, p.33-37, 2000.
40. MURUBE, J. The Córnea: part II. In: **Modern Ophthalmology: the highlights**. 3. ed. Jaypee: Highlights Medical Publrsers, 2011. v.2, p.209-247.
41. NASSIRI, N.; PANDYA, H. K.; DJALILIAN, A. R. Limbal allograft transplantation using fibrin glue. **Archive Ophthalmology**, v.129, n.2, 2011.
42. NISHIWAKI-DANTAS, M. C.; DANTAS, P. E. C.; REGGI, J. R. A. Ipsilateral limbal translocation for treatment of partial limbal deficiency secondary to ocular alkali burn. **British Journal of Ophthalmology**, v.85, p.1031–1033, 2001.
43. OLLIVIER, F. J.; GILGER, C. B.; BARRIE, K. P.; KALLBERG, M. E.; PLUMMER, C. E.; O'REILLY, S.; GELATT, K. N.; BROOKS, D. E. Proteinases of the cornea and preocular tear film. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n.4, p.199–206, 2007.
44. ONO, K.; YOKOO, S.; MIMURA, T.; USUI, T.; MIYATA, K.; ARAIE, M.; YAMAGAMI, S.; AMANO, S. Autologous transplantation of conjunctival epithelial cells cultured on amniotic membrane in a rabbit model. **Molecular Vision**, v.13, p.1138-1143, 2007.

45. PENA, J. D. O.; MELO, G. B.; GOMES, J. A. P.; HAAPALAINEN, E. F.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N. C.; FILHO, A. A. S. L.; RIZZO, L. V. Análise ultraestrutural e de fatores de crescimento de diferentes métodos de preservação da membrana amniótica utilizada em cirurgia ocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.70, n.5, p. 756-762, 2007.
46. PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B.; FAVARATO, L. S. C.; DUARTE, T. S. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural**, v.41, n.12, p.2120-2127, 2011.
47. PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; DUARTE, T. S.; MORATO, G. L.; ZAVAN, V.; ELEOTÉRIO, R. B.; CARLO, E. C. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos – aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1069-1074, 2008.
48. PRABHASAWAT, P.; TESAVIBUL, N.; KOMOLSURADEJ, W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, p.1455-1463, 2001.
49. PUMPHREY, S. A.; PIZZIRANI, S.; PIRIE, C. G. 360-degree conjunctival grafting for management of diffuse keratomalacia in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.3, p.209–213, 2011.
50. QU, L.; YANG, X.; WANG, X.; ZHAO, M.; MI, S.; DOU, Z.; WANG, H. Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserved corneal limbal stem cells in a rabbit model. **The Veterinary Journal**, v.179, p.392–400, 2009.
51. QUINTO, G. G.; MARTINS, S. A. R.; TIEMI, R.; CAMPOS, M.; BEHRENS, A. Líquido amniótico tópico: uma potencial nova alternativa para doenças da superfície ocular. **Arquivo Brasileiro Oftalmologia**, v.71, suppl.6, p.55-60, 2008.
52. RAHMAN, I.; SAID, D. G.; MAHARAJAN, V. S.; DUA, H. S. Amniotic membrane in ophthalmology: indications and limitations. **Eye**, v.23, p.1954–1961, 2009.

53. REINACH, P. S.; POKORNY, K.S. The corneal epithelium: clinical relevance of cytokine-mediated responses to maintenance of corneal health. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, Santa Maria, v.71, supl.6, p.80-88, 2008.
54. RIBEIRO, A. P.; BRITO, F. L. DA C.; MARTINS, B. DA C.; MAMEDE, F.; LAUS, J. L. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.568-575, 2008.
55. RYMER, S. Transplante de limbo. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.63, n.4, p. 307-309, 2000.
56. RYMER, S.; BURNIER, M.; MARINHO, D.; KWITKO, S.; BELFORT JUNIOR, R.; ROHR, D. Transplante autólogo de limbo conjuntival e de limbo córneo-conjuntival no tratamento das queimaduras químicas oculares em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.65, p. 161-170, 2002.
57. SAIKA, S.; OHNISHI, Y.; OOSHIMA, A.; LIU, C.-Y.; KAO, W. W.-Y. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. **Córnea**, n.21, supl.1, p.S23–S29, 2002.
58. SAMPAIO, R. L.; RANZANI, J. J. T.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; STACCIARINI, M. S.; BRAGA, E. M.; BORREZZI, C. Aspectos clínicos e imunopatológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1077-1085, 2006.
59. SANGWAN, V. S.; VEMUGANTI, G. K.; SINGH, S.; BALASUBRAMANIAN, D. Successful Reconstruction of Damaged Ocular Outer Surface in Humans using Limbal and Conjunctival Stem Cell Culture Methods. **Bioscience Reports**, v.23, n.4, p. 169-174, 2003.
60. SATO, H.; SHIMAZAKI, J.; SHIMAZAKI, N. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.39, p.428, 1998.
61. SEITZ, B.; DAS, S.; SAUER, R.; MENA, D.; HOLFMANN-RUMMELT, C. Amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defects in eyes after penetrating keratoplasty. **Eye**, v.23, p.840-848, 2009.

62. SHIMMURA, S.; SHIMAZAKI, J.; OHASHI, Y.; TSUBOTA, K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. **Córnea**, v.20, n.4, p.408-413, 2001.
63. SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. 686p.
64. SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. v.2, p.1368-1396.
65. SONMEZ, B.; BEDEN, U. Fibrin glue–assisted sutureless limbal stem cell transplantation surgery for the treatment of severe ocular chemical injury. **Córnea**, v.30, n.3, 2011.
66. TORRES, J.; FERNÁNDEZ, I.; QUADRADO, M. J.; MURTA, J.; HERRERAS, J.; RODRÍGUEZ-ARES, M. T.; BENÍTEZ-DEL-CASTILLO, J. M.; ALIÓ, J.; MUÑOZ, M. F.; CALONGE, M. Limbal transplantation: multicenter retrospective case series analysis. **Archivos de la Sociedad Española de Opftalmologia**, v.83, p.417-422, 2008.
67. WATSKY, M. A.; WEBER, K. T.; SUN, Y.; POSTLETHWAITE, A. New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies. **Internacional review of cell and molecular biology**, v.282, p.165-192, 2010.
68. WICHAYACOO, T.; BRIKSAWAN, P.; TUNTIVANICH, P.; YIBCHOK-ANUN, S. Anti-inflammatory effects of topical supernatant from human amniotic membrane cell culture on canine deep corneal ulcer after human amniotic membrane transplantation. **Veterinary Ophthalmology**, v.12, n.1, p.28-35, 2009.
69. WILLEFORD, K. O.; MILLER, W. W.; ABRAMS, K. L.; VAUGHN, B. M. Modulation of proteolytic activity associated with persistent corneal ulcers in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, n.1, p.5-8, 1998.
70. YAM, H.-F.; PANG, C.-P.; FAN, D. S.-P.; FAN, B.-J.; YU, E. Y.-W.; LAM, D. S.-C. Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. **Córnea**, v.21, n.1, p.101–105, 2002.

71. YU, F.-S. X.; YIN, J.; XU, K.; HUANG, J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin**, v.81, p.229–235, 2010.

APÊNDICE A

Tabela 1A- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente ao blefarospasmo durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 1 (recobrimento conjuntival 360°), nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	2	1	1	1	0
A2	2	2	1	1	1	0
A3	3	3	1	1	0	0
A4	2	2	1	1	0	1
A5	1	1	1	1	0	0

Tabela 2A- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente ao blefarospasmo durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 2 (membrana amniótica) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	1	1	0	0	0
A2	3	1	1	1	0	0
A3	3	3	1	1	1	0
A4	2	2	2	2	0	0
A5	1	2	2	1	0	0

Tabela 3A- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente ao blefarospasmo durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 3 (membrana amniótica e transplante de limbo) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	1	1	1	1	0	0
A2	2	2	1	1	1	0
A3	3	3	1	2	1	0
A4	2	2	0	1	0	0
A5	2	2	0	1	0	0

Legenda

(0): ausência

(1): leve

(2): moderado

(3): intenso

APÊNDICE B

Tabela 1B- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à secreção ocular durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 1 (recobrimento conjuntival 360°), nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	1	1	1	1	1	1
A2	2	2	1	1	1	2
A3	2	2	2	1	0	1
A4	2	2	1	1	1	0
A5	1	0	1	1	1	1

Tabela 2B- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à secreção ocular durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 2 (membrana amniótica) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	3	1	1	1	1	0
A2	1	1	1	1	1	0
A3	2	2	2	2	1	1
A4	2	1	1	2	1	0
A5	2	2	2	2	0	0

Tabela 3B- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à secreção ocular durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 3 (membrana amniótica e transplante de limbo) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	2	1	1	0	0
A2	2	2	1	1	1	0
A3	1	1	1	1	0	0
A4	1	1	1	1	1	0
A5	1	1	1	1	1	0

Legenda

(0): ausência

(1): +

(2): ++

(3): +++

APÊNDICE C

Tabela 1C- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à vascularização corneal durante a cicatrização da córnea nos animais do grupo 1 (recobrimento conjuntival 360°), nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	4	4	-	-	4	4
A2	2	2	-	-	4	4
A3	2	2	-	-	6	6
A4	4	4	-	-	4	4
A5	0	0	-	-	4	4

Tabela 2C- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à vascularização corneal durante a cicatrização da córnea nos animais do grupo 2 (membrana amniótica) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	4	4	-	4	4	4
A2	2	2	-	2	2	2
A3	4	4	-	4	4	6
A4	4	4	-	4	6	6
A5	4	4	-	4	4	4

Tabela 3C- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à vascularização corneal durante a cicatrização da córnea nos animais do grupo 3 (membrana amniótica e transplante de limbo) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	6	6	-	6	6	4
A2	2	2	-	2	4	4
A3	2	2	-	4	4	4
A4	6	6	-	6	4	4
A5	6	6	-	6	4	4

Legenda

(0): ausência

(2): proliferação vascular até 2 mm do limbo

(4): proliferação vascular até 4 mm do limbo

(6): proliferação vascular até 6 mm do limbo

(8): proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual)

APÊNDICE D

Tabela 1D- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente ao defeito epitelial durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 1 (recobrimento conjuntival 360°), nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	2	-	-	1	0
A2	2	2	-	-	2	2
A3	2	2	-	-	0	0
A4	2	2	-	-	1	0
A5	2	2	-	-	1	0

Tabela 2D- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente ao defeito epitelial durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 2 (membrana amniótica) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	2	-	1	0	0
A2	2	2	-	2	0	0
A3	2	2	-	2	0	0
A4	2	2	-	2	0	0
A5	2	2	-	2	0	0

Tabela 3D- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente ao defeito epitelial durante a cicatrização corneal nos animais do grupo 3 (membrana amniótica e transplante de limbo) nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	2	-	0	0	0
A2	2	2	-	1	0	0
A3	2	2	-	2	0	0
A4	2	2	-	2	0	0
A5	2	2	-	2	0	0

Legenda

(0): ausência - ausência de defeito epitelial

(1): puntiforme

(2): parcial - defeito epitelial em parte da córnea

(3): total - defeito epitelial de toda a córnea

APÊNDICE E

Tabela 1E- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à opacidade corneal durante a cicatrização da córnea nos animais do grupo 1 (recobrimento conjuntival 360°), nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	2	-	-	1	1
A2	2	2	-	-	2	3
A3	3	3	-	-	2	1
A4	3	3	-	-	2	2
A5	2	2	-	-	1	0

Tabela 2E- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à opacidade corneal durante a cicatrização da córnea nos animais do grupo 2 (membrana amniótica), nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	2	2	-	2	2	1
A2	1	1	-	2	1	1
A3	2	2	-	2	2	2
A4	3	3	-	3	2	1
A5	3	3	-	2	2	1

Tabela 3E- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à opacidade corneal durante a cicatrização da córnea nos animais do grupo 3 (membrana amniótica e transplante de limbo), nos diferentes momentos em dias.

Animais	Mi	M0	M3	M7	M15	M30
A1	3	3	-	3	3	3
A2	1	1	-	1	1	1
A3	1	1	-	2	1	1
A4	2	2	-	2	1	1
A5	2	2	-	2	1	1

Legenda

(0): não há dificuldade de observar detalhes da íris

(1): discreta - há borramento dos detalhes da íris

(2): moderada - há dificuldade em definir detalhes da íris

(3): severa - não é possível observar detalhes da íris

APÊNDICE F

Tabela 1F- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à qualidade cicatricial ao final da cicatrização corneal nos animais do grupo 1 (recobrimento conjuntival 360°), nos diferentes momentos em dias.

Animais	M15	M30
A1	2	2
A2	3	3
A3	2	2
A4	2	2
A5	1	1

Tabela 2F- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à qualidade cicatricial ao final da cicatrização corneal nos animais do grupo 2 (membrana amniótica) nos diferentes momentos em dias.

Animais	M15	M30
A1	1	1
A2	1	1
A3	1	1
A4	1	1
A5	1	1

Tabela 3F- Valores individuais da avaliação clínica subjetiva referente à qualidade cicatricial ao final da cicatrização corneal nos animais do grupo 3 (membrana amniótica e transplante de limbo) nos diferentes momentos em dias.

Animais	M15	M30
A1	2	2
A2	1	0
A3	2	1
A4	1	1
A5	1	1

Legenda

(0): restituição do epitélio com características corneais preservadas (regular, transparente, avascular e defeito epitelial ausente)

(1): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio mas com características corneais alteradas (irregular, opacidade cicatricial, vascularização remanescente)

(2): reconstrução da superfície ocular com cicatrização do defeito epitelial corneal prévio pela deposição de tecido de granulação e fibrose local (tecido róseo/branco, denso, profundo, vascularizado)

(3): reconstrução da superfície ocular mal sucedida com recorrência do defeito epitelial