

Renato Linhares Sampaio

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÓRNEAS TRATADAS
POR CERATOPLASTIA COM MEMBRANA
AMNIÓTICA XENÓGENA A FRESCO E
CONSERVADA EM GLICERINA. ESTUDO
EXPERIMENTAL EM COELHOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

ORIENTADOR: Prof. Ass. Dr. José Joaquim Tifton Ranzani

BOTUCATU

2004

Renato Linhares Sampaio

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÓRNEAS TRATADAS
POR CERATOPLASTIA COM MEMBRANA
AMNIÓTICA XENÓGENA A FRESCO E
CONSERVADA EM GLICERINA. ESTUDO
EXPERIMENTAL EM COELHOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

ORIENTADOR: Prof. Ass. Dr. José Joaquim Tifton Ranzani

BOTUCATU

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Sampaio, Renato Linhares.

Avaliação clínica, histopatológica e imunohistoquímica de córneas tratadas por ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos / Renato Linhares Sampaio. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

Orientador: José Joaquim Tilton Ranzani

Assunto CAPES: 40102149

1. Córnea - Cirurgia - Estudos experimentais

CDD 617.719

Palavras-chave: Ceratoplastia; Coelho; Córnea; Membrana amniótica; Úlcera

*“Seja qual for a obra na qual te embrenhes,
e se acaso falha o teu primeiro intento,
não desanimes nem desistas,
antes volta a recomeçar com novo alento.*

*Não haverá dificuldade nem resistência
que dominar não possas com talento,
com vontade firme e com paciência.
É muito breve a vida, a arte é vasta;
A perfeição, no entanto, se alcança
a força de trabalho e de experiência.”*

(Arturo Cuyás)

Uma breve revisão...

*Desfrutei ao longo deste Curso de Doutorado
momentos de muitas expectativas e emoções que,
de maneira bastante saudável equilibraram-se
com os momentos de preocupação e angústia,
comuns em qualquer aluno de pós-graduação.
Não houve dificuldade que não pudesse ser superada
E desafio que limitasse a vontade de continuar firme
na empreitada de fazer de cada momento difícil
uma experiência para a vida.*

*Nada teria sido possível se vocês não
estivessem ao meu lado em todos os instantes,
inclusive quando, em muitos momentos,
para a conclusão deste trabalho,
estive ausente...*

***Este trabalho é dedicado aos meus queridos
Marisa, Lucas e Vinícius***

“...O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura. Se ele for verdadeiramente sábio, não vos conduzirá a entrar na mansão de seu saber, mas antes vos conduzirá ao limiar de vossa própria mente...”

Quim,

*Obrigado pelas oportunidades,
pelo incentivo sempre presente
e por permitir seguir seus passos...*

*obrigado por confiar nos meus instintos
e compreender meus erros,
guiando-me sempre pelo caminho dos acertos
ao longo destes 10 anos ...
10 anos que espero sempre se renovem ...*

*"O sucesso nasce do querer.
Sempre que o homem aplicar
a determinação e a persistência para um objetivo,
ele vencerá os obstáculos, e , se não atingir o alvo,
pelo menos fará coisas admiráveis."*

Romeu,
*Não é justo deixar de
dizer que o resultado de tudo até agora realizado
é fruto do sua dedicação como
Pai e como colega.
Seu exemplo é sempre motivo
de muito orgulho...*

À Tita, Luiza e Ricardo,

*Não poderia deixar de reconhecer
a valiosa influência que vocês
exerceram na minha formação
como ser humano, filho e irmão....*

A vocês, ofereço.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que doaram parte de seu tempo e conhecimento para que este trabalho pudesse se concretizar. Agradeço a todos, em especial:

*Aos **Professores e funcionários** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, pelos conhecimentos e amizade,*

*A todos os **colegas** da Universidade de Uberaba, pelo incentivo e auxílio durante a realização deste trabalho;*

*À Médica Veterinária Residente **Carla Borrezzi** e aos **acadêmicos** de Medicina Veterinária **Marcelo Souza Staciarinni** e **Eduardo Miranda Braga** pela inestimável ajuda em todas as etapas de realização deste;*

*Aos **parceiros** do Curso de Medicina Veterinária de Uberaba, UNIUBE, FAZU e ABCZ, pelo auxílio e incentivo à realização deste curso de Pós-Graduação;*

*Ao Professor **Virmondes Rodrigues Jr.** e todos os **funcionários** do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, sem a ajuda dos quais a conclusão deste trabalho não teria sido possível;*

*Aos amigos **João, José Palma, Linder, Stela, Stélio, Neca***

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. ANATOMOFISIOLOGIA DA SUPERFÍCIE OCULAR	3
2.2. ETIOPATOGENIA E MECANISMOS INTRÍNSECOS DE REPARAÇÃO DAS LESÕES CORNEANAS	8
2.3. MECANISMOS DE DEFESA DA SUPERFÍCIE OCULAR	16
2.3.1. MECANISMOS DE DEFESA NÃO ESPECÍFICOS	18
2.3.1.1. BARREIRAS ANATÔMICAS	18
2.3.2. MECANISMOS ESPECÍFICOS DE DEFESA	29
2.3.2.1. RESPOSTA IMUNE AFERENTE	35
2.3.2.2. RESPOSTA IMUNE EFERENTE	38
2.4. MÉTODOS DE REPARAÇÃO DA CÓRNEA	50
2.5. UTILIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA REPARAÇÃO DE DEFEITOS DA SUPERFÍCIE OCULAR	57
3. OBJETIVOS	76
4. MATERIAL E MÉTODOS	77
4.1. OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS	77
4.2. DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	77
4.3. OBTENÇÃO E PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	79
4.3.1. MEMBRANA AMNIÓTICA XENÓGENA CONSERVADA EM GLICERINA	79

4.3.2. MEMBRANA AMNIÓTICA XENÓGENA A FRESCO	80
4.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	81
4.4.1. PRÉ-OPERATÓRIO	81
4.4.2. TRANS-OPERATÓRIO	82
4.4.2.1. PREPARO DA ÁREA PARA RECEBIMENTO DO ENXERTO	82
4.4.2.2. APLICAÇÃO DO ENXERTO	83
4.4.3. PÓS-OPERATÓRIO	85
4.5. PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO	85
4.5.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA	85
4.5.2. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	87
4.5.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA DA SUPERFÍCIE OCULAR PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA	88
4.5.3.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL E PREPARO DAS LÂMINAS	88
4.5.3.2. EXECUÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA	90
5. RESULTADOS	96
5.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA	96
5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA AVALIAÇÃO CLÍNICA	111
5.2. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	126
5.4. AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	143
6. DISCUSSÃO	148
7. CONCLUSÕES	159
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
9. APÊNDICE	198

LISTA DE FIGURAS

TÍTULO	PÁGINA
Figura 1: Desenho que ilustra a configuração das lâminas de imunohistoquímica, tendo como exemplo as lâminas com cortes de córnea do grupo 1. Para cada lâmina, de cada subgrupo, foram realizadas 5 repetições.	90
Figura 2: Desenho ilustrando a cuba utilizada na execução de algumas etapas da técnica de imunohistoquímica.	91
FIGURA 3: Representação gráfica da evolução clínica dos fenômenos de fotofobia e blefarospasmo em olhos submetidos à remoção do epitélio corneano com n-heptanol.	100
FIGURA 4: Representação gráfica da evolução clínica dos fenômenos de fotofobia e blefarospasmo em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenógena conservada em glicerina.	100
FIGURA 5: Representação gráfica da evolução clínica dos fenômenos de fotofobia e blefarospasmo em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco.	100
FIGURA 6: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de hiperemia conjuntival em olhos submetidos à remoção do epitélio corneano com n-heptanol .	101

FIGURA 7: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de hiperemia conjuntival em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.	101
FIGURA 8: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de hiperemia conjuntival em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga a fresco.	101
FIGURA 9: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de secreção ocular em olhos submetidos à remoção do epitélio corneano com n-heptanol.	102
FIGURA 10: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de secreção ocular em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.	102
FIGURA 11: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de secreção ocular em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga a fresco.	102
FIGURA 12: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de quemose em olhos submetidos à remoção do epitélio corneano com n-heptanol.	103
FIGURA 13: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de quemose em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.	103

FIGURA 14: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de quemose em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica a fresco.	103
FIGURA 15: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de neovascularização corneana em olhos submetidos à remoção do epitélio corneano com n-heptanol.	104
FIGURA 16: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de neovascularização corneana em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.	104
FIGURA 17: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de neovascularização corneana em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga a fresco.	104
Figura 18: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, imediatamente após ser submetido à aplicação de n-heptanol e remoção do epitélio corneano, sem fluoresceína.	113
Figura 19: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, imediatamente após ser submetido à aplicação de n-heptanol e remoção do epitélio corneano, corado com fluoresceína.	113
Figura 20: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, sem fluoresceína.	114

Figura 21: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com fluoresceína.	114
Figura 22: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, corada com fluoresceína, 7 dias após a remoção do epitélio corneano.	115
Figura 23: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1 corada com fluoresceína, 7 dias após a remoção do epitélio corneano.	115
Figura 24: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, com aplicação de fluoresceína, 14 dias após a remoção do epitélio corneano.	116
Figura 25: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, com aplicação de fluoresceína, 14 dias após a remoção do epitélio corneano.	116
Figura 26: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, sem aplicação de fluoresceína, 21 dias após a remoção do epitélio corneano.	117
Figura 27: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, corada com fluoresceína, imediatamente após a aplicação do enxerto.	117
Figura 28: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, sem fluoresceína, 24 horas após a aplicação do enxerto.	118
Figura 29: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 24 horas após a aplicação do enxerto.	118

Figura 30: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 72 horas após a aplicação do enxerto.	119
Figura 31: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 7 dias após a aplicação do enxerto.	119
Figura 32: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 14 dias após a aplicação do enxerto.	120
Figura 33: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.	120
Figura 34: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.	121
Figura 35: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, corada com fluoresceína, imediatamente após a aplicação do enxerto.	121
Figura 36: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 24 horas após a aplicação do enxerto.	122
Figura 37: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 72 horas após a aplicação do enxerto.	122
Figura 38: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 7 dias após a aplicação do enxerto.	123

Figura 39: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 7 dias após a aplicação do enxerto.	123
Figura 40: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 14 dias após a aplicação do enxerto.	124
Figura 41: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 14 dias após a aplicação do enxerto.	124
Figura 42: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.	125
Figura 43: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.	125
Figura 44: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho, em condições normais, com aumento de 100 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, demonstrando a transição do epitélio da córnea para o epitélio conjuntival.	133
Figura 45: Fotomicrografia da região central da córnea de coelho corada pela técnica de hematoxilina e eosina, em condições normais, demonstrando as camadas bem definidas e o epitélio íntegro sobre o estroma (aumento de 100 x).	133

Figura 46: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com aumento de 100 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina. Observa-se a expansão do epitélio da córnea. 134

Figura 47: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com aumento de 400 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina. Observa-se a expansão do epitélio da córnea. 134

Figura 48: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com aumento de 1000 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina. Observa-se a expansão do epitélio da córnea. 135

Figura 49: Fotomicrografia da região central da córnea de coelho, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, 7 dias após a remoção do epitélio, demonstrando a total reparação do defeito (aumento de 100 x). 135

Figura 50: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 136

Figura 51: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 400X. 136

- Figura 52:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 137
- Figura 53:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 137
- Figura 54:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 7 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 138
- Figura 55:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 7 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 138
- Figura 56:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 14 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 400X. 139
- Figura 57:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 7 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 139
- Figura 58:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 140

- Figura 59:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X. 140
- Figura 60:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 400X. 141
- Figura 61:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 1000X. 141
- Figura 62:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 1000X. 142
- Figura 63:** Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 1000X. 142
- Figura 64:** Fotomicrografia de linfonodo submetido à técnica de imunohistoquímica para linfócito T CD4+, com aumento de 100X. 145
- Figura 65:** Fotomicrografia de linfonodo submetido à técnica de imunohistoquímica para linfócito T CD4+, com aumento de 400X. 145

Figura 66: Fotomicrografia de linfonodo submetido à técnica de imunohistoquímica para linfócito T CD8+, com aumento de 400X. 146

Figura 67: Fotomicrografia da região central de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, submetida à pesquisa de linfócitos T CD4+, com aumento de 100X. 146

Figura 68: Fotomicrografia da região periférica de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, submetida à pesquisa de linfócitos T CD4+, com aumento de 100X. 147

Figura 69: Fotomicrografia da região central de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, submetida à pesquisa de linfócitos T CD8+, com aumento de 1000X. 147

LISTA DE TABELAS

TÍTULO	PÁGINA
Tabela 1: Distribuição dos animais por grupo e subgrupo, de acordo com o tipo de tratamento e o tempo de observação clínica e coleta dos materiais	80
Tabela 2: Interpretação dos índices de escore utilizados na avaliação clínica dos olhos em estudo	87
Tabela 3: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de fotofobia e blefarospasmo, com análise estatística dos dados	199
Tabela 4: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de hiperemia conjuntival, com análise estatística dos dados	200
Tabela 5: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de secreção ocular, com análise estatística dos dados	201
Tabela 6: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de quemose, com análise estatística dos dados	202
Tabela 7: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de neovascularização corneana, com análise estatística dos dados	203

Tabela 8: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de fotofobia e blefarospasmo, com análise estatística dos dados	204
Tabela 9: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de hiperemia conjuntival, com análise estatística dos dados	205
Tabela 10: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de secreção ocular, com análise estatística dos dados	206
Tabela 11: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de quemose, com análise estatística dos dados	207
Tabela 12: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de neovascularização corneana, com análise estatística dos dados	208
Tabela 13: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de fotofobia e blefarospasmo, com análise estatística dos dados	209
Tabela 14: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de hiperemia conjuntival, com análise estatística dos dados	210

Tabela 15: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de secreção ocular, com análise estatística dos dados	211
Tabela 16: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de quemose, com análise estatística dos dados	212
Tabela 17: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de neovascularização corneana, com análise estatística dos dados	213

SAMPAIO, R.L. Avaliação clínica, histopatológica e imunohistoquímica de córneas tratadas por ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos.

RESUMO

O presente estudo foi empreendido com o objetivo de estabelecer a cinética da resposta inflamatória e conhecer os mecanismos envolvidos na reparação de córneas tratadas por ceratoplastia utilizando, como método experimental, o emprego de membrana amniótica xenógena a fresco e conservada em glicerina no recobrimento de úlceras experimentais. Para o desenvolvimento da metodologia proposta utilizou-se 70 coelhos, os quais foram distribuídos em 5 grupos experimentais. Os animais foram avaliados por 21 dias, período durante o qual observou-se fenômenos relacionados à resposta inflamatória local, como dor, edema de córnea e conjuntiva, hiperemia conjuntival, além dos fenômenos relacionados à reparação da córnea, como a infiltração vascular e epitelização da úlcera experimentalmente criada. Para tanto, os olhos foram avaliados através de exame clínico oftalmológico, estudo histopatológico e reação imunohistoquímica, através da qual pesquisou-se a presença de linfócitos T na intimidade do tecido corneano. A avaliação clínica revelou que a membrana amniótica xenógena conservada em glicerina estimulou uma resposta inflamatória aguda maior que a membrana aplicada a fresco. A análise histopatológica indicou que ambas se comportaram de forma bastante semelhante a partir da 1ª semana de pós-operatório, apresentando as alterações clássicas da resposta inflamatória da córnea, com o predomínio de infiltrado do tipo polimorfonuclear. Os fenômenos de reparação também evoluíram respeitando os padrões normais para ambos os tratamentos, tendo sido observado, porém, que a epitelização do defeito foi mais rápida nas córneas que receberam o enxerto de membrana a fresco. A aplicação da técnica de imunohistoquímica indicou que em nenhum momento de observação houve a migração de linfócitos T para o interior da córnea, revelando que, ainda aos 21 dias, a resposta imune local é inespecífica, permitindo concluir que a resposta imune específica na córnea é tardia e que a mesma é um sítio privilegiado para aplicação de enxertos com características imunológicas distintas, visto que não houve o estímulo para o desenvolvimento de uma resposta mais específica, em nenhum dos grupos avaliados, durante toda a execução do experimento.

1. INTRODUÇÃO

A córnea forma juntamente com a esclera o arcabouço do bulbo ocular, contribuindo para a definição de sua forma e proteção das estruturas intraoculares. A córnea está localizada na face anterior do olho e, diferentemente da esclera que é opaca, apresenta-se como a porção transparente da túnica fibrosa, responsável pela refração da luz que, após atravessar todos os meios de refringência intra-oculares, alcança a túnica nervosa, situada no fundo do olho. Devido à sua localização topográfica, a córnea é freqüentemente atingida por traumas, químicos ou físicos, representados, em humanos, principalmente pela ação de substâncias abrasivas como ácidos e bases fortes. Em veterinária, destaca-se a ação mecânica de agentes traumáticos externos ou aqueles causados por anormalidades palpebrais, ciliares e do aparelho lacrimal. Estes problemas podem levar ao aparecimento de abrasões, lacerações e ulcerações de tamanho e gravidade variados, que interferem na transparência da córnea, comprometendo assim a visão.

Alem das estruturas acima citadas, a conjuntiva também está presente na superfície ocular, funcionando como importante barreira anatômica de defesa do olho, sendo encontrada recobrando externamente a esclera e internamente as pálpebras, um anexo ocular responsável, entre outras coisas, pela distribuição da lágrima sobre a córnea durante os movimentos palpebrais. A conjuntiva, que representa a maior porção de mucosa exposta do organismo, ainda é responsável pela secreção de inúmeras substâncias que compõem o conjunto de mecanismos de defesa específicos e inespecíficos da superfície ocular. Dentre estes,

destacam-se células inflamatórias, imunoglobulinas e enzimas com ação antibacteriana. Estes mecanismos respondem de forma coordenada tanto pela defesa da superfície ocular contra microorganismos, como também pelas reações imunológicas que se manifestam nas ceratoplastias com emprego de materiais biológicos ou não, além de preceder os processos reparativos comuns na restauração das estruturas que compõem a superfície ocular.

Apoiados nestas evidências, pesquisadores ao longo de muitos anos vêm estudando diversos métodos de tratamento das afecções da superfície ocular, na tentativa de restaurar a transparência da córnea e diminuir as seqüelas sobre a acuidade visual, sem contribuir para o aumento da agressão local, mediante a ativação dos mecanismos intrínsecos de defesa. Dentre as técnicas já investigadas, merecem destaque os transplantes de córnea, suturas com os mais diversos materiais, recobrimentos palpebrais e da membrana nictitante, enxertos autógenos livres e pedunculados de conjuntiva, enxertos com membranas biológicas e aplicação de adesivos teciduais biológicos e sintéticos.

As membranas biológicas têm sido extensivamente pesquisadas, tendo se destacado nos últimos anos o uso da membrana amniótica, que apresenta características próprias, como ação antiinflamatória, antimicrobiana e uma boa capacidade de adesão sobre a ferida corneal. Os estudos sobre a aplicação da membrana amniótica utilizam, na sua grande maioria, tecidos homólogos, normalmente preservados em vários meios. Estes estudos têm indicado que este tipo de enxerto é menos imunogênico e pode ser aplicado como medida terapêutica complementar em várias patologias sediadas na superfície ocular, particularmente aquelas que afligem a córnea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANATOMOFISIOLOGIA DA SUPERFÍCIE OCULAR

Como partes integrantes do arcabouço do bulbo ocular, córnea e esclera formam, juntas, a túnica fibrosa do olho, dando-lhe forma e sustentação física. Estas duas estruturas unem-se no limbo, sendo que a córnea diferencia-se da esclera por se localizar na porção anterior do olho e ser naturalmente transparente, o que faz desta o maior meio de refringência dos raios luminosos incidentes na superfície ocular, com cerca de 80% de refração total (HELPER, 1989; DYCE et al., 1990; SCROGGS & KLINTWORTH, 1992; SCHOENAU & PIPPI, 1993).

A transparência da córnea, aliada ao seu alto poder de refração, é um atributo importante para a perfeita formação da imagem pelo aparelho visual, estando isto relacionado a algumas características que diferenciam a córnea de outros tecidos, entre os quais podemos destacar: ausência de vasos sangüíneos e linfáticos, ausência de pigmentos, tamanho e disposição das fibras de colágeno, fibras nervosas amielínicas, epitélio não queratinizado e um estado de relativa desidratação, denominado estado de deturgescência, que mantém o arranjo perfeito de suas camadas (SLATTER, 1990; GELATT, 1999).

O estudo histológico revela que a córnea é composta de 4 camadas microscopicamente distintas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Na espécie humana, cita-se a presença de uma camada, denominada membrana de Bowman, que se encontra localizada entre o epitélio e o estroma (MARTIN, 1980). No cão, a presença de uma

fina membrana de estroma subepitelial, composta basicamente de fibras de colágeno, é citada por Startup (1984), como um tecido especializado na sustentação do epitélio corneal. Alguns autores consideram ainda o filme lacrimal como uma camada das estruturas componentes da túnica fibrosa (SLATTER, 1990; SCROGGS & KLINTWORTH, 1992; SCHOENAU & PIPPI, 1993; GELATT, 1999).

A camada presente na superfície da córnea constitui-se de tecido epitelial do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, que tem continuidade com o epitélio conjuntival bulbar (STARTUP, 1984; SWANK & HOSGOOD, 1996).

Apesar da semelhança do epitélio que reveste a córnea com o epitélio conjuntival, ambos são distintos e apresentam características próprias, as quais estão diretamente relacionadas com as funções desempenhadas pelas estruturas que revestem. Como exemplo, cita-se a presença de células caliciformes no epitélio conjuntival, responsáveis pela produção de glicoproteínas que formam o componente mucoso da lágrima e exercem uma importância ímpar na proteção da superfície ocular. Observa-se, porém, que existe uma perfeita interação entre os epitélios que revestem a superfície do bulbo ocular e que a integridade de ambos é essencial para o perfeito funcionamento do olho como órgão da visão (PRABHASAWAT et al., 1997; MELLER & TSENG, 1999; KIM et al., 2000; CHOI & TSENG, 2001).

Logo abaixo da membrana basal epitelial encontra-se o estroma ou substância própria, que responde por cerca de 90% da espessura total da córnea. Nesta camada encontram-se ceratócitos, fibroblastos, colágeno tipo I e II, matriz extracelular mucoprotéica e glicosaminoglicanos, com a ocasional presença

de linfócitos, macrófagos e leucócitos, distribuídos por toda a estrutura do estroma. O colágeno compreende a maior porção do estroma, apresentando-se na forma de lamelas que se distribuem simetricamente em um padrão ortogonal, onde as fibras de uma lamela estão dispostas em ângulo reto em relação às lamelas adjacentes, contribuindo, desta forma, para a transparência da córnea (STARTUP, 1984; SWANK & HOSGOOD, 1996; GELATT, 1999).

A terceira camada, conhecida como membrana limitante posterior ou de Descemet é acelular, fina e transparente, caracterizando-se pela sua grande elasticidade e incapacidade de regeneração quando rompida. Esta camada é constituída de fibras colágenas dispostas em camadas finas e paralelas, que são produzidas continuamente sobre o endotélio e que vão engrossando, progressivamente, com a idade. Esta membrana basal, modificada do endotélio, tem continuidade com o limbo, encontrando-se recobrendo o trabeculado e o ângulo irido-corneal (STARTUP, 1984; SCHOENAU & PIPPI, 1993).

O endotélio, por sua vez, é formado por camada única de células, localizada posteriormente à membrana de Descemet, e que funciona como uma barreira entre a camada estromal, com características hidrofílicas, e o humor aquoso. Esta fina membrana, que tem continuidade com as células da superfície anterior da íris, caracteriza-se por uma alta atividade metabólica, que se comprova pela riqueza em mitocôndrias existentes no citoplasma de suas células. Além disto, participa ativamente do controle de entrada e saída de água das camadas mais internas da córnea, particularmente o estroma, a partir da contínua atividade de uma bomba de Na^+ e K^+ dependente de energia, que auxilia na manutenção do estado de deturgescência

contra um gradiente de pressão e concentração (SLATTER, 1990). As células mesoteliais que compõem o endotélio têm forma hexagonal, são achatadas e encontram-se intimamente conectadas umas às outras por meio de desmossomos e interdigitações (STARTUP, 1984; SLATTER, 1990; SCHOENAU & PIPPI, 1993; GELATT, 1999).

A película de lágrima pré-corneal ou filme lacrimal é, em grande parte, responsável pelas características peculiares à córnea, mantendo a sua superfície sempre lubrificada e brilhante. Além disto, exerce função importante na manutenção do grau de hidratação da córnea, produzindo hipertonicidade durante sua evaporação e, desta maneira, extraindo água por osmose. A lágrima é ainda responsável pela remoção de material estranho à córnea, condução de oxigênio, metabólitos, células inflamatórias, proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas, além de conter substâncias com propriedades antibacterianas inespecíficas como lisozima, β -lisina, lactoferrina, entre muitas outras (BALLOW & MENDELSON, 1980; MARTIM et al., 1988; SLATTER, 1990; SCHOENAU & PIPPI, 1993; HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001).

Já a conjuntiva se caracteriza por ser a maior porção de mucosa exposta do organismo e, juntamente com o sistema lacrimal, representa uma extensão do sistema imune de mucosa, sendo, portanto, rica em células do sistema de defesa. Histologicamente, a conjuntiva é formada por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, recoberto em toda a sua extensão por uma lâmina de tecido epitelial colunar que varia de estratificado para pseudoestratificado, o qual se assemelha ao epitélio corneal; porém, apresenta-se, na conjuntiva, mais espesso e com grânulos de melanina no citoplasma das células poliédricas.

A transição de epitélio estratificado para pseudoestratificado se dá na conjuntiva palpebral, próximo da região de descarga dos ductos das glândulas de meibômio. Quanto mais próximo desta região, maior a tendência do epitélio em se apresentar do tipo pseudoestratificado que, além das características histológicas, diferencia-se do estratificado por possuir um número surpreendentemente maior de células caliciformes, sugerindo que a produção de mucina se dá preferencialmente nesta região. Logo abaixo da membrana basal, a conjuntiva é composta por estroma rico em fibras colágenas, entre as quais transitam inúmeras células, destacando-se fibroblastos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células plasmáticas. A conjuntiva encontra-se dividida em 2 porções, denominadas respectivamente de conjuntiva palpebral e conjuntiva bulbar. Alguns autores, porém, reconhecem uma terceira porção da conjuntiva, localizada na junção entre as porções bulbar e conjuntival, região esta denominada de fórnice, que faz a transição entre as duas porções anteriores. No interior do tecido conjuntival, bem como em outras superfícies mucosas, está presente grande quantidade de linfócitos e células apresentadoras de antígeno, responsáveis pelas defesas da superfície ocular, como será discutido adiante (AXELROD & CHANDLER, 1978; CHANDLER & GILLETTE, 1983; FRANKLIN & REMUS, 1984; SLATTER, 1990; DUA et al., 1994; GELATT, 1999).

O limbo é outra região de importância ímpar para a superfície ocular. Até pouco tempo, o limbo era considerado apenas a região de transição entre os epitélios da córnea e da conjuntiva; porém, mais recentemente, tem sido reconhecido como o berçário da linhagem de células tronco, indispensáveis na

reparação dos defeitos da superfície da córnea. Ao que tudo indica, o limbo apresenta condições especiais para abrigar estas células, possuindo um microambiente favorável para a sua sobrevivência e diferenciação (DUA & AZUARA-BLANCO, 1999a; DUA & AZUARA-BLANCO, 2000; ANDERSON et al., 2001; MARINHO et al., 2003).

As células tronco do limbo são capazes de migrar sobre o defeito epitelial da córnea, sofrendo diferenciação e restaurando a área agredida com bastante rapidez e eficiência, quando encontram-se em número adequado (DUA & AZUARA-BLANCO, 2000; GRUETERICH et al., 2002a; STOIBER et al., 2002; DONISI et al., 2003; ESPANA et al., 2003; MARINHO et al., 2003).

2.2. ETIOPATOGENIA E MECANISMOS INTRÍNSECOS DE REPARAÇÃO DAS LESÕES DA CÓRNEA

A integridade de todas as camadas da córnea, bem como a presença de filme lacrimal em quantidade e qualidade adequada, responde por uma transparência corneal satisfatória, o que favorece suas funções fisiológicas. Além disto, o aparelho nervoso composto de receptores da dor no epitélio e de receptores de pressão no estroma, é de grande importância para a defesa da córnea. Este rico sistema, oriundo das ramificações dos nervos ciliares longos que partem do ramo oftálmico do nervo trigêmeo permite, de forma eficiente, a ativação do ramo aferente do reflexo corneal, mediante da estimulação dos axônios das terminações epiteliais (DYCE et al., 1990; SCHOENAU & PIPPI, 1993; GELATT, 1999; LU et al., 1999).

Com base nas suas características anatomofisiológicas associadas à localização topográfica, a córnea torna-se alvo fácil de vários agentes traumáticos, tanto intrínsecos quanto extrínsecos, que interferem de forma variável na transparência corneal, podendo, desta forma, comprometer a visão. Estes, na maior parte das vezes, apresentam-se sob a forma clínica de abrasões, úlceras, lacerações e perfurações. De todos os processos mórbidos, destaca-se a ceratite ulcerativa, que representa a principal causa de perda da visão no homem e no cão (STARTUP, 1984).

A etiologia das lesões da córnea é variada, sendo as mais comuns aquelas relacionadas a traumas externos, anormalidades palpebrais, ciliares e do aparelho lacrimal. São citadas ainda deficiências nutricionais, causas neurotróficas, endocrinopatias, ceratopatias senis, disfunções da membrana basal epitelial, lagofthalmia, queimaduras químicas e enfermidades imunomediadas (STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; CHAVKIN et al., 1990; KERN, 1990; SLATTER, 1990; CHIOU et al., 1998; AZUARA-BLANCO et al., 1999; LU et al., 1999; BRODOVSKY et al., 2000; CHEN et al., 2000; ANDERSON et al., 2001).

As infecções bacterianas, micóticas e virais, eventualmente podem estar implicadas como agravantes nas ceratites ulcerativas (STARTUP, 1984; HELPER, 1989). As infecções são mais comuns quando já existe uma perda de continuidade epitelial, pois, a superfície corneal intacta funciona como uma eficiente barreira contra a penetração dos microorganismos, principalmente as bactérias. Além disto, a ação mecânica das pálpebras, bem como a presença de substâncias antibacterianas na lágrima, além da competição com a flora bacteriana

autóctone, impede o desenvolvimento de microorganismos patogênicos em condições normais (KERN, 1990; GARRANA et al., 1999; JUMBLATT et al., 1999).

As feridas da córnea seguem um padrão de cicatrização bastante sistemático e organizado, diferenciando-se de todos os outros tecidos. Isto se deve principalmente à ausência de vasos sanguíneos e linfáticos na intimidade do tecido corneal (STARTUP, 1984; KERN, 1990; LAUS & ORIÁ, 1999).

O epitélio corneal tem uma enorme capacidade regenerativa. A sua reparação se dá pelo processo de reepitelização, o qual envolve mecanismos de migração e diferenciação celular, além da multiplicação por meio de mitoses. Após um período mínimo de duas horas, as células epiteliais localizadas nas bordas da ferida começam a se achatar e perdem suas junções contíguas, iniciando um processo de migração em direção ao centro da ferida. As células epiteliais que se localizam atrás das células migratórias iniciam sua divisão num período que varia de 72 a 96 horas (LAUS & ORIÁ, 1999). Esta etapa se resume numa tentativa de aumentar a população de células locais e corrigir o defeito deixado pelas outras que migraram. As células que estão recobrando a ferida iniciam então o processo de diferenciação, formando uma lâmina estática de células escamosas (STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; SLATTER, 1990; GELATT, 1999).

O tempo de reparação de uma ferida envolvendo o epitélio corneal varia de acordo com a extensão e profundidade da lesão. Na perda de substância superficial, o epitélio pode regenerar totalmente num período de duas semanas. Quando ocorre comprometimento da membrana basal

epitelial, a reepitelização pode demorar de algumas semanas a meses e, até que isto aconteça, o epitélio recentemente formado pode ser facilmente separado do estroma subjacente, dando origem aos defeitos epiteliais persistentes. Já as feridas superficiais podem se apresentar íntegras num período que varia de 24 A 72 horas após o estabelecimento da lesão (PFISTER, 1975; RAWE et al., 1992; LEE & TSENG, 1997; GAN et al., 1999; LAUS & ORIÁ, 1999; SRIDHAR et al., 2001).

Já o estroma, devido ao fato de se encontrar em um estado relativo de inatividade metabólica, cicatriza mais lentamente e por um processo mais complexo (NASISSE, 1985). Nas feridas não complicadas do estroma, a cicatrização ocorre sem o incremento de suprimento sangüíneo, ou seja, ocorre sem que haja a necessidade de infiltrado vascular. Nestes casos, leucócitos e ceratócitos proliferam e migram para a área afetada auxiliados pelo filme lacrimal e dos vasos presentes no limbo. Macrófagos removem os restos celulares e as fibrilas de colágeno perdidas são temporariamente substituídas por uma matriz de fibrina. Assim, durante as duas primeiras semanas após a lesão, os fibroblastos proliferam e rapidamente sintetizam colágeno e outros componentes da matriz extracelular (STARTUP, 1984; SWANK & HOSGOOD, 1996). Nas feridas infectadas ou com grande perda de estroma, observa-se a cicatrização com neoformação vascular, a exemplo do que acontece em outros tecidos. Nestes casos, a infiltração celular é mais extensa e com invasão da área por vasos sangüíneos originados do plexo límbico. Desta forma, o tecido de granulação se acumula e gera uma cicatriz mais densa que na forma anterior. Após a completa reparação da ferida, os vasos sangüíneos entram em colapso, mas não desaparecem,

permanecendo o endotélio vascular atrofiado na forma de “vasos fantasmas” (STARTUP, 1984). Em ambos os casos, as fibrilas de colágeno no estroma regenerado encontram-se desorganizadas, levando à perda da transparência corneal no local da cicatriz. Com o tempo, pode ocorrer uma diminuição na densidade da cicatriz e recuperação de parte da transparência perdida (NASISSE, 1985; SWANK & HOSGOOD, 1996; GAN et al., 1999).

Devido à sua elasticidade, quando agredida, a membrana de Descemet retrai, expondo uma pequena porção do estroma. A sua reparação se dá por meio do deslizamento das células endoteliais vizinhas, que recobrem a área perdida e formam uma nova membrana (STARTUP, 1984).

Ao contrário das células que compõem o epitélio e o estroma, as células endoteliais não se dividem ativamente na maioria das espécies. Para compensar este problema, possuem grande capacidade de ampliação e de migração para o local afetado, resultando num adelgaçamento e expansão das células restantes (STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; SWANK & HOSGOOD, 1996). Alguns estudos demonstram que a regeneração do endotélio da córnea varia de acordo com a espécie, podendo ser mediada por um ou dois mecanismos independentes: mitose e/ou ampliação e migração celular. Com base nos resultados obtidos por estes estudos, observou-se que o endotélio do cão pode regenerar mediante os dois mecanismos descritos (BEFANIS et al., 1981). Se a perda da camada de endotélio for muito extensa, impedindo o restabelecimento de uma camada única novamente funcional, tem-se como consequência uma área focal de edema corneal permanente (STARTUP, 1984; SWANK & HOSGOOD, 1996; BLAKE et al., 1997).

Mesmo possuindo mecanismos de defesa relativamente eficientes, a reparação de uma ferida corneal pode complicar. Isto acontece quando o processo normal de cicatrização é impedido pela persistência do agente primário ou pela invasão da ferida por microorganismos (NASISSE, 1985). Se os leucócitos polimorfonucleares que formam a primeira linha de defesa são incapazes de deter a multiplicação bacteriana, inicia-se uma destruição tecidual com liquefação do estroma, resultando na degradação enzimática das lamelas de colágeno. Apesar das enzimas colagenolíticas de origem bacteriana exercerem importante função na penetração de bactérias nas camadas profundas da córnea, enzimas de origem local são igualmente responsáveis pela destruição tecidual. A liberação de colagenase a partir do epitélio e do estroma lesionados, bem como a ação de proteases e peptidases, contribuem para favorecer a destruição do colágeno. Leucócitos polimorfonucleares contêm numerosas enzimas líticas, as quais também auxiliam na destruição tecidual, tornando o processo de liquefação autônomo, desde que iniciado, apesar do sucesso na erradicação dos microorganismos (STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; NASISSE & NELMS, 1992; GARRANA et al., 1999; Lu et al., 1999). Se não houver a interrupção do processo lítico, a destruição do estroma pode, rapidamente, atingir as camadas mais profundas da córnea e causar descemetocèle e eventual perfuração. Quando ocorre a perfuração, o humor aquoso tende a passar pelo defeito, normalmente carreando também a íris. A íris protusa pode unir-se à fibrina, formando um tampão na ferida corneal que bloqueia eficientemente o local da perfuração. Caso isto não ocorra, ou se o grau de contaminação for elevado, pode-se ter como consequência final um quadro de atrofia do bulbo ocular ou, se ocorre

contaminação, uma endoftalmite e provável perda do olho acometido (GONÇALVES, 1975; NASSISE, 1985; SLATTER, 1990; NASISSE & NELMS, 1992; GELATT, 1999).

Outro fator complicador sobre a cicatrização da córnea diz respeito às doenças que atingem o limbo, destruindo as células da linhagem tronco presentes neste local. Estas situações, conhecidas como deficiência de células tronco do limbo, aumentam a gravidade dos fenômenos que se manifestam comumente na córnea agredida, potencializando a fotofobia e aumentando o risco de perda da visão, como resultado da persistência dos defeitos epiteliais na ausência das células limbais. Nestas situações, as análises histopatológicas revelam uma progressiva invasão do epitélio conjuntival sobre a córnea, vascularização corneal superficial crônica, destruição da membrana basal corneal, além da identificação de infiltrado inflamatório crônico. Estes achados corroboram para a pequena resposta de reparação de córneas cuja região limbal foi destruída, quando submetidas aos métodos tradicionais de ceratoplastia. Isto pode ser comprovado quando apenas um olho demonstra a deficiência de células tronco, permitindo o transplante autólogo de células limbais do olho normal para o olho com deficiência. Nestes casos, o autotransplante de células tronco do limbo restaura as características do epitélio com bastante eficiência (MORGAN & MURRAY, 1996; DUA & AZUARA-BLANCO, 1999a; ANDERSON et al., 2001; KIM et al., 2001; GRUETERICH et al., 2002a; STOIBER et al., 2002; DONISI et al., 2003; ESPANA et al., 2003; MARINHO et al., 2003).

Devido ao rico suprimento nervoso local, todos os eventos acima relacionados à agressão da superfície ocular são manifestados na forma de sinais clínicos como dor, caracterizada

por fotofobia e blefarospasmo, lacrimejamento ativo, secreção ocular e uveíte reflexa (STARTUP, 1984). Outros sinais podem estar presentes, dependendo da intensidade da lesão, do grau de contaminação e do tipo de microorganismo presente; bem como, da capacidade de resposta do organismo. Entre estes, cita-se o aparecimento de secreções oculares, presença de um halo esbranquiçado ou acinzentado indicando a presença de células polimorfonucleares e proteólise local, além de edema corneal. A vascularização sangüínea e linfática e a pigmentação também se fazem presentes nas ceratites ulcerativas, sendo mais comuns nos processos crônicos ou nas perdas graves de substância da córnea, bem como nas deficiências das células tronco do limbo (GONÇALVES, 1975; STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; GRUETERICH et al., 2002b; DONISI et al., 2003; STOIBER et al., 2002; ESPANA et al., 2003; MARINHO et al., 2003).

A intensidade e a duração destas manifestações dependerá do curso clínico da doença que, por sua vez, é determinado pelo equilíbrio entre os fatores de agressão do agente patogênico e dos mecanismos de defesa do organismo (NASISSE, 1985; KERN, 1990).

Conhecendo-se as conseqüências das lesões da córnea sobre a acuidade visual, e com base nos seus mecanismos de reparação frente aos diversos processos mórbidos, torna-se necessária a rápida instituição de medidas terapêuticas eficazes. As condutas terapêuticas baseiam-se na eliminação do agente etiológico e no combate aos sinais clínicos, objetivando-se impedir a progressão da lesão para descemetocelose ou perfuração e permitir uma cicatrização adequada, com área mínima de opacidade no final do processo de reparação. O âmbito da

terapêutica das feridas sediadas na córnea abrange os procedimentos clínicos e as condutas cirúrgicas. A instituição de um ou de outro tratamento depende do diagnóstico correto da causa primária, bem como da identificação dos agentes secundários envolvidos, além do prognóstico do problema (STARTUP, 1984; KERN, 1990; SLATTER, 1990).

Nos casos onde a lesão inicial é responsável por grande perda tecidual ou quando os procedimentos clínicos são insuficientes para a obtenção de uma perfeita cicatrização, estão indicadas as condutas cirúrgicas. Os objetivos do tratamento cirúrgico incluem, entre outros, a prevenção da progressão da lesão para a perfuração, reparação de feridas perfuradas e proteção da superfície corneal durante o processo de cicatrização (KERN, 1990).

Porém, para que se possa entender os mecanismos intrínsecos e extrínsecos envolvidos na agressão e na reparação da córnea, faz-se necessário o pleno conhecimento dos mecanismos envolvidos na defesa da superfície ocular.

2.3. MECANISMOS DE DEFESA DA SUPERFÍCIE OCULAR

Em função da freqüente exposição das estruturas que compõem a superfície ocular ao meio ambiente, é possível encontrar, neste local, uma grande variedade de mecanismos protetores. Muitos destes são mecanismos não específicos, também conhecidos como paraimunológicos. Estes mecanismos não possuem memória imunológica, agindo independentemente da origem do agente agressor e são, na sua maioria, dependentes de propriedades anatômicas e fisiológicas de estruturas anexas

como pálpebras, filme lacrimal e a superfície mucosa conjuntival, além da ação de substâncias com atividade proteolítica (LEMP & BLACKMAN, 1981; GILLETTE et al., 1982; CHANDLER & GILLETTE, 1983; GACHON & LACAZETTE, 1998; CORDEIRO & KROLOW, 1999; HAYNES et al., 1999; ENKELA et al., 2001; CHIE, 2000).

Outros mecanismos são mais complexos e específicos, possuindo memória imunológica; sendo, portanto, dependentes da resposta imune propriamente dita. Com exceção do trato uveal e da conjuntiva, o olho não possui drenagem linfática. Antígenos da superfície ocular são processados por agregados linfóides especializados no interior da conjuntiva, mais especificamente no tecido linfóide associado à conjuntiva (CALT); ou nas células de Langerhans, encontradas no limbo (FRANKLIN & REMUS, 1984; EICHENBAUN et al., 1986; STOIBER et al., 2002).

Estudos recentes têm revelado que os antígenos presentes na superfície ocular são assimilados pelo epitélio conjuntival e posteriormente transportados no interior de células fagocíticas diretamente para a substância própria da conjuntiva, onde ocorre um processamento imunológico local. Após esta etapa, o antígeno capturado é encaminhado para um linfonodo regional, a partir de células mononucleares circulantes ou via canais linfáticos adjacentes. Linfócitos estimulados migram, então, para a conjuntiva (células T) e glândulas lacrimais (células B) onde participam das reações imunes mediadas por células e produção local de imunoglobulinas, respectivamente. Todas as cinco classes de imunoglobulinas são encontradas na superfície do estroma conjuntival, apesar da IgA parecer ser a única imunoglobulina que é ativamente secretada. As outras imunoglobulinas são cogitadas por ganhar acesso à superfície ocular quando a integridade da

superfície é comprometida por um processo inflamatório (GILLETTE et al., 1982; PEDERSEN et al., 1982; SULLIVAN & ALLANSMITH, 1984; PEPPARD & MONTGOMERY, 1987; BISTNER, 1994; DAY, 1996; GACHON & LACAZETTE, 1998; CORDEIRO & KROLOW, 1999; HAYNES et al., 1999; CHIE, 2000; ENKELA et al., 2001).

No paciente alérgico, níveis elevados de IgE são encontrados na glândula lacrimal e na lágrima. Reações alérgicas podem ainda ser direcionadas por mediadores liberados pelos mastócitos localizados no estroma conjuntival e em associação com vasos sanguíneos do limbo. Cada uma das quatro maiores reações imunológicas de hipersensibilidade ocorrem dentro do olho; porém, somente os tipos I e IV são importantes nas alergias oculares, o que comprova a importância dos sistemas específicos de defesa presentes na superfície do olho (LEMP & BLACKMAN, 1981; CHANDLER & GILLETTE, 1983; BISTNER, 1994; CORDEIRO & KROLOW, 1999; PLSKOVÁ et al., 2002; COOK et al., 2004).

2.3.1. MECANISMOS DE DEFESA NÃO ESPECÍFICOS

2.3.1.1. BARREIRAS ANATÔMICAS

a) Pálpebras

A primeira barreira anatômica de proteção da superfície ocular é representada pelas pálpebras. Estas estruturas, anexas ao bulbo ocular, encontram-se recobertas externamente pelo tecido dérmico e internamente pela mucosa conjuntival palpebral. As pálpebras possuem ainda inúmeras glândulas que são responsáveis pela produção de secreções, que auxiliam na

defesa da superfície ocular (SLATTER, 1990; EVANS, 1993; ANDERSON & ANDERSON, 1994; GELATT, 1999).

As pálpebras protegem o olho por meio da resposta mecânica de abrir e fechar, que age, simultaneamente, lubrificando a superfície ocular, mediante da dispersão do filme lacrimal, e removendo partículas estranhas presentes no local. Este reflexo é originado a partir do aparato nervoso da córnea, composto de receptores da dor no epitélio e de receptores de pressão no estroma, sendo de grande importância para a defesa da córnea. A partir da estimulação sensitiva da via aferente, representada pelo ramo oftálmico do V par de nervos cranianos, o impulso é transmitido para o núcleo do nervo facial, responsável pela inervação do músculo orbicular do olho que, quando estimulado por esta via eferente, responde mecanicamente por meio do fechamento da fissura palpebral (EVANS, 1993; ANDERSON & ANDERSON, 1994; GELATT, 1999).

b) Filme lacrimal

A película de lágrima pré-corneal ou filme lacrimal é, em grande parte, responsável pelas características peculiares à córnea, mantendo a sua superfície sempre lubrificada e brilhante. Além disto, exerce função importante na manutenção do grau de hidratação da córnea, produzindo hipertonicidade durante sua evaporação e, desta maneira, extraíndo água por osmose. A lágrima é ainda responsável pela remoção de material estranho à superfície ocular, condução de oxigênio, metabólitos, células inflamatórias e imunoglobulinas para a córnea, particularmente IgG, IgA e IgM, além de conter substâncias com propriedades

antibacterianas como lisozima, β -lisina e lactoferrina, entre outras (ROBERTS & ERICKSON, 1962; SELINGER et al, 1979; GILLETTE et al, 1981; KIM et al., 1999; YOU et al, 1999; KUNERT et al., 2002).

A lágrima é o principal componente que faz a interface entre o ar atmosférico e o epitélio da superfície ocular e, para o exercício de suas funções, possui complexos mecanismos inflamatórios e não inflamatórios, que agem, de forma coordenada, na defesa da superfície do olho. O filme lacrimal é composto de 5 fases distintas, sendo que, cada uma, desempenha um papel específico. A camada mais externa é produzida pelas glândulas tarsais e de meibômio, sendo composta principalmente de lipídios, o que lhe confere a função de controlar a evaporação da lágrima e evitar o seu derramamento excessivo pelas margens palpebrais (MARTIM et al., 1988; GACHON & LACAZETTE, 1998).

A porção média, que representa a fase aquosa da lágrima, destaca-se por ser a porção mais espessa do filme lacrimal, sendo originada, na maior parte das espécies domésticas, principalmente a partir da glândula lacrimal orbital e da glândula da terceira pálpebra. Estas glândulas secretam a porção da lágrima responsável pela condução de grande parte dos nutrientes necessários à córnea, incluindo, entre estes, sais inorgânicos, glicose, proteínas e oxigênio (SLATTER, 1990; GACHON & LACAZETTE, 1998; GELATT, 1999; DI PASCOALE et al., 2004).

A camada mais interna, produzida pelas células caliciformes intra-epiteliais da conjuntiva, possui características mucosas, sendo composta basicamente por mucina, uma mucoproteína que facilita a dispersão do filme lacrimal sobre o epitélio da córnea e garante a hidratação necessária para a córnea. Além disto, esta camada permite uma boa estabilidade

do filme lacrimal sobre o epitélio corneal, principalmente da fase aquosa. Isto se deve à característica anfipática da mucina, a qual lhe permite aderir tanto às microvilosidades hidrofóbicas presentes na porção superior do epitélio quanto à fase aquosa e hidrofílica da lágrima. Mais recentemente tem sido creditada maior importância a esta camada, composta por inúmeras glicoproteínas solúveis de alto peso molecular. Em outras superfícies mucosas que não a ocular, os componentes da mucina são reconhecidos por desempenhar inúmeras funções, entre as quais se destacam as atividades tampão e antioxidante, além da capacidade de inibir a adesão de bactérias sobre a superfície tecidual. JUMBLATT et al., (1999), foram uns dos pioneiros em demonstrar experimentalmente a importância estrutural e funcional das mucinas como componentes do filme pré-corneal, comprovando o que outros autores já haviam especulado (LEMP et al., 1970; FRIEDELAND et al., 1972; LEMP & BLACKMAN, 1981; EICHENBAUM et al., 1986; MARTIM et al., 1988; CORDEIRO & KROLOW, 1999; GARRANA et al., 1999).

A importância do filme lacrimal pode ser atestada pelas alterações encontradas em olhos que, por algum motivo, apresentam deficiência na produção lacrimal. Nestas situações, o olho se apresenta seco e inflamado, o que, em grande parte das vezes, impõem ao paciente uma situação desconfortável, caracterizada por uma condição denominada de ceratoconjuntivite seca, normalmente de curso crônico e irreversível, quando não se tem uma intervenção terapêutica adequada. O aspecto crônico da inflamação pode ser atestado a partir de achados como um grande infiltrado de linfócitos T e níveis elevados de citocinas, representadas principalmente pelo fator de

necrose tumoral alfa, interleucinas 1, 6, 8 e 10, além de uma maior expressão de marcadores celulares relacionados ao complexo maior de histocompatibilidade e moléculas de adesão celular. A cronicidade e a intensidade da resposta inflamatória na superfície ocular de olhos com deficiência lacrimal são, em grande parte, responsáveis diretos pela manifestação clínica da doença que, indiferentemente da causa, gera grande desconforto pela dor e fotofobia, além de limitar a visão em função da opacidade corneal que se forma. Ensaio imunológico e estudos microscópicos revelam que, além dos achados clínicos, alterações morfológicas e funcionais como a diminuição na população de células caliciformes e a alteração do epitélio pelo mecanismo de metaplasia escamosa, são comuns durante a evolução das doenças relacionadas ao decréscimo na produção e secreção do filme lacrimal (KUNERT et al., 2002; DI PASCOALE et al., 2004).

Com base no que foi comentado, e de acordo com o que a literatura ilustra, a estrutura físico-química e os mecanismos de funcionamento da lágrima contribuem, em seu conjunto, para que ela se torne o componente de defesa não específico mais importante da superfície ocular (ROBERTS & ERICKSON, 1962; JOSEPHSON & LOCKWOOD, 1964; LEMP et al., 1970; SLATTER, 1990; ENGLISH, 1999; JUMBLATT et al., 1999; HRDLICKOVÁ-CELA et al. 2001; KUNERT et al., 2002; DI PASCOALE et al., 2004).

c) Substâncias antibacterianas

A lágrima funciona como veículo para inúmeras substâncias que participam ativamente na defesa das estruturas que compõem a superfície ocular. Tanto os fatores envolvidos na resposta paraimunológica, quanto aqueles encontrados na resposta imunológica propriamente dita, utilizam o filme lacrimal como meio de transporte para atingir principalmente a córnea, que naturalmente é desprovida de sistema vascular linfático e sangüíneo. Dos fatores envolvidos na resposta não específica, destacam-se os seguintes conjugados protéicos isolados na lágrima de cães e gatos: Lisozima, β -lisina e lactoferrina (LEMP et al., 1970; GILLETTE et al., 1981; HAYNES et al., 1999; HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001).

A lisozima é a substância antibacteriana isolada em maior quantidade na lágrima humana em olhos normais, respondendo por 30% do total de proteínas isoladas por eletroforese, destacando-se por ser a proteína mais eletropositiva. Apesar de presente na lágrima de cães, a sua concentração é substancialmente mais baixa, respondendo por apenas 3% das proteínas totais isoladas pelo mesmo método (EICHENBAUM et al., 1987). A sua ação se dá mediante a quebra das ligações de açúcar, presentes nos polímeros de peptideoglicanos que formam a parede celular das bactérias. Esta ação é mais efetiva no combate às bactérias Gram-positivas, visto que as Gram-negativas possuem uma cápsula de lipopolissacarídeos externamente à parede celular, a qual impede a ação da lisozima sobre as ligações de açúcar. A origem desta substância ainda é uma incógnita, mas ensaios recentes, que utilizaram como método

científico a imunohistoquímica, têm demonstrado que o provável sítio de produção está localizado no epitélio acinar e ductal da glândula lacrimal (MACMASTER et al., 1967; GILLETTE et al., 1981; LEMP & BLACKMAN, 1981; CHANDLER & GILLETTE, 1983; EICHENBAUM et al., 1987; CORDEIRO E KROLOW, 1999; HAYNES et al., 1999).

A segunda substância isolada do filme lacrimal é conhecida por β -lisina, e se caracteriza por uma potente atividade antibacteriana, que supera a anteriormente descrita para a lisozima. O mecanismo de ação da β -lisina não é ainda inteiramente conhecido, sabendo-se apenas que ela age rompendo a membrana celular; sendo, portanto, efetiva contra uma coleção maior de patógenos, quando comparada mais uma vez como a lisozima. A β -lisina encontra-se presente tanto na circulação quanto na lágrima, como também a lisozima; porém, enquanto aquela é secretada na circulação a partir das plaquetas, suspeita-se que a presença da β -lisina no filme lacrimal se dê a partir de um processo de concentração plasmática ou secreção ativa (CHANDLER & GILLETTE, 1983; EICHENBAUM et al., 1987; CORDEIRO E KROLOW, 1999; HAYNES et al., 1999).

Completando o quadro de substâncias antibacterianas inespecíficas isoladas no filme lacrimal, a lactoferrina é caracterizada pela sua atividade protetora e reguladora sobre a resposta imune e por ser onipresente, sendo isolada em todas as secreções do corpo. Sua ação se dá principalmente por meio de uma ligação bastante estável com átomos de ferro, além do cobre e imunoglobulinas como IgA e IgG. O ferro é elemento importante no metabolismo bacteriano, e sua escassez controla o crescimento de microorganismos

oportunistas que, eventualmente, possam colonizar a superfície ocular. É ainda provável que a lactoferrina desempenhe uma função reguladora da resposta imune, ligando-se a fatores protéicos presentes na cascata do complemento. Isto tem sido sugerido a partir da observação de que a lágrima possui ação anti-complemento, e de que a lactoferrina, um dos componentes da lágrima, liga-se com relativa facilidade às proteínas. Esta regulação da resposta imune é importante no controle da resposta inflamatória da superfície ocular, sem que haja a perda da ação antibacteriana da lactoferrina (JOSEPHSON & LOCKWOOD, 1964; FRIEDLAND et al., 1972; VEERHUIS & KIJLSTRA, 1982; CHANDLER & GILLETTE, 1983; EICHENBAUM et al., 1987; WILLCOX et al., 1997; GACHON & LACAZETTE, 1998; CORDEIRO E KROLOW, 1999; HAYNES et al., 1999; HRDLICKOVÁ et al., 2001).

As características semelhantes entre a superfície mucosa ocular e a cobertura mucosa de outras regiões do organismo têm suscitado inúmeros estudos, que têm como objetivo identificar componentes presentes na lágrima que são comuns em outras superfícies mucosas. Seguindo estes princípios, GACHON & LACAZETTE (1998), estudaram, por métodos imunoenzimáticos, a composição da lágrima e de outras secreções como saliva, secreções nasal e brônquica. Os resultados permitiram comprovar que, além das proteínas já conhecidas, a lágrima possui também cistatina e lipocalina, substâncias com comprovada ação antibacteriana, já identificadas em outras secreções.

Observa-se também que, mais recentemente, com a introdução das técnicas imunoenzimáticas no estudo dos componentes do filme lacrimal, novas proteínas têm sido

identificadas. Muitas desempenham atividades relacionadas à defesa da superfície ocular; porém, outras alternam suas funções entre a defesa e a reparação dos defeitos provocados pela agressão das estruturas que compõem a superfície do olho. Como exemplo, podemos citar a galectin-3, recentemente isolada da superfície ocular em humanos, mas reconhecida por estar presente em todos os mamíferos. Esta proteína, cujo peso molecular varia, de acordo com a espécie em estudo, de 29.000 a 35.000 daltons, pode ser secretada e expressada na superfície de inúmeras células, entre as quais, destacam-se: monócitos, macrófagos, mastócitos e células epiteliais, incluindo aquelas presentes na superfície da córnea. A galectin-3 possui importante ação mitogênica, estimulando a proliferação das células presentes na superfície ocular, particularmente dos fibroblastos, além de funcionar como agente inibidor de apoptose e estimulador do crescimento celular. O que torna mais interessante estes achados, é o fato de que, apesar da galectin-3 ser normalmente secretada por vários tipos celulares, a mesma só foi isolada na secreção ocular de pacientes cuja superfície conjuntival se mostrava inflamada no momento da colheita, não tendo sido isolada de olhos assintomáticos. Outro achado revela que esta proteína, derivada das lecitinas, não está presente na glândula lacrimal. Isto permite especular que a superfície ocular possui mecanismos próprios de comunicação que ativam determinadas vias de proteção, quando os sistemas normais de defesa e reparação falham na sua função (HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001).

Deve-se imaginar que estas substâncias não agem isoladamente, estando presentes simultaneamente no filme

lacrimal, o que permite concluir que uma boa parte dos microorganismos invasores têm seu desenvolvimento inibido por estes agentes antibacterianos presentes em olhos saudáveis.

d) Microbiota autóctone

A constante e direta exposição da superfície ocular ao meio ambiente permite, de forma natural, que as estruturas externas ao bulbo passem a conviver com uma série de microorganismos, já a partir do nascimento. Alguns destes microorganismos tornam-se residentes, mantendo uma população relativamente constante e inócua, quando em condições normais. Além disto, esta população de bactérias autóctones desempenha uma importante missão no auxílio à defesa da superfície ocular, pois, como comentado, a porção externa do olho encontra-se permanentemente exposta a inúmeras partículas estranhas, presentes em suspensão no ar atmosférico. Entre estas partículas encontramos, além da microbiota autóctone, um enorme número de microorganismos oportunistas que possuem, em maior ou menor grau, uma característica patogênica sobre as estruturas oculares. Os microorganismos residentes, mais adaptados às condições da superfície ocular, competem com os microorganismos oportunistas, muitos destes patogênicos, pela mesma cadeia alimentar local, reduzindo drasticamente os nutrientes essenciais para o crescimento de microorganismos estranhos. Além disto, a microbiota autóctone tem a capacidade de secretar substâncias que interferem no ciclo celular dos agentes oportunistas (GASKIN, 1980; MOORE et al., 1988; RIBEIRO et

al., 1991; GERDING et al., 1993a; GERDING et al., 1993b; ALLAN & DART, 1995; SALISBURY et al., 1995).

e) Renovação do tecido epitelial conjuntival e corneal

Apesar das suas características lábeis, córnea e conjuntiva possuem mecanismos próprios de defesa, os quais estão diretamente relacionados à sua estrutura histológica. A porção mais externa, representada pelo epitélio, está constantemente em renovação, mediante a descamação das células superficiais e produção de novas células a partir da membrana basal adjacente. As células recém formadas pela camada basal vão sendo conduzidas para a superfície e, à medida que se tornam maduras, passam a ocupar o espaço deixado pelas células que se desprenderam e foram removidas, pela ação conjunta do filme lacrimal e dos movimentos palpebrais. Esta renovação se dá de forma cíclica, sendo completada a cada período de 5 a 7 dias. Este mecanismo é importante, pois, devido à constante exposição da superfície ocular ao meio ambiente, inúmeras partículas estranhas e microorganismos oportunistas aderem à sua superfície, sendo eliminados juntamente com as células epiteliais que se desprenderam da superfície ocular, o que diminui a probabilidade da formação de colônias de microorganismos neste local (CHANDLER & GILLETTE, 1983; EICHENBAUM et al., 1987).

Além da função de renovar o epitélio da córnea, a membrana basal adjacente funciona ainda como uma barreira física contra a penetração de agentes para o estroma. A membrana de Descemet também exerce função semelhante à

membrana basal sendo, porém, permeável às toxinas bacterianas (LEMP & BLACKMAN, 1981; SLATTER, 1990; GELATT, 1999).

2.3.2. MECANISMOS ESPECÍFICOS DE DEFESA

Além dos mecanismos inespecíficos, a superfície ocular conta também com um complexo sistema de defesa, comandado pelo sistema imunológico, que é capaz de reconhecer e combater antígenos específicos, criando um sistema de memória que mantém os tecidos oculares que possuem propriedades linfóides, em constante alerta contra partículas estranhas que comumente se apresentam à superfície ocular (ENGLISH, 1999).

Vale lembrar que o estímulo para o início da resposta do sistema imune pode ser originado a partir da presença de um microorganismo patógeno, bem como pela presença de um material estranho à superfície ocular, como membranas utilizadas na forma de enxerto na reconstrução da córnea, esclera e conjuntiva. Assim, apesar da resposta imune possuir um caráter mais específico de atuação, os primeiros mecanismos envolvidos no combate a um agente agressor obedecem a um comando central, que na sua essência, segue as regras básicas da inflamação. Podemos, desta forma, afirmar que a resposta inflamatória precede o desencadeamento dos mecanismos específicos de defesa (GILLETTE et al., 1982; CHANDLER & GILLETTE, 1983; EICHENBAUM et al., 1987; CORDEIRO E KROLOW, 1999; SUZUKI et al., 2002).

Nestas circunstâncias, a inflamação deve ser vista como uma resposta natural do organismo a uma agressão, que

acontece com o intuito de protegê-lo da injúria inicial e de providenciar outros mecanismos para a defesa, caso o agente agressor permaneça no local. Os fatores que determinam a severidade e a duração da inflamação da superfície ocular estão relacionados principalmente com a potência e o tempo de exposição ao estímulo, além da capacidade de resposta do hospedeiro. Deve-se levar também em consideração a região onde houve a agressão, visto que determinados tecidos, como a córnea, apresentam mecanismos próprios de reação ao estímulo agressor, quando comparados com outros tecidos que naturalmente são vascularizados (WILKIE, 1990; ENGLISH, 1999; SUZUKI et al., 2002).

Desta forma, se considerarmos que a superfície mucosa ocular, pela sua posição topográfica e pela grande extensão, representa o primeiro sítio para a entrada de patógenos no bulbo ocular, é natural imaginarmos que esta representa o principal sítio de defesa da superfície ocular. Por outro lado, a córnea é imunologicamente bastante diferente da conjuntiva, possuindo, em condições normais, uma pobre população de células imunes. Dos tipos mais encontrados na córnea, destacam-se as células dendríticas e macrófagos, presentes preferencialmente na periferia corneal, e os linfócitos T e B, presentes, em maior proporção, no centro (VANTRAPPEN et al., 1985; SCHEIFFARTH, 1987; WILKIE, 1990; ENGLISH, 1999).

A relativa deficiência de células do sistema imune e a ausência de suprimento sangüíneo na córnea intacta fazem com que este tecido tenha uma baixa taxa de resposta imunológica, o que o torna um sítio privilegiado para o transplante e aplicação de membranas biológicas. Porém, durante as injúrias

da córnea, esta passa a receber suprimento sangüíneo a partir do limbo e conseqüentemente tem sua imunogenicidade alterada pela presença de um maior número de células inflamatórias. Além disto, a lágrima também reflete a condição do olho inflamado e passa a responder também contra a presença dos agentes estranhos, o que pode comprometer a técnica de reparo utilizada (MCGILL et al., 1984; SULLIVAN & ALLANSMITH, 1984; PEPPARD & MONTGOMERY, 1987; MARTIM et al, 1988; FRANKLIN, 1989).

Os primeiros sinais de inflamação aparecem após a lesão celular, quando os fosfolipídios oriundos da membrana das células epiteliais agredidas dão origem a inúmeras substâncias vasoativas, as quais aumentam o fluxo de sangue para o local afetado e alteram a permeabilidade vascular. Na superfície ocular, esta etapa pode ser vista na forma de hiperemia e edema conjuntival, aumento da secreção ocular e dor (WILKIE, 1990).

Além das substâncias vasoativas, outros elementos solúveis estão presentes na lágrima, dentre os quais destacam-se as citocinas, que são glicoproteínas com capacidade mensageira e são responsáveis pela comunicação intercelular. As citocinas são substâncias pluripotenciais que agem de forma não enzimática, em concentrações infinitamente pequenas. Dentre as atividades desempenhadas pelas citocinas, particularmente na fase aguda da resposta inflamatória, podemos destacar a quimiotaxia ou atração de células com atividade fagocítica e outras com capacidade de processar e apresentar os antígenos presentes na superfície ocular. As citocinas participam ainda do controle da intensidade da ação do sistema imune celular e humoral e da resposta de reparação que se instala após a eliminação do agente agressor. Grande parte dos mecanismos fisiológicos envolvidos na

resposta imune é coordenada pelas citocinas, que agem de forma organizada e complexa por meio de uma grande reação em cascata, com a participação de várias proteínas com atividade mensageira (SOTOZONO, 2000; TEIXEIRA, 2000).

Além dos aspectos relacionados à função de substâncias mensageiras, tem sido sugerido que as citocinas, em situações específicas, dão início a um ciclo vicioso na superfície ocular, perpetuando o processo inflamatório e conseqüentemente a agressão sobre a córnea. No âmbito desta questão, discute-se a inter-relação entre o processo inflamatório da superfície ocular e a destruição dos tecidos inflamados (GARNELLI-PIPERNO et al., 1990; GARRANA et al., 1999; JUMBLATT et al., 1999; SMITH et al., 1999; SOTOZONO, 2000; SOLOMON et al., 2001).

Das substâncias envolvidas neste mecanismo, a matriz de metaloproteinases é, até o presente momento, a mais estudada. De acordo com a literatura, estas substâncias são enzimas capazes de clivar proteínas, atacando diretamente os componentes protéicos da matriz extracelular e da membrana basal. As metaloproteinases são secretadas como proenzimas e ativadas a partir de seriadas clivagens proteolíticas, em uma região da molécula denominada de terminal N, localizada no compartimento extracelular. Após esta etapa, as proenzimas sofrem mudanças na conformação bioquímica e alteração do peso molecular. Até o presente momento, já foram identificadas 20 proenzimas que compõem a família da matriz de metaloproteinases (SMITH et al., 1999; SOLOMON et al., 2001).

GARRANA et al., (1999), observaram que, em 13 amostras de fragmentos de córneas provenientes de pacientes com erosão epitelial recorrente, 12 revelaram a presença de um ou

mais tipos de metaloproteinases. Nos debris de olhos saudáveis, não foi identificada a presença destas substâncias. Como conclusão, os autores propuseram que a expressão da matriz de metaloproteinases é inteiramente regulada na superfície ocular, particularmente naquelas onde o epitélio é afetado por episódios recorrentes de erosão. Os achados permitiram evidenciar que estas enzimas estão localizadas preferencialmente no interior das células epiteliais basais, onde desempenham a função de degradação celular, principalmente no sistema de ancoragem do epitélio sobre a membrana basal, contribuindo para a recorrência dos defeitos do epitélio corneal.

Com o objetivo de comprovar esta hipótese, SOTOZONO (2000), propôs, por meio de metodologia científica, que a inflamação da córnea, comum em várias doenças, frequentemente leva à destruição tecidual, podendo contribuir para o desenvolvimento de úlceras e perfurações, mesmo quando o processo inflamatório inicial não se caracteriza pela perda de substância do tecido corneal. Utilizando um modelo experimental baseado na criação de feridas por queimadura, com agentes alquilantes, na córnea de ratos, o autor induziu precocemente a produção de interleucina 1 e 6. Estas citocinas são implicadas como importantes fatores pré-inflamatórios, contribuindo, tanto para a infiltração de células inflamatórias, quanto para a reparação dos tecidos localmente destruídos. Este experimento demonstrou que, em algumas situações, o processo inflamatório se perpetua, contribuindo para o agravamento da lesão inicial, e que esta ação patológica das citocinas se dá, principalmente, quando ocorre a indução para a produção de matriz de metaloproteinases. Os resultados, obtidos em duas etapas,

permitiram confirmar a atividade citotóxica das metaloproteinases, além de identificar que estas, por sua vez, são induzidas pelas citocinas e que, quando um inibidor de matriz de metaloproteinases é utilizado, a concentração de citocinas diminui, indicando que, desde que iniciado o processo inflamatório, o ciclo se torna auto-suficiente, contribuindo para a destruição tecidual, mesmo quando o fator agressor inicial já tenha sido eliminado. Como conclusão, a pesquisa aqui descrita demonstra que o processo inicial de agressão é seguido por uma segunda agressão, agora governada pela matriz de metaloproteinases, e perpetuada pelas citocinas. Concluiu-se que o controle da concentração das citocinas é importante no combate da inflamação da superfície ocular e na prevenção de uma segunda escala de agressão tecidual pelas metaloproteinases, responsável pelo agravamento das lesões iniciais e perpetuação da inflamação.

Se os mecanismos paraimunológicos e a resposta inflamatória local não são capazes de neutralizar a ação dos agentes agressores, a inflamação provavelmente se perpetuará, dando origem a uma resposta imunológica, mais complexa e específica. Apesar do sistema imunológico ser bastante dinâmico, executando todas as suas etapas simultaneamente, contra inúmeros antígenos, para um melhor entendimento destes processos, passaremos a descrevê-los em duas etapas, divididas didaticamente em resposta imune aferente e resposta imune eferente.

2.3.2.1. RESPOSTA IMUNE AFERENTE

As diferentes estruturas que compõem a superfície ocular respondem de forma variada ao estímulo antigênico. A córnea, que em condições normais não possui vasos sanguíneos e linfáticos, é considerada um sítio imunológico privilegiado, respondendo pobremente à presença de antígenos e, quando o faz, normalmente a resposta é lenta e fugaz, caracterizando-se por uma baixa atividade imunológica, tanto celular quanto humoral. É esta característica que faz da córnea um elemento altamente favorável ao transplante, quando comparada com outros tecidos (SMOLIN & O'CONNOR, 1981; GILLETTE et al., 1982; LIGHTMAN, 1989; BORDERIE et al., 1998; KARABATSAS et al., 1999; KUFFOVÁ et al., 1999; SCHAUMBERG et al., 1999; SOONG et al., 2000).

A conjuntiva é a única estrutura da superfície ocular com atividade linfóide comprovada, podendo esta ser comparada à atividade das membranas mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e genito-urinário, que são conhecidos como um tecido especializado, denominado sistema imune de mucosa (FRANKLIN & REMUS, 1984; VANTRAPPEN et al., 1985; LARKIN & CREE, 1997; YOSHIDA et al., 1997; ENGLISH, 1999).

O tecido conjuntival funciona como um centro linfóide primário, sendo responsável pelo processamento dos antígenos presentes na superfície ocular. A conjuntiva possui, na sua intimidade, um tecido altamente especializado, conhecido como tecido linfóide associado à conjuntiva (CALT), que em medicina veterinária é conhecido como tecido linfóide da membrana nictitante, o qual é recoberto por um tecido epitelial caracterizado pela presença de inúmeras microvilosidades, as

quais facilitam a assimilação dos antígenos. A partir do momento que os antígenos provenientes da superfície ocular são incorporados pelo tecido linfóide local, entram em ação as células de Langerhans. Estas células, de origem mesenquimal, são encontradas preferencialmente na região do limbo, e desempenham papel semelhante ao dos macrófagos no processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T circulantes, ou diretamente ao linfonodo regional, promovendo a sensibilização do hospedeiro ao antígeno em questão (LEMP & BLACKMAN, 1981; GILLETTE et al., 1982; CHANDLER & GILLETTE, 1983; FRANKLIN & REMUS, 1984; YOSHIDA et al., 1997; CORDEIRO & KROLOW, 1999).

A origem do comando para o desenvolvimento de uma resposta imune específica na superfície ocular é a apresentação de um antígeno a um linfócito T CD4⁺, também conhecido como linfócito T auxiliar, por meio de uma célula apresentadora de antígeno. As características da resposta imune são, em grande parte, determinadas pelas interações moleculares entre estes dois tipos celulares. Outras células não pertencentes ao sistema imunológico, representadas em geral por células epiteliais, fibrócitos e células endoteliais provenientes de capilares sanguíneos, também participam deste processo. Estes tipos celulares normalmente sofrem as primeiras agressões, respondendo à lesão celular mediante a liberação de fosfolipídios de membrana que, a partir deste instante, darão origem a fatores pró-inflamatórios, representados por moléculas como as prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas e inúmeras citocinas, entre as quais se destacam o fator de necrose tumoral alfa e alguns tipos de interferon. As atividades

desempenhadas por estes fatores dão origem a uma inflamação local, caracterizada pela vasodilatação, expressão de moléculas específicas de adesão e liberação de fatores quimiotáticos (PEIFFER, 1980; FRANKLIN & REMUS, 1984; VANTRAPPEN et al., 1985; LARKIN & CREE, 1997; ENGLISH, 1999).

Os eventos anteriormente citados tendem a amplificar a resposta imune local, a partir do recrutamento de neutrófilos, monócitos, células dendríticas e células do tipo assassinas naturais (NK). Paralelamente ao aumento da circulação destas células no local da agressão, as células dendríticas são ativadas, passando a executar com mais eficiência a função de capturar e apresentar antígenos. Neste momento, a resposta de defesa da superfície ocular tem uma dupla finalidade, seja ela a de dar início à destruição inespecífica do agente agressor ou de originar uma resposta imune específica. Inicialmente, como parte da resposta inespecífica, verifica-se a liberação de inúmeras substâncias com atividade tóxica principalmente sobre os microorganismos. Estas substâncias são liberadas principalmente pelos neutrófilos e macrófagos locais, e são representadas por moléculas de oxigênio reativo, óxido nítrico e enzimas com atividade proteolítica. Ao mesmo tempo em que estas substâncias são liberadas, ocorre a fagocitose das estruturas estranhas à superfície ocular. Estes eventos são seguidos mais uma vez da liberação de substâncias quimiotáticas que intensificam a ativação e o recrutamento de células apresentadoras de antígeno. As principais citocinas envolvidas neste mecanismo de sensibilização e amplificação do sistema de defesa da superfície ocular são: interferon alfa, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 e interleucina 2. As células apresentadoras de antígeno, então

ativadas por estas substâncias, passam a capturar os antígenos e transportá-los para o linfonodo regional, onde ocorrerá a apresentação dos mesmos aos linfócitos T CD4+ (CORDEIRO E KROLOW, 1999; ENGLISH, 1999).

A cadeia de eventos acima descrita representa uma rotina para a superfície ocular, pois, a todo instante, moléculas diferentes entram em contato com a conjuntiva e a córnea, exigindo esforços sem precedentes para a sua eliminação. Porém, nem toda molécula lesa a estrutura celular local, pois, se assim fosse, a superfície ocular permaneceria insistentemente inflamada. Desta forma, entende-se que boa parte do material estranho depositado na superfície ocular ou é eliminado pelos mecanismos anatômicos ou sofre processamento e destruição local, sem alarde desnecessário ao sistema específico de defesa. Cabe também comentar que a resposta inflamatória é o ponto de partida de toda a seqüência de eventos que se segue à agressão celular local, e é pré-requisito fundamental para o desenvolvimento da resposta imunológica específica, a qual, a partir de agora, iremos comentar.

2.3.2.2 RESPOSTA IMUNE EFERENTE

Por meio do mecanismo citado acima, ocorre o desencadeamento da atividade imune que dará origem, a partir da sensibilização do hospedeiro, ao desenvolvimento da resposta eferente. Este complexo sistema de resposta imunológica que envolve a estimulação de linfócitos T e B, produção de citocinas e anticorpos, além da ativação da cascata do complemento, gera

ainda bastante discussão e tem suscitado inúmeros debates acerca do seu real mecanismo.

Toda a cascata de eventos que resultará na resposta imune específica tem início com a ativação dos linfócitos T auxiliares (T CD4+), na intimidade do linfonodo regional, a partir do momento em que ocorre a apresentação do antígeno. As células dendríticas têm a capacidade de expressar pequenos peptídeos do agente que se deseja combater, junto às moléculas que compõem o complexo maior de histocompatibilidade de classe II. Além dos antígenos do agente agressor, as células apresentadoras expressam também moléculas provenientes das células destruídas durante a agressão da superfície ocular, além de moléculas acessórias, que facilitam o reconhecimento do antígeno pelas células T CD4+, presentes no linfonodo regional. A ativação das células T auxiliares (CD4+) se dá em duas etapas. Na primeira, ocorre a ligação do receptor de células T, presente na superfície da célula T auxiliar, aos antígenos expressados pelo complexo maior de histocompatibilidade do tipo II, presentes nas células apresentadoras de antígeno. A esta etapa se segue a ligação de moléculas necessárias à estimulação das células T auxiliares, presentes em sua superfície, aos cofatores específicos para a sua estimulação, expressos na superfície das células apresentadoras de antígeno. Este primeiro contato entre os dois tipos celulares desencadeia uma série de alterações intracelulares nas células T auxiliares, que resultam nas seguintes atividades: início de proliferação celular por mitose, liberação de imunomediadores, representados pelas citocinas, dentre as quais, nesta etapa, se destaca a interleucina 2, capaz de estimular a proliferação e diferenciação das células T auxiliares em tipo 1 (T1) e tipo 2 (T2).

Após esta etapa, as células T auxiliares, já ativadas e diferenciadas, deixam o linfonodo regional em direção à corrente circulatória, ao mesmo tempo em que outros linfócitos T auxiliares presentes no linfonodo regional darão origem à mesma cascata de eventos, enquanto persistir a ativação das células apresentadoras de antígeno pelo antígeno em questão. A este evento, se segue a expansão do clone de células T auxiliares específicas contra os antígenos apresentados, e a diferenciação dos linfócitos. Finalmente, para que estas células sejam efetivas no combate ao antígeno, é necessário que sejam orientadas, o que se dá pela ação de uma série de citocinas liberadas pelas células T auxiliares, previamente ativadas. Os linfócitos T auxiliares ativados possuem subpopulações celulares, capazes de produzir citocinas específicas, cada uma responsável por uma etapa da resposta imunológica (PEIFFER, 1980; FRANKLIN & REMUS, 1984; WILKIE, 1990; ENGLISH, 1999).

Os primeiros linfócitos ativados, denominados células T0, já produzem uma pequena quantidade de interleucina 2 (IL 2), necessária para o início da proliferação e diferenciação das subpopulações de linfócitos. A partir deste momento, os linfócitos T0 dão origem a linfócitos T auxiliares T1, que produzem predominantemente IL 2 e interferon gama e linfócitos T auxiliares T2, responsáveis pela liberação de interleucina 4, 5 e 6. As citocinas desempenham múltiplas ações durante a resposta imune; porém, pode-se destacar as atividades desempenhadas pela IL 2 e pelo interferon gama, imprescindíveis no desenvolvimento da imunidade mediada por células, como a ação dos linfócitos T citotóxicos e ativação de macrófagos e células assassinas naturais (NK). Já, as citocinas produzidas pelos clones de células T2, são responsáveis

pela ativação dos linfócitos B e produção de imunoglobulinas. Os subtipos de linfócitos T auxiliares acima citados ainda apresentam mecanismos de regulação cruzada, onde as citocinas liberadas por uma subpopulação regulam a proliferação da outra (LARKIN & CREE, 1997; SOTOZONO, 2000; HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001; ENGLISH, 1999).

É ainda reconhecido que as subpopulações de linfócitos T auxiliares não são originadas em quantidades iguais e, que ambas não estão presentes em todas as respostas imunes da superfície ocular, estando isto condicionado ao tipo de antígeno presente na superfície das células apresentadoras de antígenos, grau e tipo de resposta inflamatória e de aspectos imunogenéticos inerentes ao organismo hospedeiro (SOTOZONO, 2000; HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001; ENGLISH, 1999).

Uma outra população de linfócitos T tem sido implicada na amplificação e regulação da resposta imune ocular. São as células T CD8+, ativadas também mediante a ligação de receptores de células T, presentes em sua superfície. Porém, enquanto nas células T CD4+, a ligação é feita com moléculas MHC de classe II, presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno, os receptores das células T CD8+ se ligam às moléculas MHC de classe I, presentes na superfície de qualquer célula nucleada. Aparentemente, o início de atividade das células T CD8+ ocorre preferencialmente nos linfonodos, o que permite inferir que, além da ligação com moléculas MHC de classe I, outros fatores locais, como a interleucina 2, são importantes para o processo de ativação destes linfócitos. Classicamente, estas células desempenham uma função citotóxica, sendo, portanto, reconhecidas como linfócitos T citotóxicos (TC), que agem

destruindo as células que expressam os antígenos para os quais elas foram ativadas. Outro subtipo de linfócito T CD8+ tem sido implicado em um mecanismo de regulação da resposta imune, além de participar da geração de resposta de defesa específica no mecanismo imunológico, presente na câmara anterior do bulbo ocular. Como acontece com as células T CD4+, os linfócitos T CD8+ também são divididos em subpopulações, de acordo com o tipo de citocina liberada. Assim, de maneira semelhante às células T auxiliares do tipo 2, as células citotóxicas tipo 2 também produzem substâncias que auxiliam a ativação dos linfócitos B, contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune humoral (ENGLISH, 1999).

O desenvolvimento dos eventos acima citados ainda não atingiu o objetivo desejado, qual seja o de emergir à superfície ocular e neutralizar o agente agressor. Para que isto aconteça, os linfócitos ativados abandonam o linfonodo regional em direção aos vasos sanguíneos, os quais transportam as células ativadas em direção ao local da resposta inflamatória. Nestas condições, os linfócitos ativados apresentam moléculas de adesão em sua superfície, que são capazes de reconhecer substâncias ligantes presentes na superfície das células endoteliais de áreas inflamadas. Após o estabelecimento desta ligação, os linfócitos deixam a luz do vaso em direção à área agredida, por meio de um mecanismo conhecido como diapedese leucocitária. Já fora do vaso, os linfócitos migram em direção ao local da inflamação, guiados por gradientes de concentração de substâncias quimiotáticas presentes nos locais inflamados, onde desempenham suas funções na defesa da superfície ocular (PEIFFER, 1980; EICHENBAUM et al., 1987; WILKIE, 1990; ENGLISH, 1999).

Esta complexidade no reconhecimento dos antígenos, paralelamente à identificação de várias outras moléculas acessórias, presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno, é que torna o sistema imunológico seguro, impedindo a atuação do sistema de defesa contra o próprio organismo.

a) Resposta imune humoral

As imunoglobulinas formam a frente de combate durante a resposta imune humoral, diferenciando-se de outros sistemas pela sua especificidade antigênica. Da mesma forma que em outras secreções corpóreas, a lágrima exerce papel importante na mediação desta resposta, visto ser ela o veículo destas proteínas. A produção dos anticorpos ocorre após a sensibilização do hospedeiro pelo antígeno e ativação dos linfócitos T, que organizam o recrutamento de linfócitos B para o local desejado, onde estes se transformam em plasmócitos e dão início à produção das imunoglobulinas. Este mecanismo é governado pelas células T ativadas, que passam a produzir duas classes de citocinas: fator de crescimento e fator de diferenciação das células B. A primeira citocina estimula a multiplicação dos linfócitos, enquanto que a segunda promove sua diferenciação em plasmócitos, dando início à produção de imunoglobulinas. Todas as classes de imunoglobulinas podem ser isoladas da superfície ocular, apesar de que, somente a imunoglobulina do tipo A (Ig A), é encontrada em condições normais, ao passo que as outras classes são mais facilmente identificadas quando existe algum estímulo antigênico como, por exemplo, durante processos

inflamatórios da superfície ocular. Esta facilidade para o isolamento da IgA pode ser explicado pelo fato desta ser a única imunoglobulina ativamente secretada na lágrima, apesar do consenso de que todas as imunoglobulinas são encontradas no local. A IgA é a imunoglobulina que predomina em todas as secreções corpóreas, não sendo diferente na lágrima. A IgA das secreções difere daquela encontrada no sangue, visto que enquanto estas são vistas na forma de monômeros, aquelas são encontradas formando pares (dímeros), ligadas entre si por um peptídeo denominado de cadeia J. Além deste peptídeo, a combinação das duas moléculas de IgA, que originam a IgA secretória (IgAs), apresenta ainda uma outra peça conectada, denominada de peça secretória, que funciona como um marcador para este tipo especial de IgA, além de conferir à IgAs uma maior resistência à ação de enzimas proteolíticas, encontradas em grande quantidade na lágrima. Desta forma, a IgAs tem uma meia vida maior nas secreções, o que faz desta imunoglobulina o principal mecanismo específico de defesa da superfície ocular normal (THOMPSON & OLSON, 1950; WITMER, 1955; ALLANSMITH & HUTCHISON, 1967; VAERMAN & HEREMANS, 1969; ALLANSMITH et al., 1973; MONTGOMERY et al., 1983; SULLIVAN & ALLANSMITH, 1984; PEPPARD & MONTGOMERY, 1987; HALL & PRIBNOW, 1989; CHENG et al., 1996; HALLER, et al., 1997).

Com exceção do cristalino, todas as outras estruturas oculares são povoadas por imunoglobulinas, existindo diferenças apenas em relação ao tipo e quantidade de anticorpos disponíveis em cada estrutura (SMOLIN & O'CONNOR, 1981; LIGHTMAN, 1989).

Apesar de suas características peculiares, a córnea é o tecido ocular que concentra a maior quantidade de IgG, sendo, porém, pobre em IgM, podendo este fato ser explicado pelo alto peso molecular desta última, quando comparado com o baixo peso da IgG. Em condições normais, a maior concentração de imunoglobulina da córnea é vista no estroma, aonde estas chegam por difusão. Nos processos reparativos da córnea acompanhados de neovascularização, ocorre uma maior facilidade para o acesso das imunoglobulinas à córnea. Nas lesões superficiais, estas tendem a invadir o leito da ferida auxiliadas pelo filme lacrimal, contribuindo, portanto, na defesa do local (MARTIM et al., 1988; MISSOTTEN, 1994).

Na conjuntiva, enquanto o epitélio é desprovido de anticorpos, nas camadas mais profundas são encontradas as cinco classes de imunoglobulinas, que estão localizadas principalmente nas porções superficiais da lâmina própria, decrescendo em concentração à medida que se aprofundam as camadas (PEPPARD & MONTGOMERY, 1987).

b) Resposta imune celular

Paralelamente à ação dos anticorpos, um outro tipo de resposta imune auxilia na defesa da superfície ocular. É a resposta celular mediada pelos linfócitos T que, sabe-se hoje, são divididos em três grupos específicos: linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e linfócitos T supressores.

A resposta celular tem início com a apresentação do antígeno por uma célula de Langerhan, ou pelo tecido linfóide associado à conjuntiva, a um linfócito T auxiliar circulante, que se

torna ativado e dirige-se para o linfonodo regional, local onde, num período de aproximadamente três dias, este se transforma em linfoblasto. Após esta diferenciação, o linfoblasto ativado prolifera por mais quatro dias e migra para o tecido conjuntivo, localizando-se na substância própria da conjuntiva. As células T citotóxicas são responsáveis pela destruição de células que apresentam uma antigenicidade estranha ao organismo, sendo, portanto, citotóxica para os microorganismos e também para células do próprio hospedeiro que tiveram seus marcadores de superfície alterados pela ação de algum agente viral ou mesmo por processos neoplásicos. As células T citotóxicas são ativadas pelos linfócitos T auxiliares. Ao contrário dos linfócitos T citotóxicos, as células T supressoras têm a função de regular a resposta imune celular e humoral, a partir do controle da proliferação e migração das populações de linfócitos T e B. Paralelamente a este processo, os linfócitos sensibilizados, e os macrófagos que apresentam antígenos ligados à superfície, começam a secretar algumas proteínas solúveis, denominadas citocinas, que participam da indução, expressão e regulação da resposta imune celular. Estas substâncias promovem a comunicação entre as células envolvidas nesta resposta, ampliando o processo e recrutando células para efetuar a defesa da superfície ocular. Além disto, as citocinas regulam a intensidade do processo inflamatório e comunicam às células envolvidas no processo o fim da resposta, quando do êxito do combate (LIGHTMAN, 1989; WILLCOX et al., 1997; YOSHIDA et al., 1997; CORDEIRO & KROLOW, 1999; ENKELA et al., 2001).

As citocinas envolvidas neste processo são inúmeras, cada uma com uma atividade específica, sendo as principais as seguintes:

❶ Interleucina 1: é produzida por macrófagos que funcionam como células apresentadoras de antígeno e se ligam à célula T auxiliar. Agem promovendo a diferenciação dos linfócitos T em linfoblastos e a ativação dos linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos. Além disto, participa do mecanismo da febre e da produção da interleucina 2.

❷ Interleucina 2: é secretada pelos linfócitos T ativados, promovendo a estimulação e manutenção do crescimento das células T.

❸ Fator inibidor da migração de macrófagos: tem como função estimular a concentração de macrófagos na área afetada, sendo produzido por ambas as populações de linfócitos T e B.

❹ Fator ativador de macrófagos: tem como função estimular a atividade fagocitária dos macrófagos e sua transformação em células tipo assassinas naturais (NK).

❺ Fatores quimiotáticos: são citocinas menos específicas, que agem promovendo a migração de inúmeros tipos de células inflamatórias para o local afetado, entre estas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e macrófagos.

❻ Interferon: este grupo de citocinas tem a responsabilidade de regular a resposta imune, inibindo a maturação de novos macrófagos e regulando a atividade das células T citotóxicas. É produzido pelos linfócitos T e B ativados.

A cinética da resposta imune celular corneal foi estudada mediante a injeção intracorneal de citocinas. Observou-se que, 6 horas após a aplicação, a região do limbo, principal sítio de interação entre os componentes envolvidos na resposta imune celular, já se encontrava povoada por células mononucleares,

representadas principalmente por macrófagos e linfócitos. Neste mesmo intervalo, o estudo microscópico da córnea revelou uma população aumentada de células polimorfonucleares, principalmente na região do estroma, representadas por neutrófilos e eosinófilos. A ausência de linfócitos e macrófagos no interior do estroma pode estar relacionada a uma pequena capacidade de mobilidade destes tipos celulares, quando comparados com os neutrófilos e eosinófilos e também ao fato das citocinas utilizadas terem desenvolvido uma ação quimiotática mais eficiente sobre este segundo grupo de células (HALL & PRIBNOW, 1989).

c) Complemento

Além da ação conjunta dos anticorpos e das células inflamatórias na resposta imune da superfície ocular, outro mecanismo, também envolvido na defesa da superfície ocular, é o sistema complemento. Este sistema, relacionado tanto com a resposta imune celular quanto humoral, é formado por um grupo de nove proteínas séricas termolábeis que, quando combinadas com alguns fatores específicos, são capazes de causar lise celular. A ativação deste sistema pode ser realizada por duas vias já conhecidas: a via clássica, que se dá a partir da interação de complexos antígeno-anticorpo (IgG e IgM) e a via alternativa, que possui vários ativadores, entre eles microorganismos, endotoxinas bacterianas, enzimas provenientes de tecidos lesados e IgA secretória (IgAs). As três maiores atividades biológicas do complemento podem ser resumidas a partir da ativação de fagócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos; lise de células alvo e opsonização de microorganismos e complexos imunes, de modo

que eles possam ser reconhecidos pelas células fagocitárias que expressam receptores para complemento (ROBERTS & ERICKSON, 1962; JOSEPHSON & LOCKWOOD, 1964; MONDINO et al., 1980; MONDINO et al., 1982; VEERHUIS & KIJLSTRA, 1982; EICHENBAUM et al., 1987; WILLCOX et al., 1997; CORDEIRO & KROLOW, 1999).

As proteínas que compõem o sistema complemento são reconhecidas pela letra C, a qual vem seguida de um algarismo arábico que identifica cada elemento da cadeia. Assim, podemos identificar os seguintes componentes do complemento: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 e C9. A maior parte destas proteínas encontra-se naturalmente inativada, exigido uma clivagem proteolítica para ser ativada. A forma enzimaticamente ativa é representada por uma barra acima do seu símbolo original. Além da sua ação sobre a célula, mediante a lise da membrana citoplasmática, o sistema complemento participa das principais vias efetoras da inflamação. As porções C3a e C5a, liberadas durante a ativação do complemento, atuam na potencialização do aumento da permeabilidade vascular, além de agirem estimulando a liberação de histamina pelos mastócitos. Alguns componentes possuem ainda ação quimiotática, como o componente C5a, que promove a atração de células polimorfonucleares e o componente C3b que, enquanto ligado ao complexo antígeno anticorpo, estimula a aderência de macrófagos ao complexo (MONDINO et al., 1980; MONDINO et al., 1982; VEERHUIS & KIJLSTRA, 1982; EICHENBAUM et al., 1987; WILLCOX et al., 1997; CORDEIRO & KROLOW, 1999).

A córnea possui os elementos necessários para a ativação de ambas as vias do sistema de complemento; porém, o componente C1q, a primeira fração a se ligar ao complexo

antígeno-anticorpo e responsável pelo reconhecimento e desencadeamento da reação, é encontrada "in vivo" apenas na periferia da córnea. Isto pode ser explicado pelo fato de que esta fração possui um alto peso molecular, sendo o maior elemento da cascata do complemento. Pode-se concluir, com isto, que a via clássica do complemento só ocorre na periferia da córnea, e que a principal fonte de fatores do complemento seria o aparato vascular limbal; porém, estudos "in vitro" têm demonstrado que os fibroblastos do estroma são capazes de sintetizar o fator C1, sugerindo que esta poderia ser uma fonte alternativa de fatores do complemento (MONDINO et al., 1980; MONDINO et al., 1982; ENGLISH, 1999).

2.4. MÉTODOS DE REPARAÇÃO DA CÓRNEA

Os procedimentos clínicos disponíveis para o tratamento das úlceras de córnea são inúmeros, e a escolha dos métodos a serem aplicados muda de acordo com a lesão de cada paciente. Os métodos variam desde uma simples limpeza, tanto da córnea quanto do saco conjuntival, e terapia antimicrobiana, quando se faz presente uma contaminação, até o uso de substâncias mais específicas, como substitutos da lágrima e fatores de crescimento (NASISSE, 1985; LANCE et al., 1988; MARQUES et al., 1989; KIRSCHNER et al., 1990; SHARIF & CASEY, 1993; BESSANT & DART, 1994; SWANK & HOSGOOD, 1996; DELLAERT et al., 1997; ZHANG & AKHTAR, 1997; GATON et al., 1998; WU et al., 1998; SHAH et al., 2001). Orienta-se ainda para o uso de agentes que auxiliam no combate à dor e de drogas anticolagenolíticas (NASISSE, 1985). O uso de agentes hiperosmóticos locais, bem

como a aplicação de vitaminas A, C e E, beta-irradiação, proteínas, enzimas e gamaglobulinas, além de lubrificantes oculares e cauterização química, são citados amplamente na literatura (STARTUP, 1984; HELPER, 1989; SLATTER, 1990; BURDON & McDONNELL, 1995; JOHANSEN et al., 1998).

O recobrimento do olho com tampões externos às pálpebras também são mencionados; porém, num estudo pioneiro em humanos, ARBOUR et al., (1997), observaram que este procedimento resultou em menor taxa de oxigenação da superfície epitelial da córnea, redução da renovação do filme lacrimal, diminuição da taxa de eliminação dos produtos do metabolismo corneal, além de impedir o controle do crescimento bacteriano. Neste estudo, não se observou diferença estatística no grau de cicatrização entre olhos com úlceras superficiais tratados apenas com medicamentos e aqueles que receberam o tampão além do tratamento convencional com colírios antibióticos.

Nos casos onde a lesão inicial é responsável por grande perda tecidual, ou quando os procedimentos clínicos são insuficientes para a obtenção de uma perfeita cicatrização, estão indicadas as condutas cirúrgicas. Os objetivos do tratamento cirúrgico incluem, entre outras medidas, a prevenção da progressão da lesão para a perfuração, reparação de feridas perfuradas e proteção da superfície corneal durante o processo de cicatrização (VAN EE et al., 1986; MARQUES et al., 1989; KERN, 1990; BESSANT & DART, 1994).

Vários métodos de reparação cirúrgica das lesões da córnea têm sido estudados ao longo de mais de 200 anos de pesquisas e, já no século XVIII, QUENGSY, em 1789, citado por GUIMARÃES (1979), propôs a utilização de placas de vidro em

substituição às córneas lesadas. Porém, o pioneiro na utilização deste método foi Nussbaum, em 1856, citado por Paton (1955). A partir desta época, inúmeros trabalhos neste sentido têm sido desenvolvidos (LANCE et al., 1988; HILL, 1995; NEWMAN et al., 1995; HUDDE et al., 1999).

Os transplantes de córnea são, há muitos anos, amplamente estudados, tendo sido VON HIPPEL, em 1888, citado por JENSEN (1963), o primeiro cientista a realizar um transplante de córnea. Apesar do insucesso inicial na execução do procedimento, devido às limitações técnicas, este estudo contribuiu significativamente para o desenvolvimento de novas metodologias. Seguindo os mesmos objetivos, as técnicas de transplante de córneas autógenas, alógenas e xenógenas foram aperfeiçoadas e executadas com sucesso por diversos pesquisadores, traduzindo-se em um grande avanço nas cirurgias da córnea, com benefício direto na restauração da transparência da córnea em diversas doenças da superfície ocular (PATON, 1955; BERNIS, 1961; JENSEN, 1963; DIETZ et al., 1975; BURDON & McDONNELL, 1995; HILL, 1995; ARMITAGE & EASTY, 1997; HUDDE et al., 1999). As indicações para a realização de transplantes penetrantes de córnea são inúmeras, e merecem destaque na espécie humana, na qual, em muitos olhos, é restabelecida a visão mediante a execução desta técnica, ao mesmo tempo moderna e centenária (COSTER, 1994; NEWMAN et al., 1995; TANURE et al., 1997; NISCHIWASKI-DANTAS et al., 1998; LAM et al., 1998; OFFORD et al., 1999).

Apesar da córnea ser considerada um órgão privilegiado para a transplantação, com alto poder de aceitação pelo receptor, mais recentemente, estudos sobre transplantes

penetrantes de córnea têm se voltado para a descrição de fenômenos imunológicos relacionados à inflamação e à rejeição, além de primar pelo desenvolvimento de métodos de cultura de tecidos que permitam o crescimento de córneas em laboratório e diminuam a ocorrência de complicações, como a vascularização dos tecidos transplantados e a conseqüente rejeição (LOPATIN et al., 1989; COSTER, 1994; ARMITAGE & EASTY, 1997; LAM et al., 1998; MATSUDA et al., 1999; PLSKOVÁ et al., 2002).

Apesar dos resultados animadores nos estudos voltados para a medicina veterinária, e da aplicação rotineira dos transplantes de córnea em humanos, poucas são as citações sobre o uso terapêutico de enxerto ou transplante de córnea em animais, devido à ausência de bancos de córnea, o que contribui para limitar o uso desta técnica em nosso meio (BRIGHTMAN et al., 1989; HACKER, 1991; MORALES, 1994).

Na tentativa de suplantar estes problemas, técnicas utilizando outras estruturas oculares têm sido estudadas. Merecem destaque as tarsorrafias e os recobrimentos com a membrana nictitante. Ambos são de fácil aplicação, e têm como objetivo principal oferecer proteção mecânica ao tecido lesado (HAKANSON & MERIDETH, 1987). Porém, estas técnicas limitam a exposição do olho para a aplicação tópica de medicamentos e, a menos que a sutura seja ancorada no bulbo ocular, os movimentos do olho podem provocar uma fricção indesejável entre a córnea e o tecido de recobrimento (STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; KERN, 1990; BARROS et al., 1995). Sendo assim, suas indicações são voltadas para as úlceras não complicadas, para a proteção da córnea em exoftalmias, lagoftalmias e ceratites

neurotróficas (STARTUP, 1984; MARQUES et al., 1989; MORALES, 1994; MATSUDA et al., 1999).

Quando se tem lesões ulceradas que atingem dimensões maiores que dois terços de profundidade da córnea, são recomendadas cirurgias reconstrutivas. A conjuntiva, por se apresentar como uma membrana mucosa intensamente vascularizada e, somando-se a isto, possuir mecanismos de defesa específicos e inespecíficos, com uma ótima proximidade da córnea, tem se prestado muito bem para o recobrimento das feridas da córnea (HENDERSON, 1951; NASISSE, 1985; HAKANSON & MERIDETH, 1987; NASISSE & NELMS, 1992; MORALES, 1994).

SCHOLER em 1899, citado por HENDERSON (1951), utilizou pela primeira vez um retalho de conjuntiva para a reparação de úlcera de córnea. Desde então, as características do tecido conjuntival têm sido exploradas como método de reparação da córnea.

MORALES (1994), após estudar, comparativamente, os enxertos autógenos livres e pediculados de conjuntiva no reparo de ceratectomias experimentais em cães, observou melhor evolução clínica para os enxertos pediculados. Aos 60 dias de pós-operatório, os enxertos livres apresentaram-se mais transparentes, com as córneas mais claras. Em ambos os casos, houve substituição do epitélio conjuntival implantado, por epitélio corneal normal, a partir de 30 dias após a realização da cirurgia. Os resultados finais permitiram concluir que os implantes pedunculados conferiram subsídios tróficos mais favoráveis à córnea receptora, ao passo que os enxertos livres promoveram maior transparência, sendo mais eficientes nas lesões axiais.

Como alternativa para a aplicação de enxertos, inúmeras membranas biológicas têm sido estudadas para reparação das feridas corneais.

Em busca de novos materiais para a reparação de perdas parciais de estroma corneal, Laus (1994), investigou a escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), como substituto de lamelas de córnea em ceratectomias superficiais. Os resultados finais demonstraram que o material proposto é exeqüível na restauração de porções lesadas da córnea.

Em 1994, Barros utilizou membrana amniótica xenóloga em ceratectomias penetrantes em cães, com resultados animadores.

Seguindo os mesmos princípios, Barros et al., (1995), utilizaram pericárdio eqüino conservado em glicerina em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. Os resultados demonstraram uma pressão intra-ocular baixa nos primeiros dias de pós-operatório, com aumento gradativo até os valores normais. Ao exame morfológico, identificou-se infiltrado inflamatório agudo nas fases iniciais, com subsequente epitelização. O acompanhamento mostrou os olhos em boas condições após 18 meses de cirurgia.

No ano seguinte, em 1996, Andrade testou a cápsula renal eqüina, conservada em glicerina, na ceratoplastia experimental em cães. Ao avaliar os resultados, obtidos após a aplicação do implante em 14 animais, o autor concluiu que o procedimento foi substancial para a indicação da membrana testada nas ceratoplastias, visto que as córneas evoluíram seguindo os padrões clássicos da reparação cicatricial.

Em estudo mais recente, GALERA (1999) testou a túnica vaginal a fresco na ceratoplastia lamelar experimental em cães. Dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a aplicação de enxerto com túnica vaginal a fresco revelou ser eficaz e de baixo custo na realização de ceratoplastias lamelares em cães. Os resultados demonstraram que o procedimento é coincidente com os padrões clássicos da reparação do tecido corneal, com evidência final de poucas seqüelas cicatriciais.

Outras técnicas, como o uso de lentes terapêuticas e adesivos cirúrgicos, são também citados na literatura, sem no entanto, revelarem grande interesse na medicina veterinária. Como fatores que inviabilizam o uso das lentes de contato, citam-se o alto custo de produção e a diversidade de convexidade e dimensões do diâmetro da córnea. Isto já não acontece com os adesivos, que apresentam uma grande variedade de situações onde podem ser aplicados com baixo custo (WENDLER et al., 1983; STARTUP, 1984; KERN, 1990; SAMPAIO, 1999; SU & LIN, 2000; DUCHESNE & GALAND, 2001).

O uso de adesivos em tecidos vivos já vem sendo experimentado por diversos pesquisadores há muitos anos, com vistas ao desenvolvimento de um método que possibilite uma síntese rápida e eficiente dos tecidos, com formação mínima de reação granulomatosa no local da ferida. Inicialmente, esperava-se que a substância proporcionasse efeito hemostático, firme aderência dos tecidos e ausência de efeitos colaterais, como por exemplo, ação carcinogênica (MORANDINI & ORTIZ, 1992).

TARLOV (1940) e YOUNG (1944), ambos citados por MORANDINI & ORTIZ (1992), deram o impulso inicial ao desenvolvimento de substâncias adesivas para uso em tecidos

vivos. Estes autores utilizaram respectivamente plasma enriquecido com fibrinogênio heterólogo e homólogo na confecção de colas biológicas. Estes estudos são lembrados pela iniciativa histórica, pois, os resultados não comprovaram as expectativas iniciais.

A partir desta época, o desenvolvimento e aplicação de adesivos sintéticos passaram a despertar o interesse de pesquisadores e inúmeras substâncias, como a mistura de caseína e álcool polivinil, derivados da borracha, policrilatos, resina de epóxi e resina de formaldeído foram testadas (MORANDINI & ORTIZ, 1992; SAMPAIO, 1999; DUCHESNE & GALAND, 2001).

2.5. UTILIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA REPARAÇÃO DE DEFEITOS DA SUPERFÍCIE OCULAR

A primeira referência à utilização de membranas fetais em cirurgias reparadoras data de 1910, quando, o então estudante William Thornton, aluno do último ano do curso de medicina do Hospital John Hopkins, sugeriu aos seus professores a utilização das membranas fetais como tratamento coadjuvante na cicatrização de feridas. A partir desta data, a membrana amniótica tem se mostrado útil como método auxiliar na reparação de diversos tecidos, inclusive o olho (MATTHEWS et al., 1982; DUA & AZUARA-BLANCO, 1999b; CHOI & TSENG, 2001; DEKARIS et al., 2001; CREMONINI, 2003).

Já o primeiro relato da utilização de membranas fetais em oftalmologia data de 1940, quando Rotth, citado por TI & TSENG, 2002, idealizou um modelo de reconstrução da conjuntiva a partir da aplicação de um enxerto composto de âmnio e córion a fresco. A dificuldade de se obter a membrana a fresco, no exato

momento da cirurgia, e as reações imunológicas causadas pelo perfil deste enxerto multilamelar, estimularam a procura por métodos que preservassem as características desejáveis das membranas fetais e diminuíssem as reações inflamatórias locais.

Mais recentemente, com a utilização dos conhecimentos adquiridos ao longo de anos de pesquisa, o transplante de membrana amniótica tem sido indicado como método coadjuvante no tratamento de inúmeras doenças oculares, principalmente aquelas relacionadas à superfície do olho, como a reconstrução de defeitos da córnea e esclera, no tratamento dos defeitos epiteliais recorrentes ou refratários a outros tipos de tratamento e nas lesões da córnea associadas à deficiência de células limbais, que normalmente ocorrem nas lesões por queimadura da superfície ocular. Existem também relatos da utilização da membrana amniótica no tratamento do pterígio e da síndrome de Steven-Johnson em humanos, e no tratamento do seqüestro corneal dos felinos, além da correção de cicatrizes corneais secundárias a outras patologias inflamatórias crônicas da superfície ocular, além da utilização na reconstrução de defeitos secundários à ressecção de tumores (BARROS et al., 1998; BLEGGI-TORRES et al., 1998; AZUARA-BLANCO et al., 1999; BECKER et al., 1999; CHEN et al., 2000; GABLER & LOHMANN, 2000; DEKARIS et al., 2001; GEORDIADIS & TERZIDOU, 2001; HEILIGENHAUS et al., 2001; PARIDAENS et al., 2001; ESPANA et al., 2002; GRIS et al., 2002; KAVINSKI et al., 2002; CREMONINI, 2003; OH et al., 2003; NISHIDA et al., 2004).

Para completar o espectro de situações onde esta versátil e eficiente membrana fetal pode ser utilizada, pesquisadores têm empreendido estudos na tentativa de permitir

que a membrana amniótica possa ser aplicada como matriz de suporte no cultivo de células tronco do limbo, objetivando a sua proliferação e expansão em condições de laboratório e no tratamento das complicações de cirurgias para correção do glaucoma (PRABHASAWAT et al., 1997; CHIOU et al., 1998; DUA & AZUARA-BLANCO, 1999a; BUDENZ et al., 2000; MA et al., 2000; TSAI et al., 2000; ANDERSON et al., 2001; GOMES et al., 2001; SIPPEL & FOSTER, 2001; CHAN et al., 2002; TI & TSENG, 2002; TOUHAMI et al., 2002; MARINHO et al., 2003).

O conhecimento das propriedades das membranas fetais na reparação tecidual exige, antes de qualquer coisa, o perfeito conhecimento de sua estrutura e características histológicas, além da terminologia aplicada às mesmas. Para o seu perfeito desenvolvimento, o feto precisa ao mesmo tempo estar livre e protegido, além de encontrar condições térmicas, químicas e osmóticas relativamente constantes. Para tanto, o feto encontra-se, enquanto na fase intra-uterina, recoberto por tecidos extra embrionários, representados pela placenta, que é uma estrutura que se forma pela aposição de membranas fetais e tecidos maternos, tendo como principais funções promover o intercâmbio fisiológico e manter a homeostasia entre a mãe e o feto. Além disto, os tecidos que compõem a placenta possuem propriedades endócrinas e funcionam como uma barreira contra a mistura do sangue materno com o sangue fetal (MATTHEWS et al., 1982; NODEN & LAHUNTA, 1990; BLEGGI-TORRES et al., 1998; BECKER et al., 1999; GABLER & LOHMANN, 2000; TOUHAMI et al., 2002).

Histologicamente, a membrana amniótica é composta de 3 camadas distintas, representadas por uma camada epitelial colunar simples, responsável pela secreção do

líquido amniótico, uma espessa membrana basal e um estroma naturalmente avascular. O estroma é rico em fibras de colágeno dos tipos IV e V. Estas características, associadas às propriedades antiinflamatórias e antibacterianas da membrana amniótica, têm estimulado a utilização deste anexo fetal na reconstrução da superfície ocular em diversas situações (MATTHEWS et al., 1982; SHIMMURA et al, 2001).

DUA & AZUARA-BLANCO, 1999b, em estudo clínico que utilizou o transplante de membrana amniótica no tratamento de lesões persistentes do epitélio da córnea destacaram, entre outras propriedades já conhecidas da membrana amniótica, que os efeitos antiadesivo, bacteriostático, protetor, analgésico e epitelizante contribuíram, de forma efetiva, no tratamento de lesões epiteliais secundárias a abscessos, radiação e queimaduras, além de auxiliar no tratamento das cicatrizes corneais secundárias ao simbléfaro. Já os defeitos corneais profundos, causados por agentes químicos e perfurações traumáticas recentes, não obtiveram os mesmos resultados, sugerindo que a ação tectônica da membrana amniótica como enxerto não produziu os resultados esperados.

A promoção da cicatrização da córnea e a inibição da atividade de proteinases em feridas agudas da córnea, causadas por queimaduras por álcalis, foi observada por Kim et al. (2000), apoiados em uma metodologia que utilizou, como modelo experimental, a aplicação de discos de nitrocelulose de 6,0 mm de diâmetro, embebidos em solução de NaOH 1N e mantidos sobre a região central da córnea de coelhos por um período de 30 segundos. Imediatamente após a aplicação do álcali, procedeu-se à enxertia de um retalho de membrana amniótica ancorado na

região perilimbal. Os resultados contribuíram para entender o mecanismo de inibição de proteinases e conseqüentemente os insultos inflamatórios comuns nestas feridas. Foram identificados 5 inibidores de proteinase, representados pela antiqumiotripsina, macroglobulina, antitripsina, antiplasmina e inibidor de tripsina inter- α_1 . Observou-se também que os efeitos benéficos da aplicação da membrana amniótica sobre a cicatrização das feridas corneais não se limitaram apenas à ação dos inibidores de proteases, mas também ao sinergismo entre estes fatores com outros componentes presentes na membrana, como a fibronectina, laminina, colágeno, integrina, hialuronato e fatores de crescimento. Atestou-se, ainda, que a membrana amniótica impede a infiltração de polimorfonucleares no estroma da córnea, inibindo a contínua degradação do colágeno que ocorre nas lesões causadas por substâncias abrasivas, o que contribui para acelerar o processo de reparação e diminuir as seqüelas sobre a acuidade visual. Concluiu-se que a membrana basal da membrana amniótica possui a capacidade de bloquear a ação inflamatória do insulto causado sobre a córnea, além de permitir a cicatrização mediante a inibição dos danos causados pelos agentes proteolíticos, presentes neste tipo de ferida.

O efeito antiinflamatório da membrana amniótica pôde ser comprovado, ainda, em estudos que utilizaram o transplante da membrana fetal no tratamento de distúrbios da superfície ocular, caracterizados pela persistência de defeitos no epitélio corneal. Estas lesões, comuns quando se tem o desenvolvimento anormal da membrana basal epitelial, podem estar presentes como seqüelas de inúmeras patologias traumáticas ou infecciosas (KIM & TSENG, 1995b; LEE & TSENG, 1997; BECKER et

al., 1999; MELLER et al., 2000; MEJÍA et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; AVILA et al., 2001; GRIS et al., 2002; UETA et al., 2002).

Com base nestas evidências, SHIMMURA et al., 2001, estudaram os efeitos do transplante de membrana amniótica em 20 olhos com defeito epitelial persistente da córnea. Após a concordância dos pacientes com os procedimentos, os mesmos foram submetidos ao tratamento, que consistiu na aplicação da membrana amniótica criopreservada sobre a córnea, e fixação do enxerto, na esclera, com o auxílio do fio absorvível sintético multifilamentado poligalactina 910, de espessura 10-0. Todas as membranas foram retiradas e armazenadas para posterior avaliação, após uma semana de aplicação. Os resultados permitiram concluir que a membrana amniótica agiu como suporte para o desenvolvimento do epitélio da córnea, além de funcionar com uma importante barreira que limitou a infiltração de células inflamatórias na superfície da córnea lesionada, o que corroborou para atestar sua virtuosa capacidade de adesão. Mesmo concordando que o epitélio da membrana amniótica possui fatores de crescimento que auxiliam na cicatrização da córnea, pelo fato das membranas utilizadas neste experimento terem sido preservadas em nitrogênio líquido por várias semanas, os autores não conseguiram demonstrar suas presenças. Porém, os resultados permitiram concluir que a utilização da membrana amniótica homóloga, como um enxerto temporário, aplicado sobre a superfície ocular, contribuiu beneficamente promovendo a reepitelização da córnea e seqüestrando os linfócitos presentes no infiltrado inflamatório. Este infiltrado está normalmente presente na intimidade da córnea, principalmente nos episódios de inflamação crônica da superfície ocular acompanhada de defeitos epiteliais,

o que, de forma direta, indica que a membrana amniótica contribui para reduzir a inflamação local.

Outros estudos têm demonstrado que a presença de componentes da membrana basal e de vários inibidores de proteinases na membrana amniótica contribui para interromper os insultos causados na superfície ocular pela resposta inflamatória local, além de permitir uma rápida cicatrização e inibição na formação de simbléfaro. Estas evidências são apoiadas em achados clínicos que atestam que a membrana amniótica funciona como uma barreira contra a entrada de polimorfonucleares no estroma de córneas que sofreram a perda do epitélio (KIM et al., 2000; MEJÍA et al., 2000; MELLER et al., 2000; STOIBER et al., 2002).

A aceleração do processo de cicatrização nos defeitos persistentes do epitélio da córnea, em função da deficiência de membrana basal, foi comprovada por SHIGETO et al., (2001) que, ao tratarem problemas desta natureza em 20 pacientes humanos, observaram que a aplicação de membrana amniótica homóloga resultou numa epitelização rápida, com prevenção da fibrose, adesão e infecção. Os autores concluíram ainda que a falta de antígenos de histocompatibilidade na membrana amniótica tornam-na um excelente substrato; pois, apresenta pouca ou nenhuma resposta imunológica. Estes resultados são coincidentes com outros estudos, nos quais também foi observada uma baixa resposta inflamatória na superfície de olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica homóloga, além da redução no índice de apoptose nas córneas que receberam o enxerto (MELLER & TSENG, 1999; PARK & TSENG,

2000; ADDS et al., 2001; HELIGENHAUS et al., 2001; WANG et al., 2001).

As propriedades antibacterianas também foram testadas em laboratório e, KJAERGAARD et al., (2001), num estudo pioneiro, testaram estas propriedades "in vitro", a partir da utilização de membrana coriônica e amniótica obtida de forma estéril, de 13 mulheres submetidas à cesariana eletiva. O material foi exposto a culturas bacterianas em ágar-sangue, tendo sido observado um halo de inibição no crescimento dos microorganismos expostos às membranas testadas, permitindo concluir que as membranas fetais possuem efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano.

Em humanos, inúmeras pesquisas têm demonstrado os benefícios da utilização da membrana amniótica no tratamento de diversas lesões da córnea. Histologicamente, a membrana amniótica consiste de uma camada epitelial simples, uma membrana basal e uma camada estromal avascular. Estudos recentes tem demonstrado que a camada intermediária, representada pela membrana basal, possui a propriedade de promover o crescimento e a diferenciação epitelial, além de reforçar a adesão das células epiteliais basais sobre o estroma e diminuir a apoptose, ao mesmo tempo em que suprime a formação de cicatrizes exuberantes, por meio de complexos mecanismos antiinflamatórios (MELLER & TSENG, 1999; PARK & TSENG, 2000; ADDS et al., 2001; HANADA et al., 2001; HELIGENHAUS et al., 2001; SHIMMURA et al., 2001; WANG et al., 2001; TI & TSENG, 2002).

A utilização da membrana amniótica homóloga já foi testada no tratamento do pterígio primário e recidivante por

diversos autores. A doença, que se manifesta como uma desordem degenerativa da superfície ocular e tem distribuição mundial, com maior prevalência nos trópicos, caracteriza-se pela formação de tecido fibrovascular em excesso sobre a córnea, limitando a visão e condicionando o portador a um constante desconforto no local. Inúmeros benefícios têm sido apontados com a utilização do transplante de membrana amniótica no tratamento desta doença, entre os quais podemos citar a baixa reação inflamatória na superfície ocular e a possibilidade da terapia conjunta com outras técnicas, como o transplante de células limbais e utilização de substâncias antimetabólicas. Os resultados têm demonstrado que o transplante de membrana amniótica é um procedimento efetivo do ponto de vista clínico e cosmético, representando uma modalidade de tratamento eficiente, tanto para o pterígio primário quanto para o recidivante, podendo seus efeitos ser comparados com aqueles obtidos pelos enxertos de conjuntiva (SHIMAZAKI et al., 1998; TSENG & PRABHSAWAT, 1998; MA et al., 2000; TSAI et al., 2000; CHAN et al., 2002).

Além disto, a utilização da membrana acima citada torna-se bastante útil quando existe um grande defeito conjuntival, o qual pode impedir a aproximação das margens cirúrgicas do pterígio primário, ou quando se deseja preservar a conjuntiva bulbar para uma futura cirurgia de glaucoma, o que faz do transplante de membrana amniótica a primeira opção de tratamento nestas situações (PRABHASAWAT et al., 1997; SHIMAZAKI et al., 1998; MA et al., 2000; CHAN et al., 2002; TI & TSENG, 2002).

HUI-KANG et al., (2000), compararam a utilização do transplante de membrana amniótica com estudos retrospectivos

que empregaram a aplicação de mitomicina-c e enxerto conjuntival autógeno no tratamento do pterígio. Os resultados, obtidos a partir do tratamento de 80 olhos de 71 pacientes, inicialmente com a excisão cirúrgica do pterígio e posterior transplante de membrana amniótica homóloga, conservada em uma mistura de partes iguais de meio modificado de Dulbecco e meio de Eagle, permitiram concluir que o transplante de membrana amniótica homóloga foi efetivo no tratamento do pterígio recidivante, quando comparado com os métodos tradicionais, não apresentando complicações e se mostrando útil naqueles pacientes que apresentavam grande área de conjuntivalização da córnea, ou que aguardavam cirurgia fistulizante para tratamento do glaucoma.

O transplante de membrana amniótica tem sido testado também na reconstrução da superfície ocular em olhos acometidos por pênfigo cicatricial e na Síndrome de Steven-Johnson. Nestas situações, frequentemente as lesões oculares evoluem para a cegueira, o que tem exigido o desenvolvimento de técnicas que amenizem a manifestação clínica e restaurem a transparência da córnea. A combinação do transplante de células limbais, associado ao transplante de membrana amniótica e tarsorrafia, tem demonstrado eficácia na reconstrução de grande parte dos olhos tratados (TSUBOTA et al., 1996; TSENG & PRABHASAWAT, 1998; HONAVAR et al., 2000).

Segundo BARABINO & ROLANDO, (2003), o pênfigo cicatricial é uma doença bastante severa, de origem desconhecida, que leva rapidamente à cegueira. A doença se manifesta como uma inflamação crônica que contribui para o espessamento da conjuntiva, diminuição da profundidade do

fórnice conjuntival, aparecimento de simbléfaro e, nos estágios mais avançados, deficiência na produção do filme lacrimal em ambos os olhos. A análise microscópica de material obtido dos olhos de pacientes portadores da doença demonstra que os achados clínicos se caracterizam por inúmeras alterações da superfície ocular, como diminuição da população de células caliciformes e metaplasia escamosa no epitélio conjuntival. Ainda, segundo os autores, o tratamento conservador, baseado na aplicação de drogas antiinflamatórias e imunossupressoras, contribui para reduzir a inflamação; porém, em longo prazo, apresentam efeitos colaterais amplamente conhecidos. Os resultados apresentados sugerem que a utilização da membrana amniótica é efetiva na reconstrução da superfície ocular em olhos com pênfigo cicatricial, contribuindo para a redução do desconforto. Observou-se ainda que as complicações como o simbléfaro, úlceras da córnea e o entrópio secundário, comuns nestes casos, foram abolidos ou minimizados, e que houve uma recuperação da profundidade do fórnice conjuntival. A citologia por impressão revelou um aumento na população de células caliciformes e povoamento da superfície conjuntival com células epiteliais morfolologicamente normais.

São reportados, ainda, estudos que indicam a utilização da membrana amniótica no tratamento da ceratopatia bolhosa. A doença se apresenta com a formação de edema na intimidade do estroma da córnea, simultaneamente ao aparecimento de bolhas epiteliais e subepiteliais, decorrentes de alterações endoteliais que acontecem secundariamente ao traumatismo cirúrgico, glaucoma não controlado, distrofias endoteliais e alterações congênitas. Os pacientes se apresentam

com acuidade visual diminuída, dor, fotofobia e epífora. Nestes casos, o transplante de membrana amniótica tem se mostrado eficaz no controle dos sintomas da doença, principalmente a dor. Refere-se ainda, que este tratamento apresenta resultado satisfatório no aspecto estético e na manutenção da acuidade visual, devendo ser considerada uma alternativa viável para o tratamento de pacientes portadores de ceratopatia bolhosa (PIRES et al., 1999).

Tanto em humanos, quanto em animais, a grande indicação para a utilização do transplante de membrana amniótica está relacionada com a reconstrução da córnea acidentalmente lesada, seja por agentes físicos ou químicos. As úlceras causadas por queimaduras químicas e térmicas se caracterizam pela difícil cicatrização, em função da deficiência de células tronco limbais, o que faz destas situações, importantes modelos experimentais no estudo dos efeitos da membrana amniótica sobre a cicatrização da córnea (MORGAN & MURRAY, 1996; LEE & TSENG, 1997; PRABHASAWAT & TSENG, 1997; BARROS et al., 1998; KRUSE et al., 1999; TSUBOTA et al., 1999; DUA & AZUARA-BLANCO, 2000; GABLER & LOHMANN, 2000; KIM et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; SRIDHAR et al., 2000; AVILA et al., 2001; HANADA et al., 2001; LETKO et al., 2001; CREMONINI, 2003).

As células epiteliais localizadas no limbo possuem a característica de células mãe, contribuindo para a rápida e perfeita cicatrização da córnea e da conjuntiva, sendo essenciais para a sobrevivência destes tecidos em condições normais. Quando estas células são destruídas, caracterizando uma deficiência das células limbais, os pacientes desenvolvem fotofobia e defeitos persistentes do epitélio da córnea, o que

contribui para a limitação da visão. Ao estudo histopatológico, a deficiência de células limbais se caracteriza pela invasão progressiva de tecido epitelial conjuntival sobre a córnea, vascularização superficial, atrofia da membrana basal do epitélio e infiltrado inflamatório crônico. Nestas condições, as ceratoplastias convencionais não demonstram eficácia, ao passo que as características da membrana amniótica sugerem uma alternativa no tratamento destes problemas. Os efeitos benéficos do transplante de membrana amniótica no tratamento das lesões por queimadura já foram amplamente testados, e os resultados indicaram que a aceleração do processo de cicatrização com supressão da fibrose local contribuiu para uma melhor reconstrução da superfície ocular, conferindo um prognóstico favorável quanto à restauração da visão (SHIMAZAKI et al., 1997; CHOI et al., 1998; TSENG et al., 1998; GAN et al., 1999; ANDERSON et al., 2001; WOO et al., 2001).

É consenso que, apesar da evolução no tratamento clínico e cirúrgico das lesões por queimadura da superfície ocular, estes ainda não são plenamente satisfatórios, o que exige persistência no estudo de métodos que minimizem os prejuízos causados à visão por esta modalidade de agressão. Com este objetivo, inúmeras pesquisas têm experimentado a utilização do transplante de membrana amniótica no tratamento das feridas por queimadura da superfície ocular. Avanços no conhecimento da biologia molecular e celular permitiram identificar os fatores presentes na superfície do olho que tornam estas lesões tão perversas para a visão. A explicação, já conhecida de todos, recai sobre a função exercida pelas células tronco presentes no limbo que, diante da ação abrasiva dos agentes cáusticos e térmicos,

comuns como agentes etiológicos nestas feridas, são destruídas. Assim, a capacidade de regeneração do epitélio da córnea fica comprometida, o que favorece a persistência do defeito e contribui para o aparecimento de vascularização, expansão de tecido fibroso sobre a córnea e desconforto seguido de comprometimento da visão (KIM & TSENG, 1995a; KIM & TSENG, 1995b; LEE & TSENG, 1997; SHIMAZAKI et al., 1997; GAN et al., 1999; KIM et al., 2000; SRIDHAR et al., 2000; JOSEPH et al., 2001).

SRIDHAR et al., (2000), comprovaram os efeitos benéficos do transplante de membrana amniótica no tratamento de injúrias térmicas e químicas da superfície ocular. Em estudo clínico, observaram que a membrana amniótica favoreceu a epitelização, minimizou os sinais de inflamação e reduziu a cicatriz inicial e a expansão da conjuntiva sobre a córnea. Estes achados foram seguidos de uma melhora na acuidade visual dos pacientes tratados, os quais demonstraram também menor desconforto após o tratamento com a membrana amniótica.

Seguindo os mesmos princípios, KIM et al., (2000), discutiram a eficiência da membrana amniótica no tratamento das úlceras causadas por queimadura química. Segundo os autores, após a instalação da lesão, ocorre uma rápida infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares, as quais invadem o estroma a partir dos capilares presentes no limbo. As células inflamatórias começam então a liberar enzimas com ação proteolítica, que contribuem para a destruição da córnea, particularmente do colágeno presente no estroma. A ação destas enzimas pode ser percebida por meio da manifestação clínica que se caracteriza pela formação de bolhas e perpetuação do defeito. Estes eventos são seguidos de tentativas, muitas vezes sem

êxito, de reparação pelos mecanismos intrínsecos. Observa-se, nesta fase, um aumento da população de fibroblastos e ceratócitos, simultaneamente à diminuição da destruição do colágeno. Se bem sucedido, o processo de reparação deixa como seqüela uma cicatriz normalmente exuberante. Apesar dos esforços locais para a neutralização dos efeitos primários e secundários da lesão por queimadura, o que se observa é que a organização dos eventos de reparação se dá de forma lenta, quando comparado com outros tipos de lesões da superfície ocular, o que torna a região susceptível à invasão por microorganismos, que tendem a prorrogar o processo de recuperação. Nestes casos, os autores sugerem que a aplicação da membrana amniótica favorece a reparação do local agredido, por inibir a infiltração de células polimorfonucleares e conseqüentemente limitar a ação proteolítica das enzimas liberadas por estas células inflamatórias, o que torna este método efetivo na cicatrização de úlceras causadas pela ação abrasiva de agentes químicos.

Além dos efeitos benéficos no controle da cicatrização e da inflamação, o transplante de membrana amniótica tem demonstrado ação inibitória na formação de vascularização de córneas tratadas por este método, quando comparadas com córneas tratadas por outras técnicas. A explicação recai mais uma vez sobre a composição da membrana, rica em colágeno tipo IV, laminina, e integrinas (BECKER et al., 1999; KIM et al., 1999).

Apesar dos resultados favoráveis, em diversas pesquisas, sob situações controladas, o uso clínico tem demonstrado algumas restrições, muitas delas relacionadas à

gravidade das situações, como lesões profundas da córnea ou com perda de grande quantidade de tecido estromal, como nas perfurações, como atestam DUA & AZUARA-BLANCO (1999b), quando testaram o transplante de membrana amniótica em pacientes com defeitos epiteliais persistentes e lesões profundas da córnea. Os resultados revelaram uma melhor eficiência do tratamento com transplante de membrana amniótica na cicatrização dos defeitos epiteliais superficiais, quando comparado com o efeito tectônico da membrana amniótica no tratamento das lesões profundas, situação na qual o transplante não se mostrou satisfatório.

Soma-se às propriedades atribuídas à membrana amniótica no tratamento das patologias da superfície ocular, os resultados de pesquisas mais recentes, que têm indicado que seu uso é mais amplo, incluindo o tratamento de complicações pós-operatórias de cirurgias de trabeculectomia para a correção do glaucoma (BUDENZ et al., 2000).

Seguindo estes princípios, GOMES et al., (2001), trataram 4 pacientes que apresentavam complicações pós-trabeculectomia com mitomicina-A. Os olhos que apresentavam vazamento de humor aquoso e bolha hiperfiltrante foram submetidos à cirurgia reparadora com membrana amniótica. A técnica para a correção do vazamento consistiu na dissecação da conjuntiva sobre a área da trabeculectomia. Procedeu-se, posteriormente, à remoção de todo o tecido alterado, e em seguida, confeccionou-se fragmento de membrana amniótica de tamanho semelhante ao da área exposta. O fragmento foi então suturado na episclera, com pontos separados, com fio de náilon 10-0. Na ausência de conjuntiva suficiente ou, quando a área a ser

coberta possuía extensa necrose, um segundo fragmento de membrana amniótica, maior que o primeiro, era suturado por cima, como reforço. O tratamento da bolha hiperfiltrante, complicada pelo adelgaçamento escleral, consistiu na dissecação da conjuntiva na área da bolha cística, seguido de reparo do local com fragmento de esclera, obtido de cadáver, e suturado no leito receptor com fio tipo poligalactina 910 80. Sobre este reparo escleral foi aplicado fragmento de membrana amniótica do mesmo tamanho, o qual foi ancorado por meio de sutura com o mesmo fio, na episclera. Os resultados permitiram concluir que a inflamação pós-operatória se apresentou de forma branda e que houve vascularização do enxerto, contradizendo seus efeitos inibitórios sobre a neogênese vascular, como atestaram BECKER et al., 1999. Contudo, os autores constataram que a membrana amniótica constituiu numa opção viável para o tratamento dos casos de bolha com vazamento de humor aquoso e de bolhas císticas hiperfiltrantes, resistentes ao tratamento convencional.

A literatura apresenta ainda variações quanto à forma de preparo e conservação da membrana amniótica. É consenso que a obtenção do material deve ser feita de forma estéril, devendo-se descartar a possibilidade do doador ser portador de alguma doença infecto-contagiosa (MARQUES et al., 1992; MELLO et al., 1997; MAZZANTI et al., 2000; DUA & AZUARA-BLANCO, 1999b).

Definidos os parâmetros para a seleção do doador, deve-se estabelecer o método de preparo e a técnica de preservação do material. Com a preocupação de preservar as características naturais da membrana amniótica, KIM & TSENG, 1995a, propuseram a seguinte técnica de preparo e preservação:

as placentas obtidas a partir de cesarianas eletivas foram lavadas exaustivamente com solução salina estéril, para a remoção de coágulos sanguíneos, sob uma capela de fluxo laminar. Após a lavagem, promoveu-se a dissecação romba da placenta, separando-se a membrana amniótica do restante dos anexos fetais. A membrana amniótica foi então aplicada sobre um filme de papel de nitrocelulose e lavada novamente; agora, com uma solução contendo 1000 UI/ml de penicilina, 20 mg/ml de estreptomicina e 2,5 mcg/ml de anfotericina B. Os filmes de nitrocelulose contendo a membrana foram então cortados em discos de 1,5 cm de diâmetro e armazenados em solução de glicerina a 100%, em temperatura de 4°C. As membranas passaram a ser utilizadas 30 dias após o preparo. No momento da aplicação, a membrana amniótica era submetida a uma nova lavagem com solução salina e, em seguida, imersa no mesmo tipo de solução, por um período de 30 minutos, após o que estava pronta para ser aplicada sobre o defeito corneal. O experimento, que consistiu na aplicação da membrana amniótica conservada em glicerina sobre áreas de ceratectomia previamente preparadas, permitiu concluir que as córneas dos animais tratados com o transplante se mostraram livres de neovascularização e edema, 3 meses após a aplicação da membrana, enquanto que as córneas do grupo controle, que não receberam o transplante de membrana amniótica preservada em glicerina, apresentaram vascularização com granuloma central. Os resultados obtidos neste experimento permitiram concluir que as medidas adotadas para facilitar a epitelização corneal foram clinicamente eficientes, demonstrando a viabilidade da utilização da membrana amniótica preservada em glicerina como sucedâneo da córnea.

Inúmeros outros experimentos seguiram a metodologia apresentada por KIM & TSENG, (1995^a), com pequenas modificações que, de maneira geral, não interferiram nas indicações e nos resultados obtidos pela utilização da membrana amniótica no tratamento das lesões da superfície ocular, o que pode ser comprovado mediante a análise das pesquisas executadas por KIM et al., (2000).

Seguindo os mesmos princípios, algumas metodologias revisadas sugerem a utilização do meio de Dulbecco, modificado por Eagle, estocado a -80°C , como método de preservação da membrana amniótica (PRABHASAWAT & TSENG, 1997; PRABHASAWAT et al., 1997; HONAVAR et al., 2000; MA et al., 2000; AVILA et al., 2001; CHOI & TSENG, 2001). Outros autores sugerem a utilização do dimetil sulfóxido como meio de preservação da membrana, estocando-a -80°C (SHIMAZAKI, et al., 1997; SHIMAZAKI, et al., 1998; HANADA et al., 2001; SHIMMURA et al., 2001).

Apesar do grande número de estudos empreendidos nos últimos anos sobre a utilização do transplante de membrana amniótica no tratamento de diversas patologias da córnea, persiste a necessidade de pesquisas que testem a eficiência da utilização de membranas xenólogas. Supondo-se que as propriedades da membrana amniótica são mantidas, mesmo quando aplicadas entre indivíduos de espécies diferentes, a utilização da mesma seria favorecida pelo aumento do número de doadores disponíveis, incluindo animais de produção. Na tentativa de contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na utilização do transplante de membrana amniótica xenógena, apresentamos a seguinte proposta de trabalho.

3. OBJETIVOS

Na tentativa de elucidar os mecanismos anteriormente mencionados, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Pesquisar a evolução clínica da resposta inflamatória da superfície ocular, após a aplicação de enxerto de membrana amniótica xenóloga coletada de bovino, preservada em glicerina e a fresco, no tratamento de lesões superficiais da córnea;
2. Pesquisar a presença das células do sistema imune presentes na córnea, por meio de ensaios imunológicos em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga;
3. Contribuir para o estudo dos mecanismos envolvidos na defesa da superfície ocular e na reparação corneal frente à aplicação de materiais imunogenicamente estranhos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e seleção dos animais

Para a execução da metodologia proposta, foram utilizados 70 coelhos da raça Nova Zelândia, com idade de 6 meses, machos e fêmeas, sem distinção de cor da pelagem e com peso médio de 2,5 kg. Os animais foram fornecidos pelo setor de cunicultura das Faculdades Associadas de Uberaba (FAZU).

Durante a realização do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas suspensas, em local apropriado, com água e comida à vontade.

4.2. Divisão dos grupos experimentais

Os animais selecionados foram numerados de 1 a 70 e distribuídos, aleatoriamente, por sorteio, entre os grupos experimentais. Foram estipulados 5 grupos, 3 deles com 20 animais cada e outros 2 grupos com 5 animais, identificados de acordo com o tratamento em:

- a) Grupo 1 (G1): grupo de 20 animais selecionados aleatoriamente, os quais foram submetidos à ceratectomia superficial sem a aplicação de nenhuma técnica de ceratoplastia;
- b) Grupo 2 (G2): grupo de 20 animais selecionados aleatoriamente, os quais foram submetidos à ceratectomia superficial e ceratoplastia com membrana amniótica xenógena conservada em glicerina a 100%;

- c) Grupo 3: grupo de 20 animais selecionados aleatoriamente, os quais foram submetidos à ceratectomia superficial e ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga a fresco;
- d) Grupo 4: grupo de 5 animais selecionados aleatoriamente, os quais receberam a aplicação da membrana amniótica xenóloga a fresco sobre a superfície da córnea íntegra, sem a remoção do epitélio pelo n-heptanol ou qualquer outro procedimento;
- e) Grupo 5: grupo de 5 animais selecionados aleatoriamente, os quais foram mantidos sem a realização de nenhum procedimento cirúrgico, servindo de testemunha para os demais grupos.

Após a distribuição dos animais de acordo com o tratamento proposto, os 20 espécimes selecionados para os grupos G1, G2 e G3 foram novamente divididos aleatoriamente em 4 subgrupos de 5 animais cada, sendo que, para cada subgrupo, foi determinado um período para a colheita dos materiais necessários à avaliação da metodologia proposta. Os tempos para a colheita dos materiais foram estabelecidos em:

- a) Subgrupo 1 (T1): colheita após 72 horas de realização do procedimento proposto;
- b) Subgrupo 2 (T2): colheita após 7 dias de realização do procedimento proposto;
- c) Subgrupo 3 (T3): colheita após 14 dias de realização do procedimento proposto;
- d) Subgrupo 4 (T4): colheita após 21 dias de realização do procedimento proposto.

Somente os grupos G4 e G5 contaram com apenas 5 animais, tendo sido os mesmos avaliados durante toda a execução do experimento, em todos os intervalos descritos acima.

Tabela 1: Distribuição dos animais por grupo e subgrupo, de acordo com o tipo de tratamento e o tempo de observação clínica e colheita dos materiais

GRUPO	SUBGRUPO		
GRUPO 1	IDENTIFICAÇÃO	NÚMERO DE ANIMAIS	TEMPO DECORRIDO DESDE A CIRURGIA ATÉ A COLHEITA DE DADOS E MATERIAIS
	T1	5	72 HORAS
	T2	5	7 DIAS
	T3	5	14 DIAS
	T4	5	21 DIAS
GRUPO 2	IDENTIFICAÇÃO	NÚMERO DE ANIMAIS	TEMPO DECORRIDO DESDE A CIRURGIA ATÉ A COLHEITA DE DADOS E MATERIAIS
	T1	5	72 HORAS
	T2	5	7 DIAS
	T3	5	14 DIAS
	T4	5	21 DIAS
GRUPO 3	IDENTIFICAÇÃO	NÚMERO DE ANIMAIS	TEMPO DECORRIDO DESDE A CIRURGIA ATÉ A COLHEITA DE DADOS E MATERIAIS
	T1	5	72 HORAS
	T2	5	7 DIAS
	T3	5	14 DIAS
	T4	5	21 DIAS
GRUPO 4	5 ANIMAIS OBSERVADOS DURANTE TODA A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO		
GRUPO 5	5 ANIMAIS OBSERVADOS DURANTE TODA A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO		
TOTAL DE ANIMAIS	70		

4.3. Obtenção e preparo da membrana amniótica

4.3.1. Membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina

A membrana utilizada na ceratoplastia dos animais do grupo 2 foram obtidas de bovinos no momento do abate, em frigorífico fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF)¹, por meio de colheita asséptica e transportadas para uma sala isolada, onde foram preparadas, respeitando-se a seguinte metodologia:

as placentas foram obtidas após o abate e abertura da cavidade abdominal. O útero gestante foi colocado sobre uma bandeja, protegida por panos estéreis, com o auxílio de material cirúrgico previamente autoclavado. Separou-se, então, a membrana amniótica dos demais tecidos adjacentes, por meio de manobras manuais, posteriormente ao que, a membrana amniótica foi lavada exaustivamente com solução salina estéril. Após esta primeira higienização, promoveu-se uma nova lavagem, com uma solução contendo 1000 UI/ml de penicilina G Benzatina², 20 mg/ml de estreptomicina³ e 2,5 mcg/ml de anfotericina B⁴, segundo a metodologia sugerida por KIM & TSENG, 1995. A membrana foi então colocada sobre discos de papel de nitrocelulose previamente esterilizado, de 10 cm de diâmetro, com a porção epitelial voltada para cima e a porção representada pela membrana basal em contato com o papel de nitrocelulose. Os discos de nitrocelulose contendo a membrana foram por fim armazenados em solução de glicerina a 100%⁵ e refrigerados a 4°C, por um período mínimo de 30 dias e máximo de 90 dias antes da utilização.

4.3.2. Membrana amniótica xenóloga a fresco

A membrana amniótica xenóloga a fresco, utilizada na ceratoplastia dos 20 animais do grupo 3 e no recobrimento da córnea íntegra dos 5 animais do grupo 4, também foi obtida de bovinos no momento do abate, em

¹ Frigorífico Boi Bravo, Uberaba-MG.

² Penretard®-Laboratório Cibran

³ Estreptomicina 5g-Laboratório Fort Dodge do Brasil

⁴ Anfotericina B 50 mg- Laboratório Cristália

frigorífico fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), por meio de colheita asséptica e transportadas para uma sala isolada, onde foram preparadas seguindo a mesma metodologia citada no item anterior (4.3.1), não tendo sido realizada, porém, a fase de imersão na glicerina e conservação sob refrigeração. Após as etapas de lavagem, a membrana foi colocada sobre um pano estéril e recoberta por outro semelhante, ambos umedecidos com solução fisiológica, tendo sido utilizada no recobrimento das córneas dos animais dos grupos 3 e 4, imediatamente após o preparo.

4.4. Procedimento cirúrgico

4.4.1. Pré-operatório

Antecedendo a conduta operatória propriamente dita, procedeu-se aos cuidados relativos ao preparo dos animais para a cirurgia; como se segue:

- Jejum hídrico de 2 horas e alimentar de 12 horas.
- Pré-medicação anestésica com Acepromazina⁶ na dose de 0,5 mg/kg de peso corpóreo, por via intra-muscular, 30 minutos antes da aplicação da anestesia.
- Manutenção dos animais sob anestesia dissociativa, utilizando-se quetamina⁷ na dose de 30,0 mg/Kg de peso vivo, pela via intramuscular, associada ao cloridrato de xilazina⁸ na dose de 5,0mg/Kg de peso corpóreo, pela mesma via.

⁵ Glicerina 100%: Laboratório Myaky Ltda

⁶ Acepran 0,2%[®] - Univet S.A. Industria Veterinária

⁷ Dopalen[®] - Laboratório Agribrands do Brasil Ltda

⁸ Dopaser[®] – Laboratório Calier do Brasil

- Após a aplicação dos anestésicos os animais foram monitorados, observando-se o grau de consciência. Imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico, foi instilada uma gota de colírio anestésico⁹ à base de cloridrato de tetracaína, cloridrato de fenilefrina e ácido bórico, sobre o olho a ser operado.
- Todos os animais, incluindo aqueles pertencentes ao grupo 5, que serviu de controle, foram submetidos aos procedimentos acima mencionados.

4.4.2. Trans-operatório

4.4.2.1. Preparo da área para recebimento do enxerto

Tomados os cuidados citados para o período pré-operatório, os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram submetidos à anestesia e, após atingirem plano anestésico satisfatório, o qual foi determinado pela ausência de reação ao toque da córnea, foram cuidadosamente posicionados em decúbito lateral. Os olhos foram lavados inicialmente com solução fisiológica estéril, visando a remoção de partículas contidas no espaço conjuntival, após o que foram submetidos à anti-sepsia com colírio à base de vitulinato de prata a 10%¹⁰. Realizou-se a fixação mecânica das pálpebras com blefarostato auto-estático e fixação do bulbo ocular com a aplicação de duas pinças hemostáticas, tipo mosquito, na esclera. Foi então colocado um pano de campo fenestrado, com orifício de 5 cm de diâmetro, ao redor da área a ser operada. Com o campo

⁹ Colírio anestésico® - Allergan

¹⁰ Argirol® - Allergan

operatório devidamente preparado, procedeu-se à remoção do epitélio da córnea para a aplicação do enxerto. A remoção do epitélio da córnea foi realizada a partir da associação de um agente químico com manobras mecânicas. Para tanto, utilizou-se uma pequena porção de algodão fixado em uma haste e embebido em n-heptanol, o qual possui ação abrasiva sobre o epitélio. Após a aplicação do n-heptanol, a porção do epitélio que se desprendeu foi removida com o auxílio de uma lâmina de bisturi 11, levemente aplicada sobre a superfície da córnea, com movimentos horizontais, de uma extremidade do limbo até a outra. A confirmação da remoção do epitélio foi realizada mediante a aplicação do colírio de fluoresceína¹¹, o qual foi instilado sobre o olho, observando-se, com ajuda de uma fonte luminosa, a impregnação do estroma pelo corante, após lavagem da superfície ocular com solução fisiológica.

4.4.2.2. Aplicação do enxerto

a) Membrana amniótica xenógena conservada em glicerina a 100% (grupo 2)

Após a realização da ceratectomia, como mencionado anteriormente no item 4.4.2.1, foi efetuada a aplicação do enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, sobre a córnea de todos os animais do grupo 2. A membrana, previamente preparada como especificado no item 4.3.1, foi retirada da geladeira 2 horas antes do procedimento cirúrgico e lavada em condições estéreis, com solução fisiológica, durante 5 minutos. Após esta primeira lavagem, a membrana

¹¹ Colírio de Fluoresceína: Allergan

permaneceu imersa em solução fisiológica até o início do procedimento cirúrgico. As membranas foram recortadas momentos antes da aplicação, em tamanho suficiente para recobrir toda a superfície da córnea, tendo sido as mesmas ancoradas na região do limbo, por meio de suturas simples separadas, com fio de náilon monofilamentado ou de polietileno 6-0. O excesso de membrana foi retirado com auxílio de uma tesoura romba, já com o enxerto aplicado sobre a superfície ocular, de forma que o enxerto se encontrasse recobrendo apenas a córnea e a região limbal, sem invadir a esclera.

b) Membrana amniótica xenóloga a fresco (grupo 3)

Após o manejo da membrana, como relatado no item 4.3.2, o enxerto a fresco foi aplicado sobre o leito receptor, previamente preparado, como relatado anteriormente para a aplicação da membrana amniótica conservada em glicerina, nos animais do grupo 1. Neste caso, as membranas foram aplicadas após as etapas de lavagem.

c) Membrana amniótica xenóloga a fresco (grupo 4)

Os animais deste grupo receberam a aplicação do enxerto de membrana amniótica xenóloga a fresco sem que fossem submetidos à remoção do epitélio da córnea, como descrito no item 4.4.2.1; ou seja, o enxerto foi aplicado sobre a córnea intacta.

4.4.3. Pós-operatório

Foi aguardado o retorno anestésico dos animais, com posterior aplicação de colares do tipo Elisabetano, com o objetivo de se evitar traumas sobre o local operado. Os animais foram então conduzidos para suas respectivas gaiolas, onde se procedeu à avaliação clínica dos olhos operados durante todo o período de realização do experimento.

4.5. Protocolos de avaliação

4.5.1. Avaliação clínica

Os animais de todos os grupos foram avaliados em intervalos pré-determinados, quando foram observados fenômenos relacionados com a evolução clínico-cirúrgica dos pacientes, tais como dor, representada pelos sinais de fotofobia e blefarospasmo, secreção ocular, edema da córnea e da conjuntiva, neovascularização corneal e grau de transparência da córnea. Observou-se ainda o tempo de permanência da membrana sobre a córnea e o intervalo de tempo necessário para a total epitelização da área de ceratectomia. Estas alterações permitiram estabelecer a evolução clínica da inflamação da superfície ocular e a capacidade de cicatrização do epitélio da córnea tratada pelos métodos propostos. Todas as alterações foram qualificadas e posteriormente quantificadas de forma subjetiva, como representado na tabela 2.

TABELA 2: Interpretação dos índices de escore utilizados na avaliação clínica dos olhos em estudo

ESCORE	0	1	2	3	4
INTERPRETAÇÃO DO ESCORE	Ausência de manifestação do fenômeno	Manifestação leve	Manifestação moderada	Manifestação intensa	Manifestação grave

O exame consistiu na abertura da fissura palpebral e identificação das alterações anteriormente relacionadas. Inicialmente, o exame foi realizado sem aplicação de qualquer colírio. Após esta inspeção prévia, os olhos foram lavados com solução fisiológica estéril e receberam uma gota de fluoresceína, para a devida identificação da presença do enxerto sobre a córnea dos animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 e do grau de epitelização do defeito criado nos animais dos grupos 1, 2 e 3, tendo sido possível a verificação deste parâmetro nos olhos dos animais que receberam a aplicação da membrana (grupos 2 e 3), somente após o desprendimento da mesma.

As alterações macroscópicas foram registradas por meio de fotografias, realizadas com o uso de uma lente macro 100¹² acoplada a uma câmara fotográfica¹³. As fotografias foram realizadas após a execução do exame clínico, respeitando-se os intervalos anteriormente citados para a colheita dos materiais para análise.

Os intervalos de observação dos fenômenos clínicos foram padronizados da seguinte forma:

a) até o sétimo dia: intervalo de 24 horas entre as observações;

¹⁵ Lente macro 100 Vivitar

¹⁶ Câmara Vivitar modelo V400

- b) do sétimo ao décimo quarto dia: intervalo de 48 horas;
- c) do décimo quarto ao vigésimo primeiro dia: intervalo de 72 horas.

4.5.2. Avaliação morfológica

Ao final dos tempos anteriormente determinados para cada subgrupo, os animais foram novamente anestesiados, utilizando-se o mesmo protocolo descrito no item 4.4.1. Foram retirados fragmentos das córneas e da conjuntiva de todos os olhos observados durante o experimento.

As córneas foram cuidadosamente retiradas com o uso de bisturi e tesoura de córnea, aplicados sobre a região do limbo. O fragmento de conjuntiva foi obtido com o auxílio de tesoura de íris. O material foi então fixado em formaldeído tamponado em solução aquosa a 10%, reduzido, incluído em parafina, cortado em uma espessura padrão de 5 micrômetros e corado pelo método de hematoxilina e eosina. Posteriormente ao preparo histológico do material, procedeu-se ao exame microscópico e fotomicrografia. Foram avaliados os parâmetros referentes à presença de edema, neoformação vascular, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares e grau de epitelização do defeito criado na córnea, além do tempo de permanência da membrana utilizada na forma de enxerto.

Imediatamente após o término dos procedimentos de colheita, aprofundou-se o plano anestésico e executou-se a eutanásia, com a aplicação de 10 ml de cloreto de potássio pela via intraperitoneal. As funções cardíaca e respiratória foram monitoradas até se atestar o óbito dos animais.

4.5.3. Avaliação da resposta imune específica da superfície ocular pela técnica de imunohistoquímica

A caracterização da resposta imune específica foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica, com a qual pesquisou-se a presença de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8, em todos os tecidos obtidos, nos intervalos citados no item 4.2.

4.5.3.1. Obtenção do material e preparo das lâminas

Para a execução desta etapa, procedeu-se à seguinte seqüência de eventos: após o cumprimento do tempo de observação para cada subgrupo, como consta no item 4.2, foram colhidos fragmentos de córnea e conjuntiva, como realizado no item 4.5.2. Para a padronização da técnica de imunohistoquímica, foram utilizados também, nesta etapa, fragmentos de linfonodo mesentérico. Após a colheita, os materiais foram acondicionados em criotubo devidamente identificado com o número do animal, grupo experimental e tempo de obtenção, e armazenados em botijão contendo nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196° Celsius. O material foi fixado em meio OCT¹⁴, sobre uma plataforma metálica e cortado em aparelho tipo criostato¹⁵, em fragmentos de 5 micrômetros, a uma temperatura de -26° Celsius. Os cortes foram então fixados sobre lâminas de vidro para microscopia, próprias para tecidos congelados¹⁶, as quais já possuem uma camada

¹⁴ Tissue-Tek®: OCT compound (Embedding Medium for Frozen Tissue Specimens to Ensure Optimal Cutting Temperature). Sakura Finetek U.S.A., Inc. Torrance, CA 90501, USA.

¹⁵ Cryocut 1800®: Reichert-Jung

¹⁶ Dako® Silanized Slides: DAKO Corporation, Carpinteria, CA 93013, USA.

adesiva sobre a sua superfície e mantém o corte de tecido firmemente aderido sobre a lâmina. Após a fixação dos tecidos em lâmina, as mesmas foram separadas por papel alumínio e armazenadas em congelador, a uma temperatura de -12° Celsius. Os cortes dos animais dos mesmos subgrupos foram realizados sobre a mesma lâmina, como esquematizado na figura 1, tendo sido fixados, portanto, 5 cortes por lâmina. Padronizou-se que o corte mais próximo da identificação da lâmina (parte superior da lâmina), corresponderia ao animal 1 do subgrupo correspondente (T1, T2, T3 ou T4) e assim sucessivamente, encontrando-se o corte do animal 5 mais distante da identificação da lâmina (parte inferior da lâmina). Para contemplar a proposta, foram produzidas 5 lâminas semelhantes, contendo cortes do mesmo material, as quais foram numeradas em L1, L2, L3, L4 e L5. Estabeleceu-se também que as lâminas 1 (L1) seriam utilizadas na pesquisa dos linfócitos T CD4; as lâminas 2 (L2) para a pesquisa dos linfócitos T CD8 e as lâminas 4 (L4) serviram de controle. As lâminas 3 (L3) e 5 (L5), foram novamente armazenadas, em congelador, como lâminas de reserva.

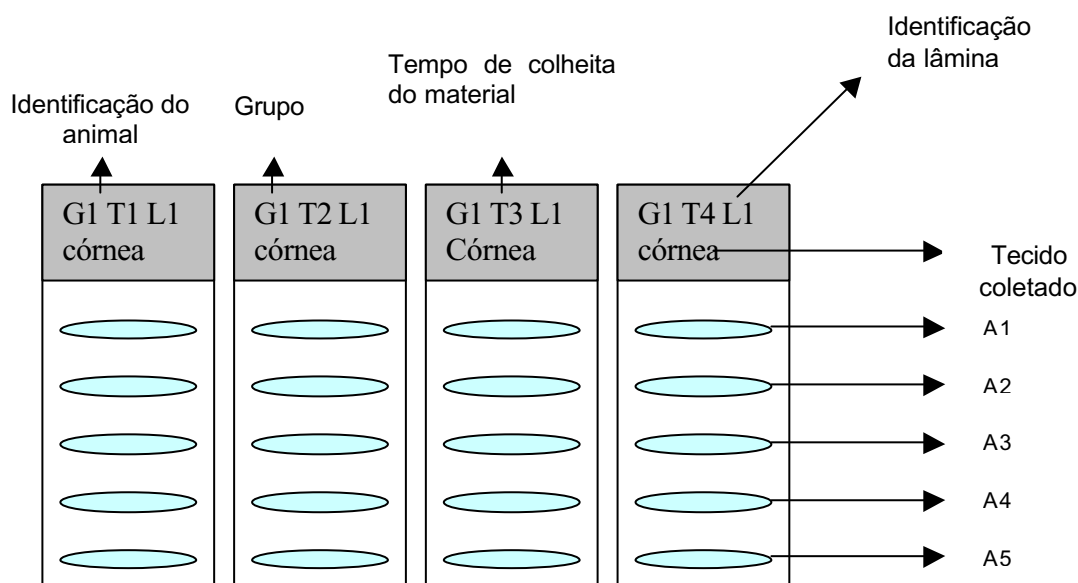


Figura 1: Desenho que ilustra a configuração das lâminas de imunohistoquímica, tendo como exemplo as lâminas com cortes de córnea do grupo 1. Para cada lâmina, de cada subgrupo, foram realizadas 5 repetições.

4.5.3.2. Execução da técnica de imunohistoquímica

a) Bloqueio da peroxidase

No momento de realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas foram retiradas do congelador e distribuídas, individualmente, em sentido vertical, dentro de uma cuba de vidro, contendo água oxigenada 30 volumes (H_2O_2 30V)¹⁷, diluída em metanol puro para análise (PA)¹⁸, em uma solução a 3% (Figura 2). Para o preenchimento da cuba, utilizou-se uma mistura de 150 ml de metanol PA com 4,5 ml de H_2O_2 30V. As lâminas ficaram submersas nesta mistura por um período de 10 minutos. Esta etapa teve como objetivo bloquear a peroxidase presente nos tecidos, a

¹⁷ Perhidrol: 30% H_2O_2 para análise, Merck S.A. Indústrias Químicas.

¹⁸ Álcool metílico P.A. CH_3OH , Casa Americana Artigos para Laboratório Ltda.

qual, quando ativa, interfere na ligação dos demais componentes da reação.

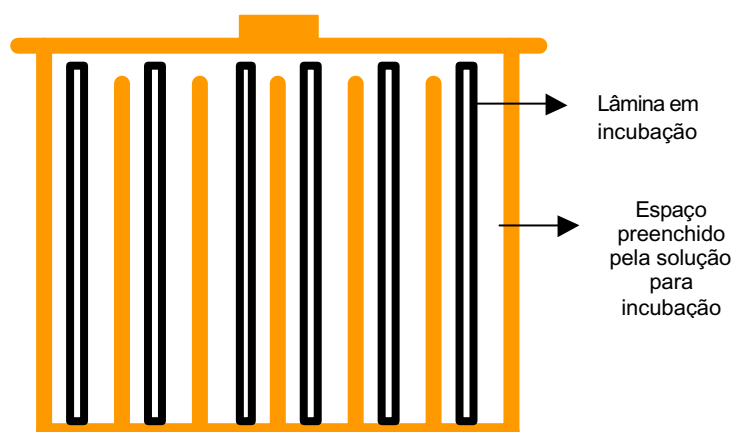


Figura 2: Desenho ilustrando a cuba utilizada na execução de algumas etapas da técnica de imunohistoquímica.

b) Lavagem com PBS tween a 0,05%

Após o bloqueio da peroxidase, como ilustrado acima, as lâminas foram submetidas a 3 lavagens seriadas de 10 minutos cada, utilizando-se, para tal, uma solução balanceada de PBS tween¹⁹, numa concentração de 0,05%. Estas lavagens foram realizadas na mesma cuba utilizada no bloqueio da peroxidase, cobrindo as lâminas com a solução e trocando a mesma após o tempo pré-determinado para cada sessão de lavagem. Esta etapa teve como objetivo inibir a presença de possíveis ligações indesejáveis nos tecidos que se desejou estudar.

¹⁹ PBS tween a 0,05%: solução salina tamponada com fosfato com adição de detergente tween, a 0,05%.

c) Incubação em PBS BSA²⁰ a 2%

Realizadas as lavagens com a solução de PBS tween a 0,05%, realizou-se a incubação das lâminas em solução de PBS BSA a 2%, por um período de 30 minutos. Nesta etapa, as lâminas foram dispostas em sentido horizontal, apoiadas sobre um suporte de acrílico, com a face que continha os cortes voltada para cima, em uma cuba de acrílico opaco. O espaço da cuba foi preenchido com água, até uma altura inferior à que se encontravam as lâminas, permitindo que a incubação acontecesse em ambiente úmido e temperatura ambiente. A solução para incubação foi então depositada sobre as lâminas, até que recobrisse toda a sua superfície, permanecendo sobre a mesma durante todo o período de incubação. Decorridos 30 minutos, a solução foi removida mediante a inclinação das lâminas, permitindo que a mesma escorresse pela borda lateral.

d) Incubação com anticorpo primário

Após a etapa anterior, e utilizando-se a mesma cuba preenchida por água, sem cobrir as lâminas e em temperatura ambiente, procedeu-se à incubação do material com os anticorpos primários. O anticorpo primário possui afinidade específica para o tipo celular que se deseja marcar. Neste experimento foram utilizados anticorpos específicos para linfócitos T CD4²¹ e TCD8²², produzidos em camundongo, contra linfócitos T CD4 e CD8 de coelhos.

²⁰ BSA: albumina de soro bovino

Para a execução desta etapa utilizou-se, inicialmente, as lâminas com cortes dos linfonodos, para a padronização da diluição adequada dos reagentes. Procedeu-se então à incubação nas seguintes diluições dos anticorpos primários em solução balanceada BSA 2%:

a) diluição de 1/25 (1µl de anticorpo para 50µl de PBS BSA 2%)

b) diluição de 1/50 (1µl de anticorpo para 50µl de PBS BSA 2%).

Para cobrir totalmente cada lâmina, foram utilizados 500µl da solução acima descrita. Esta etapa exigiu a incubação por um período de 2 horas. Ao final de todo o processo, verificou-se que a diluição de 1/50 foi satisfatória, permitindo uma boa marcação dos tipos celulares pesquisados, tendo sido então estabelecida esta diluição para a execução da imunohistoquímica nos tecidos oculares colhidos.

e) Lavagem

Procedeu-se mais uma vez à lavagem das lâminas, na mesma cuba ilustrada na figura 2. Nesta etapa foram realizadas 4 lavagens seriadas, onde as lâminas permaneciam, durante cada uma, 10 minutos embebidas em solução PBS Tween a 0,05%.

²¹ Mouse anti Rabbit CD4 (MCA 799), Clone Number KEN-4: Serotec Ltd, 22 Bankside, Station Approach, Kidlington, Oxford, UK.

²² Mouse anti Rabbit CD8 (MCA 1576), Clone Number 12C7: Serotec Ltd, 22 Bankside, Station Approach, Kidlington, Oxford, UK.

f) Incubação com conjugado (anticorpo secundário marcado)²³

O conjugado é representado pelo anticorpo secundário, produzido em coelho e com afinidade pelo anticorpo do camundongo, marcado com a substância que irá corar os tipos celulares em estudo. Este conjugado é formado, portanto, por um anticorpo que tem afinidade pelo anticorpo primário, ligando-se a ele com bastante especificidade e por uma substância corante, a qual é responsável pela reação imunoenzimática. A incubação com o conjugado ocorreu na mesma cuba utilizada para a incubação do anticorpo primário, nas mesmas condições, por um período de 1 hora. Para esta etapa, utilizou-se uma diluição de 1/200 do conjugado em solução balanceada PBS BSA a 2%.

g) Lavagem

Realizou-se a lavagem das lâminas na cuba ilustrada na figura 2. Também nesta etapa foram realizadas 4 lavagens seriadas, onde as lâminas permaneciam, durante cada etapa, por 10 minutos imersas em solução PBS Tween a 0,05%.

h) Incubação com Streptoavidina Peroxidase (Strpt ABComplexo²⁴)

Nesta etapa procedeu-se à incubação com Streptoavidina conjugada com a peroxidase por 30 minutos, nas

²³ Biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulins, code n^o E 0354: Dakocytomation Denmark A/S. Produktionsvej 42 DK-2600, Glostrup, Denmark.

²⁴ EstreptABComplex Código K 0377: 1 ml de streptavidina/ 1ml de biotinylated horse adish peroxidase, Dakocytomation, Denmark A/S. Produktionsvej 42 DK-2600, Glostrup, Denmark.

mesmas condições utilizadas para a incubação dos anticorpos primário e secundário.

i) Lavagem

Realizou-se a lavagem das lâminas como ilustrado na figura 2. Também nesta etapa foram realizadas 4 lavagens seriadas, de 10 minutos cada, em solução PBS Tween a 0,05%.

j) Revelação com DAB/H₂O₂

Finalizando a técnica de imunohistoquímica as lâminas foram incubadas em uma solução contendo 1 mg/ml de líquido DAB e 0,05% de H₂O₂ em tampão tris/HCl, em pH 7,2, à temperatura ambiente, por um período de 10 minutos. Decorrido o tempo necessário para a revelação, interrompeu-se a reação com a lavagem das lâminas em água corrente.

k) Contra-coloração com hematoxilina e montagem das lâminas com lamínula e bálsamo

Para melhor visualização da reação que permitiu a marcação da superfície das membranas celulares em estudo, procedeu-se à coloração com hematoxilina, a qual, por meio da coloração do núcleo acidófilo, promove um contraste com a membrana celular corada pela técnica de imunohistoquímica. Esta etapa foi seguida da aplicação de lamínula sobre os cortes já completamente preparados, preservando assim o material para posterior leitura e interpretação.

5. RESULTADOS

Com o objetivo de contemplar a proposta de trabalho anteriormente apresentada e ilustrar os resultados obtidos a partir da aplicação dos métodos descritos, foram avaliados parâmetros referentes à evolução clínica, histopatológica e imunohistoquímica, os quais, a partir de agora, passo a apresentar.

5.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Durante todo o período de execução do experimento, foram avaliados parâmetros referentes à inflamação da superfície ocular e reparação da córnea, representados pela manifestação clínica de fotofobia e blefarospasmo, hiperemia conjuntival, secreção ocular, quemose e neovascularização da córnea, além do tempo de permanência do enxerto sobre a superfície ocular e da taxa de reepitelização do defeito criado nas córneas em estudo, em todos os tratamentos realizados. A evolução destes índices permitiu identificar, de forma bastante precisa, a cinética da resposta inflamatória da superfície ocular e o desenvolvimento do processo de reparação corneal.

Observou-se que, tanto na ceratoplastia com a membrana amniótica conservada em glicerina (grupo 2), quanto na ceratoplastia com a membrana a fresco (grupo 3), a sensibilidade à luz e o blefarospasmo se mostraram com índices que variaram de leve a moderado nas primeiras 72 horas de observação. Estes achados, porém, pareceram estar relacionados com a ação abrasiva do n-heptanol aplicado sobre a córnea; pois, no grupo 1, o qual foi submetido apenas à ceratectomia superficial, observou-se fenômeno

semelhante. Os olhos tratados com a membrana amniótica xenóloga a fresco se mostraram menos doloridos nas primeiras 24 horas, em todos os animais, comportamento este que se mostrou mais favorável que o do grupo que não recebeu nenhuma membrana. Após as primeiras 72 horas, observou-se que os animais do grupo 1 passaram a ter uma redução nos índices relacionados ao desconforto ocular até o décimo quarto dia, quando os olhos se apresentaram sem fotofobia e blefarospasmo. Nos olhos do grupo 2, os fenômenos relacionados à dor se mostraram mais intensos, quando comparados com os olhos do grupo 3. Enquanto que naqueles, a fotofobia e o blefarospasmo atingiram níveis graves no sétimo, os olhos que receberam a aplicação da membrana a fresco mantiveram-se com manifestação intensa no mesmo período. Tanto no tratamento com a membrana conservada quanto com a membrana a fresco, houve redução dos parâmetros de dor a partir do décimo quarto dia, tendo estes se manifestado de forma leve aos 21 dias tanto nos olhos que receberam a membrana a fresco quanto nos olhos que receberam a membrana conservada em glicerina (figuras 3, 4 e 5).

A evolução clínica do fenômeno de hiperemia conjuntival se mostrou semelhante à apresentada para a fotofobia e blefarospasmo. No grupo 1, a hiperemia conjuntival se mostrou moderada nos primeiros 7 dias, tendendo a diminuir a partir de então, tornando-se ausente no vigésimo primeiro dia de observação (figura 6). Nos olhos que receberam a membrana conservada em glicerina, observou-se que, já nas primeiras 24 horas, a hiperemia conjuntival variou de moderada a intensa, progredindo para índices graves no sétimo dia, regredindo para índices moderados no décimo quarto dia e, a partir daí, regrediu novamente para índices leves, aos 21 dias de observação (figura 7). Os olhos que receberam a membrana a fresco

apresentaram a mesma tendência que os olhos que receberam a membrana conservada, demonstrando, porém, índices menores. Assim, observou-se, nestes olhos, hiperemia conjuntival moderada nas primeiras 24 horas, a qual progrediu para um quadro mais severo nos três primeiros dias, atingindo níveis graves no sétimo dia. A partir daí, a hiperemia conjuntival dos olhos tratados com a membrana a fresco apresentaram tendência de queda, mostrando-se moderada no décimo quarto dia e ausente no vigésimo primeiro dia de pós-operatório (figura 8).

Ainda com ênfase aos fenômenos relacionados à inflamação, observou-se que a evolução clínica da secreção ocular se mostrou mais moderada no grupo 1 nos primeiros 7 dias, tendendo a desaparecer a partir do décimo quarto dia e, finalmente, mostrando-se ausente 21 dias após a aplicação do n-heptanol e remoção do epitélio corneal. Nos olhos tratados com a membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, registraram-se índices intensos de secreção ocular já nas primeiras 24 horas, os quais progrediram para índices graves no terceiro dia, mantendo-se assim até o sétimo dia de pós-operatório, quando passaram a regredir sistematicamente, mostrando-se leves 21 dias após a cirurgia. A membrana a fresco, mais uma vez, se mostrou menos agressiva, impondo índices moderados nas primeiras 24 horas, os quais evoluíram para índices intensos em 72 horas e graves aos 7 dias. A partir de então, caiu bruscamente para padrões leves no décimo quarto dia, estando ausente no vigésimo primeiro dia de pós-operatório (figuras 9, 10 e 11).

A quemose também serviu de parâmetro para aferir o grau de resposta inflamatória, demonstrando perfil semelhante àquele verificado na hiperemia conjuntival, visto que ambos os fenômenos

são governados pela mesma cadeia de eventos bioquímicos e celulares. Nos olhos submetidos apenas à remoção do epitélio, representados pelo grupo 1, observou-se que a quemose evoluiu de leve, nas primeiras 24 horas, para moderada, nos primeiros 7 dias, diminuindo até o décimo quarto dia, quando, então, desapareceu. Nos olhos que receberam o implante de membrana conservada em glicerina, o edema da conjuntiva apresentou evolução clínica semelhante aos olhos que receberam a membrana a fresco. Em ambos os tratamentos a quemose apresentou índices moderados no dia seguinte à realização da cirurgia, evoluindo para intenso no terceiro dia e mantendo-se assim até o sétimo dia de observação. A partir de então, em ambos os tratamentos, houve tendência de queda, sendo que no grupo que recebeu a membrana a fresco esta foi mais rápida, permitindo o desaparecimento dos sintomas aos 21 dias, o que não aconteceu com o grupo tratado com a membrana conservada, o qual apresentou, ao final das observações, índices leves de quemose (figuras 12, 13 e 14).

A neovascularização da córnea se mostrou ausente nas primeiras 72 horas em todos os grupos, mantendo-se como tal no grupo 1 em quase todos os momentos de observação do experimento, tendo sido verificada uma ligeira tendência de neoformação vascular, em alguns animais, no sétimo dia (figura 15). Já nos grupos tratados, observou-se discreta injeção ciliar a partir do limbo, já no terceiro dia de pós-operatório, a qual progrediu para níveis moderados até o sétimo dia. Quatorze dias após a aplicação das membranas, ambos os grupos tratados apresentaram vascularização intensa, a qual regrediu para índices moderados no grupo que recebeu a membrana conservada em glicerina e leves nos olhos tratados com a membrana a fresco (figuras 16 e 17).

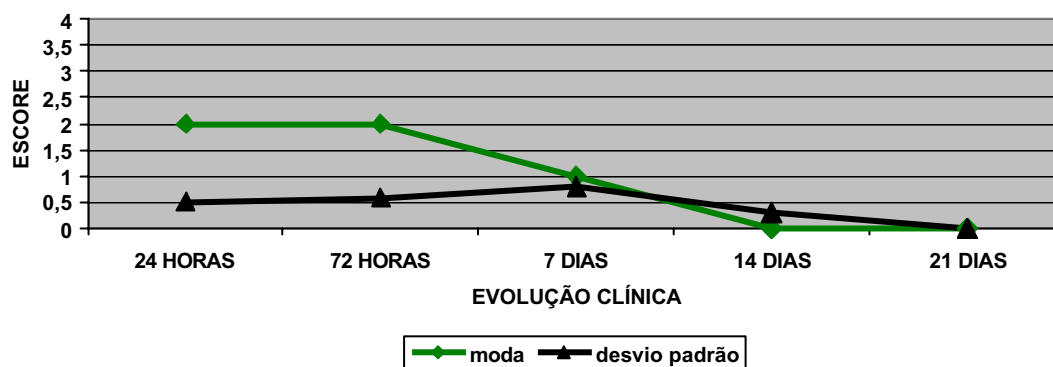


FIGURA 3: Representação gráfica da evolução clínica dos fenômenos de fotofobia e blefarospasmo em olhos submetidos à remoção do epitélio corneal com n-heptanol.

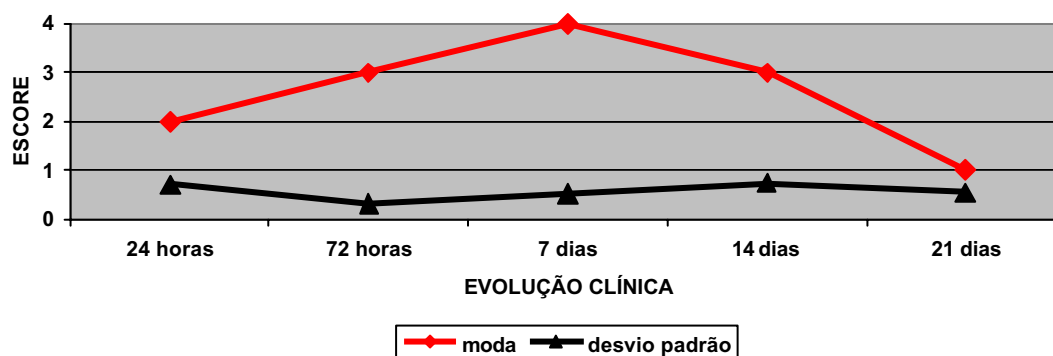


FIGURA 4: Representação gráfica da evolução clínica dos fenômenos de fotofobia e blefarospasmo em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenógena conservada em glicerina.

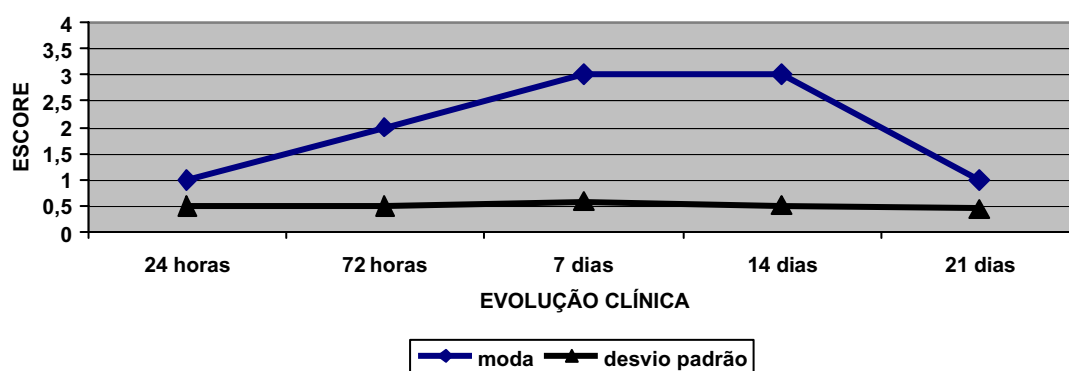


FIGURA 5: Representação gráfica da evolução clínica dos fenômenos de fotofobia e blefarospasmo em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenógena a fresco.

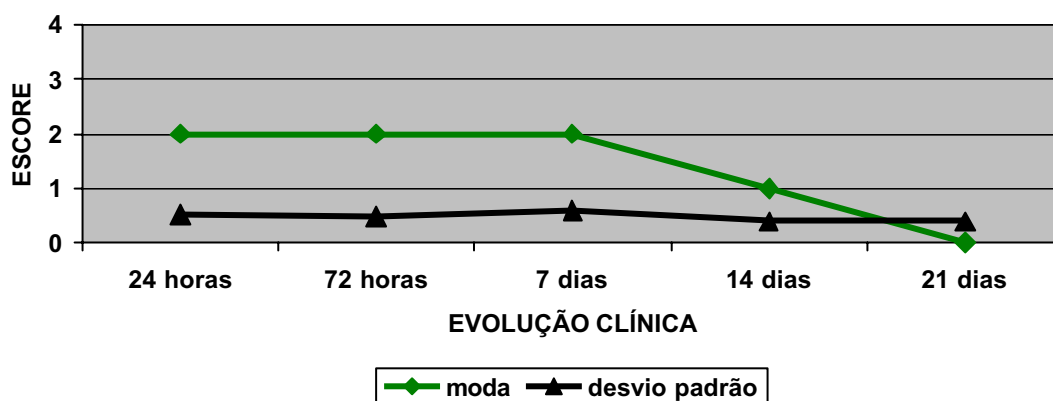


FIGURA 6: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de hiperemia conjuntival em olhos submetidos à remoção do epitélio corneal com n-heptanol.

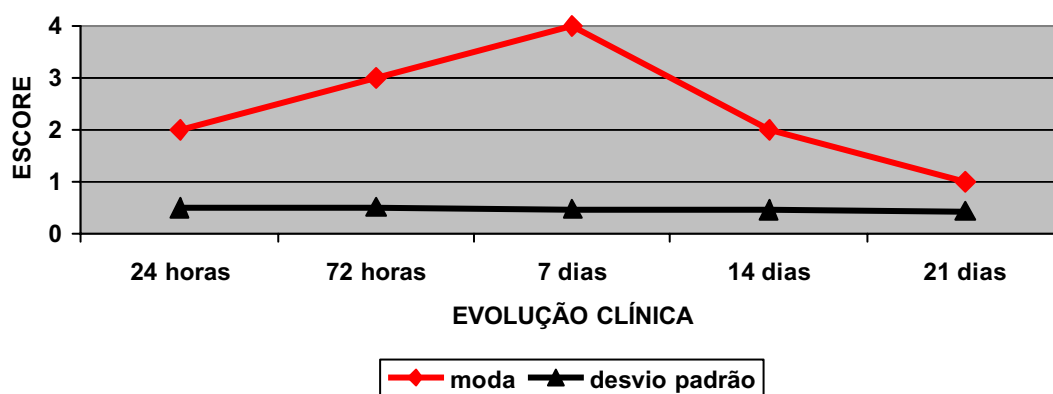


FIGURA 7: representação gráfica da evolução clínica do fenômenos de hiperemia conjuntival em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.

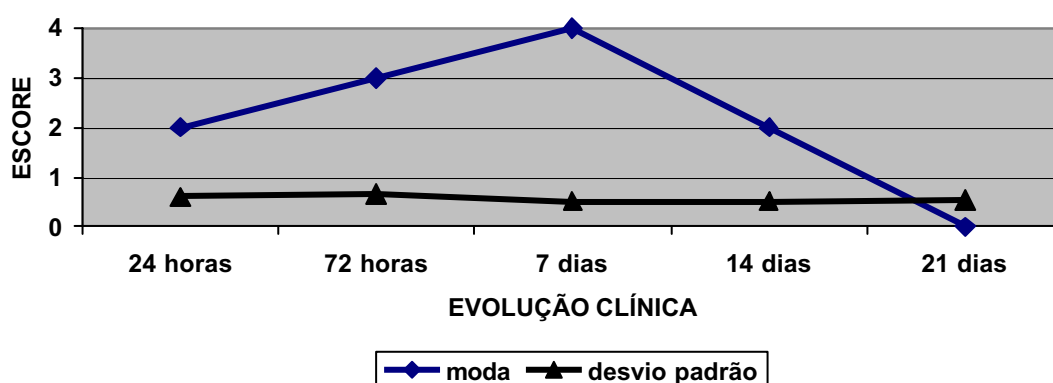


FIGURA 8: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de hiperemia conjuntival em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga a fresco.

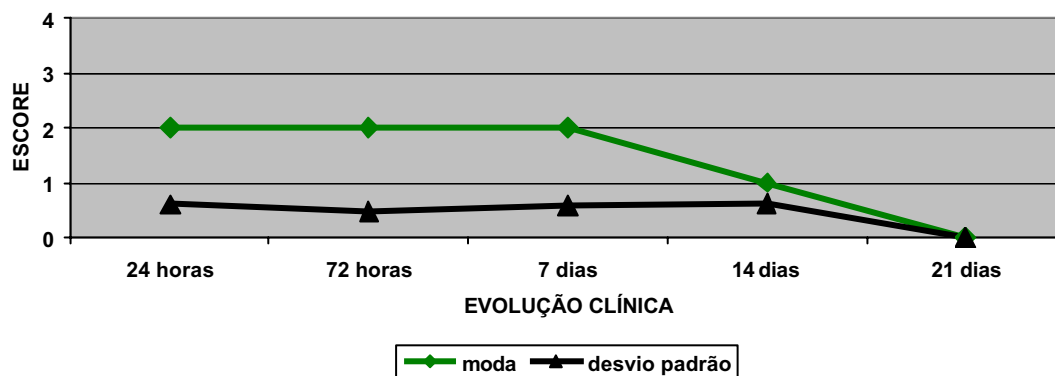


FIGURA 9: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de secreção ocular em olhos submetidos à remoção do epitélio corneal com n-heptanol.

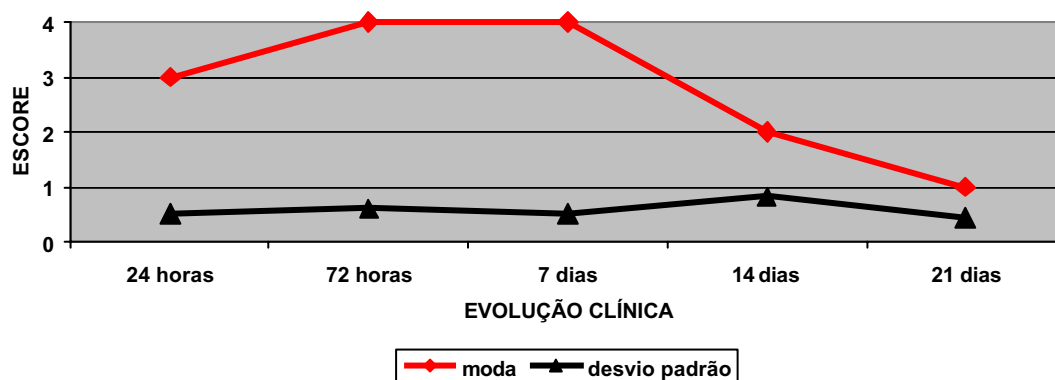


FIGURA 10: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de secreção ocular em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.

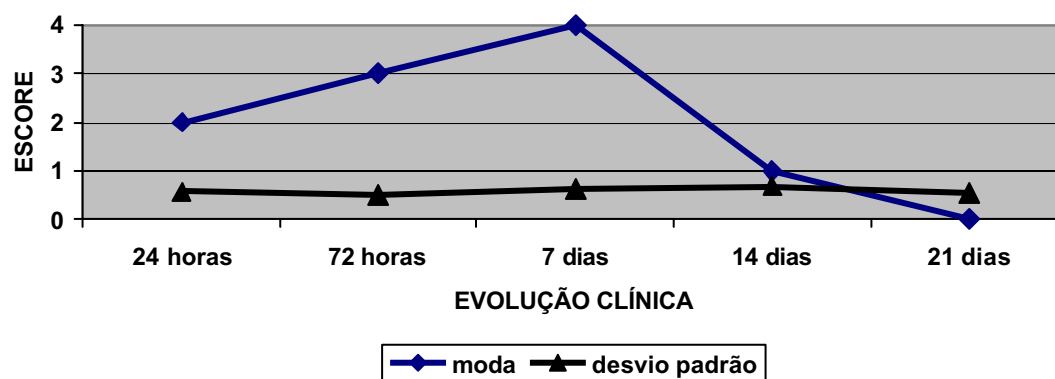


FIGURA 11: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de secreção ocular em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga a fresco.

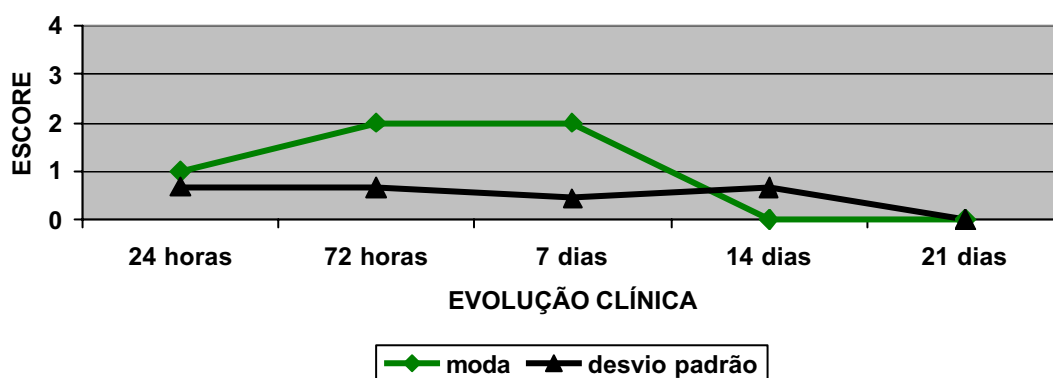


FIGURA 12: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de quemose em olhos submetidos à remoção do epitélio corneal com n-heptanol.

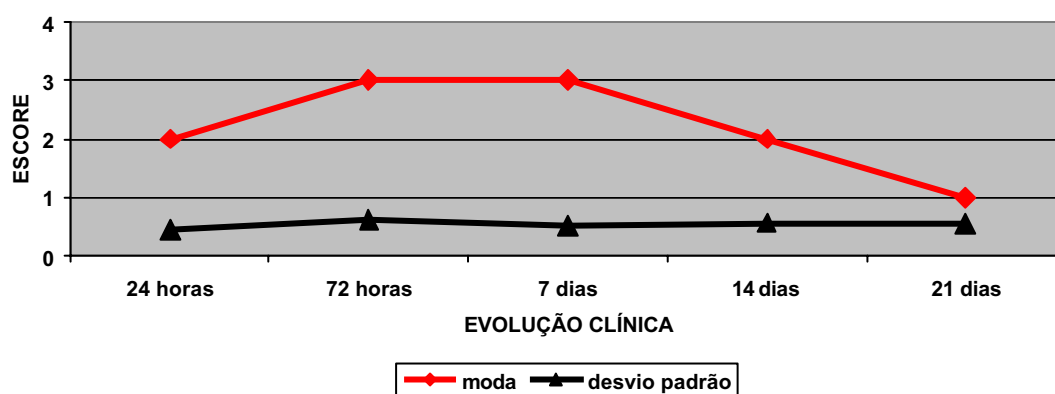


FIGURA 13: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de quemose em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.

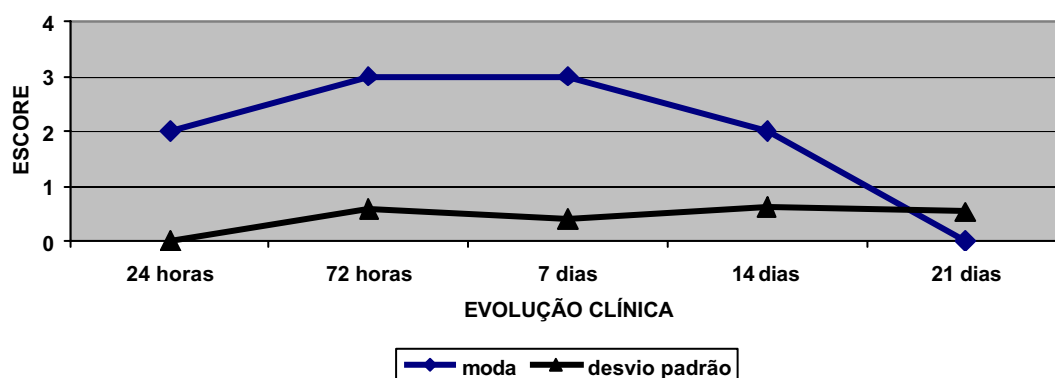


FIGURA 14: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de quemose em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica a fresco.

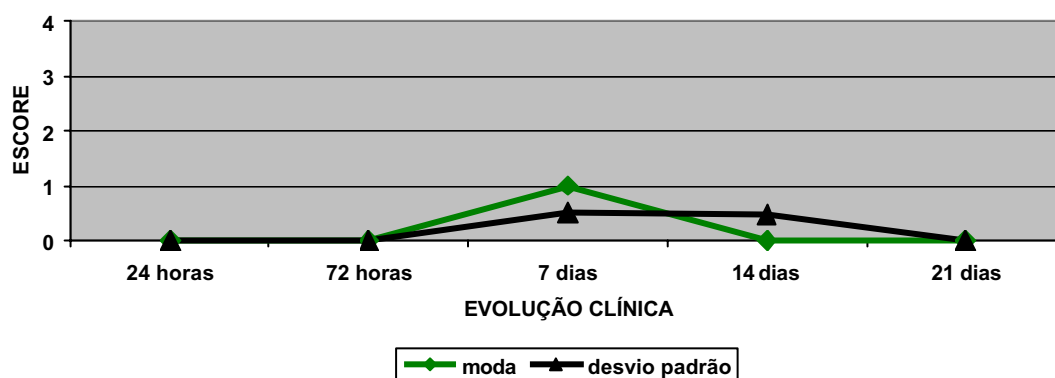


FIGURA 15: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de neovascularização corneal em olhos submetidos à remoção do epitélio corneal com n-heptanol.

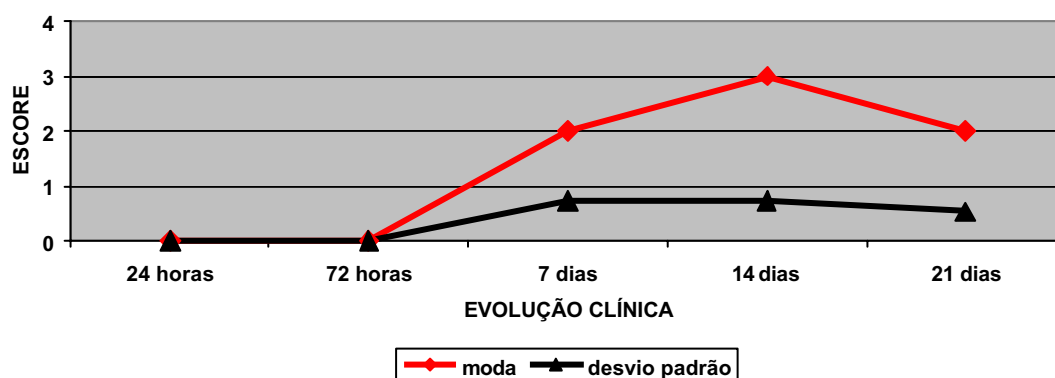


FIGURA 16: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de neovascularização corneal em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina.

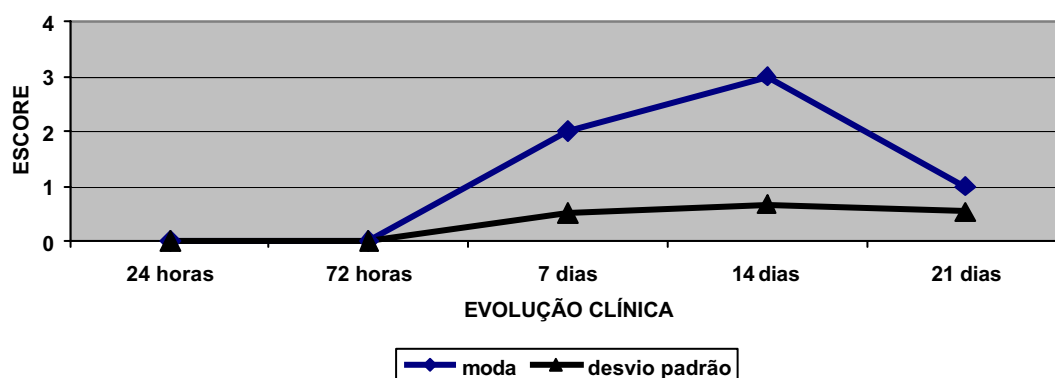


FIGURA 17: representação gráfica da evolução clínica do fenômeno de neovascularização corneal em olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga a fresco.

O edema da córnea não foi representado graficamente, pois, a presença da membrana impediu o seu registro até que a mesma se mostrasse ausente da superfície ocular. Porém, observou-se que o edema se fez presente, de forma leve, em alguns olhos do grupo 1, entre o segundo e o sétimo dia de observação, desaparecendo totalmente a partir do oitavo dia de pós-operatória. Vale ressaltar que o edema de córnea apresentado por estes olhos não comprometeu a visão, como pode ser comprovado mediante a análise das figuras 18 a 22. No grupo tratado com a membrana conservada em glicerina, observou-se edema corneal com índices que variaram de moderado a intenso após o desprendimento do enxerto, o que ocorreu em média no décimo dia, tornando-se mais grave a partir do décimo quarto dia, o que coincidiu com o aumento da vascularização da córnea. A partir desta data e, simultaneamente ao decréscimo da intensidade da vascularização, o edema corneal diminuiu, apresentando-se, aos 21 dias, com índice leve de manifestação (figuras 32 a 34). Nos olhos que receberam a membrana amniótica xenógena a fresco, o edema também passou a ser observado a partir do momento que houve a perda do enxerto, o que aconteceu, em média, a partir do sétimo dia de pós-operatório (figuras 38 a 43). Nesta fase, o edema se mostrou moderado, tendendo a diminuir a partir de então e mostrando-se ausente já no décimo quarto dia após a realização da cirurgia.

Ainda com relação ao edema da córnea, vale ressaltar que, em ambos os grupos tratados, o mesmo se mostrou mais intenso na região central, diminuindo simultaneamente em tamanho e intensidade, à medida que ocorria a epitelização do defeito criado na córnea. Paralelamente ao desaparecimento do edema, em ambos os grupos tratados, observou-se a instalação de uma área

opaca na região central das córneas que receberam o implante, fenômeno este que sugere a presença de uma cicatriz, como seqüela ao processo de reparação. Nestes animais, a cicatriz se apresentou moderada aos 14 dias e leve aos 21 dias de pós-operatório, com tendência em se manifestar menos opaca nos animais que receberam a membrana amniótica xenógena a fresco (figuras 32 a 34 e 38 a 43).

Com relação ao tempo de permanência da membrana sobre a área de ceratectomia, observou-se que a mesma manteve-se por mais tempo nos olhos que receberam a membrana conservada em glicerina. Em média, a membrana permaneceu aplicada sobre a superfície da córnea por um período de 10 dias, não se observando, em nenhum dos animais deste grupo, o desprendimento do implante com tempo inferior a 7 dias. Dos 10 animais dos subgrupos 3 e 4, 3 apresentaram a membrana firmemente aderida ao olho aos 12 dias de pós-operatório (figuras 27 a 32). No grupo que recebeu a membrana a fresco, o implante permaneceu firmemente aderido sobre a superfície ocular por apenas 6 dias, em média, sendo que poucos animais apresentaram a membrana, ainda íntegra, no sétimo dia de observação (figuras 35 a 39). No grupo que recebeu a membrana a fresco sobre a córnea intacta, a mesma não permaneceu por tempo superior a 3 dias, rompendo-se precocemente na região central e mantendo-se ainda ancorada na periferia, por meio dos pontos de sutura.

A reparação do defeito epitelial artificialmente criado com a aplicação do álcool n-heptanol e da ação mecânica da lâmina de bisturi, se apresentou de forma variável nos grupos em estudo; porém, observou-se que os fenômenos reparativos passaram a se manifestar de forma mais organizada após a redução dos sinais

de inflamação. No grupo 1, o qual foi submetido apenas à ceratectomia, observou-se que 24 horas após a remoção do epitélio, a córnea ainda apresentava-se desnuda, corando inteiramente com a fluoresceína, o que pode ser visto nas figuras 18 e 19. Decorridas 72 horas da cirurgia, observou-se a epitelização centrípeta da córnea, com recobrimento epitelial da margem corneal próxima ao limbo (figuras 20 e 21). Aos 7 dias de pós-operatório, dos 15 animais operados, 5 ainda apresentaram a parte central da córnea com ausência de recobrimento epitelial; porém, a tendência foi de completa epitelização do defeito aos 7 dias, em média, para os demais animais (figuras 22 e 23).

Nos animais do grupo 2, os quais receberam a membrana conservada em glicerina, observou-se, após o desprendimento do enxerto, que todos os olhos apresentavam áreas de tamanho variável com ausência de epitélio. Registrou-se, ainda, que os fenômenos reparativos foram mais eficientes após a completa eliminação da membrana, e que a mesma, enquanto presa à margem da córnea pela sutura, funcionou como fator limitante ao processo de cicatrização. Em média, a cicatrização se fez completa aos 12 dias de pós-operatório, sendo que alguns animais ainda apresentaram pequena área com ausência de epitélio aos 14 dias de observação (figura 32).

Nos animais do grupo 3, tratados com a membrana a fresco, as áreas com ausência de epitélio se mostraram menores em todos os tempos de observação, quando comparados com os animais que receberam a membrana conservada em glicerina. Aos 7 dias, observou-se pequena lesão central, a qual, em média, desapareceu aos 10 dias de pós-operatório (38 a 41).

Como pode ser observado pela análise das fotografias,

a membrana amniótica xenógena obtida de bovinos apresentou comportamento diferente, quando aplicada após um período de permanência em glicerina a 100%, comparada com a membrana transplantada a fresco. Dentre as diferenças observadas, o tempo de permanência do enxerto sobre a córnea se mostrou maior na membrana conservada em glicerina, tendo sido registrado que a mesma se manteve, em média, por 10 dias aplicada sobre a córnea (figuras 27 a 31). Já a membrana aplicada a fresco permaneceu sobre o local do enxerto por um período médio de 6 dias (figuras 35 a 38). É possível afirmar que a glicerina diminuiu a taxa de autólise da membrana, permitindo-lhe sobreviver em média mais 4 dias sobre a córnea dos animais que receberam o implante de membrana após conservação na glicerina, quando comparado com os olhos que receberam o implante da membrana a fresco. Vale também comentar que após a autólise, a membrana normalmente permaneceu ancorada no limbo pela sutura. Nestes casos, observou-se que a membrana contribuiu para agredir a superfície da córnea, interferindo de forma negativa nos mecanismos de reparação da superfície ocular, o que pode ser comprovado na análise das figuras 31, 32, 34, 38 e 39.

As figuras 27 e 35 ilustram, respectivamente, olhos submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenógena conservada em glicerina a 100% e a fresco, imediatamente após a aplicação do enxerto. Observa-se leve hiperemia conjuntival, resultante da ação irritante do n-heptanol utilizado para promover a remoção do epitélio. Os enxertos foram ancorados na região do limbo, com 8 pontos simples separados, utilizando-se fio sintético monofilamentado 6-0. Observa-se boa transparência do implante a fresco, mesmo quando corado com fluoresceína. Os olhos que

receberam a membrana conservada em glicerina apresentaram comportamento semelhante, imediatamente após a aplicação do enxerto. Os olhos também se mostraram ligeiramente irritados, com leve hiperemia conjuntival e quemose. A principal diferença observada se limitou a uma moderada opacidade da membrana amniótica submetida à conservação com a glicerina, quando comparada com a membrana a fresco, a qual se mostrou com melhor transparência (figuras 27 a 31 e 35 a 36).

É possível observar ainda que os animais do grupo 1 seguiram um padrão normal de cicatrização, com a diminuição gradativa dos fenômenos inflamatórios nos primeiros 7 dias, o que ocorreu simultaneamente ao avanço dos fenômenos reparativos, representados pela epitelização do defeito criado na córnea (figuras 18 a 26).

As figuras 32 a 34 e 38 a 43 permitem acompanhar o desenvolvimento da reação de vascularização das córneas dos grupos 2 e 3, respectivamente, a qual passa de uma vascularização superficial aos 14 dias para uma vascularização mais profunda aos 21 dias de pós-operatório, com tendência a diminuir, visto que a cicatrização do defeito já se fez completa e a inflamação já cedeu.

Nos animais do grupo 4, os quais receberam o implante da membrana amniótica xenógena à fresco sobre a superfície da córnea íntegra, observou-se que os mesmos não apresentaram sinais de inflamação dignos de nota, em nenhum momento de observação. Houve apenas a manifestação de dor leve, 24 horas após a cirurgia, tendo a mesma desaparecido após 3 dias de observação. A membrana aplicada sobre a córnea íntegra permaneceu por no máximo 3 dias, rompendo-se precocemente no

centro e permanecendo ainda por algum tempo presa pela sutura ancorada na região do limbo. Isto demonstra que não houve boa aderência da membrana sobre o epitélio da córnea. Os animais do grupo 5 permaneceram como testemunha durante toda a execução do experimento, não tendo sido observada, nos olhos destes animais, nenhuma alteração que pudesse responsabilizar os fatores ambientais nas alterações registradas para os grupos 1, 2, 3 e 4.

5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA AVALIAÇÃO CLÍNICA

Executou-se a análise estatística dos indicadores numéricos utilizados na demonstração gráfica dos parâmetros anteriormente comentados (tabelas 3 a 17; figuras 3 a 17). Utilizou-se, para tanto, a comparação de duas médias, por meio do Teste T de Student, considerando-se uma significância de 5%. A análise foi realizada a partir da comparação entre os grupos 2 e 3, em cada momento de observação, para cada parâmetro ilustrado graficamente. Com base no valor da média e do desvio padrão, obtido, a partir dos índices de cada variável ao longo do experimento, obteve-se a seguinte análise estatística.

Para os fenômenos de fotofobia e blefarospasmo conclui-se que, no intervalo compreendido entre 24 horas e 7 dias, o desconforto apresentado pelo grupo tratado com a membrana conservada em glicerina foi significativamente maior. A partir do décimo quarto dia, não houve diferença estatística desta variável entre os grupos comparados.

O fenômeno de hiperemia conjuntival apresentou comportamento semelhante à variável anterior. Nos primeiros 14 dias de observação, a manifestação clínica de hiperemia conjuntival foi estatisticamente superior nos animais tratados com a membrana xenógena conservada em glicerina, quando comparado com aqueles que receberam a membrana a fresco. Aos 21 dias de observação não foi verificada diferença estatística entre os grupos avaliados estatisticamente.

Já para o fenômeno de secreção ocular, não foi verificada diferença estatística entre os grupos 2 e 3 nos primeiros 7 dias de pós-operatório. Porém, a partir do sétimo dia, a diferença

entre os dois grupos foi significativa, com o grupo 2 apresentando um maior volume de secreção que o grupo 3.

Para a quemose, verificou-se diferença significativa entre os grupos 2 e 3 apenas nas primeiras 72 horas, com o grupo 2 apresentando índices significativamente maiores neste intervalo de tempo. A partir das 72 horas de observação, não se verificou diferença estatística entre os dois grupos.

A neovascularização só foi observada após o sétimo dia, apresentando diferença estatística entre os grupos 2 e 3 apenas no sétimo dia, quando a neoformação vascular foi significativamente maior no grupo 2. Nos intervalos subsequentes, não se verificou diferença significativa entre os dois grupos.



Figura 18: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, imediatamente após ser submetido à aplicação de n-heptanol e remoção do epitélio corneal, sem fluoresceína.



Figura 19: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, imediatamente após ser submetido à aplicação de n-heptanol e remoção do epitélio corneal, corado com fluoresceína.

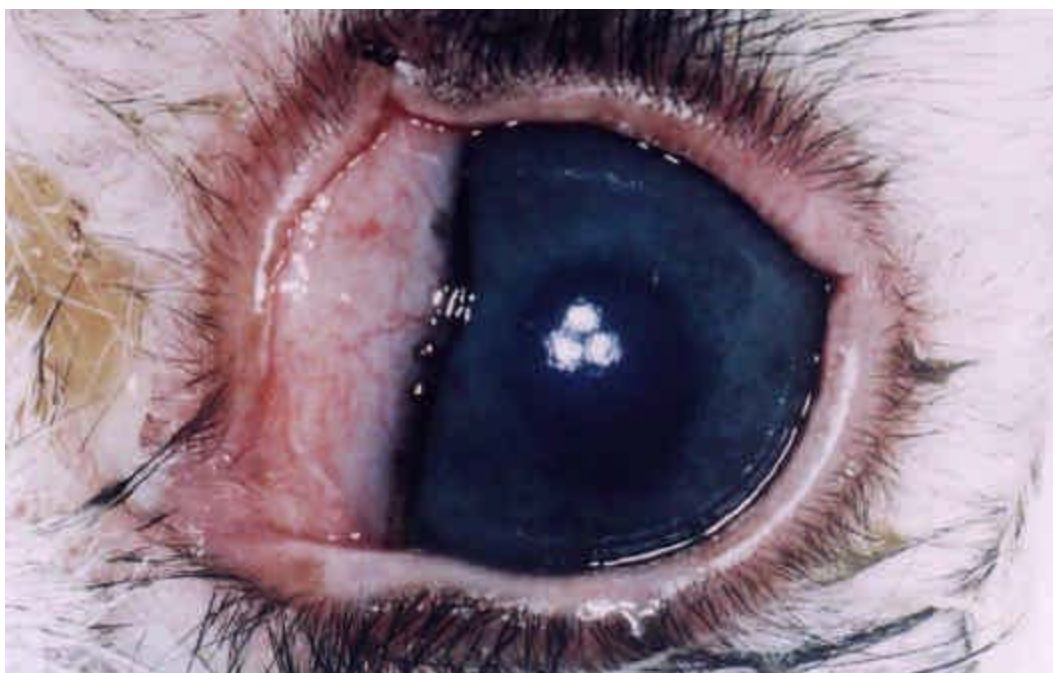


Figura 20: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, sem fluoresceína.



Figura 21: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com fluoresceína.



Figura 22: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, corada com fluoresceína 7 dias após a remoção do epitélio corneal.



Figura 23: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1 corada com fluoresceína, 7 dias após a remoção do epitélio corneal.



Figura 24: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, com aplicação de fluoresceína, 14 dias após a remoção do epitélio corneal.



Figura 25: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, com aplicação de fluoresceína, 14 dias após a remoção do epitélio corneal.



Figura 26: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 1, sem aplicação de fluoresceína, 21 dias após a remoção do epitélio corneal.

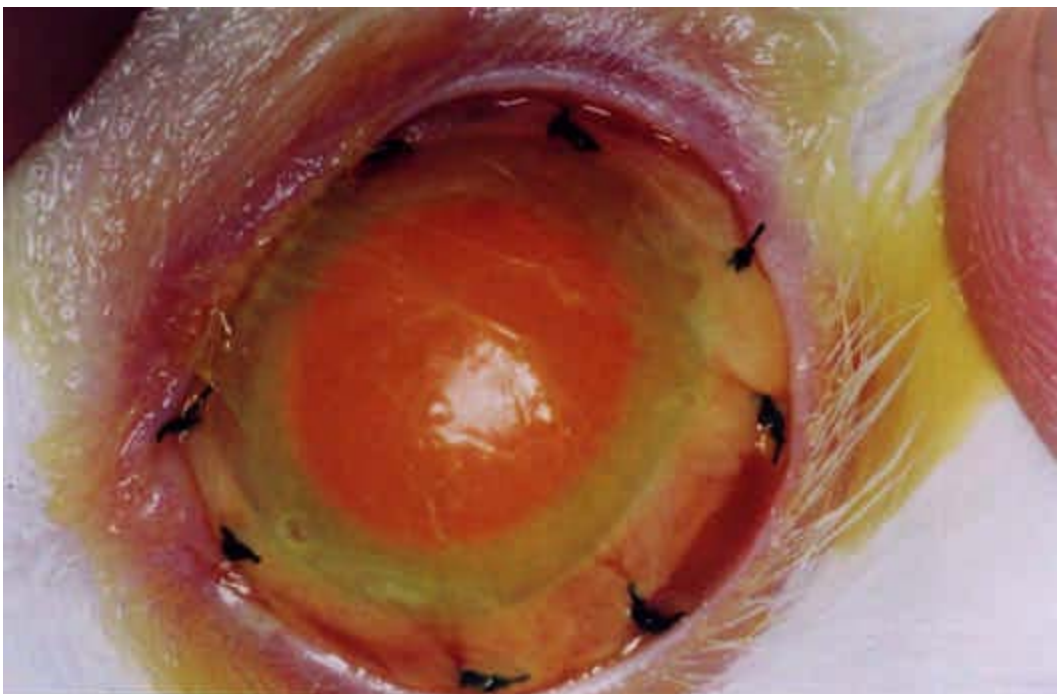


Figura 27: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, corada com fluoresceína, imediatamente após a aplicação do enxerto.



Figura 28: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, sem fluoresceína, 24 horas após a aplicação do enxerto.

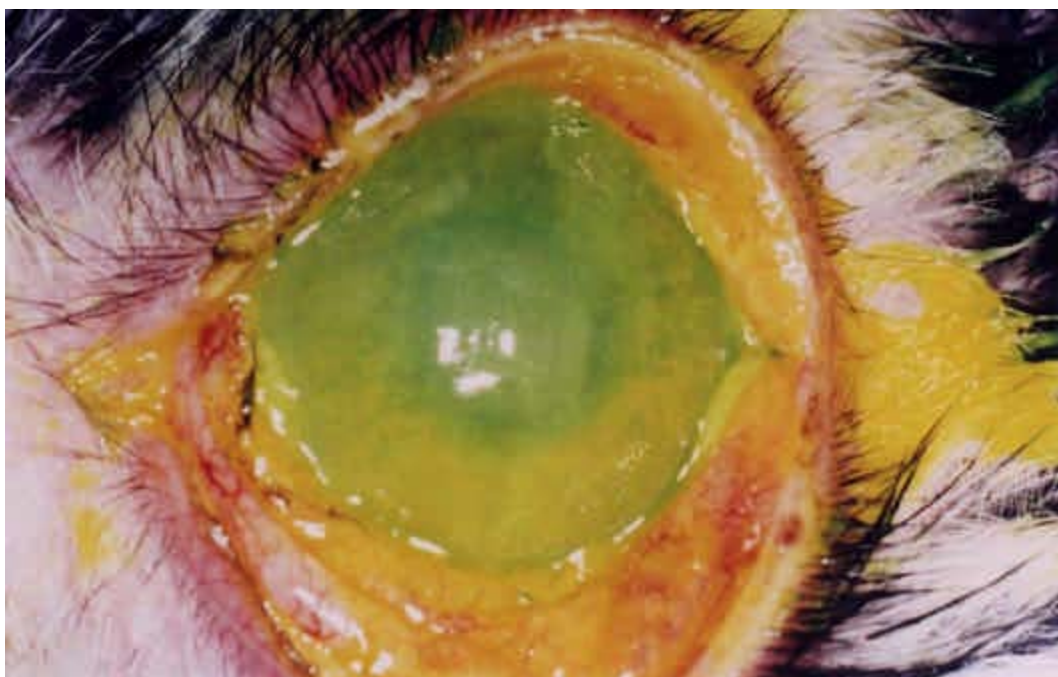


Figura 29: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 24 horas após a aplicação do enxerto.

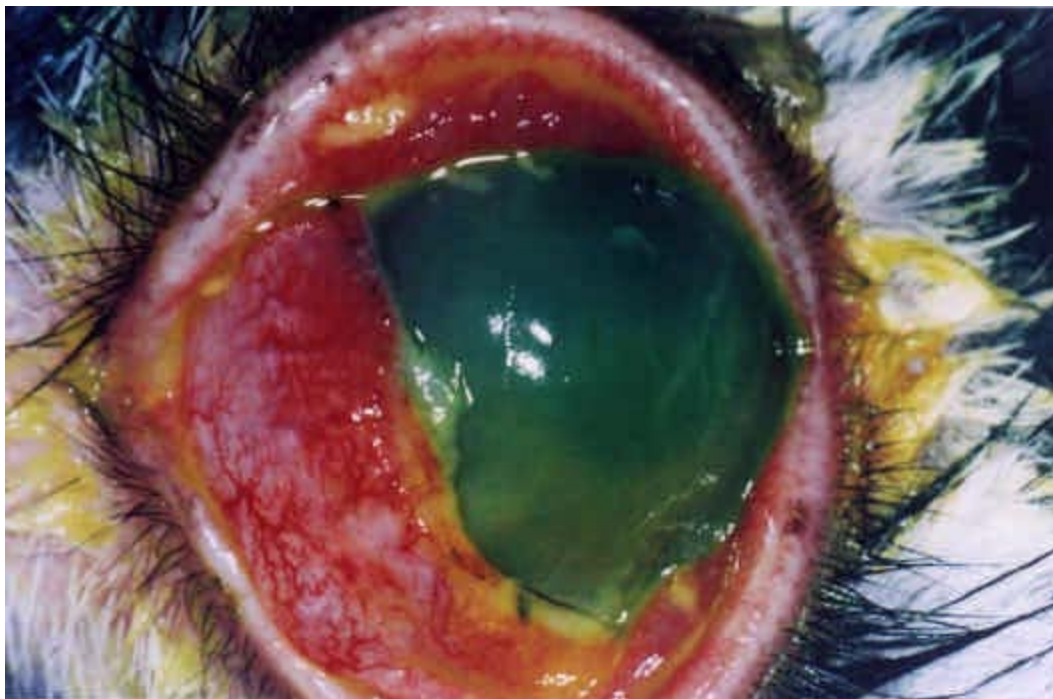


Figura 30: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 72 horas após a aplicação do enxerto.

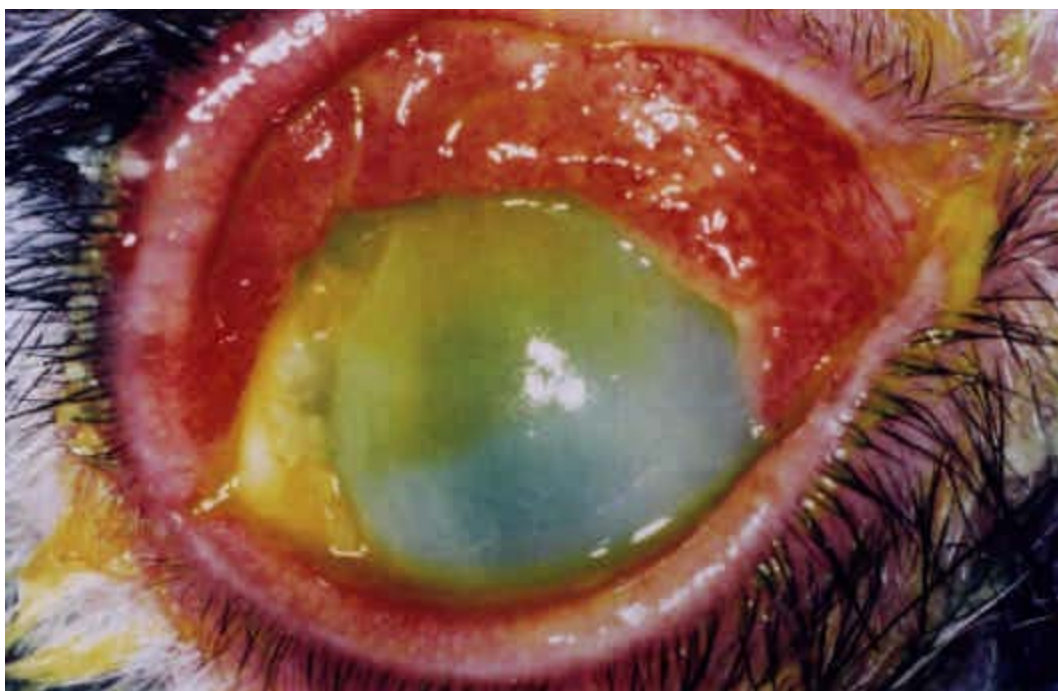


Figura 31: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 7 dias após a aplicação do enxerto.

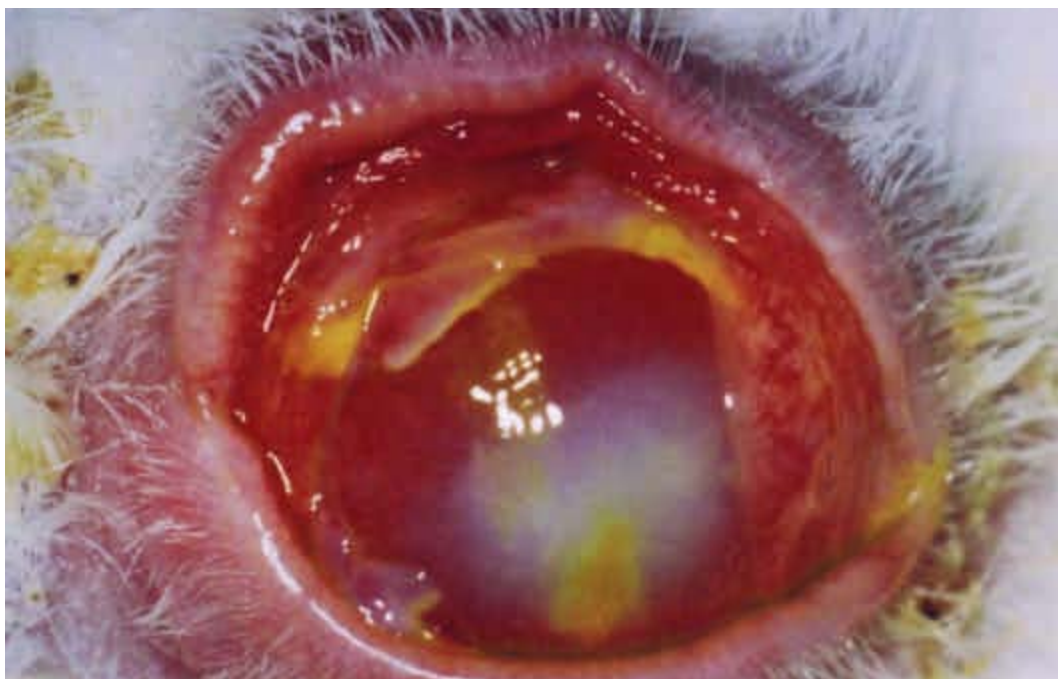


Figura 32: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 14 dias após a aplicação do enxerto.



Figura 33: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.



Figura 34: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 2, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.



Figura 35: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, corada com fluoresceína, imediatamente após a aplicação do enxerto.



Figura 36: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 24 horas após a aplicação do enxerto.



Figura 37: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 72 horas após a aplicação do enxerto.



Figura 38: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 7 dias após a aplicação do enxerto.



Figura 39: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 7 dias após a aplicação do enxerto.



Figura 40: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 14 dias após a aplicação do enxerto.



Figura 41: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 14 dias após a aplicação do enxerto.

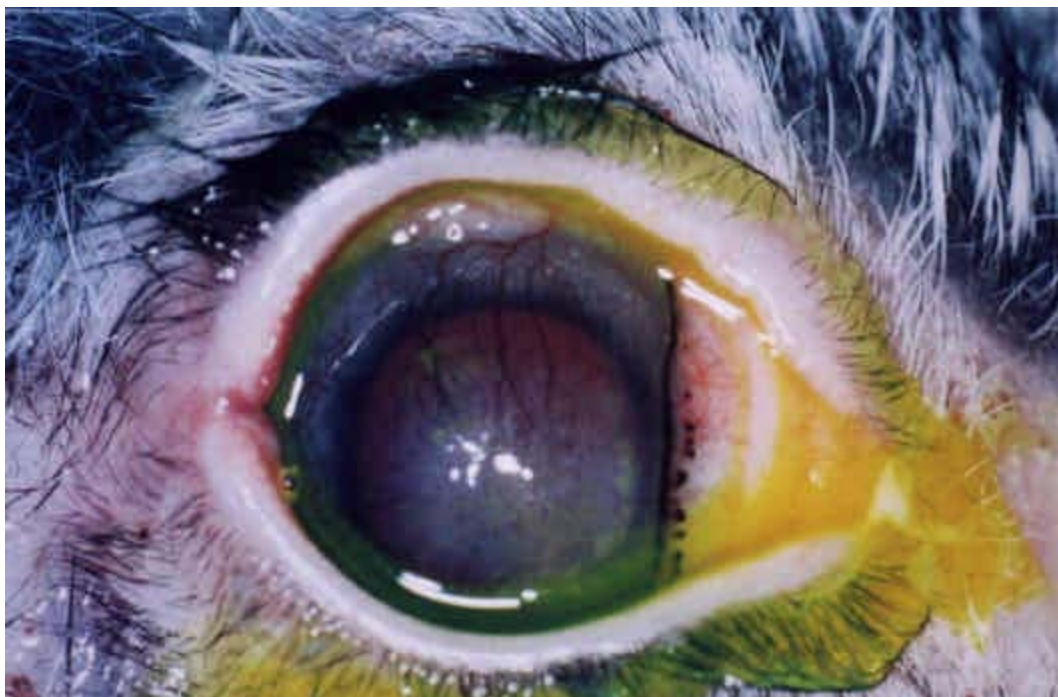


Figura 42: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.



Figura 43: Fotografia da superfície ocular de animal do grupo 3, com fluoresceína, 21 dias após a aplicação do enxerto.

5.2. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A avaliação microscópica permitiu caracterizar, com bastante precisão, a cinética do processo inflamatório e o perfil do infiltrado celular que se instalou na córnea dos olhos estudados, além de contribuir para a perfeita avaliação do fenômeno de reparação do epitélio corneal.

Inicialmente, estabeleceu-se o modelo padrão para a córnea do coelho, mediante a avaliação de um corte de córnea normal, proveniente dos animais do grupo 5. O estudo evidenciou a presença de 4 camadas bem definidas, representadas pelo epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Observou-se que o epitélio do tipo estratificado possui um número variado de camadas, que tendem a aumentar à medida que se aproxima da área de transição entre o epitélio corneal e conjuntival. As células epiteliais variaram em sua forma, apresentando-se de aparência colunar nas camadas mais internas e pavimentosas na porção mais superficial do epitélio. No estroma, foi possível observar uma população regular de fibroblastos, distribuídos simetricamente por toda a córnea, enquanto que na periferia, foi possível evidenciar a presença de vasos sanguíneos entre a esclera e a conjuntiva, como demonstrado na figuras 44 e 45. Não se observou a presença de células inflamatórias nos cortes de conjuntiva e córnea, durante a avaliação microscópica destes animais.

Nos animais que foram submetidos apenas à ceratectomia superficial, foi possível observar, 72 horas após a remoção da camada superficial da córnea, a expansão epitelial a partir do limbo, com a formação de camada única de células na

região central e camadas múltiplas à medida que se aproxima da região limbal. Nesta fase, é possível observar também um infiltrado inflamatório composto exclusivamente de células polimorfonucleares, com predomínio de neutrófilos e alguns eosinófilos. A distribuição das células inflamatórias não se mostrou simétrica, evidenciando-se uma concentração moderada de células do tipo polimorfonuclear na periferia, próximo ao limbo. Já na região central da córnea, o infiltrado se apresentou leve 3 dias após a ceratectomia, localizando-se preferencialmente na porção mais superficial do estroma sem cobertura epitelial e na porção subepitelial, onde o processo de expansão e migração já havia iniciado (figuras 46, 47 e 48). Foi possível também observar uma maior concentração de vasos sanguíneos na região limbal, com a tendência destes em avançar para o estroma da córnea, particularmente na região periférica. Além da expansão epitelial, verificou-se, já nesta fase, um aumento da população de fibroblastos jovens, indicando mais uma vez que o processo de reparação da córnea tem início imediatamente após a agressão, apesar da ausência de vasos sanguíneos em condições normais (figura 46).

Aos 7 dias, as córneas do grupo 1 demonstraram a presença de infiltrado inflamatório ainda moderado na região periférica. Já na região central da córnea, o infiltrado permaneceu leve; porém, agora, distribuído pelas camadas mais profundas do estroma. Observou-se uma maior expansão epitelial, já com a restauração quase que completa da camada mais superficial da córnea. Apesar do nível de expansão ter se mostrado satisfatório quanto à área de cobertura, notou-se que o mesmo se apresentou estreito na região central, composto, às vezes, por camada única de

células epiteliais que se apresentaram de forma achatada, caracterizando o processo de expansão celular (figuras 48 e 49). A proliferação vascular não progrediu, mantendo-se igual ao descrito para o período de 72 horas.

Aos 14 dias, o exame microscópico revelou que houve completa formação do epitélio corneal, com multiplicação das camadas e regularização da forma das células, as quais passaram a se apresentar mais alongadas. Os fenômenos inflamatórios começaram a ceder, tendo sido evidenciado leve infiltrado inflamatório, ainda composto exclusivamente por células polimorfonucleares, na região periférica, principalmente ao redor dos vasos sanguíneos, os quais apareceram em número e tamanho semelhante ao encontrado aos 7 dias; porém, presentes em planos mais profundos na periferia da córnea. As células inflamatórias passaram a ser encontradas ocasionalmente na região central da córnea, estando as mesmas distribuídas simetricamente pelas camadas mais profundas do estroma. Aos 21 dias, observou-se perfeita organização do epitélio e diminuição do infiltrado inflamatório periférico. Uma avaliação mais minuciosa permitiu evidenciar a presença de pequenos vasos sanguíneos próximos à região central da córnea, ao redor dos quais observou-se um pequeno infiltrado inflamatório.

Já nos animais que receberam a membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, verificou-se que, 3 dias após a aplicação do enxerto, os fenômenos inflamatórios apresentaram índices maiores de manifestação, quando comparados ao grupo submetido apenas à ceratectomia. Percebeu-se infiltrado inflamatório intenso distribuído pelas camadas do estroma

na região periférica, com tendência do mesmo em se estender para a região central, na qual a quantidade de células polimorfonucleares se mostrou moderada, com maior concentração na porção superficial do estroma, principalmente abaixo do epitélio recentemente formado. Observou-se, nesta fase, que a membrana funcionou como importante barreira de contenção contra a penetração de células inflamatórias, o que pode ser observado na análise das figuras 50 e 51. É possível evidenciar a expansão do epitélio corneal a partir do limbo, abaixo da membrana amniótica (figura 52). Nestes animais, a proliferação vascular se mostrou mais intensa na periferia, tendo sido observado que alguns vasos ocasionalmente apresentaram-se mais longos, ultrapassando o limite de transição entre córnea e esclera, invadindo o estroma em direção ao centro. Aos 3 dias de pós-operatório, os animais que receberam a membrana amniótica xenóloga a fresco apresentaram, ao exame microscópico, comportamento igual ao grupo tratado com a membrana conservada em glicerina. O infiltrado inflamatório apresentou o mesmo perfil de células do tipo polimorfonuclear, com predominância de neutrófilos, e a membrana também se mostrou eficiente na contenção das células inflamatórias vindas da superfície ocular, o que pode ser verificado pelo pequeno número de células inflamatórias na porção do estroma mais próxima da lesão (figura 53).

Com 7 dias de pós-operatório, observou-se grande progresso na formação epitelial de ambos os grupos que receberam a membrana amniótica, com maior expansão nos animais tratados com a membrana a fresco. Nesta fase já foi possível observar uma maior proliferação de células inflamatórias nos animais que receberam a membrana conservada em glicerina. Nestes, o infiltrado

se apresentou intenso na região periférica, moderado na porção subepitelial central e leve nas camadas inferiores do estroma, também na região central da córnea. A proliferação vascular também se mostrou mais intensa, com tendência de expansão vascular nas camadas mais profundas e centrais da córnea. Nesta fase ainda é possível identificar a membrana amniótica que foi conservada em glicerina presa na superfície ocular (figura 54). Os olhos tratados com a membrana a fresco apresentaram perfil de distribuição das células inflamatórias semelhante; porém, o infiltrado se mostrou moderado na região periférica e na porção subepitelial central e leve nas camadas profundas do estroma central. A neoformação vascular se mostrou também menos intensa nesta fase, no enxerto a fresco, quando comparado com o enxerto conservado em glicerina (figura 55).

Aos 14 dias já foi possível verificar que o epitélio já se encontrava completamente formado em todos os animais dos grupos tratados com enxerto de membrana amniótica. O infiltrado inflamatório se mostrou menor tanto nos olhos que receberam a membrana a fresco quanto naqueles tratados com a membrana conservada em glicerina. Observou-se um menor povoamento das células inflamatórias na região subepitelial, que passou a se mostrar de intensidade semelhante ao infiltrado verificado no estroma. Apesar da resposta inflamatória na porção central da córnea ter se mostrado mais amena neste período, o mesmo não ocorreu na periferia. Nesta região, o infiltrado se mostrou moderado em ambos os grupos tratados com a membrana amniótica xenóloga. Também se observou o aumento no número e calibre dos vasos sanguíneos, os quais passam a penetrar na porção mais central da córnea,

principalmente no interior do estroma (figuras 56 e 57). É possível verificar também a congestão vascular, a qual passa a existir a partir deste momento no grupo 2 (figura 56).

Completados 21 de pós-operatório, tanto os olhos tratados com o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, quanto aqueles que receberam o enxerto a fresco, demonstraram índices de resposta inflamatória bastante diminuídos. Apesar da neoformação vascular ter se mostrado mais intensa na região central da córnea, na região periférica os vasos diminuíram em número e tamanho. O epitélio corneal se mostrou estratificado em toda a superfície onde anteriormente existia a lesão, com a presença de algumas células inflamatórias do tipo polimorfonuclear, distribuídas entre as células epiteliais (figuras 58 e 59). Nos animais que receberam a membrana a fresco é possível observar, aos 21 dias, uma moderada congestão vascular na intimidade do tecido corneal (figura 60). Já nos animais que receberam o enxerto de membrana amniótica xenógena observou-se que, apesar a redução nos sinais macroscópicos e microscópicos de inflamação, a congestão vascular ainda era intensa, como pode ser verificado na figura 61. Um indício de que, apesar da instalação de um equilíbrio aparente entre os fenômenos inflamatórios e reparativos, ainda havia estímulo para o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares é a intensa diapedese, observada na figura 62. Nesta figura é possível observar a marginação leucocitária e a passagem de células do tipo polimorfonuclear para o estroma da córnea do grupo tratado com a membrana conservada em glicerina, 21 dias após a aplicação do enxerto.

A figura 63 ilustra um corte de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, demonstrando a capacidade de adesão da membrana amniótica sobre o estroma. Esta figura contrasta com as figuras 50 e 53, as quais demonstram a membrana afastada da superfície do estroma corneal. Isto se deve ao tipo de tratamento aos quais as lâminas foram submetidos. Na figura 63, as lâminas foram congeladas, o que manteve a intimidade da ligação da membrana com a córnea. Já as figuras 50 e 53 foram submetidas à conservação com formol, o que interrompeu a adesão da membrana à córnea. Pelos aspectos clínicos, enquanto presente sobre a superfície ocular, tanto a membrana aplicada a fresco quanto conservada em glicerina demonstraram uma boa capacidade de adesão sobre a superfície da córnea cujo epitélio foi química e mecanicamente removido.



Figura 44: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho, em condições normais, com aumento de 100 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, demonstrando a transição do epitélio da córnea para o epitélio conjuntival.

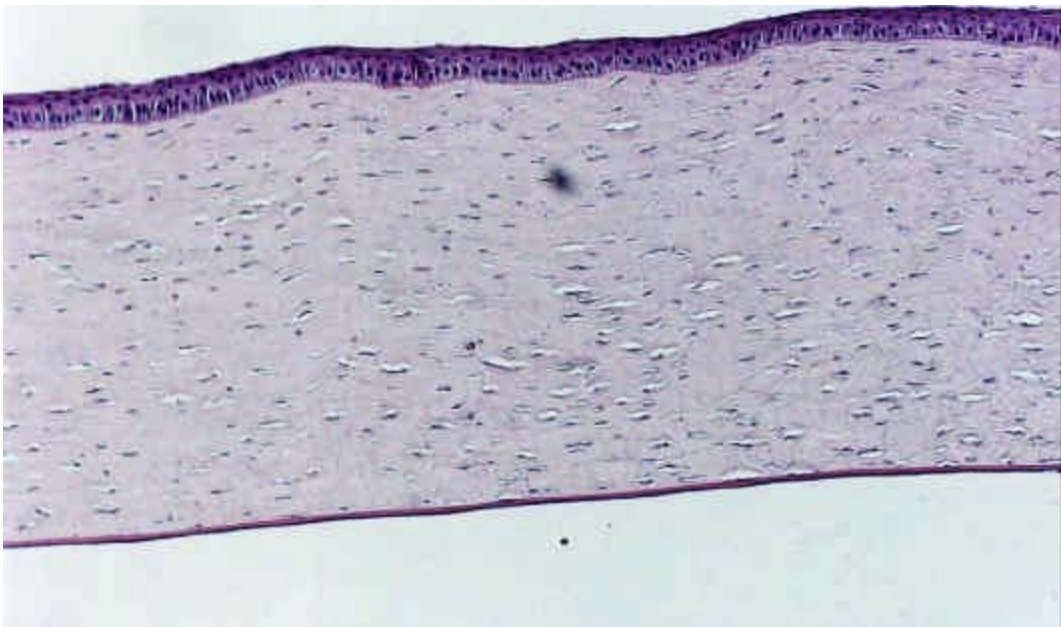


Figura 45: Fotomicrografia da região central da córnea de coelho corada pela técnica de hematoxilina e eosina, em condições normais, demonstrando as camadas bem definidas e o epitélio íntegro sobre o estroma (aumento de 100 x).

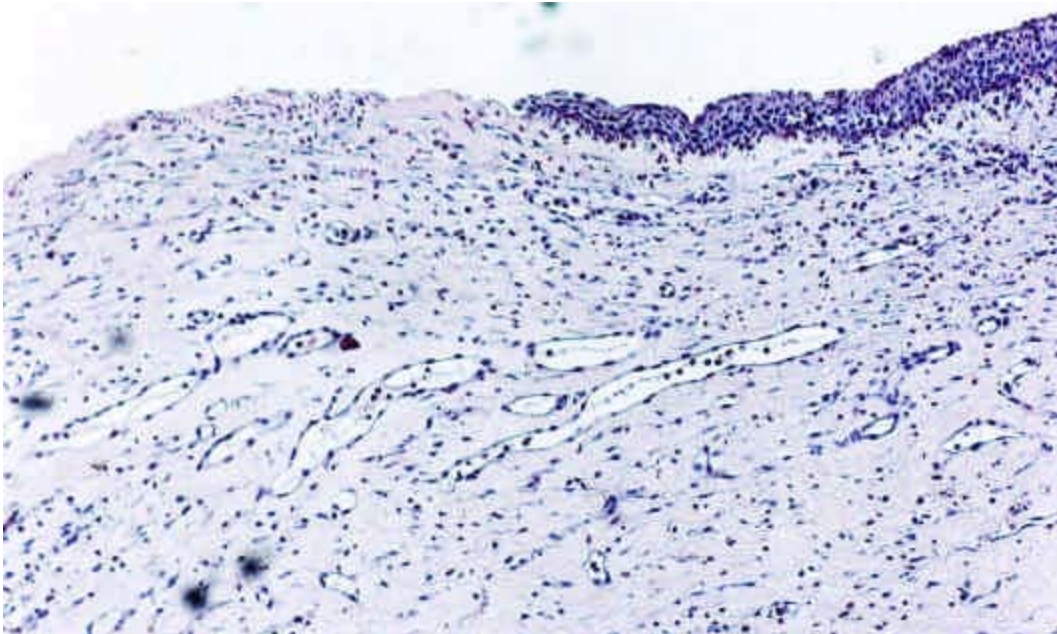


Figura 46: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com aumento de 100 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina. Observa-se a expansão do epitélio da córnea.

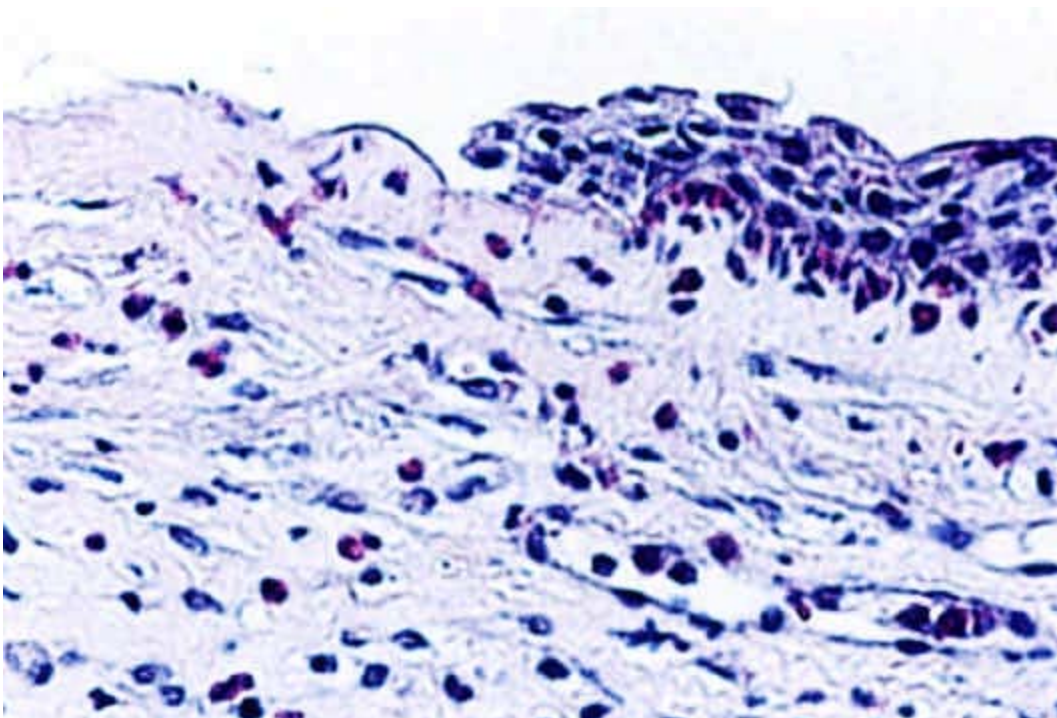


Figura 47: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com aumento de 400 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina. Observa-se a expansão do epitélio da córnea.

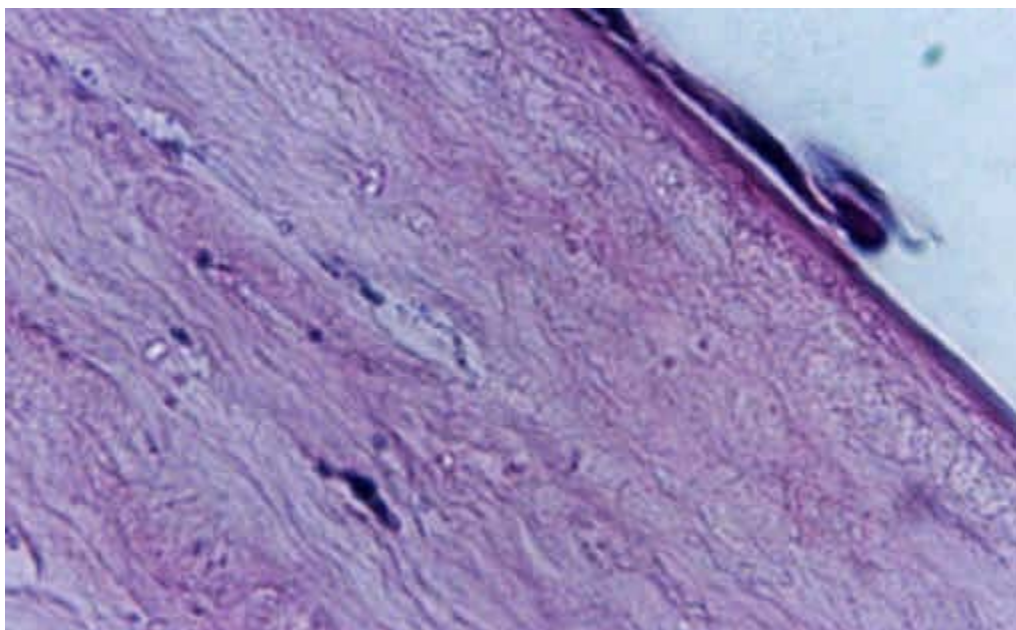


Figura 48: Fotomicrografia da região periférica da córnea de coelho do grupo 1, 72 horas após a remoção do epitélio, com aumento de 1000 vezes, corada pela técnica de hematoxilina e eosina. Observa-se a expansão do epitélio da córnea.



Figura 49: Fotomicrografia da região central da córnea de coelho, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, 7 dias após a remoção do epitélio, demonstrando a total reparação do defeito (aumento de 100 x).

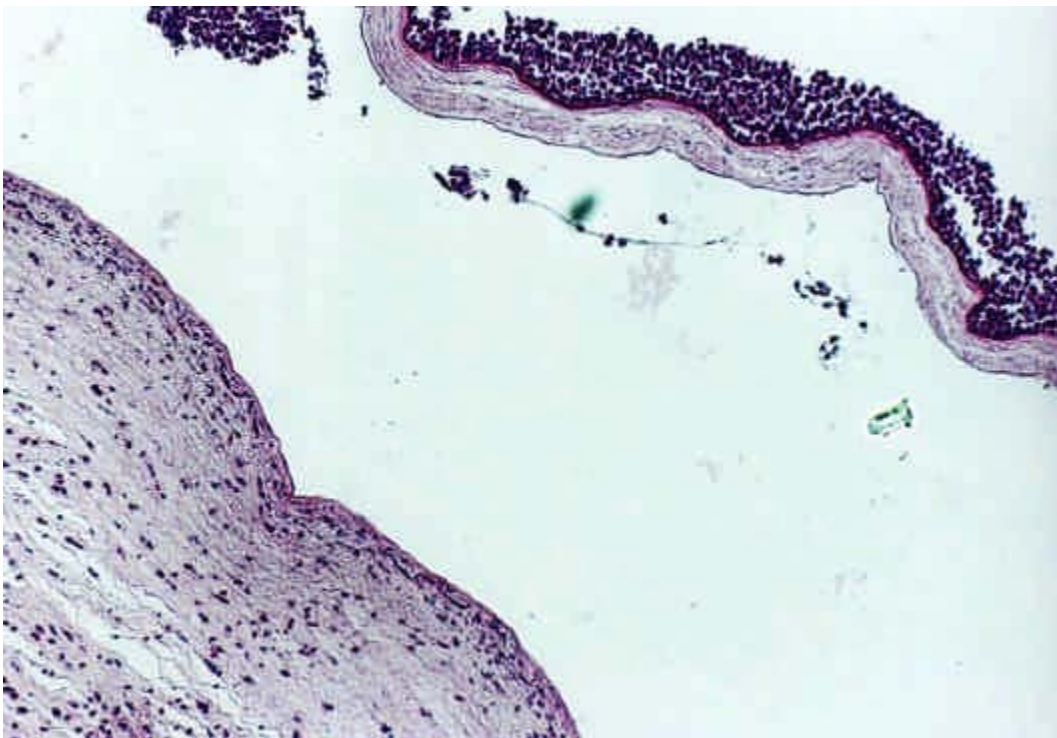


Figura 50: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

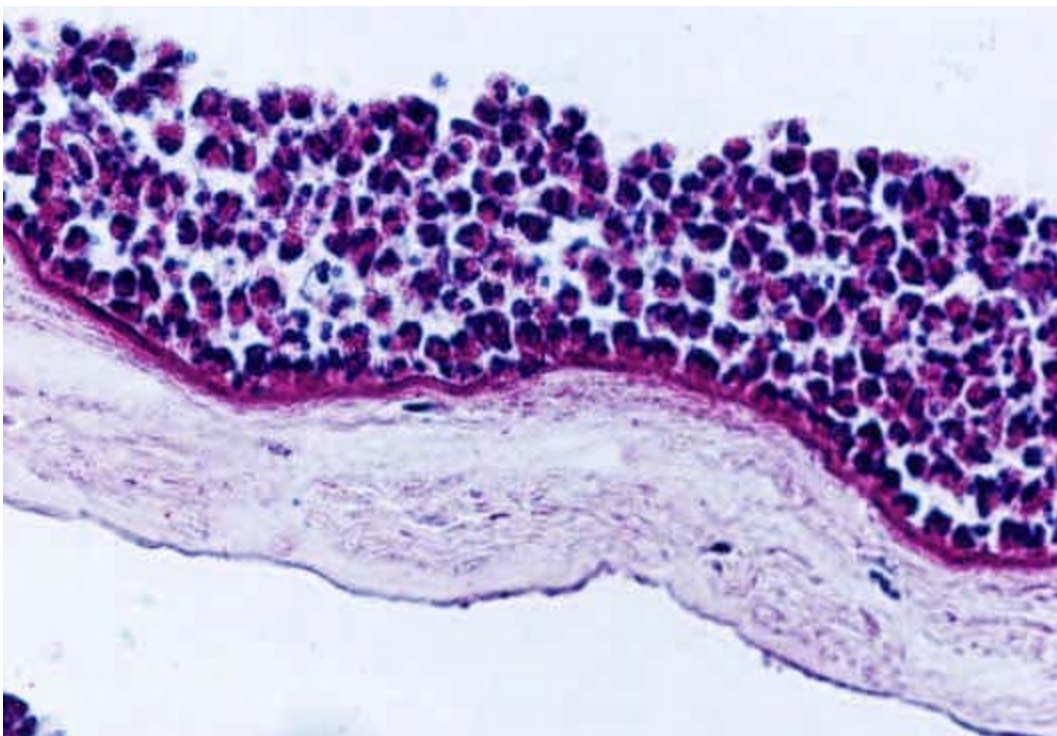


Figura 51: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 400X.

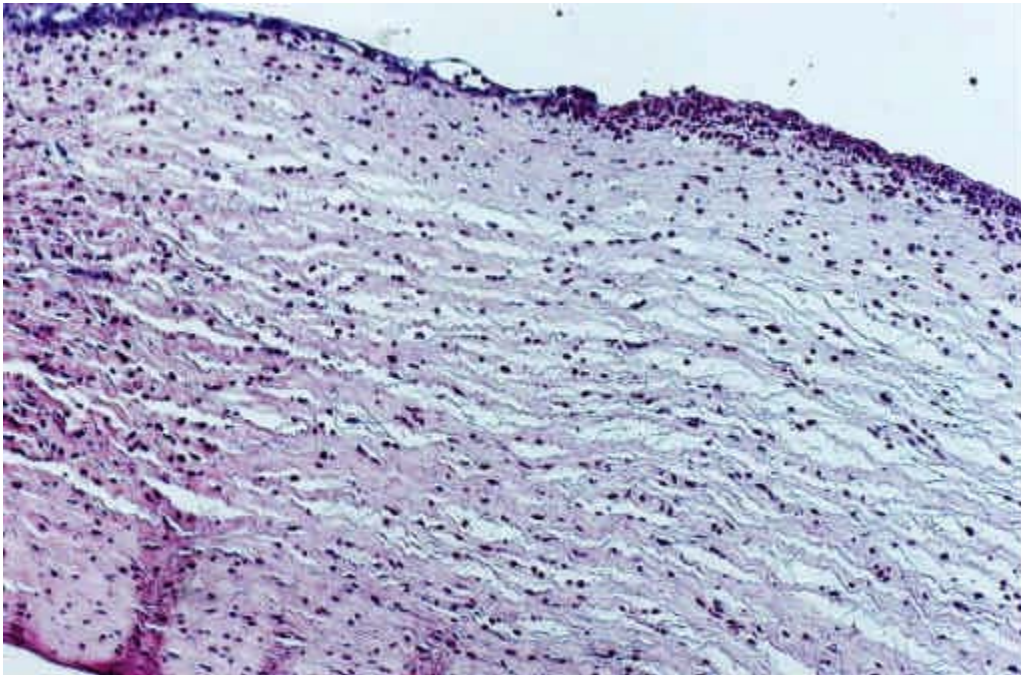


Figura 52: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

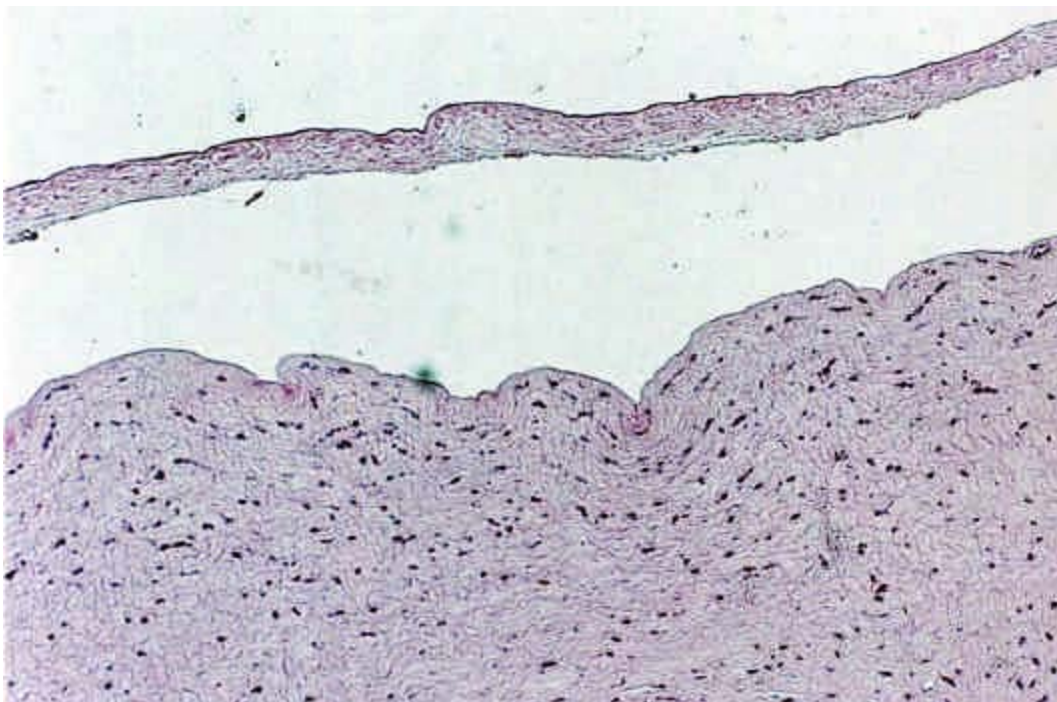


Figura 53: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

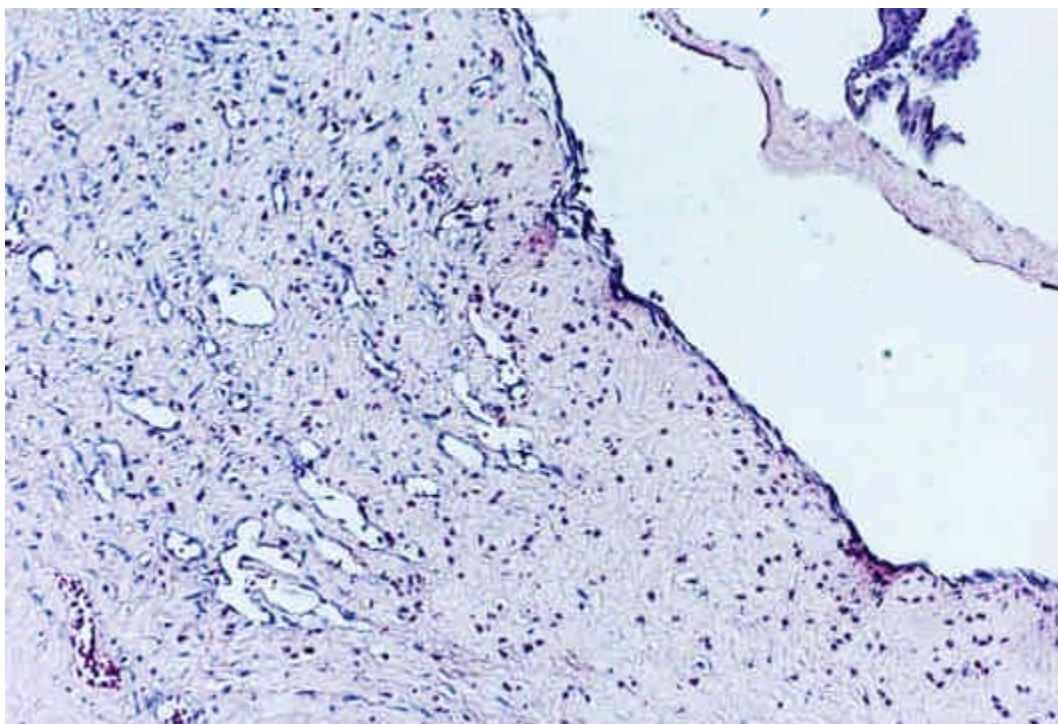


Figura 54: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 7 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

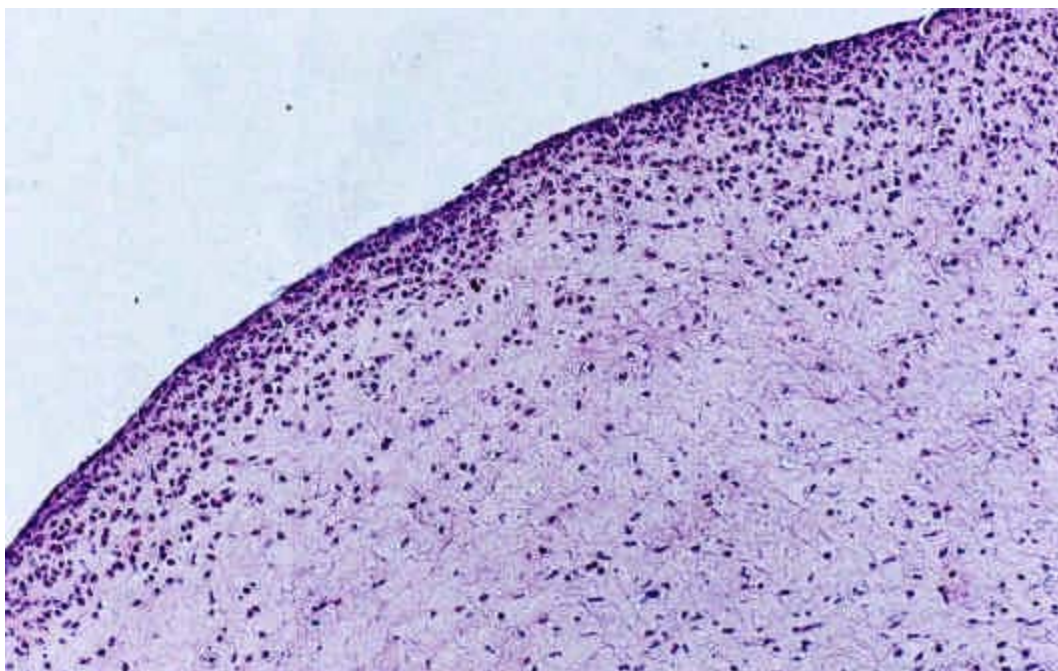


Figura 55: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 7 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

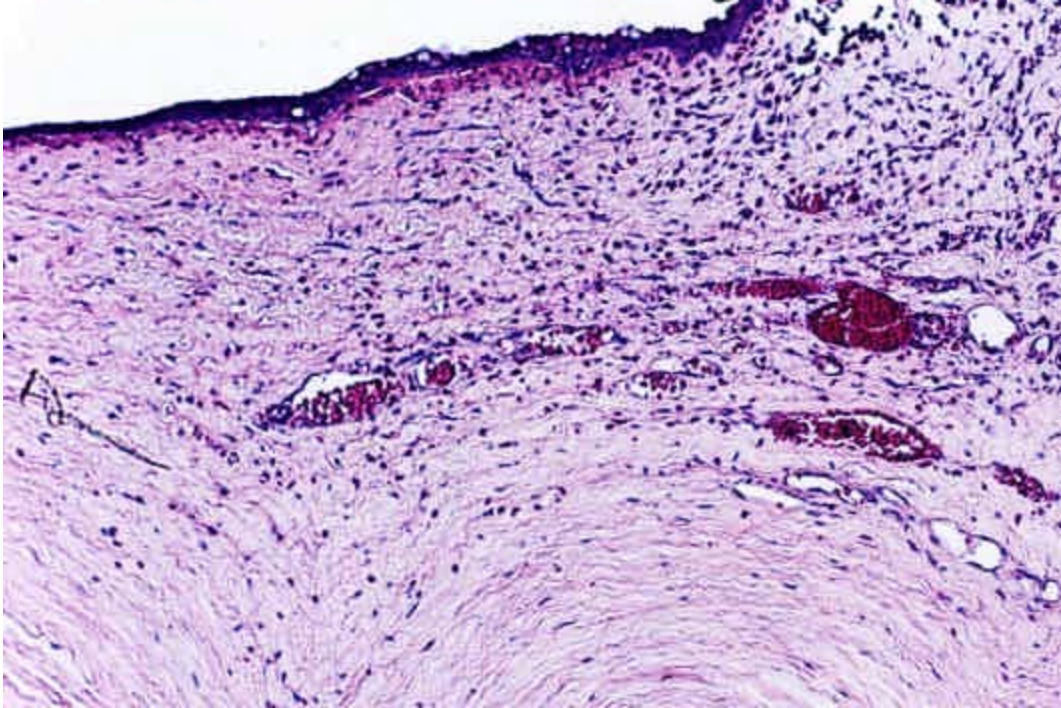


Figura 56: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 14 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 400X.

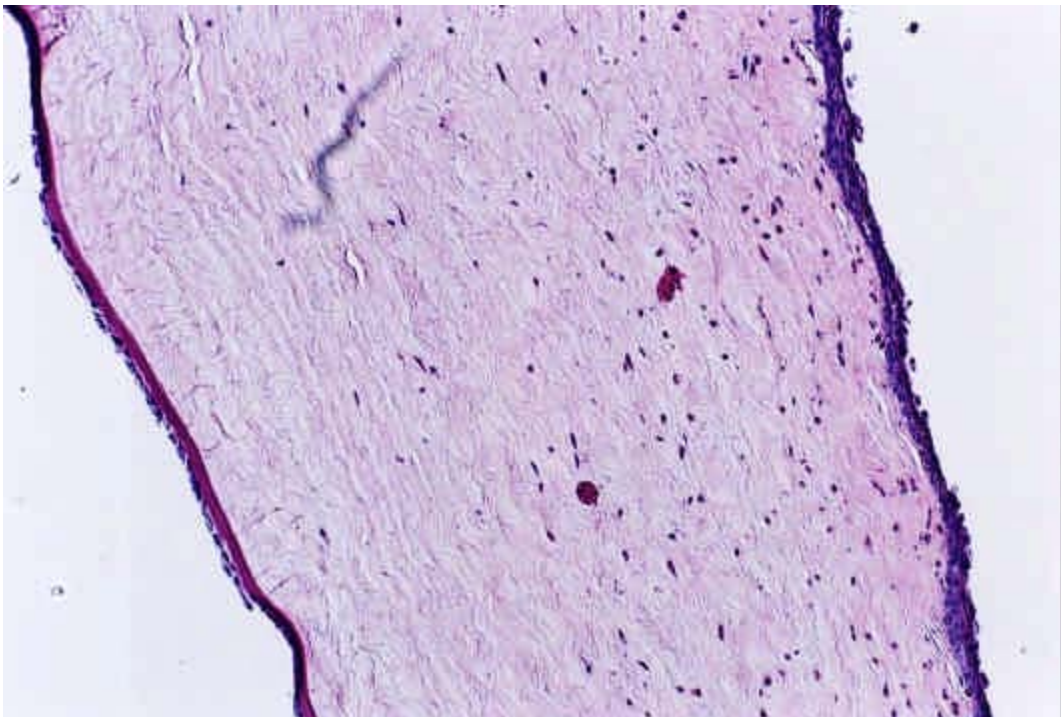


Figura 57: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 7 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

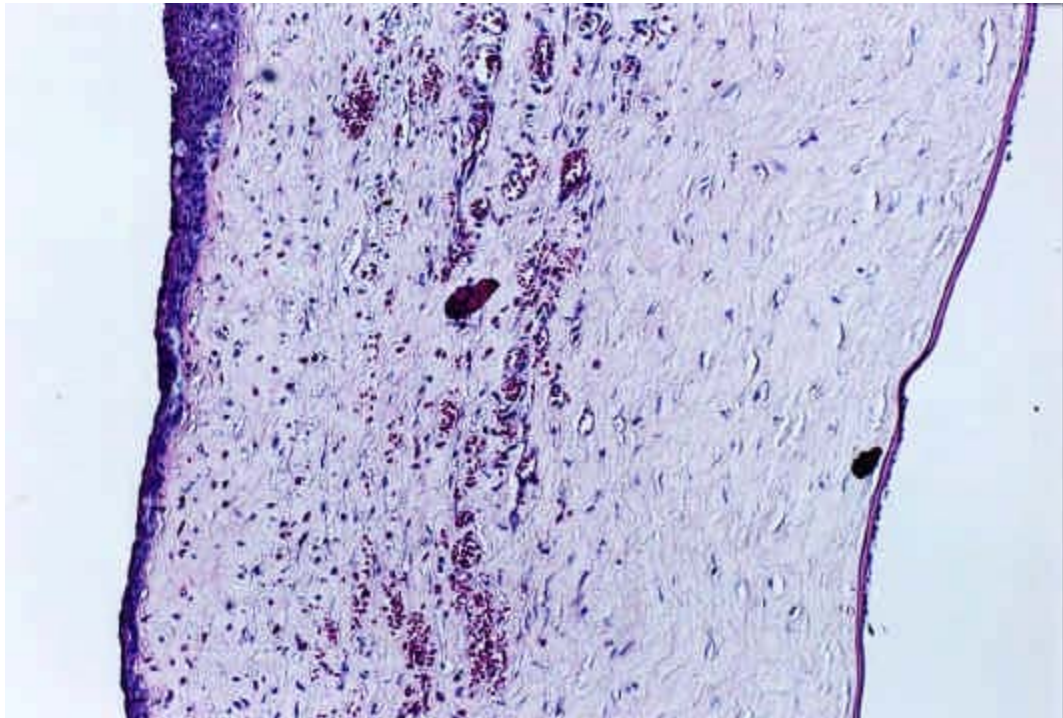


Figura 58: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

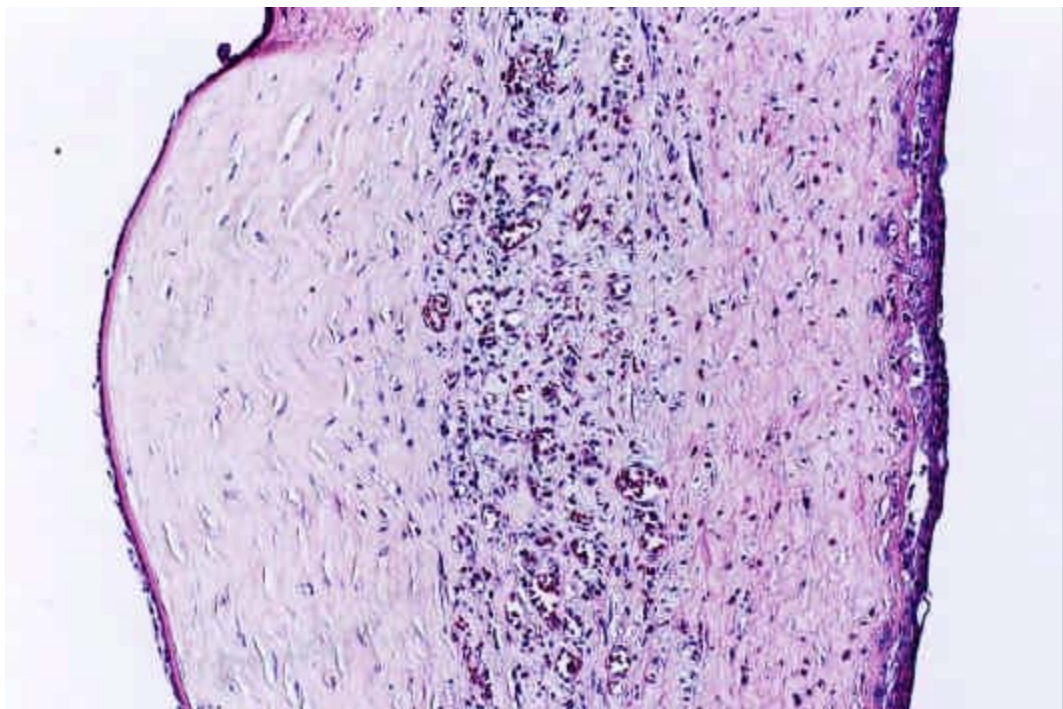


Figura 59: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 100X.

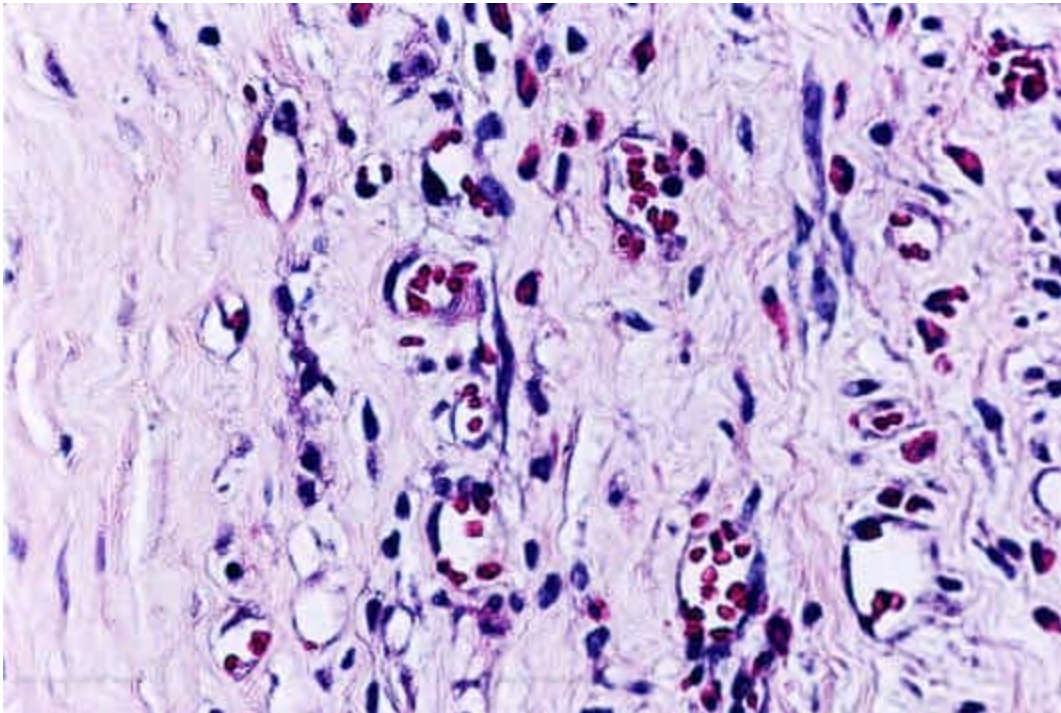


Figura 60: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena a fresco, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 400X.

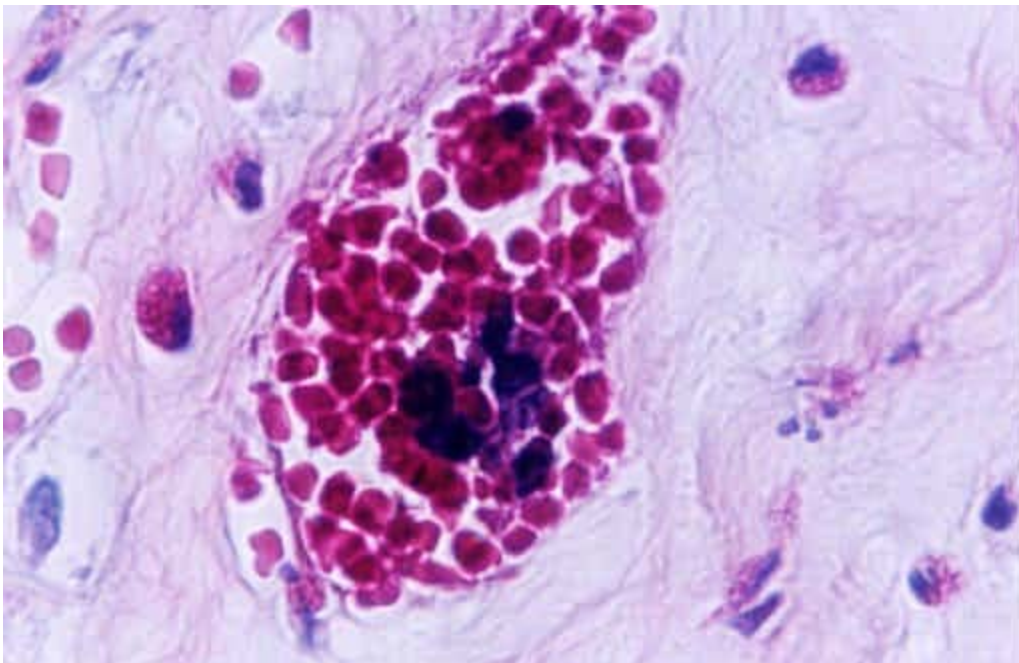


Figura 61: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 1000X.

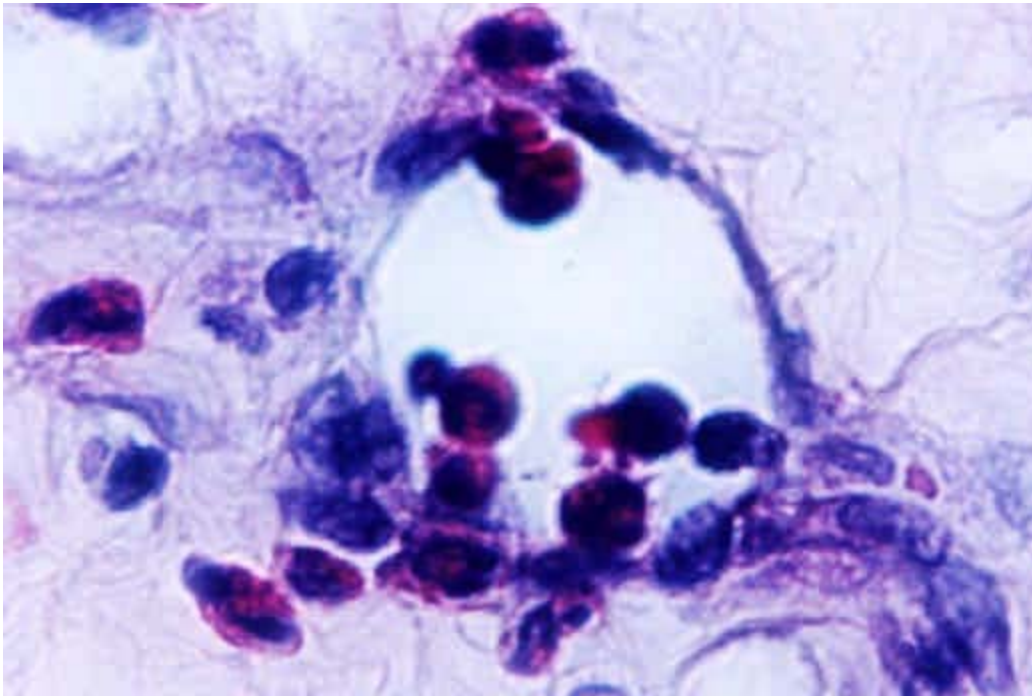


Figura 62: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 1000X.

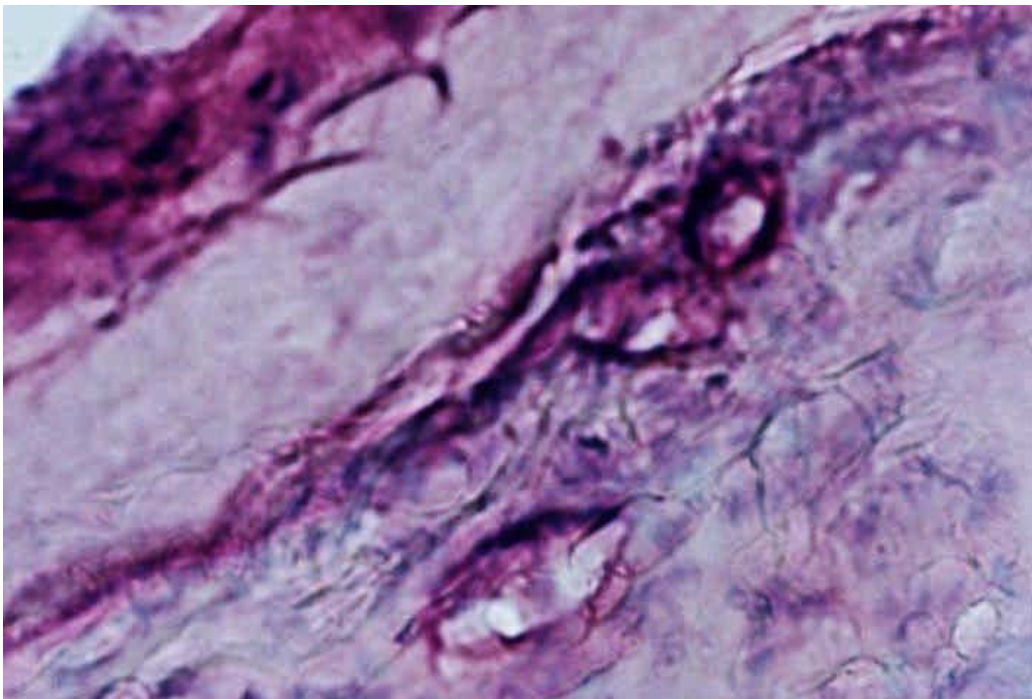


Figura 63: Fotomicrografia de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 72 horas após a cirurgia, corada pela técnica de hematoxilina e eosina, com aumento de 1000X.

5.4. AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Os resultados obtidos pela análise imunohistoquímica demonstraram que a resposta inflamatória apresentada pelo modelo experimental proposto foi exclusivamente inespecífica, visto que não foi identificada a presença de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ em nenhum momento de observação, tanto na córnea quanto na conjuntiva dos grupos 1, 2 e 3. Isto complementa os achados obtidos mediante a avaliação histopatológica dos tecidos em estudo, os quais permitiram identificar a presença de infiltrado inflamatório do tipo polimorfonuclear, com predominância de neutrófilos. A análise imunohistoquímica revelou que nos linfonodos existe uma concentração permanente de linfócitos das linhagens CD4⁺ e CD8⁺, o que pode ser comprovado mediante a observação das figuras 64, 65 e 66, aonde se verifica que, ao redor de núcleos de células mononucleares corados pela hematoxilina, ocorre uma reação imunoenzimática na parede celular, a qual passa a se apresentar com granulações marrons. Esta reação indica que nestes cortes existe o tipo celular pesquisado, permitindo interpretar que as figura 65 e 66 representam, respectivamente, uma reação imunohistoquímica positiva para a presença de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, no linfonodo mesentérico.

As figuras 67 e 68 representam, respectivamente, cortes de córnea na região central e periférica, contracorados com hematoxilina, os quais foram submetidos à reação de imunohistoquímica para a pesquisa de linfócitos T CD4⁺, 7 dias após a realização da ceratectomia superficial e aplicação de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina. Não se

observa nestas figuras reação típica para o tipo celular pesquisado, indicando que neste tecido, neste momento, não existe a presença de linfócitos T CD4+. O mesmo aconteceu nos demais momentos de observação, tanto para linfócitos T CD4+ quanto para CD8+, indicando que até 21 dias de pós-operatório não ocorre a infiltração de linfócitos das linhagens pesquisadas, na córnea de animais submetidos à ceratoplastia com membrana amniótica xenógena conservada em glicerina ou a fresco (figura 69) Isto confirma o que foi estabelecido pela análise microscópica dos cortes de córnea corados pelo método de hematoxilina e eosina, os quais demonstraram, como descrito anteriormente, a presença de infiltrado do tipo polimorfonuclear.

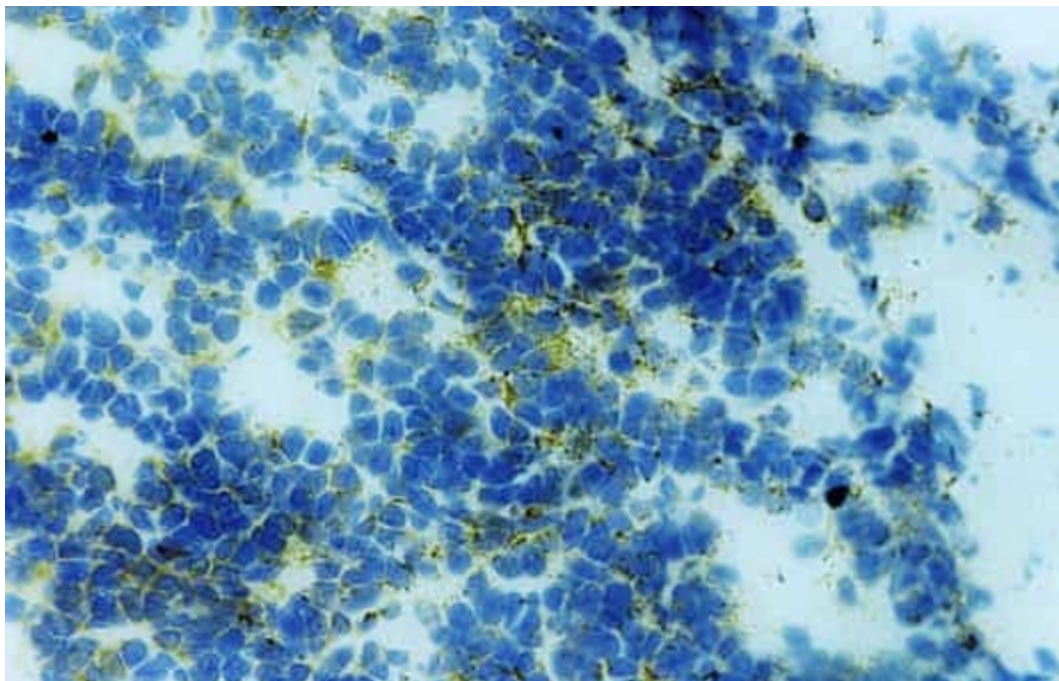


Figura 64: Fotomicrografia de linfonodo submetido à técnica de imunohistoquímica para linfócito T CD4+, com aumento de 100X.

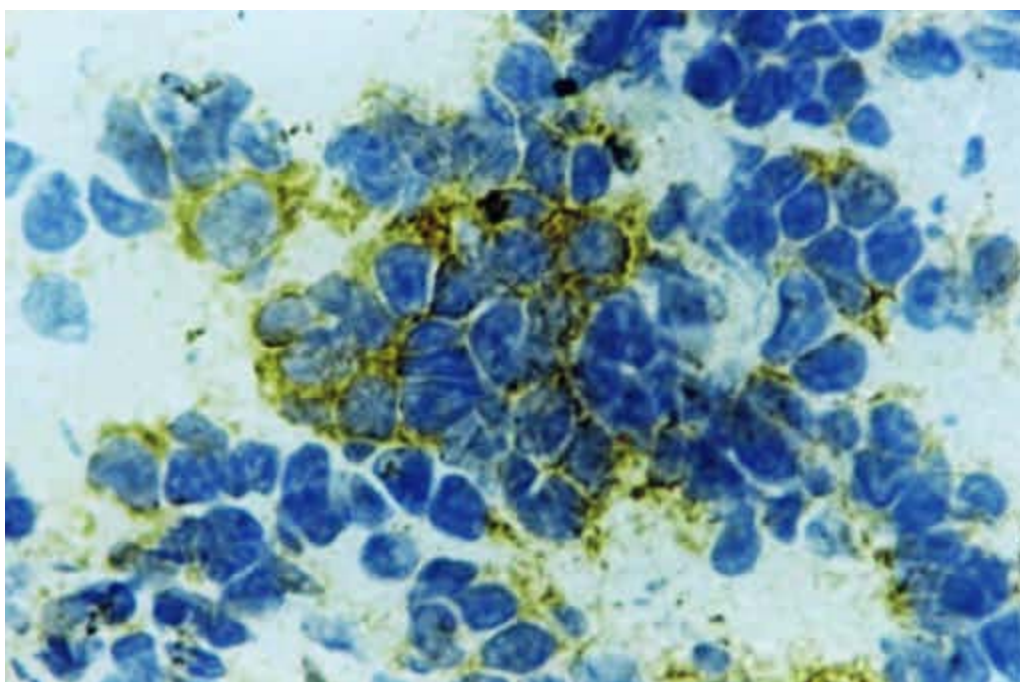


Figura 65: Fotomicrografia de linfonodo submetido à técnica de imunohistoquímica para linfócito T CD4+, com aumento de 400X.

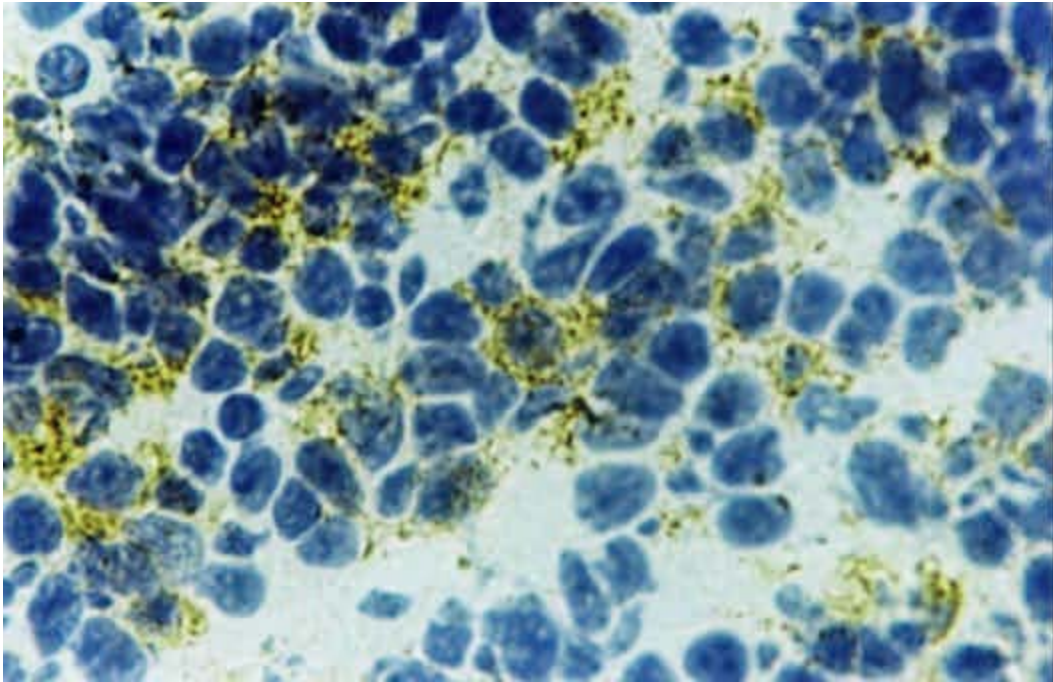


Figura 66: Fotomicrografia de linfonodo submetido à técnica de imunohistoquímica para linfócito T CD8+, com aumento de 400X.

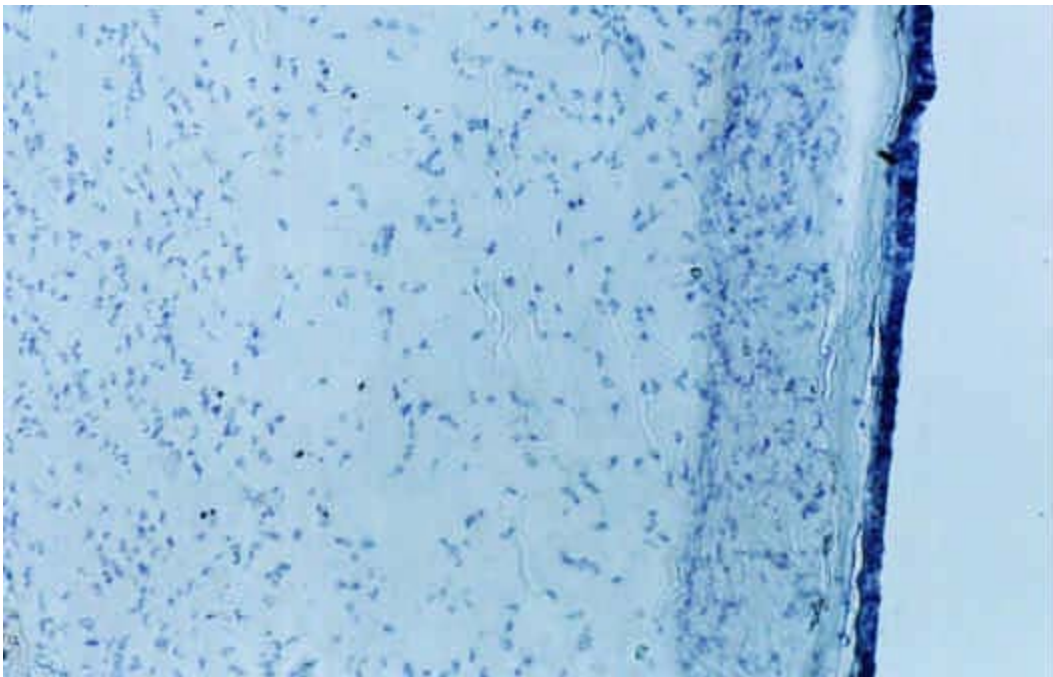


Figura 67: Fotomicrografia da região central de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, submetida à pesquisa de linfócitos T CD4+, com aumento de 100X.

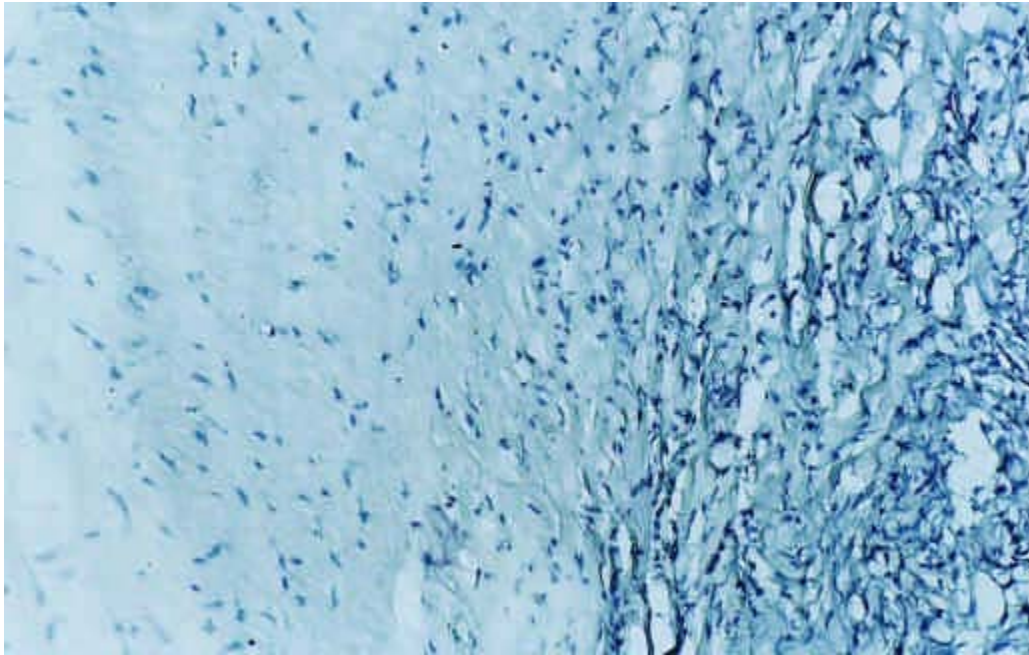


Figura 68: Fotomicrografia da região periférica de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, submetida à pesquisa de linfócitos T CD4+, com aumento de 100X.

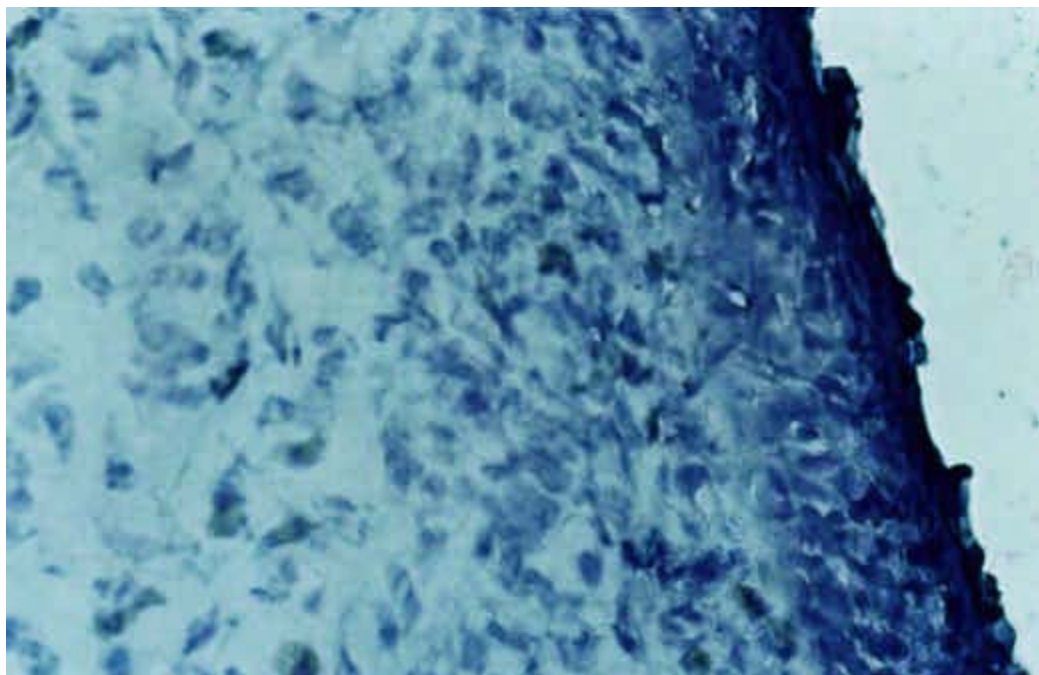


Figura 69: Fotomicrografia da região central de córnea que recebeu o enxerto de membrana amniótica xenógena conservada em glicerina, 21 dias após a cirurgia, submetida à pesquisa de linfócitos T CD8+, com aumento de 1000X.

6. DISCUSSÃO

Não são raras as situações nas quais o Médico Veterinário ou o Médico Oftalmologista se deparam com condições de agravo à superfície ocular, com comprometimento da integridade das estruturas que a compõem. Muitos destes episódios colocam em risco a visão do homem ou do animal, quando já não estão lhe causando grande desconforto há algum tempo. O comprometimento da visão traz prejuízos irreparáveis tanto para o homem quanto para os animais, podendo, para estes últimos, determinar a sua própria sobrevivência (HELPER, 1989; DYCE et al., 1990; SLATTER, 1990; SCROGGS & KLINTWORTH, 1992; SCHOENAU & PIPPI, 1993; GELATT, 1999).

São inúmeras as patologias que podem se manifestar na superfície ocular, devendo-se destacar aquelas com capacidade de lesar a córnea e alterar a sua transparência, o que impede a sua função refrativa e conseqüentemente a visão. Outras vezes, as lesões podem determinar a destruição do tecido corneal, colocando em risco a integridade do bulbo ocular, já que a córnea esta presente na porção anterior do olho, funcionando com interface entre o meio ambiente e as estruturas intra-oculares (STARTUP, 1984; SWANK & HOSGOOD, 1996; PRABHASAWAT et al., 1997; MELLER & TSENG, 1999; KIM et al., 2000; CHOI & TSENG, 2001).

O reconhecimento da importância da córnea na execução do complexo processo da visão fez com que, ao longo de muitos anos, inúmeros pesquisadores se empenhassem no estudo da etiologia das enfermidades que afligem a

superfície ocular, seus mecanismos no desenvolvimento das doenças e as possibilidades terapêuticas específicas para cada uma. Além disto, a identificação dos mecanismos de reparação da córnea foram importantes para que se pudesse determinar as condições necessárias para o restabelecimento da transparência e conseqüentemente da sua capacidade refrativa. O conjunto de conhecimentos científicos acumulados por tantos anos vem contribuindo para que métodos empíricos dêem lugar a técnicas comprovadamente eficientes na recuperação da função das estruturas oculares (PATON, 1955; BERNIS, 1961; JENSEN, 1963; BALLOW & MENDELSON, 1980; WENDLER et al., 1983; STARTUP, 1984; MARTIM et al., 1988; KERN, 1990; SLATTER, 1990; SCHOENAU & PIPPI, 1993; PRABHASAWAT et al., 1997; MELLER & TSENG, 1999; KIM et al., 2000; SU & LIN, 2000; CHOI & TSENG, 2001; DUCHESNE & GALAND, 2001; HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001).

Dentre as patologias que acometem a superfície ocular do homem e dos animais, os traumas se destacam pelo alto índice de morbidade e pela gravidade das lesões, muitas com potencial de levar à cegueira, quando bilateral. Outro fator que faz das patologias traumáticas um capítulo a parte na oftalmologia é a forma súbita como estas se manifestam, além da grande variação no tipo de reação do organismo frente ao agente agressor. Por isto, muitos estudos são empreendidos com o objetivo de melhorar o conhecimento existente sobre a fisiopatologia dos traumas da superfície ocular e os mecanismos envolvidos na reparação das lesões, a partir de diversos métodos (GONÇALVES, 1975; STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; CHAVKIN et al.,

1990; KERN, 1990; SLATTER, 1990; CHIOU et al., 1998; AZUARA-BLANCO et al., 1999; LU et al., 1999; BRODOVSKY et al., 2000; CHEN et al., 2000; ANDERSON et al., 2001).

O uso de membranas biológicas vem se mostrando promissor no tratamento das feridas da superfície do olho, particularmente da córnea, a qual, como já vimos, tem grande importância no mecanismo da visão. De uma maneira geral, as membranas são aplicadas com o objetivo de proteger a superfície ocular agredida, impedindo a ação de fatores externos que possam eventualmente contribuir para perpetuar ou agravar a lesão inicial. Espera-se, também, que a membrana permita a reparação do defeito, contribuindo para o retorno da função da córnea (VAN EE et al., 1986; MARQUES et al., 1989; KERN, 1990; KIRSCHNER et al., 1990; SHARIF & CASEY, 1993; BARROS et al., 1994; BESSANT & DART, 1994; BARROS et al., 1995; ANDRADE, 1996; SWANK & HOSGOOD, 1996; DELLAERT et al., 1997; ZHANG & AKHTAR, 1997; WU et al., 1997; GATON et al., 1998; GALERA, 1999; SHAH et al., 2001).

Nos últimos anos, despertou-se um interesse maior na utilização de enxertos de membranas fetais no tratamento de diversas patologias sediadas na superfície ocular, traumáticas ou não. Pelas características demonstradas pela membrana amniótica em diversos ensaios experimentais e algumas aplicações clínicas, a mesma tem se destacado como importante método terapêutico na reconstrução da superfície ocular. Evidências científicas de sua ação antiinflamatória, antimicrobiana e epitelizante serviram para difundir o seu uso no tratamento de patologias degenerativas e na reconstrução da superfície ocular acometida por neoplásicas, traumas e moléstias

imunomediadas, estimulando ainda mais a procura por informações que sustentem estas hipóteses (MATTHEWS et al., 1982; BARROS et al., 1998; BLEGGI-TORRES et al., 1998; AZUARA-BLANCO et al., 1999; DUA & AZUARA-BLANCO, 1999b; BECKER et al., 1999; CHEN et al., 2000; GABLER & LOHMANN, 2000; CHOI & TSENG, 2001; DEKARIS et al., 2001; GEORDIADIS & TERZIDOU, 2001; HEILIGENHAUS et al., 2001; PARIDAENS et al., 2001; ESPANA et al., 2002; GRIS et al., 2002; KAVINSKI et al., 2002; TI & TSENG, 2002; CREMONINI, 2003; OH et al., 2003; NISHIDA et al., 2004).

Grande parte do sucesso na aplicação das membranas biológicas no tratamento das lesões da córnea se deve ao fato da mesma se comportar de forma diferente dos outros tecidos, funcionando como um sítio privilegiado para o transplante. Isto pode ser comprovado pela análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, mediante a aplicação da técnica de imunohistoquímica, a qual foi utilizada com o intuito de identificar linfócitos T na córnea e na conjuntiva. Não se comprovou a presença de uma resposta específica em nenhum momento de observação, visto que os linfócitos responsáveis pela deflagração da resposta específica não foram identificados nos tecidos pesquisados. Isto sugere que a membrana amniótica xenógena não foi integrada aos componentes que dão início à resposta imune específica, representados pelas células apresentadoras de antígeno, o que caracteriza a via aferente da resposta imune da superfície ocular. A resposta inflamatória inicialmente verificada foi de natureza inespecífica, tendo sido originada pelo trauma cirúrgico, o qual determinou a lesão das células epiteliais da córnea em maior

extensão e da conjuntiva numa escala menor. Isto pode ser comprovado pela comparação da evolução clínica e histopatológica entre o grupo submetido apenas à ceratectomia e os grupos tratados com a aplicação da membrana sobre a área de ceratectomia. Observou-se que, nos primeiros dias de pós-operatório, a resposta inflamatória foi semelhante entre os animais dos grupos 1, 2 e 3, o que permite inferir que a inflamação inicial se deu a partir dos fatores pró-inflamatórios originados a partir da conversão dos fosfolipídios da membrana das células destruídas em ácido araquidônico. Estes fatores agiram, inicialmente, aumentando o fluxo sanguíneo local, por meio da vasodilatação, caracterizada pela manifestação clínica da hiperemia conjuntival. Posteriormente, aumentaram a permeabilidade vascular, contribuindo para a saída de líquido, que se manifestou na forma de edema conjuntival. A permeabilidade vascular aumentada e a presença de substâncias quimiotáticas contribuíram para a marginação leucocitária e diapedese, a qual aumentou a capacidade de resposta dos mecanismos de defesa local, mediante o recrutamento de células de defesa, representadas inicialmente por polimorfonucleares, os quais estiveram presentes em todas as fases de observação (GILLETTE et al., 1982; PEDERSEN et al., 1982; SULLIVAN & ALLANSMITH, 1984; PEPPARD & MONTGOMERY, 1987; WILKIE, 1990; BISTNER, 1994; DAY, 1996; GACHON & LACAZETTE, 1998; CORDEIRO & KROLOW, 1999; HAYNES et al., 1999; CHIE, 2000; SOTOZONO, 2000; TEIXEIRA, 2000; ENKELA et al., 2001; PLSKOVÁ et al., 2002; COOK et al., 2004).

É possível verificar que as lesões superficiais sofrem um rápido processo de reparação, quando não complicadas por

fatores como contaminação por microorganismos ou ação deletéria de algum elemento estranho. Isto indica que a córnea possui mecanismos próprios para a recuperação da sua funcionalidade e que a proximidade com a conjuntiva lhe confere subsídios tróficos e defesa necessária para a sua plena recuperação. Além disto, a existência das células tronco na região do limbo também favorece a rápida restauração da córnea, conferindo-lhe uma permanente fonte de células de reposição (PFISTER, 1975; STARTUP, 1984; NASISSE, 1985; KERN, 1990; SLATTER, 1990; RAWE et al., 1992; SWANK & HOSGOOD, 1996; BLAKE et al., 1997; LEE & TSENG, 1997; GAN et al., 1999; GELATT, 1999; LAUS & ORIÁ, 1999; SRIDHAR et al., 2001).

Este conjunto de elementos intimamente relacionados à córnea nos faz acreditar que existe um perfeito equilíbrio entre as estruturas que compõem a superfície ocular. A córnea, naturalmente transparente e, pelos motivos que lhe conferem esta característica, mais indefesa, está cercada pela conjuntiva e pelo limbo. A conjuntiva é ricamente vascularizada e com capacidade ilimitada de defender a superfície ocular por meios específicos e inespecíficos, enquanto que o limbo serve de berçário para a linhagem de células tronco, importantes na reposição de células epiteliais da superfície corneal (DUA & AZUARA-BLANCO, 2000; GRUETERICH et al., 2002a; STOIBER et al., 2002; DONISI et al., 2003; ESPANA et al., 2003; MARINHO et al., 2003)..

Os animais do grupo 1 foram testemunhas da eficiência dos fenômenos reparativos da córnea, demonstrando a habilidade da mesma em se recuperar de uma agressão, quando o agente traumatizante não mais persiste sobre o local.

A completa remoção do epitélio a partir da aplicação do n-heptanol, o qual possui ação abrasiva sobre o epitélio corneal, associado a manobras instrumentais com a lâmina de bisturi, foi seguida de uma imediata resposta de reparação. Verificou-se que 24 horas após a lesão, as células da periferia iniciaram um processo de expansão e migração em direção ao centro, culminando no preenchimento da superfície por novas células epiteliais num período médio de 7 dias. Durante este período, observou-se que a conjuntiva respondeu favoravelmente ao estímulo, recrutando células inflamatórias do tipo polimorfonuclear, as quais passaram a estar presente em maior quantidade na área próxima ao limbo e logo abaixo do defeito criado na córnea. Este fato sugere a hipótese de que, independente da origem da agressão, a superfície ocular se prepara para uma possível permanência do agente etiológico, formando uma linha de defesa ao redor da lesão. Estas células promovem a limpeza da região agredida, eliminando restos celulares e agentes contaminantes que, eventualmente, podem penetrar na intimidade do tecido corneal desprotegido pela ausência do epitélio. Simultaneamente à formação do infiltrado inflamatório, as células epiteliais vindas do limbo seguem em plena expansão em direção à região mais central da córnea. Quando atingem seu objetivo, as células que migram de maneira centrípeta a partir de toda a borda da lesão encontram-se no centro e, pelo mecanismo de inibição por contato, interrompem a expansão sobre a ferida. Observa-se ao fim desta etapa que o epitélio na região central é estreito, muitas vezes formado por apenas uma camada de células, enquanto que a periferia se destaca por se apresentar

multilamelar. Esta rápida epitelização é importante para a impermeabilização da córnea, o que contribui para diminuir a hidratação do estroma e o conseqüente desarranjo das fibras de colágeno, que caracteriza o edema corneal. Além de controlar o edema, a epitelização protege a córnea contra a entrada de microorganismos, os quais são freqüentemente identificados como fatores complicadores das lesões da córnea. A partir da total epitelização da córnea, a recém formada camada epitelial começa a se multiplicar, dando origem a novas camadas, restaurando a integridade do epitélio anteriormente destruído. Simultaneamente à evolução dos mecanismos de reparação do grupo 1, observou-se a regressão dos sinais clínicos de inflamação e a diminuição no número de células polimorfonucleares presentes no infiltrado inflamatório que se formou por ocasião do trauma. Neste mesmo grupo, verificou-se que a reparação se fez presente, em quase todos os animais, na ausência de formação vascular na córnea. Isto reforça a hipótese de que, nas lesões não complicadas, a reparação acontece de forma rápida o suficiente para não estimular a liberação de fatores angiogênicos e que, desde que as células limbais se encontrem íntegras, a córnea é capaz de restaurar as suas funções de forma rápida e eficiente.

Comparando-se os resultados observados para o grupo 1 aos dos grupos que receberam o enxerto da membrana amniótica sobre a área de ceratectomia, podemos afirmar que nestes últimos houve um retardo na conclusão dos fenômenos de reparação, ao mesmo tempo em que os sinais de inflamação persistiram por um período maior. Pôde-se verificar que em ambos os grupos tratados com o enxerto de membrana

amniótica, a mesma agiu de forma eficiente na contenção de células inflamatórias vindas da superfície ocular. Apesar da membrana ter permanecido firmemente aderida à superfície da córnea por um período não inferior a 6 dias, observou-se que não houve limitação à expansão epitelial. Porém, a partir do momento que a membrana perdeu a sua resistência natural e sofreu ruptura na região central, tendo permanecido ancorada pela sutura confeccionada na região do limbo, esta passou a agredir a superfície ocular, limitando a capacidade de reparação da superfície da córnea. É importante atestar que a membrana, enquanto íntegra, não interferiu nos processos reparativos da córnea, apesar da maior intensidade na resposta inflamatória que se instalou nos olhos que receberam o implante da membrana sobre a área de ceratectomia. Vale também registrar que parte da diferença verificada entre a resposta inflamatória nos olhos submetidos apenas à ceratectomia e aqueles que receberam a aplicação da membrana se deve à agressão causada pela perfuração da conjuntiva bulbar com a agulha de sutura, aonde a membrana foi ancorada. Além disto, o fio de sutura também se comportou de forma agressiva, promovendo a irritação da conjuntiva e conseqüentemente ampliando e perpetuando a resposta à dor na superfície ocular. A comprovação destes fatos pode ser verificada na análise da evolução clínica dos grupos 2 e 3, quando se observa que após a completa eliminação da membrana amniótica os fenômenos reparativos se consolidaram, ao mesmo tempo que a resposta inflamatória tendeu a desaparecer.

A análise dos resultados obtidos para os grupos tratados com a aplicação da membrana amniótica sugere que

tanto o enxerto a fresco quanto aquele conservado em glicerina se mostraram favoráveis à cicatrização da superfície da córnea, não impondo obstáculos à migração do epitélio sob a membrana. A análise histopatológica revelou que nos 7 primeiros dias de observação a expansão das células epiteliais, a partir do limbo, seguiu os mesmos padrões do grupo 1; porém, a partir do momento da ruptura da membrana houve a perpetuação da resposta inflamatória, seguida do retardo na cicatrização. Ao comparar os resultados dos grupos 2 e 3, percebemos que a evolução clínica dos olhos que receberam a aplicação da membrana a fresco foi mais favorável, o que, em parte, pode ser explicado pelo fato do enxerto ter sido eliminado mais cedo. Porém, a presença de fragmentos da membrana que permaneceram presos pela sutura insistiu em agredir a conjuntiva, contribuindo para perpetuar a resposta inflamatória e retardar a cicatrização. Este fato pode ser comprovado pela intensidade da formação vascular na intimidade do tecido corneal, o que sugere um aspecto de cronicidade, caracterizando que houve a perpetuação da agressão. Nos animais que receberam a membrana conservada em glicerina, observou-se uma maior intensidade dos fenômenos relacionados à inflamação, principalmente após a 1ª semana de pós-operatório, podendo este fato, mais uma vez, ser explicado pela permanência da membrana por um período longo sobre a superfície ocular.

De uma maneira geral, os resultados aqui apresentados sugerem que a superfície ocular possui condições próprias de reagir às agressões causadas por agentes químicos e físicos. A ausência de linfócitos do tipo CD4+ e CD8+ reforça a

importância da córnea como um sítio privilegiado para o transplante e aplicação de enxertos com membranas biológicas. Porém, devemos tomar o cuidado de discutí-los respeitando-se o modelo experimental aqui apresentado, o qual consistiu na remoção do epitélio da córnea em condições controladas. O mecanismo envolvido na resposta imunológico contra a presença de membranas biológicas segue uma trajetória diferente da resposta imunológica observada nas lesões inflamatórias crônicas da superfície ocular com perda de substância corneal, comprovando que a aplicação da membrana amniótica no tratamento das lesões da superfície ocular no modelo experimental proposto causa apenas transtornos locais, os quais são esperados em função do trauma causado pela técnica de ceratectomia superficial.

7. CONCLUSÕES

As argumentações anteriormente apresentadas sobre os aspectos relacionados à inflamação e reparação de córneas tratadas com a aplicação do enxerto de membrana amniótica xenógena permitem inferir que a metodologia proposta é exeqüível como modelo experimental para o estudo da inflamação e reparação da superfície ocular e com base na análise dos resultados, conclui-se que:

A superfície ocular respondeu prontamente à agressão de suas estruturas por meio de uma resposta inflamatória aguda, a qual persistiu durante todo o tempo de permanência do agente agressor sobre a superfície ocular;

A superfície ocular tem uma pequena capacidade de assimilar antígenos provenientes de membranas biológicas utilizadas como enxerto, visto que a resposta imune aos 21 dias ainda se mostrava inespecífica, sendo representada exclusivamente por células do tipo polimorfonuclear. Além das características peculiares da córnea, observou-se que a conjuntiva também reagiu tardiamente a estímulos antigênicos, concluindo-se que o processamento local dos antígenos provenientes da membrana amniótica e a sua eliminação precoce pela superfície ocular evitaram a assimilação pelas células apresentadoras de antígeno e a provável deflagração de uma resposta imunológica específica, tanto celular quanto humoral;

As avaliações clínica, histopatológica e imunohistoquímica permitem concluir que existe um

antagonismo entre a cinética da resposta inflamatória e a consolidação dos fenômenos reparativos dos tecidos que compõem a superfície ocular, demonstrando que enquanto persiste a fase mais aguda da inflamação, a cicatrização se apresenta lenta. Por outro lado, a capacidade de resposta local demonstrada pela grande população de células do tipo polimorfonuclear, presentes após a lesão, sugerem que a superfície ocular possui ampla e eficiente capacidade de resposta à agressão de suas estruturas;

A membrana amniótica xenógena não ofereceu resistência à epitelização da córnea, desde que perfeitamente aplicada sobre a superfície ocular, devendo ser completamente removida até o sétimo dia de pós-operatório, quando a reparação já se encontra em estágio avançado de evolução;

Não foi possível atestar os efeitos inibitórios da membrana amniótica sobre a neoformação vascular da córnea, visto que a mesma funcionou como fator de agressão da superfície ocular após a ruptura, perpetuando a inflamação e retardando a cicatrização, o que reforça a necessidade de remover a membrana e a sutura até a 1ª semana, quando a resposta inflamatória entre o grupo 1 foi semelhante aos grupos 2 e 3;

A tolerância imunológica demonstrada pela superfície ocular neste modelo experimental demonstra a viabilidade da utilização da membrana amniótica xenógena, proveniente de bovinos, no tratamento das lesões da superfície ocular;

Apesar das conclusões acima citadas, não se deve subestimar a capacidade de resposta da superfície ocular

frente a ação de condições de agravo contra as suas estruturas, particularmente a córnea. A utilização das membranas deve ser vista como fator coadjuvante de todo o processo de reparação, tendo o momento certo de ser aplicada e retirada, não devendo concorrer com os mecanismos intrínsecos de inflamação e reparação;

Os resultados obtidos não devem ser vistos como definitivos, mas apenas como elementos de um conjunto de estudos que tem como objetivo estabelecer métodos viáveis de tratamento das lesões da superfície ocular;

A somatória de conhecimentos adquiridos durante a realização deste experimento permite concluir, por fim, que a superfície ocular reserva, ainda, inúmeros subsídios para a pesquisa dos mecanismos envolvidos na inflamação e reparação, visto que por trás de cada resposta obtida encontrou-se muitas outras perguntas, as quais permitiram o contínuo exercício da investigação dos aspectos aqui relacionados.

5. REFERÊNCIAS²⁵

ADDS, P.J.; HUNT, C.J.; DART, J.K. Amniotic membrane grafts, fresh or frozen? A clinical and in vitro comparison. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 8, p. 905-907, 2001.

ALLAN, B.D.S.; DART, J.K.G. Strategies for the management of microbial keratitis. **Br. J. Ophthalmol.** v. 79, p. 777-786, 1995.

ALLANSMITH, M.; HUTCHISON, D. Immunoglobulins in the conjunctiva. **Immunology**, v. 12, p.225-229, 1967.

ALLANSMITH, M.; WHITNEY, C.R.; MCCLELLAN, B.H.; NEWMAN, L.P. Immunoglobulins in the human eye. **Arch. Ophthalmol.**, v. 89, p. 36-45, 1973.

ANDERSON, D.F.; ELLIES, P.; PIRES, R.T.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 5, p. 567-575, 2001.

ANDERSON, W.D.; ANDERSON, B.G. **Atlas of canine anatomy**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. 1230p.

²⁵ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

ANDRADE, A.L. **Emprego Experimental da cápsula renal de equino (*Equus caballus*, LINNAEUS, 1758), preservada em glicerina, no reparo de ceratectomias superficiais em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758):** avaliação clínica e morfológica. 1996. 74f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ARBOUR, J.D.; BRUNETTE, I.; BOISJOLY, H.M. Should we patch corneal erosions? **Arch. Ophthalmol.**, v. 115, p. 313-317, 1997.

ARMITAGE, W. J.; EASTY, D. L. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, p. 16-24, 1997.

AVILA, M.; ESPANA, M.; MORENO, C.; PENA, C. Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in rabbit model. **Cornea**, v. 20, n. 4, p. 414-420, 2001.

AXELROD, A. J.; CHANDLER, J.W. Morphologic characteristics of conjunctival-associated lymphoid tissue in the rabbit. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, n. 17, p. 182-190, 1978.

AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C.T.; DUA, H.S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 399-402, 1999.

BALLOW, M.; MENDELSON, L. Specific immunoglobulin E antibodies in tear secretions of patients with vernal conjunctivitis. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 66, n. 2, p. 112-118, 1980.

BARABINO, S.; ROLANDO, M. Amniotic membrane transplantation elicits goblet cell repopulation after conjunctival reconstruction in a case of severe ocular cicatricial pemphigoid. **Acta Ophthalmol. Scand.**, v. 81, p. 68-71, 2003.

BARROS, P. S. M. Aspectos cirúrgicos do uso de membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina nas ceratoplastias penetrantes da córnea de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1994, Curitiba. **Resumos....** Curitiba, 1994. p.84.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; MALERBA, T. A.; BURNIER Jr., M. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprothesis. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 32, p. 251 -255, 1995.

BARROS, P.S.M.; GARCIA, J.A.; LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L.; SALLES GOMES, T.L. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Vet. Ophthalmol.**, v. 1, n. 2-3, p. 119-123, 1998.

BECKER, M.D.; KRUSE, F.E.; AZZAM, L.; NOBILING, R.; REICHILING, J.; VÖLCKER, H. In vivo significance of ICAM-1-dependent

leukocyte adhesion in early corneal angiogenesis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 3, p. 612-618, 1999.

BEFANIS, P.J.; PEIFFER, R.L.; BROWN, D. Endothelial repair of the canine cornea. **Am. J. Vet. Res.**, v. 42, p. 590-595, 1981.

BERNIS, W.O. Partial penetrating keratoplasty in dogs. **Sowthwest. Vet.**, v. 15, p. 30-44, 1961.

BESSANT, D.A.R.; DART, J.K.G. Lamellar keratoplasty in the management of inflammatory corneal ulceration and perforation. **Eye**, v. 8, p. 22-28, 1994.

BISTNER, S. Allergic and immunologic mediated diseases of the eye and adanexae. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 24, n. 4, p. 711-734, 1994.

BLAKE, D.A.; YU, H.; YOUNG, D.L. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, p. 1119-1129, 1997.

BLEGGI-TORRES, I.F.; WERNER, B.; PIAZZA, M.J. Ultrastructural study of the normal human amniotic membrane. **J. Bras. Patol.**, v. 34, n. 3, p. 140-143, 1998.

BORDERIE, V.M.; SCHEER, S.; TOUZEAU, O.; VEDIE, F.; CARVAJAL-GONZALES, S.; LAROCHE, L. Donor organ cultured corneal tissue selection before penetrating keratoplasty. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 82, p. 382-388, 1998.

BRIGHTMAN, A.H.; MCLAUGHLIN, S.A.; BROGDON, J.D. Autogenous lamellar corneal grafting in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 195, p. 469-475, 1989.

BRODOVSKY, S.C.; McCARTY, C.A.; SNIBSON, G.; LOUGHNAN, M.; SULLIVAN, L.; DANIELL, M.; TAYLOR, H.R. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review. **Ophthalmology**, v. 107, p. 1829-1835, 2000.

BUDENZ, D.L.; BARTON, K.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 130, n. 5, p. 580-588, 2000.

BURDON, M.A.; McDONNELL, P. A survey of corneal graft practice in the United Kingdom. **Eye**, v. 9, p. 6-12, 1995.

CHAN, C.M.L.; LIU, Y.P.; TAN, D.T.H. Ocular surface changes in pterygium. **Cornea**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2002.

CHANDLER, J.W.; GILLETTE, T.E. Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. **Ophthalmology**, v. 90, n. 6, p. 585-591, 1983.

CHAVKIN, M.J.; RIIS, R.C.; SCHRLIE, P.H. Management of a persistent corneal erosion in a boxer dog. **Cornell Vet.**, v. 80, p. 347 - 356, 1990.

CHEN, H.J.; PIRES, R.T.F.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 84, n. 8, p. 826-833, 2000.

CHENG, K.H.; SPANJAARD, L.; RUTTEN, H.; DANKERT, J.; POLAK, B.C.P.; KIJLSTRA, A. Immunoglobulin A antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in the tear fluid of contact lens wearers. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 37, n. 10, p. 2081-2088, 1996.

CHIE, S. Second injury in the cornea: the role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. **Cornea**, v. 19, n.6, p. 155-159, 2000.

CHIOU, A.G.Y.; FLORAKIS, G.J.; KAZIM, M. Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular surface dysfunction. **Surv. Ophthalmol.**, v. 43, n. 1, p. 19-46, 1998.

CHOI, T.H.; KIM, J.Y.; WEE, W.R.; LEE, J.H. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. **Cornea**, v. 17, n. 4, p. 389-395, 1998.

CHOI, T.H.; TSENG, S.C. In vivo and in vitro demonstration of epithelial cell-induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane. **Cornea**, v. 20, n. 2, p. 197-204, 2001.

COOK, E.B.; STAHL, J.L.; SEDGWICK, J.B.; BARNEY, N.P.; GRAZIANO, F.M. The promotion of eosinophil degranulation and adhesion to conjunctival epithelial cells by IgE-activated conjunctival mast cells. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 92, n. 1, p. 65-72, 2004.

CORDEIRO, J.M.C.; KROLOW, R.C. Mecanismos de defesa da superfície ocular. **Hora Vet.**, n. 112, p. 62-67, 1999.

COSTER, D. Influences on development of corneal transplantation. **Eye**, v. 8, p. 1-11, 1994.

CREMONINI, D.N. **Avaliação clínica e histopatológica da cicatrização de úlceras de córnea experimentais em coelhos, com deficiência de células límbicas, recobertas com membrana amniótica xenógena criopreservada em diferentes meios.** 2003. 120f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DAY, M.J. Low IgA concentration in the tears of german shepherd dogs. **Aust. Vet. J.**, v. 74, n. 6, p. 433-436, 1996.

DEKARIS, I.; GABRIC, N.; MRAVICIC, I.; KARAMAN, Z.; KATUSIC, J.; LAZIC, R.; SPOLJARIC, N. Multilayer vs. monolayer amniotic membrane transplantation for deep corneal ulcer treatment. **Coll. Antropol.**, v. 25, p. 23-28, 2001.

DELLAERT, M.M.J.; CASEY, T.A. Influence of topical human epidermal growth factor on postkeratoplasty re-epithelisation. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 81, p. 391-395, 1997.

DIETZ, O.; SCHAEZT, F.; SCHLITER, H. Operaciones en el ojo. In:____. **Operaciones y Anestesia de los grandes y Pequeños Animales.** Zaragoza: Acribia, 1975. (p. inicial e final do capítulo)

DI PASCUALE, M.A.; ESPANA, E.M.; KAWAKITA, T.; TSENG, S.C.G. Clinical characteristics of conjunctivochalasis with or without aqueous tear deficiency. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 88, n.3, p. 388-392, 2004.

DONISI, P.M.; RAMA, P.; FASOLO, A.; PONZIN, D. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. **Cornea**, v. 22, n. 6, p. 533-538, 2003.

DUA, H.S.; GOMES, J.A.; JINDAL, V.K. Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lachrymal gland. **Curr. Eye Res.**, v. 13, n. 87, p.____, 1994. (completar páginas do artigo)

DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 414-419, 1999a.

DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, n. 6, p. 748-752, 1999b.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Surv. Ophthalmol.**, v. 44, n. 5, p. 415-425, 2000.

DUCHESNE, B.; TAHI, H.; GALAND, A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation (case report). **Cornea**, v. 20, n. 2, p. 230-232, 2001.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. Os órgãos dos sentidos. In:____. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 225 - 235.

EICHENBAUN, J.D.; LAVACH, J.D.; GOULD, D.H.; SEVERIN, G.A.; PAULSEN, M.E.; JONES, R.L. Immunohistochemical staining patterns of canine eyes affected with chronic superficial keratitis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, n. 9, p. 1952-1955, 1986.

EICHENBAUN, J.D.; LAVACH, J.D.; SEVERIN, G.A.; PAULSEN, M.E.; Immunology of the ocular surface. **Compend. Small Anim. Pract.**, v. 9, n. 11, p. 1101-1109, 1987.

ENGLISH, R.V. Immune response and the eye. In:____. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 239-258.

ENKELA, H.; JAN, P.; KAREL JR, S.; MELKOVÁ, Z.; KALTNER, H.; FILIPEC, M.; LIU, F.T.; GABIUS, H.J. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 11, p. 1336-1340, 2001.

ESPANA, E.M.; PRABHASAWAT, P.; GRUETERICH, M.; SOLOMON, A.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 86, n. 6, p. 640-645, 2002.

ESPANA, E.M.; GRUETERICH, M.; SENG, E.T.; TSENG, S.C.G. Phenotypic study of a case receiving a keratolimbal allograft and amniotic membrane for total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v. 110, n. 3, p. 481-486, 2003.

EVANS, H.E. **Miller's anatomy of the dog**. 3 ed. Philadelphia:W.D. Saunders Company, 1993. 1113p.

FRANKLIN, R.M.; REMUS, L.E. Conjunctival-associated lymphoid tissue: evidence for a role in the secretory immune system. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, n. 25, p. 181-187, 1984.

FRANKLIN, R.M. The ocular secretory immune system: a review. **Curr. Eye Res.**, v. 9, p. 599-606, 1989.

FRIEDLAND, B.R.; ANDERSON, D.R.; FORSTER, R.K. Non-lysozyme antibacterial factor in human tears. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 74, n. 1, p. 52-59, 1972.

GABLER, B.; LOHMANN, C.P. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto the corneal surface. **Ophthalmology**, v. 107, p. 1344-1346, 2000.

GACHON, A.F.; LACAZETTE, E. Tear lipocalin and the eye's front line of defence. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 82, p. 453-455, 1998.

GALERA, P. D. **Emprego da túnica vaginal autógena, a fresco, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães.** 1999. 77f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; KIM, H.J. Effect of leukocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, p. 575-581, 1999.

GARRANA, R.M.R.; ZIESK, J.D.; ASSOULINE, M.; GIPSON, I.K. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 6, p. 1266-1279, 1999.

GASKIN, J.M. Microbiology of the canine and feline eye. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 10, n. 2, p. 303-316, 1980.

GATON, D.D.; STIEBEL-KALISH, H.; LOYA, N. The effect of tear substitute and silicone oil on re-epithelization of the cornea. **Eye**, v. 12, p. 141-144, 1998.

GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology.** 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1544p.

GEORDIADIS, N.S.; TERZIDOU, C.D. Epiphora caused by conjunctivochalasis: treatment with transplantation of

preserved human amniotic membrane. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 619-621, 2001.

GERDING Jr, P.A.; CORMANY, K.; WEISIGER, R.; KAKOMA, I. Survey and topographic distribution of bacterial and fungal microorganisms in eyes of clinically normal dogs. **Canine Pract.**, v. 18, n. 2, p. 34-38, 1993a.

GERDING Jr, P.A.; CORMANY, K.; WEISIGER, R.; KAKOMA, I. Survey and topographic distribution of bacterial and fungal microorganisms in eyes of clinically normal cats. **Canine Pract.**, v. 21, n. 3, p. 20-23, 1993b.

GILLETTE, T.E.; CHANDLER, J.W.; GRINER, J.V. Langehans cells of the ocular surface. **Ophthalmology**, n. 89, p. 700-10, 1982.

GILLETTE, T.E.; GREINER, J.V.; ALLANSMITH, M.R. Immunohistochemical localization of human tear lysozyme. **Arch. Ophthalmol.**, v. 99, p. 298-300, 1981.

GOMES, J.A.P.; FERNANDES, L.H.S.; KOMAGOME, C.K.; HÖFLING-LIMA, A.L.; PRATA Jr, J.A. Uso de membrana amniótica no tratamento de complicações pós-trabeculectomia. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 64, n. 5, p. 1-8, 2001.

GONÇALVES, C. P. Queratitis. In:____. **Oftalmologia**. 4. ed. Brasília: Atheneu, 1975. p. 131 - 140.

GRANELLI-PIPERNO, A.; NOLAN, P.; INABA, K.; STEINMAN, R.M. The effect of immunosuppressive agents on the induction of nuclear factors that bind to sites on the interleukin 2 promoter. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 1869-1872, 1990.

GRIS, O.; WOLLEY-DOD, C.; GÜELL, J.L.; TRESSERRA, F.; LERMA, E.; CORCOSTEGUI, B.; ADÁN, A. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. **Ophthalmology**, v. 109, p. 508-512, 2002.

GRUETERICH, M.; ESPANA, E.M.; TOUHAMI, A.; TI, S.E.; TSENG, C.G.S. Phenotypic study of a case with successful transplantation of *ex vivo* expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v. 109, n. 8, p. 1547-1552, 2002a.

GRUETERICH, M.; ESPANA, E.M.; TSENG, C.G.S. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 43, n. 1, p. 63-71, 2002b.

GUIMARÃES, R. Q. **Ceratoplastia interlamelar xenógena de galinha em coelho, utilizando córneas conservadas em cloreto de sódio por três dias, um mês e 14 anos. Estudo biomicroscópico e histopatológico.** 1979. 233f. Tese (Doutorado em Oftalmologia) Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HACKER, D. V. Frozen corneal grafts in dogs and cats: a report on 19 cases. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 27, p. 387-398, 1991.

HAKANSON, N E.; MERIDETH, R. E. Conjunctival pedicle grafting in the treatment of corneal ulcers in the dog and cat. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 23, p. 641-648, 1987.

HALL, J.M.; PRIBNOW, J.F. IgG and igA antibody in tears of rabbits immunized by topical application of ovalbumin. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 138-144, 1989.

HALLER, E.; AUER-GRUMBACH, P.; STUENZNER, D.; KESSLER, H.H.; PIERER, K.; MUELLNER, K.; ZENZ, H. Detection of antichlamydial antibodies in tears. **Ophthalmology**, v. 104, n. 1, p. 125-130, 1997.

HANADA, K.; SHIMAZAKI, J.; SHIMMURA, S.; TSUBOTA, K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 131, n. 3, p. 324-331, 2001.

HAYNES, R.J.; TIGHE, P.J.; DUA, H.S. Antimicrobial defensive peptides of the human ocular surface. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 737-741, 1999.

HEILIGENHAUS, A.; BAUER, D.; MELLER, D.; STEUHL, K.P.; TSENG, S.C. Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, n. 42, v.9, p. 1969-1974, 2001.

HELPER, J. C. Diseases and surgery of the cornea and sclera. In:____. **Magrane's canine ophthalmology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1989. p. 102-149.

HENDERSON, W. The repair of corneal injuries in the dog by conjunctival keratoplasty. **Vet. Rec.**, v. 63, p. 240-241, 1951.

HILL, J.C. Systemic cyclosporin in high-risk keratoplasty: long-term results. **Eye**, v. 9, p. 422-428, 1995.

HONAVAR, S.G.; BANSAL, A.K.; SANGWAN, V.S.; RAO,G.N. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson Syndrome. **Ophthalmology**, v. 107, n. 5, p. 975-579, 2000.

HRDLICKOVÁ-CELA, E.; PLZÁK, J.; SMETANA, K.; MELKOVÁ, Z.; KALTNER, H.; FILIPEC, L.; FU-TONG; GABIUS, H.J. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 11, p. 1336-1340, 2001.

HUDDE, T.; MINASSIAN, D.C.; LARKIN, D.F.P. Randomized controlled trial of corticosteroid regimens in endothelial corneal rejection. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 1348-1352, 1999.

JENSEN, E. C. Experimental corneal transplantation in the dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 142, p. 11 - 22, 1963.

JOHANSEN, S.; HEEGARD, S.; PRAUSE, J.U. The healing effect of all-trans retinoic acid on epithelial corneal abrasions in rabbits.

Acta Ophthalmol. Scand., v. 76, p. 401-404, 1998.

JOSEPH, A.; DUA, H.S.; KING, A.J. Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 9, p. 1065-1069, 2001.

Ophthalmol., v. 85, n. 9, p. 1065-1069, 2001.

JOSEPHSON, A.S.; LOCKWOOD, D.W. Immunoelctrophoretic studies of the protein components of normal tears. **J. Immunol.**, v. 93, p. 532-539, 1964.

JUMBLATT, M.M.; MCKENZIE, R.W.; JUMBLATT, J.E. MUC5AC mucin is a component of the human precorneal tear film. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, p. 43-49, 1999.

KARABATSAS, C.H.; COOK, S.D.; SPARROW, J.M. Proposed classification for topographic patterns seen after penetrating keratoplasty. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 403-409, 1999.

KAVINSKI, L.C.; TEIXEIRA, R.B.; PRESOTTO, E.J. **Transplante de membrana amniótica para reconstrução da superfície corneal pós-ceratectomia em gatos com seqüestro corneal.** Santa Catarina: CRMV-SC, 2002. Disponível em: <<http://www.crmvsc.org.Br/>>. Acesso em: 29 mar. 2004.

KERN, T.J. Ulcerative Keratitis. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 20, p. 643-666, 1990.

KIM, H.S.; SAH, W.J.; KIM, Y.J.; KIM, J.C.; HAHN, T.W. Amniotic membrane, tear film, corneal and aqueous levels of ofloxacin in rabbit eyes after amniotic membrane transplantation. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 628-6234, 2001.

KIM, J.C.; TSENG, S.C. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. **Korean J. Ophthalmol.**, v. 32, p. 32-46, 1995a.

KIM, J.C.; TSENG, S.C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v. 14, n.5, p. 473-84, 1995b.

KIM, J.S.; KIM, J.C.; NA, B.K.; JEONG, J.M.; SONG, C.Y. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. **Exp. Eye Res.**, v. 70, n. 3, p. 329-337, 2000.

KIM, W.J.; HELENA, M.C.; MOHAN, R.R.; WILSON, S. Changes in corneal morphology associated with chronic epithelial injury. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 35-42, 1999.

KIRSCHNER, S.E. Persistent corneal ulcers. What to do when ulcers won't heal. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 20, n. 3, p. 627-642, 1990.

KJAERGAARD, N.; HEIN, M.; HYTTEL, L.; HELMING, R.B.; SCHONHEYDER, H.C.; ULDBJERG, N.; MADSEN, H. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 94, n. 2, p. 221-229, 2001.

KRUSE, F.E.; ROHRSCHEIDER, K.; VOLCKER, H.E. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. **Ophthalmology**, v.106, n.8, p.1504-10, 1999.

KUFFOVÁ, L.; HOLÁN, V.; LUMSDEN, L.; FORRESTER, J.V.; FILIPEC, M. Cell subpopulation in failed human corneal grafts. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 1364-1369, 1999.

KUNERT, K.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. **Arch. Ophthalmol.**, v. 120, n. 3, p. 330-337, 2002.

LAM, D.S.C.; WONG, A. K.K.; THAM, C.C.Y.; LEUNG, A.T.S. The use of combined intravenous pulse methylprednisolone and oral cyclosporin in the treatment of corneal graft rejection: a preliminary study. **Eye**, v. 12, p. 615-618, 1998.

LANCE, S.E.; CAPONE JR, A.; SUNDA-RAJ, N.; ROAT, M.I.; THOFT, R.A. Diamond burring and surgical keratectomy: morphologic comparison in the rabbit. **Arch. Ophthalmol.**, v. 106, p. 830-834, 1988.

LARKIN, D.F.P.; ALEXANDER, R.A.; CREE, I.A. Infiltrating inflammatory cell phenotypes and apoptosis in rejected human corneal allografts. **Eye**, v. 11, p. 68-74, 1997.

LAUS, J.L.; ROSSI, M.A.; SOUZA, M.S.B.; BARROS, P.S.M.; MORALES, A. Avaliação dos efeitos de um novo adesivo para fins biológicos (Colagel®) na ceratoplastia experimental em cães. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 30, p. 183-193, 1993.

LAUS, J. L. **Emprego da escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis*, STEIDACHNER, 1859), conservada em glicerina, como sucedâneo de córneas no reparo de ceratectomias superficiais: estudo experimental em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758).** 1994. 71f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

LAUS, J.L.; ORIÁ, A.P. Doenças corneanas em pequenos animais. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v. 2, p. 26-33, 1999.

LEE, S.H.; TSENG, S.C. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 123, n. 3, p. 303-312, 1997.

LEMP, M.A.; BLACKMAN, J.H. Ocular surface defense mechanisms. **Ann. Ophthalmol.**, v. 13, n. 1, p. 61-63, 1981.

LEMP, M.A.; HOLLY, F.J.; IWATA, S.; DOHLMAN, C.H. The precorneal tear film. I. factors in spreading and maintaining a

continuous tear film over the corneal surface. **Arch. Ophthalmol.**, v. 83, p. 89-95, 1970.

LETKO, E.; STECHSCHULTE, S.U.; KENYON, K.R.; SADEQ, N.; ROMERO, T.R.; SAMSON, M.C.; NGUYEN, Q.D.; HARPER, S.L.; PRIMACK, J.D.; AZAR, D.T.; GRUTERICH, M.; DOHLMAN, C.H.; BALTATZIS, S.; FOSTER, S.C. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. **Arch. Ophthalmol.**, v. 119, n. 5, p. 659-663, 2001.

LIGHTMAN, S. **Immunology of eye diseases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. v. 13, 171p.

LOPATIN, D.E.; POPERIN, N.V.; MACCALLUM, D.K.; MEYER, R.F.; LILLIE, J.H. Changes in aqueous immunoglobulin and albumin levels following penetrating keratoplasty. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 30, p. 122-131, 1989.

LU, P.C.S.; YE, H.; MAEDA, M.; AZAR, D.T. immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 20-27, 1999.

MA, D.H.K.; SEE, L.C.; LIAU, S.B.; TSAI, R.J.F. Amniotic membrane graft for primary pterygium: comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 84, n. 9, p. 973-978, 2000.

MACMASTER, P.R.B.; ARONSON, S.B.; BEDFORD, M.J. Mechanisms of the host response in the eye. **Arch. Ophthalmol.**, v. 77, p. 392-399, 1967.

MARINHO, D.; HÖFLING-LIMA, A.L.; KWITKO, S.; TSENG, S.C.G. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation? **Cornea**, v. 22, n. 4, p. 338-342, 2003.

MARQUES, A.; SMIALOWISKI, E.B.; ANDREWS, J.M. Biomateriais na substituição de tecidos moles. **Acta Cir. Bras.**, v. 4, n. 4, p. 158-167, 1989.

MARQUES, A.; BRENDA, E.; GOMES, H.C.; ANDREWS, J.M. Glutaraldeído e formaldeído na fixação e armazenamento de tecidos preservados. **Acta Cir. Bras.**, v. 7, n. 2, p. 77-79, 1992.

MARTIM, C.L.; MUNNEL, J.; KASWAN, R. Normal ultrastructure and histochemical characteristics of canine lachrymal gland. **Am. J. Vet. Res.**, n. 49, p. 1566-72, 1988.

MARTIN, C.L. Ophthalmic disease. In:____. KIRK, R.W. **Current veterinary therapy: small animal practice**. 7 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980. cap. 7, p. 504-598.

MATTHEWS, R.N.; FAULK, W.P.; BENNETT, J.P. A review of the role of amniotic membranes in surgical practice. **Obstet. Gynecol. Annu.**, n. 11. p. 31-58, 1982.

MATSUDA, A.; YOSHIKI, A.; TAGAWA, Y.; MATSUDA, H.; KUSAKABE, M. Corneal wound healing in tenascin knockout mouse. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 6, p. 1071-1080, 1999.

MAZZANTI, A.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; SILVEIRA, A. F.; STEDILE, R.; GUEDES, A.G.P.; BRAGA, F.A.; RYCHESKY, M. Reparação da traquéia de cão com segmento muscular homólogo de diafragma conservado em glicerina a 98%. **Ciênc. Rural**, v 30, n. 6, p. 1011-1016, 2000.

MCGILL, J.; LIAKOS, G.M.; GOULDING, N.J. Normal tear protein profiles and age-related changes. **Br. J. Ophthalmol.**, n. 68, p. 316, 1984. (falta pág. final)

MEJÍA, L.F.; ACOSTA, C.; SANTAMARÍA, J.P. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. **Cornea**, v. 19, n. 3, p. 288-291, 2000.

MELLER, D.; TSENG, T.S. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 5, p 878-886, 1999.

MELLER, D.; PIRES, R.T.; MACK, R.J.; FIGUEIREDO, F.; HEILINGENHAUS, A.; PARK, W.C.; PRABHASAWAT, P.; JOHN, T.; McLEOD, S.D.; STEUHL, K.P.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. **Ophthalmology**, v. 197, n. 5, p. 980-989, 2000.

MELLO, C.M.G.M.; MAIA, F.J.S.; ACCETTA, I.; SODRÉ-LIMA, H.; GUZMAN-SILVA, M.A.; CHAVES, C.P. Uso da membrana do cordão umbilical humano como enxerto biológico em feridas recentes do esôfago cervical: estudo experimental em cães. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 24, n. 3 p. 167-172, 1997.

MISSOTTEN, L. Immunology and herpetic keratitis. **Eye**, v. 8, p. 12-21, 1994.

MONDINO, B.J.; RATAJCZAK, H.; GOLDBER, D.; SCHANZLIN, D.J.; BROWN, S.I. Alternate and classical pathway components of complement in the normal cornea. **Arch. Ophthalmol.**, v. 98, p. 346-349, 1980.

MONDINO, B.J.; SUNDAR-RAJ, C.V.; BRADY, K.J. Production of first component of complement by corneal fibroblasts in tissue culture. **Arch. Ophthalmol.**, v. 100, p. 478-480, 1982.

MONTEIRO, E.C.L.; SCHELLINI, S.A.; MARQUES, M.E.A.; KAMEGASAWA, A.; PADOVANI, C.R. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 63, n. 1, p. 33-37, 2000.

MONTGOMERY, P.C.; AYYILDIZ, A.; LEMAITRE-COELHOS, I.M.; VAERMANS, J.P.; ROCKEY, J. Induction and expression of antibodies in secretions: the ocular immune system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 409, p. 428-440, 1983.

MOORE, C.P.; HELLER, N.; MAJORS, L.J.; WHITLEY, R.D.; BURGESS, E.C.; WEBER, J. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, n. 6, p. 773-777, 1988.

MORALES, A. **Comparação entre enxertos autólogos livres e pediculados de conjuntiva no reparo de ceratectomias superficiais: estudo experimental em cães (*Canis familiares*, LINNAEUS, 1758)**. 1994. 77f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MORANDINI, W.; ORTIZ, V. Adesivos biológicos em cirurgia. **Acta Cir. Bras.** v. 7, p. 80-85, 1992.

MORGAN, S.; MURRAY, A. Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries. **Eye**, v. 10, p. 349-354, 1996.

NASISSE, M. P. Canine ulcerative keratitis. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v. 7, p. 686 - 701, 1985.

NASISSE, M. P.; NELMS, S. Equine ulcerative keratitis. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v. 8, p. 537 - 555, 1992.

NEWMAN, D.K.; ISAACS, J.D.; WATSON, P.G.; MEYER, P.A.R.; HALE, G.; WALDMANN, H. Prevention of immune-mediated corneal graft destruction with the anti-lymphocyte monoclonal antibody, CAMPATH-1H. **Eye**, v. 9, p. 564-569, 1995.

NISHIDA, K.; YAMATO, M.; HAYASHIDA, Y.; WATANABE, K.; MAEDA, N.; WATANABE, H.; YAMAMOTO, K.; NAGAI, S.; KIKUCHI, A.; TANO, Y.; OKANO, T. Functional bioengineered epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature responsive cell culture surface. **Transplantation**, v. 77, n. 3, p. 379-385, 2004.

NISHIWASKI-DANTAS, M.C.; DANTAS, P.E.C.; HOLZCHUH, N., NETTO, A.D.; GIOVEDI FILHO, R.; GIOVEDI, M.; ALMEIDA, G.V. Indicações de transplante penetrante de córnea. 1991-1995. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 61, p. 26-33, 1998.

NODEN, D.M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990. 399p.

OFFORD, E.A.; SHARIF, N.A.; MACÉ, K.; TROMVOUKIS, Y.; SPILLARE, E.A.; AVANTI, O.; HOWE, W.E.; PFEIFER, A.M.A. Immortalized human corneal epithelial cells for ocular toxicity and inflammation studies. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, p. 1091-1101, 1999.

OH, J.H.; KIM, J.C.; CHAN, J. Repair of scleromalacia using preserved scleral graft with amniotic membrane transplantation. **Cornea**, v. 22, n. 4, p. 288-293, 2003.

PARIDAENS, D.; BEEKHUIS, H.; VAN DEN BOSCH, W.; REMEYER, L.; MELLES, G. Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and

primary acquired melanosis with atypia. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 6, p. 658-661, 2001.

PATON, R. T. **Keratoplasty**. New York: Mc Graw-Hill, 1955. 280p.

PARK, W.C.; TSENG, S.C. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 41, n. 10, p. 2906-2914, 2000.

PEDERSEN, B.; ANDERSEN, M.S.; KLAUBER, A.; OTTOVAY, E.; PRAUSE, J.U.; ZHONG, C.; NORRILD, B. Secretory IgA specific for herpes simplex virus in lacrimal fluid from patients with herpes keratitis-a possible diagnostic parameter. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 6, n. 10, p. 648-653, 1982.

PEIFFER, R.L. Ocular immunology and mechanisms of ocular inflammation. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.120, n 2, p. 281-302, 1980.

PEPPARD J.V.; MONTGOMERY, P.C. Studies on the origin and composition of IgA in rat tears. **Immunology**, v. 62, p. 193-198, 1987.

PFISTER, R.R. The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: a scanning electron microscope study. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 14, n. 9, p. 648-661, 1975.

PIRES, R.T.; TSENG, S.C.; PRABHASAWAT, A.J.; PUANGSRICHAREM, V.; MASKIM, S.L.; KIM, J.C. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. **Arch. Ophthalmol.**, v. 117, p. 1291-1297, 1999.

PLSKOVÁ, J.; DUNCAN, L.; HOLÁN, V.; FILIPEC, M., KRAAL, G., FORRESTER, J.V. The immune response to corneal allograft requires a site-specific draining lymph node. **Transplantation**, v. 73, n. 2, p. 210-215, 2002.

PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; BURKETT, G.; TSENG, S.C.G. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. **Ophthalmology**, v. 104, n. 6, p. 974-985, 1997.

PRABHASAWAT, P.; TSENG, S.C. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. **Arch. Ophthalmol.**, v. 115, n. 11, p. 1360-1367, 1997.

RAWE, I.M.; TUFT, S.J.; MEEK, K.M. Proteoglycan and collagen morphology in superficially scarred rabbit cornea. **Histochem. J.**, v. 24, p. 311-318, 1992.

RIBEIRO, V.L.S.; LILENBAUM, W.; BRAGA, M.A.; ANTÔNIO, F.A.M. Aspectos da conjuntivite bacteriana em cães no Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 13, n. 2, p. 19-20, 1991.

ROBERTS, S.R.; ERICKSON, O.F. Dog tear secretion and tear proteins. **J. Small Anim. Pract.**, v. 3, p.1-5, 1962.

SALISBURY, M.A.R.; KASWAN, R.L.; BROWN, J. Microorganisms isolated from the corneal surface before and during topical cyclosporine treatment in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, n. 7, p. 880-884, 1995.

SAMPAIO, R.L. **Estudo comparativo entre o adesivo biológico de fibrina e o adesivo sintético n-butil-cianoacrilato nas ceratoplastias lamelares experimentais em cães.** 1999. 108f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SCHAUMBERG, D.A.; MOYES, A.L.; GOMES, J.A.P.; DANA, M.R. corneal transplantation in young children with congenital hereditary endothelial dystrophy. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 127, n. 4, p. 373-378, 1999.

SCHEIFFARTH, O.F. T. lymphocytes of the normal human cornea. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 71, p. 384-388, 1987.

SCHOENAU, J.S.F.; PIPPI, N.L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **Hora Vet.**, v. 12, p. 49-53, 1993.

SCROGGS, M.W.; KLINTWORTH, G.K. Normal eye and adanexa. In:____. **Histology for pathologists.** New York: Raven Press, 1992. p. 903-10.

SELINGER, D.S.; SELINGER, R.C.; REED, W.P. Resistance to infection of the external eye: the role of tears. **Surv. Ophthalmol.**, v. 24, n. 1, p. 33-38, 1979.

SHAH, S.; SARHAN, A.R.S.; DOYLE, S.J.; PILLAI, C.T.; DUA, H.S. The epithelial flap for photorefractive keratectomy. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, p. 393-396, 2001.

SHARIF, K.W.; CASEY, T.A. Changing indications for penetrating keratoplasty, 1971-1990. **Eye**, v. 7, p. 485-488, 1993.

SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 82, n. 3, p. 235-240, 1998.

SHIMAZAKI, J.; YANG, H.Y.; TSUBOTA, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. **Ophthalmology**, v. 104, n. 12, p. 2068-2076, 1997.

SHIMMURA, S.; SHIMAZAKI, J.; OHASHI, Y.; TSUBOTA, K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. **Cornea**, v. 20, n. 4, p. 408-413, 2001.

SIPPEL, K.C.; MA, J.J.; FOSTER, C.S. Amniotic membrane surgery. **Curr. Opin. Ophthalmol.**, v. 12, n. 4, p. 269-281, 2001.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In:___ **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p. 257 - 303.

SMITH, V.A.; HOH, H.B.; EASTY, D.L. Role of ocular matrix metalloproteinase in peripheral ulcerative keratitis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 1376-1381, 1999.

SMOLIN, G.; O'CONNOR, G.R. **Ocular immunology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. 322p.

SOLOMON, A.; ROSENBLATT, M.; MONROY, D.; JI, Z.; PFLUGFELDER, S.C.; TSENG, S.C.G. Suppression of interleukin 1(alfa) and interleukin 1 (beta) in human epithelial cels cultured on the amniotic membrane stromal matrix. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 4, p. 444-449, 2001.

SOONG, H.K.; MEYER, R.F.; SUGAR, A. Small overlaping tectonic keratoplasty involving graft-host junction of penetrating keratoplasty. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 129, n. 4, 465-467, 2000.

SOTOZONO, C. Second injury in the cornea: the role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. **Cornea**, v. 19, n. 6, p. 155-159, 2000.

SRIDHAR, M.S.; BANSAL, A. K.; SANGWAN, V.S.; RAO, G.N. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 130, n. 1, p. 134-137, 2000.

SRIDHAR, M.S.; VIRENDER, S.S.; AASHISH, B.K.; GULAPALLI, R.N. Amniotic membrane transplantation in the management of shield ulcers of vernal keratoconjunctivitis. **Ophthalmology**, v. 108, p. 1218-1222, 2001.

STARTUP, F.G. Corneal ulceration in the dog. **J. Small Anim. Pract.**, v. 25, p. 737-752, 1984.

STOIBER, J.; MUSS, W.H.; POHLA-GUBO, G.; RUCKHOFFER, J. GRABNER, G. Histopathology of human corneas after amniotic membrane and limbal stem cell transplantation for severe chemical burn. **Cornea**, v. 21, n. 5, p. 482-489, 2002.

SU, C.Y.; LIN, C.P. Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation: a case report. **Ophthalmic Surg. Laser**, v. 31, n. 2, p. 151-154, 2000.

SULLIVAN, D.A.; ALLANSMITH, M.R. Source of IgA in tears of rats. **Immunology**, v. 53, p. 791-799, 1984.

SUZUKI, T.; SANO, Y.; SASAKI, O.; KINOSHITA, S. Ocular surface inflammation induced by propionibacterium acnes. **Cornea**, v. 21, n. 8, p. 812-817, 2002.

SWANK, A.; HOSGOOD, G. Corneal wound healing and the role of growth factors. **Compend. Contin. Educ. Small Anim. Pract.**, v. 18, p. 1007 - 1016, 1996.

TANURE, M.A.G.; MUINHOS, G.K.; GONÇALVES, I.R.F. JACOBOWITZ, S.; MOYA, S.T.F.; LIMA, W.T.M. Utilização de córneas de doadores com idade igual ou superior a 60 anos em ceratoplastias penetrantes. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 56, p. 963-670, 1997.

TEIXEIRA, R.B. **Efeitos da aplicação tópica da Ciclosporina "A" a 2% sobre a córnea de cães submetidos à ceratoplastia lamelar com implante de pericárdio de eqüino preservado em glicerina: avaliação clínica e morfológica.** 2000. 158f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

THOMPSON, R.; OLSON, H. Antibody production in the rabbits cornea. **J. Immunol.**, v. 65, p. 633-651, 1950.

TI, S.; TSENG, S.C. management of primary and recurrent pterygium using amniotic membrane transplantation. **Curr. Opin. Ophthalmol.**, v. 13, n. 4, p. 204-212, 2002.

TOUHAMI, A.; GRUETERICH, M.; TSENG, S.C.G. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 987-994, 2002.

TSAI, R.J.F.; LI, L.M.; CHEN, J.K. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 2, p. 86-93, 2000.

TSENG, S.C.; PRABHASAWAT, P. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Arch. Ophthalmol.**, v. 116, n. 4, p. 431-441, 1998.

TSENG, S. C. G.; PRABHSAWAT, P.; BARTON, K.; GRAY, T.; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Arch. Ophthalmol.**, v. 116, p. 431-441, 1998.

TSUBOTA, K.; FUKAGAWA, K.; FUGIHARA, T.; SHIMMURA, S.; SAITO, I.; SAITO, K.; TAKEUCHI, T. Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, p. 28-34, 1999.

TSUBOTA, K.; SAKATE, Y.; OHYAMA, M.; TODA, I.; TAKANO, Y.; ONO, M.; SHINOZAKI, N.; SHIMAZAKI, J. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced cicatricial pemphigoid and Stevens-johnson Syndrome. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 122, n. 5, p. 38-52, 1996.

UETA, M.; KWEON, M.N.; SANO, Y.; SOTOZONO, C.; YAMADA, J.; KOIZUMI, N.; KIYONO, H.; KINOSHITA, S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 129, n. 3, p. 464-470, 2002.

VAERMAN, J.P.; HEREMANS, J.F. The immunoglobulins of the dog-II: the immunoglobulins of canine secretions. **Immunochemistry**, v. 6, p. 779-786, 1969.

VAN EE, R.T.; NASISSE, M.P.; HELMANN, G. Effects of nylon and polyglactin 910 suture material on perilimbal corneal wound healing in the dog. **Vet. Surg.**, V. 15, p. 435-440, 1986.

VANTRAPPEN, L.; GEBOES, K.; MISSOTTEN, L.; MAUDGAL, P.C.; DESMETT, V. Lymphocytes and langerhans cells in the normal human cornea. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 26, n. 2, p. 220-225, 1985.

VERRHUIS, R.; KIJLSTRA, A. Inhibition of hemolytic complement activity by lactoferrina in tears. **Exp. Eye Res.**, v. 34, p. 257-265, 1982.

WANG, M.X.; GRAY, T.B.; PARK, W.C.; PRABHASAWAT, P.; CULBERSTON, W.; FORSTER, R.; HANNA, K.; TSENG, S.C.G. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. **Cataract. Refract. Surg.**, v. 27, p. 310-319, 2001.

WENDLER, M.E.; FALZONI, W.L.; FALZONI, BELFORT Jr. R. Adesivos teciduais no tratamento de perfuração corneana. Estudo comparativo em cobaias. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 46, n. 5, p. 138-140, 1983.

WILKIE, D.A. Control of ocular inflammation. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 20, n. 3, p. 693-713, 1990.

WILLCOX, M.D.P.; MORRIS, C.A.; THARKUR, A.; SACK, R.A.; WICKSON, J.; BOEY, W. Complement and complement regulatory proteins in human tears. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, n. 1, p.1-8, 1997.

WITMER, R.H. Antibody formation in rabbit eye: studied with fluorescein-labeled antibody. **Arch. Ophthalmol.**, v. 53, p. 811-816, 1955.

WOO, H.M.; KIM, M.S.; KWEON, O.K.; KIM, D.Y.; NAM, T.C.; KIM, J.H. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodeling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 3, p. 345-349, 2001.

WU, X.Y.; TSUK, A.; LEIBOWITZ, H.M.; TRINKAUS-RANDALL, V. In vivo comparison of three different porous materials intended for use in keratoprosthesis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 82, p. 569-576, 1998.

YOSHIDA A.; IMAYAMA, S.; SHIGERU, S.; KAWANO, Y.I.; ISHIBASHI, T. Increased number of IgE positive Langerhans cells in the conjunctiva of patients with atopic dermatitis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 81, p. 402-406, 1997.

YOU, L.; KRUSE, F.E.; POHL, J.; VÖLCKER, H.E. Bone morphogenetic proteins and growth and differentiation factors in the human cornea. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, p. 296-311, 1999.

ZHANG, Y.; AKTAR, R.A. Epidermal growth factors stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase during wound closure in rabbit corneal epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, p. 1139-1149, 1997.

8. APÊNDICE

Tabela 3: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de fotofobia e blefarospasmo, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	2	3	2	0	0
2	1	2	1	0	0
3	2	1	1	0	0
4	1	2	2	1	0
5	1	2	1	0	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	2	2	0	
2	2	3	1	0	
3	1	2	1	0	
4	2	2	0	0	
5	1	2	1	0	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	3		
2	1	3	1		
3	1	2	0		
4	2	3	1		
5	2	2	2		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	2	2			
2	2	3			
3	1	2			
4	2	2			
5	1	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	2	1	0	0
MÉDIA	1,55	2,35	1,266667	0,1	0
DESVIO PADRÃO	0,510418	0,587143	0,798809	0,316228	0

Tabela 4: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de hiperemia conjuntival, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	2	3	2	1	0
2	1	2	2	1	1
3	2	3	3	1	0
4	2	2	2	2	0
5	1	2	2	1	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	3	2	1	
2	2	2	3	1	
3	2	2	2	1	
4	1	2	3	1	
5	2	3	2	2	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	3		
2	2	2	2		
3	3	3	2		
4	1	2	3		
5	2	2	1		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	1	3			
2	2	2			
3	2	2			
4	2	2			
5	2	2			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	2	2	1	0
MÉDIA	1,8	2,35	2,266667	1,181818	0,166667
DESVIO PADRÃO	0,523148	0,48936	0,593617	0,40452	0,408248

Tabela 5: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de secreção ocular, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	1	2	2	1	0
2	1	3	2	1	0
3	2	2	3	1	0
4	1	2	2	2	0
5	2	2	3	2	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	2	2	0	
2	2	3	3	1	
3	3	3	2	1	
4	2	2	1	1	
5	1	2	2	2	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	2		
2	3	2	1		
3	2	2	2		
4	2	3	2		
5	1	2	2		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	2	2			
2	2	2			
3	2	2			
4	1	2			
5	2	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	2	2	1	0
MÉDIA	1,8	2,3	2,066667	1,2	0
DESVIO PADRÃO	0,615587	0,470162	0,593617	0,632456	0

Tabela 6: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de quemose, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	1	2	2	0	0
2	1	2	2	0	0
3	2	2	2	0	0
4	1	1	2	0	0
5	1	2	3	1	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	1	2	2	0	
2	2	3	2	0	
3	1	2	2	0	
4	1	2	3	2	
5	2	2	3	0	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	3	3	2		
2	1	3	2		
3	2	2	2		
4	1	2	3		
5	1	3	2		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	3	3			
2	2	4			
3	2	2			
4	1	2			
5	1	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	1	2	2	0	0
MÉDIA	1,5	2,35	2,266667	0,3	0
DESVIO PADRÃO	0,688247	0,67082	0,457738	0,674949	0

Tabela 7: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 1, para o fenômeno de neovascularização corneal, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	0	0	1	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	1	1	0
4	0	0	1	0	0
5	0	0	0	0	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	0	0	0	0	
2	0	0	1	0	
3	0	0	1	1	
4	0	0	1	1	
5	0	0	0	0	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	0	0	0		
2	0	0	0		
3	0	0	1		
4	0	0	1		
5	0	0	0		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	0	0			
2	0	0			
3	0	0			
4	0	0			
5	0	0			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	0	0	1	0	0
MÉDIA	0	0	0,533333	0,3	0
DESVIO PADRÃO	0	0	0,516398	0,483046	0

Tabela 8: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de fotofobia e blefarospasmo, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	2	3	4	2	1
2	1	3	4	4	2
3	3	3	4	3	1
4	1	3	3	3	2
5	2	3	3	4	1
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	3	4	3	2
2	1	3	4	4	1
3	1	2	3	2	1
4	2	3	3	3	2
5	2	3	3	3	2
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	4		
2	3	3	4		
3	1	3	4		
4	2	3	3		
5	1	3	3		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	1	2			
2	2	3			
3	1	3			
4	2	3			
5	3	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	3	4	3	1
MÉDIA	1,75	2,9	3,533333	3,1	1,4
DESVIO PADRÃO	0,71635	0,307794	0,516398	0,737865	0,547723

Tabela 9: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de hiperemia conjuntival, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	3	3	4	3	1
2	2	3	3	2	1
3	2	3	4	2	1
4	3	4	4	2	1
5	2	2	3	2	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	3	3	1	
2	3	3	4	2	
3	3	4	3	2	
4	3	4	4	2	
5	2	3	4	2	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	4		
2	3	4	4		
3	3	3	4		
4	3	3	3		
5	2	3	4		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	2	3			
2	3	4			
3	2	3			
4	2	3			
5	2	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	3	4	2	1
MÉDIA	2,45	3,2	3,666667	2	0,8
DESVIO PADRÃO	0,510418	0,523148	0,48795	0,471405	0,447214

Tabela 10: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de secreção ocular, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	3	4	4	3	1
2	3	4	4	2	1
3	2	3	3	2	2
4	3	4	3	3	1
5	2	4	4	2	1
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	3	3	3	1	
2	3	4	4	4	
3	2	2	3	2	
4	2	3	3	2	
5	2	3	4	2	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	3	4	4		
2	3	3	3		
3	2	4	4		
4	2	3	4		
5	3	4	3		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	3	3			
2	3	4			
3	3	4			
4	2	3			
5	2	4			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	3	4	4	2	1
MÉDIA	2,55	3,5	3,5625	2,3	1,2
DESVIO PADRÃO	0,510418	0,606977	0,512348	0,823273	0,447214

Tabela 11: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de quemose, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	2	3	3	2	1
2	3	4	4	3	1
3	2	3	4	2	0
4	3	4	3	3	1
5	2	2	3	2	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	3	3	1	
2	2	3	4	2	
3	3	4	3	2	
4	2	3	3	2	
5	2	3	4	2	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	4		
2	3	4	4		
3	2	2	3		
4	2	3	3		
5	2	3	3		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	2	3			
2	3	4			
3	2	4			
4	2	3			
5	2	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	3	3	2	1
MÉDIA	2,25	3,2	3,4	2,1	0,6
DESVIO PADRÃO	0,444262	0,615587	0,507093	0,567646	0,547723

Tabela 12: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 2, para o fenômeno de neovascularização corneal, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/SCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	0	0	2	3	2
2	0	0	2	4	1
3	0	0	1	3	2
4	0	0	2	3	2
5	0	0	2	2	1
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	0	0	3	4	
2	0	0	2	2	
3	0	0	2	2	
4	0	0	3	3	
5	0	0	2	3	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	0	0	3		
2	0	0	4		
3	0	0	2		
4	0	0	3		
5	0	0	2		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	0	0			
2	0	0			
3	0	0			
4	0	0			
5	0	0			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	0	0	2	3	2
MÉDIA	0	0	2,333333	2,9	1,6
DESVIO PADRÃO	0	0	0,723747	0,737865	0,547723

Tabela 13: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de fotofobia e blefarospasmo, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	1	2	3	3	1
2	1	2	3	4	1
3	2	3	3	3	2
4	1	2	2	3	1
5	2	3	3	4	1
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	1	2	3	3	
2	1	3	4	4	
3	1	2	3	4	
4	2	2	3	3	
5	2	3	2	3	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	2	3		
2	1	3	3		
3	1	2	4		
4	2	3	4		
5	1	2	3		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	1	2			
2	1	3			
3	1	2			
4	2	2			
5	2	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	1	2	3	3	1
MÉDIA	1,4	2,4	3,066667	3,4	1,2
DESVIO PADRÃO	0,502625	0,502625	0,593617	0,516398	0,447214

Tabela 14: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de hiperemia conjuntival, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	2	3	4	2	0
2	1	2	3	2	1
3	2	2	4	1	1
4	1	2	4	2	0
5	2	3	3	1	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	3	3	1	
2	2	2	3	2	
3	3	4	4	2	
4	1	2	3	1	
5	2	3	4	2	
SUBGRUPO 3 (T3)	2	3	3		
1	3	3	4		
2	3	3	4		
3	2	2	3		
4	2	2	4		
5	2	3	3		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	2	3			
2	3	4			
3	2	2			
4	2	3			
5	2	2			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	3	4	2	0
MÉDIA	2,05	2,65	3,533333	1,6	0,4
DESVIO PADRÃO	0,604805	0,67082	0,516398	0,516398	0,547723

Tabela 15: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de secreção ocular, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	2	3	4	2	0
2	3	3	4	2	1
3	2	4	4	1	0
4	1	3	3	1	0
5	2	3	3	2	1
SUBGRUPO 2 (T2)	3	4	4	2	
1	2	3	3	1	
2	2	4	4	1	
3	2	4	3	3	
4	2	3	2	1	
5	3	4	4	2	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	3		
2	3	4	3		
3	2	3	4		
4	2	4	4		
5	3	3	4		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	3	4			
2	3	3			
3	2	3			
4	3	3			
5	2	4			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	3	4	1	0
MÉDIA	2,3	3,4	3,466667	1,6	0,4
DESVIO PADRÃO	0,571241	0,502625	0,63994	0,699206	0,547723

Tabela 16: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de quemose, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	1	3	3	2	1
2	3	3	3	2	0
3	2	3	4	2	0
4	2	2	3	1	1
5	2	2	3	1	0
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	2	2	3	1	
2	2	3	4	2	
3	2	3	3	2	
4	2	3	3	3	
5	2	2	3	2	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	2	3	3		
2	3	3	4		
3	2	2	3		
4	1	2	3		
5	2	3	3		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	2	3			
2	2	4			
3	1	2			
4	2	2			
5	2	3			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	2	3	3	2	0
MÉDIA	1,95	2,65	3,2	1,8	0,4
DESVIO PADRÃO	0,510418	0,587143	0,414039	0,632456	0,547723

Tabela 17: Demonstração dos valores obtidos durante a avaliação clínica dos animais do grupo 3, para o fenômeno de neovascularização corneal, com análise estatística dos dados

DIVISÃO DO GRUPO/IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	TEMPO DE OBSERVAÇÃO/ESCORE				
SUBGRUPO 1 (T1)	24 HORAS	72 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1	0	0	1	3	1
2	0	0	2	4	2
3	0	0	1	3	2
4	0	0	1	2	1
5	0	0	2	2	1
SUBGRUPO 2 (T2)					
1	0	0	2	3	
2	0	0	1	3	
3	0	0	2	2	
4	0	0	1	2	
5	0	0	2	3	
SUBGRUPO 3 (T3)					
1	0	0	2		
2	0	0	2		
3	0	0	1		
4	0	0	1		
5	0	0	2		
SUBGRUPO 4 (T4)					
1	0	0			
2	0	0			
3	0	0			
4	0	0			
5	0	0			
ANÁLISE DOS DADOS					
MODA	0	0	2	3	1
MÉDIA	0	0	1,533333	2,7	1,4
DESVIO PADRÃO	0	0	0,516398	0,674949	0,547723