MIRIAN SILIANE BATISTA DE SOUZA

Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica

São Paulo

2003

MIRIAN SILIANE BATISTA DE SOUZA

Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Cirurgia

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros

São Paulo

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1253
FMVZ

Souza, Mirian Siliane Batista de

Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica / Mirian Siliane Batista de Souza. — São Paulo : M. S. B. Souza, 2003.

161 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2003.

Área de concentração: Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros.

1. Córnea. 2. Cães. 3. Enxerto em animais. 4. Membranas fetais. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA, Mirian Siliane Batista de

Título: Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Ao meu Pai, pela querida lembrança e por sua dedicação.

À minha Mãe, pelo seu exemplo de perseverança e carinho, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

*Aos meus irmãos, Madalena, Osmar, Gilberto,
Silvia e Marcelo, obrigada pelo carinho e
compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros*, pela orientação, incentivo, confiança e principalmente pelos ensinamentos sempre com muito profissionalismo, mostrando tudo com muito objetividade e clareza. Muito obrigada e eterno respeito.

Ao meu querido companheiro *Luiz Francisco Zanella*, pelo apoio e carinho nos momentos de dificuldades. Obrigada por estar sempre presente.

À *Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, pela receptividade e por me proporcionar o desenvolvimento na pós-graduação.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES*, por me conceder uma bolsa de estudo.

À *Prof. Dra. Silvia Renata Cortopassi*, pela amizade e colaboração nas anestésias dos animais do experimento.

À aluna *Lilian Nogueira* e pós-graduanda *Tatiana Intelizano*, pela colaboração durante os procedimentos anestésicos dos cães.

Ao *Prof. Dr. Fernando Ferreira*, pela elaboração da análise estatística e dos gráficos.

À *Dra. Maria Cristina Martins*, pela amizade, dedicação e colaboração para o estudo histopatológico.

Ao *Dr. João Pessoa*, pela realização dos cortes de peças para o envio ao serviço de histopatologia.

Ao *Dr. José Álvaro Pereira Gomes*, pelos ensinamentos do manuseio com a membrana amniótica e a oportunidade que me permitiu o acompanhamento da rotina do Setor de Doenças Externas da EPM. Obrigada pela oportunidade.

À *Dra. Myrna Serapião*, pela amizade, carinho e pelos ensinamentos durante meu estágio no Setor de Doenças Externas da EPM e, a manipulação com a membrana amniótica.

Ao *Dr. Marcelo Cunha*, pela amizade e as oportunidades de treinamentos e ensinamentos em microcirurgia. Os quais, eu jamais esquecerei.

A *todas as pessoas* do Departamento de Oftalmologia da EPM - Unifesp em especial ao Setor de Doenças Externas, pela receptividade e oportunidade de estagiar neste setor em especial, a *Dra. Luciene Barbosa de Souza*, pela oportunidade de permitir que eu acompanhasse a rotina do ambulatório do Setor de Doenças Externas, oportunidade que ampliou meus conhecimentos em oftalmologia.

Ao técnico de laboratório *Paulo Albe*, pelo carinho e confecção das lâminas para a histopatologia.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia *Dra. Júlia Matera, Dr. Âgelo Stopiglia, Dr. Marcos Gioso, Dr. Denise T. Fantoni e Dr. Cássio Auada* pela amizade, atenção e respeito.

Às amigas *Angélica de Mendonça Vaz Safatle e Roseli Borges Teixeira*, pelo companheirismo e amizade que muito me ajudou nestes anos.

À amiga *Adriana Morales*, pela amizade que mesmo distante, parece sempre estar muito próxima.

À amiga *Enely Pisani*, pelo apoio e amizade que atravessa os anos.

Ao Secretário *Belarmino Ney Pereira*, por toda paciência e colaboração durante toda esta jornada.

Às funcionárias da pós-graduação da *FMVZ-USP*, pelo respeito e dedicação.

Aos funcionários da pós-graduação da *UEL*, pela colaboração e prestatividade.

Às minhas amigas *Luciane Biazzone e Tilde Froes*, pela amizade e companheirismo ao longo desses inesquecíveis anos.

À amiga *Carmen Helena Vasconcellos*, pela amizade e por sempre me receber tão bem em sua casa.

À amiga *Janis Regina Gonzales* pela amizade e confecção do Abstract

Às amigas *Sandra, Andressa, Viviane, Patrícia, Tatiana*, pelo carinho e amizade ao longo deste percurso.

Aos meus amigos da pós-graduação *Adriana Lima Teixeira, Alex Barbosa Carvalho, Andréa, Cíntia Godoy, Fernando Barros Nóbrega Maia, Francisco Moreno, João Pigatto, Juliana Freddo, Renata Squarzoni Quinze*, obrigada pelo companheirismo.

Ao Sr. *José*, pelos cuidados e carinho com os animais do experimento.

Ao funcionário *José Miron Oliveira da Silva* por ser sempre prestativo.

Aos funcionários da biblioteca, em especial à *Margareth, Claudia e Rosa*, pelo carinho e receptividade que sempre estiveram presentes ao longo desta caminhada.

Ao Prof. Dr. *Eduardo Alberto Tudury*, pela amizade e por me mostrar os caminhos da pesquisa, no decorrer da graduação. Muito obrigado pelo seu exemplo.

Ao Prof. Dr. *José Luiz Laus*, pela minha formação em cirurgia e em especial em oftalmologia e pelo exemplo de profissionalismo. Minha eterna gratidão.

Aos Professores do Departamento de Clínicas Veterinárias, pelo apoio e compreensão durante a pós-graduação e em especial a *Eliane P. Palaoro* e ao *Hélio Autran de Moraes*, pela amizade e carinho durante momentos difíceis desta etapa.

Às minhas colegas e amigas de trabalho da UEL, *Carmen Hilst*, *Nilva Mascarenhas*, *Mônica Vick Bahr Arias* e *Maria de Lourdes E. Farias*, pelo carinho demonstrado em todos momentos que nos encontramos e por concordar com meu afastamento do trabalho para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao *Prof. Dr. Italmar T. Navarro*, pelo carinho e apoio, mas principalmente por sempre me mostrar os caminhos com muita sabedoria.

Ao *Sr. Edécio* – Centro de Controle de Zoonoses de Osasco - SP, pela colaboração nas doações dos animais experimentais.

Ao laboratório *Bayer SA - Saúde Animal*, pela doação de vermífugos.

Ao laboratório *Fort Dodge Saúde Animal LTDA*, pela doação das vacinas.

Ao laboratório *Schering-Plough Animal Health*, pela doação do teste de produção de lágrima de Schirmer.

À *Farmácia Oftalmológica Ophthalmos*, em especial ao *Dr. Acácio*, pela doação de soluções para o preparo das membranas biológicas.

Aos cães utilizados neste estudo, meu respeito e agradecimento.

À *todos* que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta obra.

À **DEUS**, por sempre iluminar o meu caminho.

RESUMO

Souza, M. S. B. **Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina:** avaliação clínica e morfológica. [Comparative study between lamellar keratoplasty using allogeneous glycerin-preserved amniotic and alantoamniotic membranes in dogs: clinical and morphological evaluation]. 2003. 161 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Ceratite ulcerativa é uma das enfermidades oculares mais comuns em cães e requer tratamento clínico-cirúrgico urgente. Neste contexto, o tratamento cirúrgico com implante de membrana biológica é opção benéfica. Estudou-se o implante de membrana amniótica (MA) e membrana alantoamniótica (MAAM) alógenas preservadas em glicerina a 98% em vinte córneas de cães submetidas previamente à ceratectomia lamelar superficial. Dividiram-se os cães em dois grupos para o estudo aos 2, 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. Avaliaram-se, segundo parâmetros clínico-oftalmológicos e histopatológicos. Clinicamente detectou-se fotofobia e blefarospasmo, tipos e graus de secreção, edema e neovascularização corneana e transparência da córnea no local do implante. Nos períodos pré-determinados as córneas foram submetidas à avaliação histológica. Foram constatados, com base no exame ocular, graus leves a moderado de fotofobia e blefarospasmo; predominou o tipo de secreção mucoso com grau moderado e o edema corneano permaneceu leve no grupo que recebeu MA, e moderada a leve no grupo que recebeu MAAM. A neovascularização intensificou-se no 15º dia de pós-operatório em ambos os grupos. Com base nos achados histopatológicos os grupos evoluíram de forma semelhante; constatou-se o desenvolvimento do processo de cicatrização dentro dos parâmetros normais para a córnea. Concluiu-se que a

utilização da MA comparada com a MAAM de cães preservadas em glicerina a 98% em ceratoplastias não diferem quanto sua evolução segundo os parâmetros adotados para análise. Ambas as membranas são igualmente efetivas como membrana biológica alógena na reparação de defeito corneano.

Palavras-chave: Córnea. Cães. Enxertos em animais. Membranas fetais.

ABSTRACT

Souza, M. S. B. **Comparative study between lamellar keratoplasty using allogeneous glycerin-preserved amniotic and alantoamniotic membranes in dogs:** clinical and morphological evaluation. [Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica]. 2003. 161 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Ulcerative ceratitis is one of the most frequent ocular diseases in dogs and it requires prompt surgical and clinical therapy. In this context, surgical treatment using biological membrane implants is a benefic option. In this study alogenous 98% glycerin-preserved amniotic (MA) and alantoamniotic (MAAM) membranes were implanted on twenty corneas from dogs previously submitted to superficial lamellar keratectomy. Clinical, ophthalmologic and histological parameters were investigated. The animals were divided in two groups and pos-operative corneal histological evaluation was taken on days 2, 7, 15, 30 and 60. Photophobia, blefarospasm, different types and severity of ocular secretion, corneal edema and neovascularization and corneal transparency at the implant site. Ocular examination revealed mild to severe photophobia and blefarospasm, moderate mucous secretion was the most frequent. Corneal edema was mild in the MA group and mild to moderate in the MAAM group. From the 15th pos-operative day neovascularization was more pronounced for both groups. Based on the histological findings the groups showed similar evolution and the healing process was found to be within normal parameters for the corneal tissue. We concluded that in dogs 98% glycerin-preserved MA and MAAM applied to keratoplasty do not differ among the parameters evaluated. Both membranes are equally effective as allogeneous biological membrane for the repair of corneal defects.

Key-words: Cornea. Dogs. Graft. Fetal membranes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva de fotofobia/blefarospasmo em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.	86
Figura 2 -	Representação gráfica da avaliação clínica quanto ao tipo de secreção ocular em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.	87
Figura 3 -	Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva de secreção ocular em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.	88
Figura 4 -	Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva do edema em córneas de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.	89
Figura 5 -	Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva de neovascularização em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.	90
Figura 6 -	Imagem fotográfica da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se aposição da membrana no local da ceratectomia, opacidade do implante e edema adjacente, presença dos pontos de sutura e congestão conjuntival.	91
Figura 7 -	Imagem fotográfica da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se aposição da membrana no local da ceratectomia, opacidade do implante e edema adjacente, presença dos pontos de sutura e congestão conjuntival.	91
Figura 8 -	Imagem fotográfica da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se edema da córnea adjacente ao implante, presença de neovascularização iniciando-se nas proximidades do limbo e invadindo o local do implante e a presença dos pontos de sutura.	92
Figura 9 -	Imagem fotográfica da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se edema da córnea adjacente ao implante, presença de neovascularização iniciando-se nas proximidades do limbo e invadindo o local do implante e a presença dos fios de sutura.	92

Figura 10 -	Imagem fotográfica da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se neovascularização da córnea e de todo o implante, edema adjacente ao implante, presença de pontos de sutura e granuloma de fio.	93
Figura 11 -	Imagem fotográfica da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se neovascularização da córnea e do implante vindos do limbo, edema adjacente ao implante e presença dos pontos.	93
Figura 12 -	Imagem fotográfica da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se neovascularização da córnea, opacidade na região do implante e presença de granuloma de fio.	94
Figura 13 -	Imagem fotográfica da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se neovascularização da córnea, opacidade na região do implante e presença de granulomas de fio.	94
Figura 14 -	Imagem fotográfica da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se neovasos vindos do limbo, opacidade na região do implante e presença de granulomas de fio.	95
Figura 15 -	Imagem fotográfica da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se neovascularização da córnea e no local do implante, opacidade na região do implante e presença de granulomas de fio.	95
Figura 16 -	Fotomicrografia da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – inflamação intensa aguda (HE, 400X) e B – adesão do implante sem epitелização (HE, 100X).	101
Figura 17 -	Fotomicrografia da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – inflamação por polimorfonucleares e linfócitos não muito intensos, presença de seqüestro (HE, 400X), B – inflamação por polimorfonucleares, totalmente epitелizado e presença de epitелio infiltrando-se por baixo do implante (HE, 400X), C – neovascularização, presença de fio de sutura, epitелio infiltrando-se ao redor do fio de sutura e edema estromal (HE, 400X) e D – neovascularização importante (HE, 400X) .	101
Figura 18 -	Fotomicrografia da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – acantose, fibrose, epitелização total do implante, neovascularização intensa e inflamação (HE, 200X) e B – neovascularização intensa (HE, 400X).	102

Figura 19 -	Fotomicrografia da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – não se reconhece o implante (HE, 100X) e B – fibrose superior e edema inferior (TM, 100X).	102
Figura 20 -	Fotomicrografia da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – epitélio normal (PAS, 200X) e B – presença de reação tipo corpo estranho pela presença de fios de sutura (HE, 400X).	103
Figura 21 -	Fotomicrografia da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – inflamação com predominância de polimorfonucleares (HE, 400X) e B – incorporação parcial do implante com parte não aderida (HE, 100X).	103
Figura 22 -	Fotomicrografia da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – epitélio atrófico e totalmente epitelizado (HE, 400X) e B – inflamação aguda e neovascularização (HE, 200X).	104
Figura 23 -	Fotomicrografia da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – não se reconhece o implante e neovascularização intensa (HE, 100X) e B – edema estromal com fibras totalmente compactadas (HE, 200X).	104
Figura 24 -	Fotomicrografia da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – epitélio normal, neovascularização e inflamação crônica (HE, 200X), B – reação tipo corpo estranho, incorporação total do implante, edema estromal inferior, fibrose superior, neovascularização e endoteliose (HE, 100X), C – comparação entre a fibrose (superior) e edema (inferior) e presença de neovascularização(TM, 100X) e D – fibrose superior e edema inferior (TM, 200X).	105
Figura 25 -	Fotomicrografia da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – epitélio normal e neovascularização superior (HE, 400X) e B – edema estromal inferior e fibrose superior (HE, 400X).	105

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A.D.		Ano domini
ARVO	-	Association for Research in Vision and Ophthalmology
ATPase	-	Adenosina Trifosfato
bFGF		Fator de crescimento fibroblástico básico
cm	-	Centímetro
FMVZ	-	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
°	-	Grau
°C		Graus Celcius
GI	-	Grupo I
GII	-	Grupo II
TGF α	-	Fator Transformador de Crescimento α
TGF β	-	Fator Transformador de Crescimento β
HE	-	Hematoxilina eosina
K ⁺	-	Íon potássio
Na ⁺	-	Íon sódio
®	-	Marca registrada
MAAM	-	Membrana Alantoamniótica
MA	-	Membrana Amniótica
mcg	-	Micrograma
μ m	-	Micrômetro
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetros

mg	-	Miligrama
PAS	-	Periodic Acid-Schiff
PSGAG		Polisulfato de glicosaminoglicana
%	-	Porcentagem
pH	-	Potencial hidrogeniônico
kg	-	Quilograma
TGF- β		Fator transformador de crescimento β
TM		Tricrômio de Masson
UI	-	Unidades internacionais
USP	-	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	ANATOMIA, HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DA CÓRNEA	22
2.2	REGENERAÇÃO E CICATRIZAÇÃO DA CÓRNEA	31
2.3	CERATITES ULCERATIVAS	36
2.3.1	Terapêutica clínica e clínico-cirúrgica	39
2.3.2	Terapêutica cirúrgica	48
2.4	MEMBRANAS BIOLÓGICAS	52
2.4.1	Membrana amniótica	55
2.4.1.1	Embriologia, histologia e função da membrana amniótica	56
2.4.1.2	Membrana amniótica em cirurgias oculares reparadoras	59
3	MATERIAL E MÉTODO	72
3.1	ANIMAIS	72
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	73
3.3	OBTENÇÃO E PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA ALÓGENA	73
3.4	OBTENÇÃO E PREPARO DA MEMBRANA ALANTOAMNIÓTICA ALÓGENA	74
3.5	PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS E CIRÚRGICOS	75
3.6	PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO	77
3.6.1	Avaliação clínico-oftalmológica	77
3.6.2	Avaliação morfológica	78
3.6.2.1	Microscopia óptica de luz	78

3.6.3	Avaliação estatística	79
4	RESULTADOS	80
4.1	AVALIAÇÃO CLÍNICO-OFTALMOLÓGICA	80
4.1.1	Quemose	80
4.1.2	Congestão	80
4.1.3	Grau de fotofobia e blefarospasmo	81
4.1.4	Tipos e graus de secreção ocular	81
4.1.5	Edema	82
4.1.6	Neovascularização	83
4.1.7	Viabilidade e transparência do implante	84
4.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	96
4.3	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	106
5	DISCUSSÃO	107
6	CONCLUSÕES	132
	REFERÊNCIAS	133
	APÊNDICES	153

1 INTRODUÇÃO

As úlceras de córnea e as enfermidades que levam à avulsão parcial da córnea, requerem reparações cirúrgicas, como apoio terapêutico, muitas vezes, imprescindíveis à restauração da integridade das estruturas lesadas.

Estas afecções, quando não tratadas ou tratadas de forma inadequada, podem acarretar deficiência ou perda da visão, infecção intraocular ou, nos casos mais graves, a perda do bulbo ocular.

Com base nisto, ressalta-se a aplicação cirúrgica dos implantes de córnea que apresentam propriedades benéficas na reestruturação das porções danificadas da córnea. As membranas fetais, particularmente, a membrana amniótica, apresentam efeito antiinflamatório, antibacteriano e de substrato nas queimaduras oculares e em outras lesões da córnea. Nos animais, quando implantada a membrana fetal, observam-se igualmente efeitos benéficos na reparação da área lesionada.

Em busca da real importância de se separar a membrana amniótica da membrana alantóide, resolveu-se explorar em ceratoplastias lamelares a membrana amniótica comparada à membrana alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina a 98% em olhos de cães, buscando-se a reestruturação de uma córnea lesada, mimetizando, possivelmente um quadro de ceratite ulcerativa. Enfermidade esta muito comum na oftalmologia veterinária. Para tanto, avaliou-se a evolução clínica e morfológica, com a finalidade de registrar a evolução do processo de cicatrização destas membranas junto à córnea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA, HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DA CÓRNEA

A superfície ocular mantém-se em constante contato com o meio externo sendo, desta forma, o constituinte do bulbo ocular mais suscetível aos traumas e agressões, que advêm do meio exterior.

O bulbo ocular possui mecanismo de defesa próprio e mantém homeostasia com o restante do organismo (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999). Incluem-se no grupo de mecanismos de defesa as pálpebras, os cílios e a membrana nictitante ou da terceira pálpebra, que também estimulam o reflexo de piscar. O movimento de piscar induz, sincronicamente, ao estímulo reflexo no aparelho lacrimal, auxiliando na eliminação de corpos estranhos.

O filme lacrimal tem como função diluir substâncias estranhas, como toxinas e proteínas, e equilibrar a microbiota normal local (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999).

O bulbo ocular é limitado anteriormente pela córnea, posteriormente pela esclera e a zona de transição entre estas duas estruturas é conhecida por limbo (SCHOENAU; PIPPI, 1993).

A córnea é transparente, avascular e desprovida de pigmentos. No cão sua espessura varia de 0,45mm a 0,55mm no centro e 0,5mm a 0,65mm na periferia (SAMUELSON, 1999). Sua espessura aumenta significativamente com a idade (MURPHY; POLLOCK, 1993). Ela é mais espessa nas fêmeas do que nos machos.

Apresenta variação racial, individual e entre as espécies. Seu raio é de aproximadamente 8,5mm a 9,0mm. As raças de cães de grande porte apresentam pequeno achatamento axial da córnea, quando comparada com as raças de pequeno e de médio porte. Sua dimensão médio-lateral é 10% maior que a dorso-ventral, cuja dimensão é 16 a 18mm, proporcionando formato ovalado à córnea (MURPHY; POLLOCK, 1993).

A córnea tem como funções dar suporte aos constituintes intraoculares, a refração (devido a sua curvatura) e a transmissão da luz (por sua transparência). É nutrida pela lágrima e humor aquoso os quais são, também, responsáveis pela limpeza da superfície ocular (SAMUELSON, 1999).

A córnea do cão é formada por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio, de fora para dentro (SAMUELSON, 1999). Alguns autores consideram o filme lacrimal como uma quinta camada (SLATTER, 1992). Há ainda uma camada denominada de membrana de Bowman localizada entre o epitélio e o estroma nos homens, primatas, aves, coelhos e grandes herbívoros (SAMUELSON, 1999).

O epitélio é simples, escamoso, não ceratinizado e contíguo ao epitélio conjuntival (HELPER, 1989). Ele cobre a superfície externa da córnea e mede aproximadamente 25 a 40 μm de espessura. O epitélio é mais espesso na periferia do que no centro (SAMUELSON, 1999). O epitélio é uma membrana semipermeável, suscetível a dessecação, trauma, inflamação, toxicidade por drogas e hipóxia. Nos cães, o epitélio consiste de uma simples camada de células basais, duas a três camadas de células poliédricas e duas ou três camadas de células escamosas não ceratinizadas (SAMUELSON, 1999). As células profundas vão se tornando

achatadas à medida que se superficializam, pelas descamações que ocorrem naturalmente na córnea (SLATTER, 1992).

A camada mais interna do epitélio é a membrana basal, que é realçada no corte histológico e corada com *Periodic Acid-Schiff* (PAS). Na primeira camada de células basais, as células são firmemente aderidas à lâmina basal por hemidesmossomos, apoiando as fibras de colágeno e a lâmina glicoproteica. Diferentes tipos de colágeno, em especial o tipo IV, hialuronato e fibronectina, também contribuem para esta adesão.

Células em asa são agrupamentos de células poligonais, sendo dispostas em duas ou três camadas e entre as camadas. Em algumas espécies, estas camadas formam uma zona de transição entre as células colunares basais e as células escamosas mais superficiais (SAMUELSON, 1999). Estas células apresentam características próprias, que é a presença de tonofilamentos intracelulares feitos de subunidades de ceratina (POWER; NEVES, 1996).

A camada superficial é composta por células achatadas e poligonais. Contém muitos microvilos e micropregas. A função dessas microprojeções é controversa, mas acredita-se que elas colaborem na estabilização do filme lacrimal na superfície corneana (SAMUELSON, 1999).

O estroma ou substância própria compreende 90% da espessura da córnea (SAMUELSON, 1999; SLATTER, 1992). É composto por fibrócitos (ceratócitos), fibroblastos, fibras de colágeno e substância fundamental. O espaço entre as fibras contém fibroblastos que produzem colágeno do tipo I e II (BANKS, 1993). Nesses espaços dispostos ao acaso, encontram-se linfócitos, macrófagos e neutrófilos ocasionais (SLATTER, 1992). As fibras de colágeno são arranjadas paralelamente, sendo as lamelas posteriores mais regulares em sua disposição, quando

comparadas às do terço anterior do estroma (SLATTER, 1992). O espaçamento regular das fibras colágenas mantém a transparência da córnea (SLATTER; HAKANSON, 1993). As lamelas anteriores são mais oblíquas na superfície. As fibras de colágeno, juntamente com as proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, compõem 15 a 25% do estroma, e fornece o principal suporte da córnea. Dentre as glicosaminoglicanas, encontram-se mais freqüentemente o queratan sulfato (65% do total). Estas substâncias têm a capacidade de reter e absorver água (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999). Os ceratócitos estromais podem sintetizar colágeno, glicosaminoglicanos e mucoproteína da substância fundamental (SLATTER; HAKANSON, 1993). Estes formam uma complexa rede, interconectada por *gap junctions*, e participam da homeostase estromal através da síntese e degradação de moléculas (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999).

A membrana de Descemet é uma camada homogênea, acelular, sendo o limite interno de proteção da córnea (SAMUELSON, 1999), e considerada a membrana basal do endotélio (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999). É composta por colágeno do tipo IV, laminina e fibronectina. A fibronectina tem a função de promover a adesão das células endoteliais à membrana de Descemet (POWER; NEVES, 1996). É uma estrutura elástica e seus extremos se enrolam para trás da câmara anterior, quando rompida (SAMUELSON, 1999; SLATTER, 1992). Essa membrana não se cora com a fluoresceína (SLATTER, 1992), embora se core, positivamente, com a coloração de PAS, quando comparada à outras membranas basais (SAMUELSON, 1999). É produzida a partir das células endoteliais e sua espessura aumenta com a idade (POWER; NEVES, 1996; SAMUELSON, 1999; VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999).

O endotélio ou mesotélio é composto por uma simples camada de células achatadas que reveste internamente a membrana de Descemet. O endotélio e a membrana de Descemet são considerados contínuos à íris e corpo ciliar (HELPER, 1989). A microscopia especular e a eletrônica de varredura mostram que as células apresentam formato hexagonal, microvilosidades e poros (SAMUELSON, 1999). Há controversas quanto à habilidade regenerativa desta camada. Suas células não se proliferam, *in vivo*, no homem, no macaco e no gato, e observações opostas foram descritas no coelho (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999). Quando há perda endotelial, ocorre deslizamento das células vizinhas na tentativa de repor o espaço deixado por estas células (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999). Em cães jovens, quando há destruição de até 90% desta camada, a regeneração ocorre em seis semanas. A limitada capacidade de replicação das células endoteliais está relacionada com a idade e a espécie animal, ocorrendo a diminuição das células endoteliais com a idade (SLATTER, 1992).

A córnea contribui com 74% do poder dióptrico do olho. A refração central é de aproximadamente 43 dioptrias, sendo a soma dos poderes dióptricos referentes ao ar-lágrima, lágrima-córnea e córnea-humor aquoso.

A transparência da córnea é mantida pelo arranjo ordenado das fibras de colágeno, ausência de pigmentos e vasos, epitélio desprovido de ceratina e seu estado de deturgescência. Esta deturgescência é mantida pela transferência ativa de Na^+/K^+ - ATPase, barreiras epiteliais e endoteliais, superfície de evaporação, pressão intra-ocular e pressão de edema estromal (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999). Qualquer alteração em uma destas barreiras pode resultar na rápida movimentação de água para dentro do estroma, que é altamente hidrofílico (SAMUELSON, 1999; SCHOENAU; PIPPI, 1993; VAUGHAN; ASBURY, 1990).

A perda epitelial pode resultar em aumento de 200% na espessura da córnea e a perda endotelial pode resultar em aumento de até 500% (GUM; GELATT; OFRI, 1999; SCHOR; BERFORT JR., 1996; SEVERIN, 1989). A força osmótica entre a lágrima, o humor aquoso e o estroma corneano provavelmente afetam a hidratação da córnea, porém o mecanismo é ainda desconhecido (GUM; GELATT; OFRI, 1999; SEVERIN, 1989).

O endotélio remove água por osmose. As junções celulares endoteliais são menos eficientes que as epiteliais. A bomba endotelial consiste de enzimas localizadas na parede lateral das membranas plasmáticas, são ATPase dependentes, produzidas pelas mitocôndrias presentes nas células endoteliais. A ATPase que transporta íons bicarbonato para o humor aquoso, assim como a que transporta sódio e potássio, são importantes na homeostasia corneana.

A evaporação da água do filme lacrimal produz leve hipertoxicidade do filme lacrimal, que pode ser fator importante na retirada de água do estroma corneano e ajudar a manter o estado de desidratação (VAUGHAN; ASBURY, 1990).

O edema corneano pode ocorrer juntamente com traumas, inflamações e muitos processos degenerativos da córnea (SPENCER, 1996). Este é um resultado do excesso de água no epitélio e/ou no estroma, podendo causar desconforto, redução da visão e predisposição à infecção (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996a). Como resultado do excesso de água ocorre aumento da espessura do tecido em decorrência do acúmulo de fluido no interior e entre as lamelas (SPENCER, 1996). O diâmetro das fibrilas de colágeno permanece o mesmo e o fluido adicional aloja-se no espaço interfibrilar (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996a). Além disso, há menor aumento no volume devido ao inchaço dos cetarócitos e, na fase inflamatória, há influxo de células inflamatórias tipo polimorfonucleares (SPENCER, 1996). O diâmetro

corneano e o raio de curvatura da córnea não se alteram. O edema projeta-se posteriormente, promovendo encurtamento e pregueamento da membrana de Descemet (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996a).

Caso o epitélio seja removido ou lesado, o espessamento estromal resultante será leve, restrito e subjacente à área epitelial lesada, neste caso, manifestação de dor e/ou diminuição da visão é evidenciada (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996a).

O edema estromal moderado sem envolvimento epitelial, tem pouca influência na visão, embora possa permanecer crônico levando a opacidades estrômicas, dobras de Descemet e a astigmatismo irregular com redução da visão (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996a).

O edema epitelial leva a diminuição da visão e a irregularidade da superfície corneana (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996a). Comumente, o edema é reversível, se a causa for removida e se o equilíbrio dos líquidos for restabelecido. O edema crônico pode causar vascularização da córnea ou ceratopatia bolhosa, onde se formam vesículas contendo líquido no epitélio ou sob ele (SLATTER; HAKANSON, 1993).

O edema é caracterizado por vários graus de opacidade, denominando-se as opacidades menores de nébula, as opacidades acinzentadas de mácula e as opacidades branco-densas de leucoma (BANKS, 1993).

Com o aumento da pressão intra-ocular ocorre edema, que pode ser reversível, caso a pressão retorne rapidamente ao normal. Neste caso o edema é causado pelo influxo de humor aquoso, perda da integridade endotelial, ruptura do arranjo das fibras de colágeno ou pela combinação destes fatores (GUM; GELATT; OFRI, 1999).

A nutrição da córnea é realizada por capilares do limbo, pelo filme lacrimal e pelo humor aquoso (MURPHY; POLLOCK, 1993). O metabolismo da glicose é a

fonte principal de energia que se difunde através do humor aquoso. O oxigênio difunde-se principalmente através da lágrima, e em menor quantidade pela circulação límbica e aquosa. (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999).

A inervação da córnea é rica, em nervos sensoriais oriundos do nervo ciliar longo, e este da divisão oftálmica do nervo trigêmeo. A camada de células epiteliais é ricamente inervada e suas terminações nervosas são desprovidas de bainha de mielina. As camadas mais superficiais são primariamente inervadas por receptores da dor, e o estroma apresenta predominância de receptores de pressão. Neste caso, as lesões superficiais, em que ocorre exposição das terminações nervosas, resultam em dor intensa, e são sempre mais dolorosas que as lesões mais profundas (SAMUELSON, 1999). A córnea apresenta sensibilidade 100 vezes maior que a conjuntiva (VIEIRA; LIMA; CUNHA; MASCAVO, 1999).

Por estimulação do ramo ciliar sensorial da divisão oftálmica do nervo trigêmeo, a dor comumente está presente nas inflamações corneanas. Embora a inflamação da córnea por herpes simples, possa diminuir a sensação da córnea (SPENCER, 1996).

A córnea é desprovida de vasos. A vascularização da córnea pode ser considerada parte da resposta a um processo inflamatório. A vascularização do limbo contém anastomose entre vasos superficiais, derivados da circulação conjuntival, e vasos profundos, derivados da circulação ciliar-episcleral anterior. Os vasos profundos são contínuos com a vascularização da íris. Muitas inflamações corneanas estão associadas ao reflexo de dilatação dos vasos da íris e irites. Ceratoirites podem causar um derramamento de leucócitos da íris para a câmara anterior, produzindo hipópio (SPENCER, 1996).

A neovascularização da córnea aparece em resposta a vários fatores, incluindo edema, infiltração de células e necrose tecidual, que podem estar relacionados a algumas afecções e processo de cicatrização. Esses fatores estão associados, possivelmente, a alterações no pH, modificação do processo oxidativo e por liberação de enzimas das células inflamatórias e necrose do estroma, e do epitélio (SLATTER; HAKANSON, 1993, SPENCER, 1996). A reação vascular inicial por inflamação da córnea é a hiperemia perilimbar que pode apenas permanecer na periferia, assim como envolver outras estruturas (SPENCER, 1996). A vascularização pode ser superficial ou profunda (SLATTER; HAKANSON, 1993).

A vascularização superficial é observada quando os vasos invadem até um terço anterior do estroma, tendo continuidade com a circulação conjuntival através do limbo. Esses vasos superficiais apresentam coloração vermelho-vivo e se ramificam (SLATTER; HAKANSON, 1993) e estão relacionados com doenças da camada subepitelial (SPENCER, 1996). Nas lesões superficiais os capilares do limbo estendem-se até a camada subepitelial (SPENCER, 1996).

A vascularização profunda tem continuidade com a circulação ciliar e desaparece no limbo. Geralmente, esses vasos profundos são mais curtos, retilíneos e de coloração vermelho-escuro. Eles estão relacionados com as lesões corneanas profundas (SLATTER; HAKANSON, 1993) e com lesões estromais (SPENCER, 1996). Com a vascularização profunda, os capilares límbicos estendem-se entre as lamelas estromais (SPENCER, 1996).

A profundidade da vascularização traduz o nível da lesão, assim como a evolução pós-operatória de uma determinada afecção. Embora a vascularização seja uma resposta benéfica para a reparação da córnea, este processo reduz a sua transparência, assim como induz a presença de pigmento e ocasionais transportes

de anticorpos e células inflamatórias, que podem advir do processo de cicatrização ou em consequência dele (SLATTER; HAKANSON, 1993).

Durante a fase inicial da inflamação, geralmente, não são vistos vasos na córnea, embora o estímulo para iniciar a neovascularização, evidentemente, já tenha ocorrido (SPENCER, 1996).

A extensão da neovascularização varia com a severidade, com o foco inflamatório e com a duração da lesão. Com a diminuição da intensidade da inflamação, os vasos regredem e perdem a evidência, embora possam persistir como vasos fantasmas, que são clinicamente visíveis por alguns anos e podem ser detectados histologicamente. O fator que inicia a involução da vascularização não é conhecido (SPENCER, 1996).

O filme lacrimal e o epitélio servem como efetiva barreira para a invasão de microorganismo à córnea. A interrupção desta barreira permite que a infecção tenha acesso às camadas mais profundas. A membrana de Descemet serve de barreira limitante e resiste à perfurações por um período considerável de tempo, após a destruição do estroma (SPENCER, 1996).

2.2 REGENERAÇÃO E CICATRIZAÇÃO DA CÓRNEA

O epitélio corneano é do tipo pavimentoso estratificado não ceratinizado e representa 10 a 12 % da espessura total da córnea humana. Sob microscopia óptica há três tipos principais de células: superficiais ou escamosas, intermediárias ou em forma de asa e basais (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996b).

As células basais constituem a camada epitelial germinativa. O epitélio límbico corresponde à zona de transição entre o epitélio corneano e conjuntival. Este difere morfológicamente do epitélio da córnea, por possuir células de Langerhans e melanócitos e do epitélio conjuntival pela ausência de células caliciformes (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996b).

As células germinativas (*stem cells*) localizam-se na região límbica. Na córnea, a região correspondente às células germinativas é a das paliçadas de Vogt. As células germinativas entram em mitose originando uma célula filha diante da necessidade da regeneração tecidual. Estas células permanecem como células germinativas, pois garantem o reservatório de células precursoras e a outra se destina a dividir e diferenciar-se em células epiteliais da córnea. Esta última é conhecida como célula amplificadora transitória, advém das células germinativas, apresenta maior atividade mitótica e tem tempo de vida mais curto (ALVES; KARA-JOSÉ, 1996b). Estas células formam o grupo de células basais e à medida que estas células se dividem ocorre a migração da periferia para o centro da córnea. Quanto mais ao centro da córnea tornam-se mais diferenciadas perdendo parte da capacidade de divisão rápida. Estas células retornam a esta habilidade de divisão quando são novamente estimuladas. Somente as células basais entram em mitose e as células filhas são empurradas para a superfície.

O processo de cicatrização da córnea pode ser dividido em três componentes principais: migração, proliferação e adesão tecidual. Os fatores são interdependentes e ocorrem simultaneamente, porém a contribuição de cada um varia de acordo com a área, profundidade e causa da lesão (GOMES; LIMA; ADAN, 1999).

A cicatrização da córnea ocorre de forma diferente nas lesões superficiais e profundas, nas perfurações e nas complicações.

Nas lesões superficiais, a cicatrização se dá por migração e mitose celular. A migração celular inicia-se imediatamente após ter ocorrido a lesão. Uma hora após, as células pertencentes à camada do epitélio basal passam a se achatar (KERN, 1990; NASISSE, 1985). Decorridas seis horas ocorre deslizamento das células epiteliais na tentativa de recobrir a área desnuda (NASISSE, 1985). Neste processo estão envolvidas as células epiteliais de transporte, que são também conhecidas como células poligonais, localizadas entre a camada de células superficiais e basais. Seqüencialmente, na área desnuda são secretados fibrina, fibrinogênio e fibronectina (KERN, 1990). Leucócitos polimorfonucleares chegam até a lesão pelo filme lacrimal e inicia-se a remoção dos *debris* celulares remanescentes (KERN, 1990; NASISSE, 1985). Há mitose ativa e migração celular no período de três a quatro dias após o trauma e o processo de reparação se completa em cinco a sete dias, com reconstituição da arquitetura normal (KERN, 1990; NASISSE, 1985). O sistema nervoso simpático, hormônios, fatores de crescimento e mensageiros bioquímicos podem influenciar neste fenômeno (KERN, 1990). Caso ocorra perda total do epitélio, a córnea será recoberta, entre 48 e 72 horas, pelo deslizamento das células epiteliais conjuntivais. Inicialmente, a cicatriz da camada epitelial é delgada. Em um período que pode variar de poucas semanas a alguns meses, o epitélio conjuntival assume características morfológicas normais. O epitélio é completamente restabelecido em aproximadamente duas semanas (WHITLEY; GILGER, 1999).

Nas lesões profundas, em que há envolvimento do epitélio e de um quarto do estroma, a reparação ocorre mais lentamente por deslizamento epitelial e substituição estromal. O epitélio da margem da lesão se achata e desliza, cobrindo a

ferida e preenchendo-a (WHITLEY; GILGER, 1999). Em seguida ocorre proliferação de fibroblastos, que se inicia pelo estroma. Os fibroblastos provêm dos ceratócitos estromais e histiócitos, e então continua a reação de fibroblastos. Os ceratócitos das margens da lesão morrem por apoptose, e a área desnuda é preenchida por um tampão de fibrina (ALVES; NAKASHIMA, 1999). Os leucócitos polifonucleares participam do debridamento proteolítico dos restos celulares, vindos principalmente do filme lacrimal e, em menor grau, por migração a partir do estroma. Em três dias, ceratócitos ativados da periferia da lesão iniciam a secreção de colágeno. Fibroblastos, convertidos em ceratócitos, invadem a ferida por estimulação do epitélio de revestimento. Colágeno é secretado continuamente por algumas semanas, aumentando a resistência da ferida por três a seis meses (KERN, 1990; NASISSE, 1985).

Lesões que levam a perfuração da membrana de Descemet, fazem com que a borda desta camada se enrole e um tampão de fibrina recubra o local da ferida. Em poucas horas, células endoteliais adjacentes migram e cobrem o defeito. A habilidade mitótica do endotélio apresenta comportamento diferente entre as espécies (KERN, 1990; SLATTER, 1992). Estas células originam uma nova membrana de Descemet (ALVES; NAKASHIMA, 1999; SLATTER, 1992). Uma vez restabelecida a camada endotelial, ela retorna às suas funções normais, de barreira e de bomba, mantendo assim, a deturgescência, a espessura e a transparência da córnea (ALVES; NAKASHIMA, 1999).

A cicatrização da córnea passa a ser complicada quando o processo normal de reestruturação de córnea é retardado ou impedido. Os principais fatores que desencadeiam este processo são a persistência do fator desencadeante ou a invasão de microorganismo (NASISSE, 1985).

A simples quebra da barreira epitelial predispõe a córnea à invasão por microrganismos. As células inflamatórias mostram-se incapazes de deter a multiplicação dos agentes nocivos, ocorrendo a destruição tecidual. Conseqüentemente, há degradação de colágeno e por conseguinte, liquefação da estrutura que, na maioria das vezes, é rápida (NASISSE, 1985).

Bactérias presentes no local iniciam a liberação de enzimas colagenolíticas que permitem sua entrada na córnea. O epitélio e o estroma liberam a colagenase que desencadeia a liquefação pela clivagem das fibras colágenas. Há liberação de proteases e peptidases que por conseqüência contribuem para a posterior destruição do colágeno. Deste evento, também participam diversas enzimas líticas contidas nos leucócitos polimorfonucleares (NASISSE, 1985).

Com a destruição do estroma, há exposição da membrana de Descemet que pode evoluir para perfuração da mesma e da camada subjacente, o endotélio. Caso evolua para perfuração, ocorre extravasamento do humor aquoso que flui através do defeito, ocorrendo prolapso da íris como conseqüência. A íris prolapsada associada à deposição de fibrina tampona o defeito, e conseqüentemente inicia-se o processo de cicatrização. A cicatriz neste local, ocorre de forma bem densa, que é denominada de leucoma aderente (NASISSE, 1985)

A íris prolapsada pode persistir e continuar o extravasamento de humor aquoso, e como conseqüência, pode vir a desenvolver glaucoma, endoftalmite ou atrofia do corpo ciliar e posteriormente *phthisis bulbi* (NASISSE, 1985).

Caso não ocorra a perfuração da córnea, haverá destruição de grande parte das lamelas de colágeno do estroma e esta estrutura apresentará deficiência em sua regeneração. Conseqüentemente após este processo há ativação dos fibroblastos e

formação de tecido cicatricial denso por uma incompleta e demorada reestruturação da córnea, dificultando o retorno a sua transparência (NASISSE, 1985).

2.3 CERATITES ULCERATIVAS

As doenças da córnea foram classificadas, segundo Whitley e Gilger (1999), em causas inflamatórias e não inflamatórias. As causas inflamatórias, também conhecidas como ceratites inflamatórias, foram divididas em ceratites ulcerativas e não ulcerativas. Ainda, segundo Helper (1989), as ceratites ulcerativas, foram subdivididas em simples, profundas, dentríticas ou serpentiginosas, nutricionais ou neuromusculares. Whitley e Gilger (1999) classificaram quanto à profundidade das camadas da córnea em superficiais, estromais, profundas e descemetocelares.

A ceratite ulcerativa é considerada a mais comum das enfermidades oculares que acometem o cão (WHITLEY; GILGER, 1999). Quando não complicadas cicatrizam rapidamente, mas quando complicadas podem comprometer a visão ou progredir para perda do olho por endoftalmite, glaucoma, *phthis bulbi* ou combinação destas alterações (WHITLEY; GILGER, 1999).

Dentre as afecções secundárias que levam à erosão da túnica, pode-se citar os traumas, defeitos palpebrais, anormalidades ciliares e do filme lacrimal, dobras nasais (KERN, 1990; LAFORGE, 1997; NELSON; MACMILLAN, 1988; RENWICK, 1996; SLATTER, 1992; STARTUP, 1984; VAUGHAN; ASBURY, 1990; WHITLEY; GILGER, 1999), corpos estranhos (MORGAN, 1982; RENWICK, 1996; STARTUP, 1984), infecções bacterianas, micóticas e virais (HELPER, 1989; KERN, 1990;

KIRSCHNER, 1990; LAFORGE, 1997; STARTUP, 1984;), queimaduras químicas (GELATT, 2003; KIRSCHNER, 1990; NASISSE, 1985; PORTNOY; INSLEER; KAUFMAN, 1989; RENWICK, 1996; STARTUP, 1984), edema corneano persistente (LAFORGE, 1997; RENWICK, 1996), fator racial nos braquiocefálicos devido à proeminência do bulbo ocular, lagoftalmo e diminuição da sensibilidade corneana (STARTUP, 1984; WOLFER; GRAHN, 1994), deficiência nutricional, causas neurotróficas (HELPER, 1989; STARTUP, 1984), estresse (NASISSE, 1985), doenças imunomediadas, calcificações degenerativas do estroma anterior (KIRSCHNER, 1990), erosão epitelial crônica ou úlcera indolente (STARTUP, 1984) e autotraumatismo (GELATT, 2003).

Os sinais clínicos se manifestam através da dor evidenciada por blefarospasmo, lacrimejamento, fotofobia e protrusão da terceira pálpebra (ANDREW; GELATT, 2001). O blefarospasmo se manifesta por consequência da contração reflexa do músculo orbicular (SEVERIN, 1989). A fotofobia é resultante do espasmo do músculo ciliar por uveíte reflexa (JOBIM, 1983; STARTUP, 1984). Inicialmente há estímulo dos nervos sensitivos da córnea que causa ingurgitamento reflexo dos vasos da íris e consequente miose. Este estímulo sensitivo ocorre pela estimulação reflexa do ramo parassimpático do nervo oculomotor, resultando em espasmo ciliar doloroso (NASISSE, 1985).

Outros sinais evidentes são: hiperemia conjuntival, opacidade e vascularização corneanas e miose, caso ocorra uveíte secundária (STARTUP, 1984).

O diagnóstico fundamenta-se na avaliação da córnea e dos anexos oculares. Para melhor avaliação das camadas da córnea é importante explorá-la com magnificação obtida por lupa de pala e fonte de iluminação ou lâmpada de fenda

para se evidenciar presença de irregularidades na estrutura. O uso de corantes vitais é bastante útil, pois mostra defeitos epiteliais e das outras camadas da córnea. O corante fluoresceína é o mais utilizado, corando apenas o estroma que é hidrofílico; o epitélio e a membrana de Descemet sendo lipofílicos não são corados. O corante Rosa Bengala é um corante vital que cora em vermelho brilhante as células epiteliais degeneradas ou mortas e o muco. Este corante é menos utilizado e é indicado quando houver deficiência do filme lacrimal.

Opacidade ocorre em decorrência do desenvolvimento do edema em alguma das camadas da córnea.

A vascularização corneana sugere a duração e a natureza da úlcera. Quando os vasos se mostram na forma de árvore há acompanhamento de alterações superficiais; quando se manifestarem retos e paralelos, denotam a existência de vascularização profunda. A vascularização intensa indica cronicidade do processo pois os vasos invadem a córnea no máximo um milímetro ao dia (NASISSE, 1985).

É importante destacar, dentre as úlceras, a erosão persistente dos cães ou úlcera refratária ou indolente. Estas úlceras são superficiais e que se curam lentamente e com tendência a recidivar. A espécie mais acometida é o cão, mas também há relatos em gatos e eqüinos. Sua aparência clínica é característica, com a membrana basal epitelial apresentando-se desprendida do estroma. Ocorre por defeito dos hemidesmossomos que aderem o epitélio ao estroma.

2.3.1 Terapêutica clínica e clínico-cirúrgica

A busca da cura das ceratites ulcerativas vem de longa data. Tahija e Chandler (1990) descreveram que o tratamento das úlceras de córnea foi orientado primeiramente por Galen (A.D. 131 a 210) em "Patologia Ocular e Tratamento" recomendou que, em se mantendo a úlcera limpa, a cicatrização ocorreria normalmente. O oftalmologista bizantino Aetius de Amida (A.D. 502 a 575), aconselhou friccionar o interior da úlcera com uma preparação feita com zinco diluído em leite materno e enxaguando com água e leite. Após este período e com o progresso da oftalmologia, no decorrer de todos estes anos, muitas outras terapêuticas conservativas e cirúrgicas surgiram.

Atualmente a terapêutica clínica fundamenta-se em aliviar a dor, impedir ou controlar as infecções, promover a rápida regeneração das camadas da córnea, controlar a lise tecidual e evitar a neovascularização (LAFORGE, 1997).

Inicialmente promove-se o afastamento do possível fator desencadeante da lesão. E por conseguinte, busca-se minimizar a dor através do uso de ciclopégicos. Estes agentes promovem a dilatação da pupila e conseqüentemente, inibem o espasmo ciliar pelo bloqueio dos receptores parassimpáticos da íris e corpo ciliar. Não atuam na dor referente à estimulação dos nervos corneanos. Promovem também a diminuição dos índices de formação de sinéquias secundárias (NASISSE, 1985). A atropina é um fármaco que faz parte desse grupo e é o mais utilizado. Recomenda-se como posologia da atropina que seja instilada uma a quatro vezes ao dia (MILLER, 2001; WHITLEY; GILGER, 1999).

O uso de anestésicos tópicos pode desencadear toxicidade epitelial e seu uso é indicado apenas durante o exame clínico.

Por se saber que os antibióticos tópicos impedem a invasão bacteriana, estes são usados de forma "profilática" e no controle ou remissão da infecção. As bactérias

mais comuns encontradas nas ceratites ulcerativas são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*. São indicadas as associações com três antibióticos: neomicina, bacitracina e polimixina B na posologia de três vezes ao dia, no caso de prevenção da infecção em úlceras superficiais (MILLER, 2001). Outras duas indicações são a tobramicina ou ciprofloxacina a cada uma ou duas horas, nas úlceras profundas e progressivas. Diante das úlceras com *melting* recomenda-se o uso de antibióticos bactericidas como a tobramicina ou as novas fluoquinolonas com posologia de três ou mais vezes ao dias. E quando a úlcera progredir para perfuração recomenda-se associar o antibiótico sistêmico que tenha boa penetração ocular (MILLER, 2001).

As infecções fúngicas têm como agentes causais mais comuns os *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Cândida*. Nestes casos, indica-se a natamicina, miconazol, nistatina, anfotericina B, cetoconazol, fluconazol ou flucitosina a cada uma ou duas horas nos primeiros dois a três dias reduzindo a frequência para seis a oito vezes ao dia durante cinco a 10 dias e então quatro vezes ao dia até resolução do processo.

Os agentes anticolagenolíticos são substâncias que inibem a collagenase e parecem ter efeito primário nas primeiras 48 a 72 horas do início da lesão. Os fármacos conhecidos com este efeito são a acetilcisteína, soro autólogo, ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) (LAFORGE, 1997) e a heparina (NASISSE, 1985; STARTUP, 1984; WHITLEY; GILGER, 1999).

Os lubrificantes oculares são indicados naqueles casos em que a úlcera é desencadeada por ceratoconjuntivite seca, lagoflato ou exoftalmia. Os mais utilizados são à base de metilcelulose, octifenolpolioxietileno e carbopolímeros (LAFORGE, 1997).

Os agentes hiperosmóticos tópicos, como o cloreto de sódio a 5 ou 7,5%, diminuem o edema corneano. Sendo indicados, principalmente, nas úlceras refratárias, em que a redução do edema se torna benéfica para promover a aderência da membrana basal (KERN, 1990; NASISSE, 1985; STARTUP, 1984).

Em alguns pacientes pode-se fazer o uso de antiinflamatório não esteroidais sistêmicos com objetivo da redução da inflamação intraocular e promover conforto ao paciente (MILLER, 2001). O uso de antiinflamatórios esteroidais tópicos é contra-indicado por promover supressão da epitelização, inibição da migração leucocitária, da formação de colágeno e da vascularização da córnea, potencialização da collagenase e supressão inespecífica do sistema imune (NASISSE, 1985). Estes agentes são indicados em certos tipos de ceratite ulcerativa punctata viral e no controle da vascularização, desde que o processo de cicatrização esteja completo e a córnea apresentando teste de fluoresceína negativo (STARTUP, 1984).

Alguns autores recomendam o uso de vitaminas A, C e E, e defendem o benefício destas vitaminas na estimulação da cicatrização da córnea em úlceras refratárias (STARTUP, 1984).

As úlceras refratárias são de tratamento bastante cuidadoso. A literatura recomenda associar à terapia fatores de crescimento epidérmico, aprotinina, soro (plasma), polisulfato de glicosaminoglicanas ou fibronectina (ANDREW; GELATT, 2001; MILLER, 2001; WILKIE; WHITTAKER, 1997).

Os fatores de crescimento epidérmico são polipeptídios encontrados na lágrima. Estes agentes estimulam a mitose das células epiteliais da córnea, aumentam a regeneração epitelial, podendo ser necessário para o metabolismo normal das células epiteliais da córnea e aumentando a síntese de proteínas podem promover a cicatrização da córnea (ANDREW; GELATT, 2001). A aprotinina inibe a

plasmina e outras proteases séricas, uma vez que nas úlceras refratárias encontram-se níveis elevados das plasminas (ANDREW; GELATT, 2001). Soro autólogo apresenta fatores de crescimento e alfa-2-macroglobulina que têm atividade anticolagenase (ANDREW; GELATT, 2001; WOLFER; GRAHN, 1994).

O polisulfato de glicosaminoglicana (PSGAG) inibe as proteases séricas, incluindo a plasmina e os ativadores do plaminogênio. As úlceras refratárias apresentam níveis elevados de proteases lacrimais, cujos níveis são reduzidos após o início da aplicação desta substância (ANDREW; GELATT, 2001). Miller (1996) descreveu a aplicação de PSGAG em 14 cães apresentando úlcera refratária, que com o tratamento convencional tiveram recidiva da lesão. Posteriormente, os cães foram tratados apenas com PSGAG solução a 5%, tópica, três vezes ao dia e debridamento mecânico com *swab* de algodão seco. Após sete dias já havia ocorrido a epitelização da área ulcerada em 83% dos olhos examinados. O autor concluiu que o uso do PSGAG é um tratamento promissor para este tipo de úlcera.

Dentre os tratamentos médico-cirúrgicos destacam-se a aplicação de lentes de contato terapêuticas, os adesivos, os debridamentos ou desepitelização e as ceratotomias. Estas técnicas não requerem anestesia geral ou tranquilização, sendo necessário na maioria dos casos, apenas anestesia tópica.

As lentes de contato hidrofílicas terapêuticas protegem a córnea, aliviando a dor e facilitando a cura por difusão do medicamento e transporte de oxigênio na superfície da córnea. Elas são indicadas para todos os tipos de úlceras e principalmente nas refratárias, que permitem maior contato entre o epitélio e a membrana basal. Também parecem ser benéficas nas ceratites superficiais, descemetocel e perfurações (AQUAVELLA; CERRO; MUSCO; UEDA; DE PAOLIS, 1987; BISTNER, 1992; KERN, 1990; KIRSCHNER, 1990; LAFORGE, 1993;

MORGAN, 1982; PORTNOY; INSLER; KAUFMAN, 1989; RENWICK, 1996; STARTUP, 1984).

Sansom e Barnett (1997) relataram que as lentes de contato estimulam a reepitelização corneana, protegendo-a de efeitos esfoliativos que as pálpebras produzem com o reflexo de piscar, estimulando também a vascularização corneana, permitindo, assim, a cicatrização da lesão. As lentes de contato são indicadas, também na ceratopatia vesicular, prevenindo a ruptura das vesículas, reduzindo a dor, estimulando a reepitelização e promovendo estabilização o filme lacrimal. Sansom e Barnett (1997) recomendam a utilização destas lentes no pós-operatório de simbléfaro, por reduzir as posteriores aderências recidivantes. As lentes de contato terapêuticas são de fácil aplicação e extração, necessitam somente de anestesia tópica. Podem funcionar como sistema distribuidor de medicamento. O uso das lentes de contato é contra-indicado em córneas com úlceras infectadas (HELPER, 1989; LAFORGE, 1993; NASISSE, 1985; SANSOM; BARNETT, 1997). Embora tenham efeitos benéficos, algumas complicações podem ser encontradas, como edema corneano conseqüente a hipóxia no uso inadequado desta lente (NASISSE, 1985; SANSOM; BARNETT, 1997), neovascularização, infecção secundária e perda da lente (NASISSE, 1985).

Andrew e Gelatt (2001) relataram que as lentes de contato são benéficas para o processo de cura da úlcera refratária em 62 a 92% dos casos. A desvantagem encontra-se principalmente no fato das lentes serem de uso humano e seu ajuste é inadequado para as córneas da maioria dos cães. Para isso é necessário o uso de lentes próprias para esta espécie, pois a curvatura da córnea dos cães é muito pronunciada quando comparada à córnea humana.

Os adesivos teciduais são indicados como tratamento das úlceras infectadas ou de rápida progressão ou para a reparação das perfurações. Neste grupo, incluem-se o cianoacrilato (BODAGHI; LÉVY; VOTAN; HOANG-XUAN, 1996; KERN, 1990; LAFORGE, 1993; LAFORGE, 1997; MAGUEN; NESBURN; MACY, 1984; MIZUNO; HAYASAKA, 1982; MOSCHOS; DROUTSAS; BOUSSALIS; TSIOLIAS, 1997; NASISSE, 1985; WENDLER; FALZONI; FALZONI; BELFORT JR., 1983), a película celulósica (BRIK, 1991; PIPPI; SAMPAIO, 1990; SCHOENAU; PIPPI; SCHOSSLER, 1993) e o fibrinogênio (PEYRET, 1986).

O cianoacrilato parece ser o adesivo de eleição (KERN, 1990; LAFORGE, 1993; NASISSE, 1985). Este adesivo é indicado para as pequenas perfurações, descemetoceloses, úlceras estromais profundas e erosão recorrente. Nasisse (1985) relata o aparente efeito antibacteriano e interrupção da liquefação do estroma. Refojo et al. (1968¹ apud SCHOENAU; PIPPI; SCHOSSLER, 1993, p. 174) e Webster Jr. et al. (1968² apud SCHOENAU; PIPPI; SCHOSSLER, 1993, p. 174) foram os pioneiros no uso deste adesivo. Refojo et al. (1968) compararam o cianoacrilato e o silicone em córnea de coelhos, conferindo tolerância ao produto e mostrando ser atóxico. Webster Jr. et al. (1968) utilizaram comparativamente n-heptil2-cianoacrilato e metil2-cianoacrilato em perfurações de córneas humanas, mostrando igualmente efeito benéfico na cicatrização da ferida.

Mizuno e Hayasaka (1982) usaram cianoacrilato com retalho escleral em perfurações corneanas agudas em humanos e obtiveram resultados satisfatórios na preservação das estruturas intra-oculares, favorecendo uma possível ceratoplastia penetrante posteriormente.

¹ REFOJO, M. F.; DOHLMAN, C. H.; AHMAD, B. et al. Evaluation of adhesives for corneal surgery. **Archives of Ophthalmology**, v. 80, n. 11, p. 645-656, 1968.

² WEBSTER JR., R. G.; SLANSKY, H. H.; REFOJO, M. F. et al. The use of adhesive for the closure of corneal perforations. **Archives of Ophthalmology**, v. 80, n. 12, p. 705-709, 1968.

Wendler, Falzoni, Falzoni e Belfort Jr. (1983) utilizaram experimentalmente o cianoacrilato de uso médico comparativamente ao de uso doméstico em perfurações corneanas de cobaias. Os animais foram avaliados com biomicroscopia por um período de sete dias, após o que suas córneas foram submetidas a exame histopatológico. Puderam concluir que ambos os produtos apresentam desempenho satisfatório.

Bodaghi, Lévy, Votan e Hoang-Xuan (1996) investigaram o adesivo de cianoacrilato em nove pacientes humanos com ceratite ulcerativa periférica associados a doenças inflamatórias oculares e concluíram pela efetividade e boa tolerância dos adesivos no tratamento dessas úlceras.

Moschos, Droutsas, Boussalis e Tsioulis (1997) utilizaram cianoacrilato em 365 córneas de pacientes humanos que foram divididos em três grupos: para impedir a perfuração, em córnea perfurada e em perfuração maior que três milímetros. Obtiveram resultados satisfatórios quanto à cicatrização das áreas ulceradas nos três grupos. Concluíram que a cola é um método efetivo para a cicatrização da ferida corneana.

A película celulósica foi estudada por Brik (1991), que a aplicou na córnea previamente desepitelizada de dez coelhos albinos. Os animais foram avaliados por um período de doze horas, após o que se procedeu à retirada da película. O autor observou completa epitelização da ferida corneana decorridas 48 horas do início do procedimento.

Pippi e Sampaio (1990) aplicaram película celulósica em ceratectomia lamelar de coelhos. Os autores estudaram estes animais por um período de 30 dias, e concluíram que o método foi bastante promissor para a proteção e recuperação deste tipo de lesão. Comparativamente, Schoenau, Pippi e Schossler (1993),

estudaram o mesmo tipo de material e suturas convencionais em incisões corneanas de cães produzidas experimentalmente. Obtiveram resultados mais favoráveis em relação à cicatrização com o uso da película comparado à síntese tradicional.

Laus, Rossi, Souza, Barros e Morales (1993) empregaram um adesivo constituído por gelatina, resorcina e formaldeído (Colagel[®]), em córneas de cães previamente submetidos a ceratectomia lamelar superficial. As córneas foram avaliadas clinicamente e por exame histopatológico e mostraram a ineficácia do produto para reparações de lesões corneanas.

Peyret (1986) estudou comparativamente a aplicação de suturas tradicionais e adesivos de fibrinogênio humano (Tissucol 500[®]) em feridas córneo-esclerais produzidas experimentalmente em coelhos. Os animais foram avaliados por até 90 dias e então suas córneas foram submetidas a histopatologia. O autor concluiu que há pouca diferença entre os procedimentos.

O debridamento ou desepitelização mecânica é indicada sempre que a úlcera for persistente. Este procedimento tem por objetivo promover remoção do epitélio desvitalizado, organismos e *debris* celulares (NASISSE, 1985). Em consequência da debridamento ocorrem a estimulação do epitélio adjacente e a produção da membrana basal e hemidesmossomos normais (ANDREW; GELATT, 2001; WHITLEY; GILGER, 1998). Indica-se, após o debridamento mecânico a aplicação de lente de contato, por promover melhor aposição do epitélio ao estroma e proporcionar a proteção epitelial (ANDREW; GELATT, 2001).

Pode-se associar ao debridamento, agentes químicos que têm por objetivo remover o epitélio e membrana basal anormais e *debris* epiteliais e estromais, pois o debridamento mecânico pode não remover o epitélio anormal de maneira suficiente e o estroma anterior alterados. As desvantagens do debridamento químico

são os danos excessivos ao tecido normal e aumento do desconforto após o procedimento (WHITLEY; GILGER, 1999). Na cauterização química é indicado o fenol (RENEWICK, 1996; STARTUP, 1984), o iodo 2% (LAFORGE, 1993; STARTUP, 1984), o ácido tricloroacético, a betadina ND 1% (LAFORGE, 1997) e o iodopovidona 0,2 a 0,5% (ANDREW; GELATT, 2001; WHITLEY; GILGER, 1999).

Ceratotomias punteadas e em grade mostram ser bastante benéficas na estimulação da epitelização (CHAMPAGNE; MUNGER, 1992; LAFORGE, 1997; PICKETT, 1995; RENEWICK, 1996; TURNER; BLOGG, 1997), por aumentar o contato do colágeno do tipo I do estroma ao epitélio ou por permitir uma aderência melhor devido à interrupção do colágeno estromal (ANDREW; GELATT, 2001). Segundo Andrew e Gelatt (2001), ambas as técnicas aumentam a taxa de cura das úlceras refratárias que vão de 72 a 83% após a ceratotomia punteada e 83 a 100% após a ceratotomia em grade.

A ceratotomia é considerada um procedimento de baixo custo, embora exista o risco de perfuração da córnea, especialmente quando este é realizado apenas com anestesia tópica (MILLER, 2001). É importante que se tenha familiaridade com a técnica e prática que são essenciais para o êxito do procedimento (ANDREW; GELATT, 2001).

2.3.2 Terapêutica cirúrgica

O tratamento cirúrgico das lesões ulcerativas da córnea tem despertado o interesse há muitas décadas. A história da ceratoplastia foi descrita por Paton em

1955 (p. 4), onde destacou o pioneirismo de Pellier de Quengsy (1789)³ que propôs substituir a córnea opaca por um implante artificial de vidro. A extensiva referência lista Salzer (1900)⁴; Magitot (1911)⁵; Ascher (1922)⁶; Kuhnt (1922)⁷; Forster (1923)⁸; Castroviejo (1932)⁹; Löhlein (1942)¹⁰; Paufigue, Sourdille e Offret (1948)¹¹; Arruga (1952)¹² entre muitos outros.

É importante destacar que do ponto de vista histórico, a idéia do transplante de córnea teve início há mais de 200 anos. Em 1814, Schmidt¹³ (apud PATON, 1955, p. 4) descreveu a técnica de *flap* conjuntival em gatos e em 1824, Reisinger¹⁴ (apud PATON, 1955, p. 5), propôs substituir a córnea opacificada humana por outra transparente de animal. Tal procedimento foi por ele denominado de ceratoplastia. Boruchoff e Thoft (1984, p. 645) destacaram a era moderna da ceratoplastia pelo pioneirismo do cirurgião alemão Von Hippel¹⁵ no século XIX.

³ QUENGSY, G. P. **Précis au cours d'Opérations sur la chirurgie des yeux**. Didot, Paris, 1789.

⁴ SALZER, F. Kritische and litterarische studien über transplantation in hinblick auf die frage der keratoplastik. **Ztschr. F. Augenh.**, v. 3, p. 516-530 e v. 4, p. 124-145, 1900.

⁵ MAGITOT, A. Recherches expérimentales sur la survie possible de la cornée conservée en dehors de l'organisme et sur la kratoplastie difre. **Ann. D'ocul.**, v. 146, p. 1-34, 1911.

⁶ ASCHER, K. W. Zur keratoplastikfrage. III. Bericht ber die bis zum Ende des Sommersemester 1921 ausgefhrten Hornhautberpflanzungen. **Arch. F. Ophth.**, v. 107, p. 439-479, 1922.

⁷ KUHN, H. III: **Operationen an der Hornhaut**. In: Elschnig, A., Ed.: **Augenrztliche Operationslehre**. V. 1, springer-verlag OHG, Berlin, 1922, p. 514-558.

⁸ FORSTER, A. E. A review of keratoplastic surgery and some experiments in keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology**, v. 6, p. 366-375, 1923.

⁹ CASTROVIEJO, R. Keratoplasty: an historical and experimental study, including a new method. Part I. **American Journal of Ophthalmology**, v. 15, p. 825-838, 1932.

¹⁰ LHLEIN, W. Keratoplastik. In: THIEL, R. (Ed.). **Ophthalmologische operatinoslechte**. Lieferung:, Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1942. p. 249-298.

¹¹ PAUFIQUE, L.; SOURDILLE, G. P.; OFFRET, G. **Les greffes de la corne (kratoplasties)**. Paris: Masson & Cie, 1948. p. 7-39, 137-139, 142-154, 159-164.

¹² ARRUGA, H. **Ocular surgery**. 3^d ed. New York: McGraw- Hill Book, 1952. Transl. By HOGAN, M. J., and CHAPARRO, L. E.

¹³ SCHMIDT, L. **De pupilla arteficiali in sclerotica aperienda**. Dissert. Inaug., Tbingen, 1814; cited in Hippel, A. von. (1877)

¹⁴ REISINGER. Die keratopalastik, ein versuch zur erweiterung der augenheilkunde, **Bayerische Annalcu**, v. 1, p. 207, 1824 cited in CASTROVIEJO, R. (1932) and HIPPEL, A. von. (1877)

¹⁵ von HIPPEL, A. On transplantation of the cornea. **Berichte Ophthalmology Gesellschaft Heidelberg**, v. 18, p. 54, 1886.

Von Hippel¹⁶ (1877 apud PATON, 1955, p. 7), após várias tentativas na busca de uma técnica apropriada para a substituição da córnea opacificada, descreveu uma ceratoplastia penetrante com implante de prótese de vidro de três milímetros de diâmetro, construída por um joalheiro. Os resultados foram pouco satisfatórios.

Somente em 1952, Stocker¹⁷ (apud BORUCHOFF; THOFT, 1984, p. 645) relatou o primeiro sucesso da ceratoplastia para o tratamento de edema corneano. Acreditou que o sucesso deveu-se ao fato do uso de esteróide tópico. Desde então muitos outros estudos foram conduzidos e novas técnicas reparadoras surgiram.

A literatura médica veterinária descreve técnicas que buscam a proteção da córnea como as tarsorrafias (HELPER, 1989; JOBIM, 1983; LAFORGE, 1993; LAFORGE, 1997; MEUNIER, 2001; NASISSE, 1985; SLATTER, 1992), os recobrimentos com terceira pálpebra, também conhecidos como *flap* (BARNETT, 1966; BLOGG; DUTTON; STANLEY, 1989; HELPER; BLOGG, 1983; JOBIM, 1983; LAFORGE, 1993; LAFORGE, 1997; MISHRA, 1991; NASISSE, 1985; RENWICK, 1996; SLATTER, 1992; STARTUP, 1984).

A tarsorrafia e o recobrimento com terceira pálpebra apresentam aplicação limitada no tratamento das ulcerações corneanas, mas são indicados na proptose pós-traumática, na prevenção das ceratopatias por exposição, no tratamento conservativo das erosões recorrentes seguidas de debridamento e na ausência de infecção bacteriana severa (KERN, 1990; NASISSE, 1985). Ambos os procedimentos são contra-indicados no tratamento das ceratites ulcerativas profundas e infectadas, por limitar a inspeção da córnea e a terapia tópica (KERN, 1990). Estas técnicas não promovem suporte nas adjacências da córnea e

¹⁶ von HIPPEL, A. Ueber die operative Behandlung totaler stationärer Hornhaut-Trübungen, **Arch. F. Ophth.**, v. 23, p. 79-160, 1877.

¹⁷ STOCKER, F. W. Successful corneal graft in a case of endothelial and epithelial dystrophy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 35, p. 349, 1952.

interferem com a liberação de *debris* necróticos da superfície, propiciando a instalação de infecção (WILKIE, WHITTAKER, 1997).

Miller (2001) relatou que durante muitos anos os veterinários utilizaram os recobrimentos de terceira pálpebra na tentativa de trazer suporte às úlceras estromais profundas, mas é sabido que isto não ocorre. As células epiteliais da superfície posterior da terceira pálpebra não contribuem para a cicatrização da córnea e a vascularização não leva suprimento para área da lesão corneana, devido ao espaço entre a terceira pálpebra e a córnea.

Os recobrimentos conjuntivais, por sua vez, fornecem proteção para a córnea ulcerada, além de serem considerados uma fonte direta de componentes do sistema imune, incluindo os leucócitos, anticorpos e antiproteases séricas. Segundo NASISSE (1985), estes recobrimentos exercem atividades antimicrobiana e anticolagenolítica significativa.

Neste grupo estão incluídos os recobrimentos conjuntivais em 180° e 360° (BROOKS, 1991; GILGER; WHITLEY, 1999; LAFORGE, 1997;) e enxertos de conjuntiva pediculados (BLOGG; DUTTON; STANLEY, 1989; GILGER; WHITLEY, 1999; LAFORGE, 1997; HAKANSON; MERIDETH, 1987; WILKIE; WHITTAKER, 1997; WOLF, 1991) e em ponte (LAFORGE, 1997; NASISSE, 1985).

Os procedimentos cirúrgicos reconstrutivos são aqueles efetuados diretamente na lesão corneana, empregando suturas e enxertos. Apresentam as vantagens de preservar a transparência da córnea e sua função, podendo ser aplicados nas úlceras profundas e extensas. As desvantagens relacionam-se à habilidade e experiência do cirurgião e seu acesso ao instrumental oftálmico específico (KERN, 1990).

Nassisse (1985) indicou as cirurgias reconstrutivas nas úlceras maiores que 2/3 de profundidade da espessura da córnea, incluindo as descemetoceloses e perfurações. Neste contexto incluem-se as suturas diretas da córnea (HELPER, 1989; KERN, 1990), enxertos de córnea autólogos (BRIGHTMAN; MCLAUGHLIN; BROGDON, 1989; KERN, 1990; KHODADOUST, 1973; KUDVA; DESHPANDE, 1983; PANCHBHAI; KULKARNI, 1986; SOUZA; LAUS; MORALES; FIGUEIREDO; MAIA; VALERI, 1997), alógenos (DICE; SEVERIN; LUMB, 1973; KUDVA; DESHPANDE, 1983; MISHA; REDDY, 1991; ROCHA, 1962) e xenógenos (CHAVES; BARROS; MARTINS; ARAÚJO; ARAÚJO; EURIDES; JACOMINI, 1997; CHAVES; BARROS; MARTINS; ARAÚJO; ARAÚJO; EURIDES; SILVA, 1997; GUIMARÃES, 1979), enxertos de conjuntiva livres (KERN, 1990; MORALES; LAUS; SOUZA; SANTOS; FIGUEIREDO; VALERI, 1996; NASISSE, 1985; SOUZA; LAUS; MORALES; FIGUEIREDO; MAIA; VALERI, 1997; THOFT, 1977; WILKIE; WHITTAKER, 1997) e pediculados (LAUS; SOUZA; MORALES; ANDRADE; FIGUEIREDO; SANTOS; VALERI, 1996; MORALES; LAUS; SOUZA; SANTOS; FIGUEIREDO; VALERI, 1996) e transposições córneo-escleral (GILGER; WHITLEY, 1999; NASISSE, 1985; PARSHALL, 1973; PEIFFER; NASISSE; COOK; HARLING, 1987; POWELL, 1986; SLATTER, 1992) e córneo-conjuntival (KERN, 1990).

Estão inclusos ainda, neste grupo, os implantes de membrana biológica autógena (KOENING; KAUFMAN, 1983; SPOOR; RAMOCKI; COWDEN, 1989), alógena (GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996) e xenógena (BARROS; GARCIA; LAUS; FERREIRA; SALLES GOMES, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; GODOY, 2001; TEIXEIRA, 2000). A literatura médica ainda ressalta os transplantes de limbo como fonte de células germinativas precursoras do epitélio corneano. Os

transplantes de limbo visam a reconstrução da superfície corneana danificada e são indicados em córneas com queimaduras térmicas ou químicas, doenças das membranas mucosas, como a Síndrome de Stevens-Johnson, as anirídias ou as cirurgias múltiplas do segmento anterior (RYMER, 2000). Tal procedimento ainda não foi explorado na medicina veterinária.

2.4 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Diante da necessidade de reconstrução da superfície ocular, por perdas teciduais secundárias a traumatismos e excisões cirúrgicas, e frente às dificuldades de se obter tecidos similares e compatíveis com a estrutura lesada, há muito se buscam opções de tecidos que possuam substituir tal defeito. Neste contexto, as membranas biológicas foram empregadas em diversos estudos experimentais e, devido aos seus comprovados benefícios, atualmente estão sendo aplicadas rotineiramente para fins reparativos em várias especialidades.

O pericárdio eqüino conservado em glicerina foi empregado na reparação de defeitos da aorta abdominal (ANDRETTO; GONZALES; ANTUNES; BORELLI; FERNANDES FILHO; ARAÚJO; GUIDUGLI NETO, 1975), traquéia (ANDRETTO; ORSO; GUIDUGLI NETO; DE VUONO; ANTUNES; BORELLI; IWASAKI, 1976), colédoco (ALVARENGA, 1977), diafragma (RANZANI; GANDOLF; FRANCO; CASTRO; NICOLETTI, 1990) e falhas de fragmentos ósseos (RANZANI; SAMPAIO; FRANCO; CASTRO, 1996). Pericárdio autólogo fresco foi empregado na reconstrução de defeitos do átrio (BRISSEON; HOLMBERG, 2001). Outras

membranas, como o peritônio autólogo e alógeno foram utilizados como substitutos de falhas da parede esofagiana (DALECK; DALECK; GANDOLFI; ALESSI, 1987) e dentre as membranas fetais, a membrana amniótica em feridas cutâneas (PAULO, 1997) e em defeitos de bexiga (REDDY; GUPTA; CHARAN; SING, 1999).

Na oftalmologia veterinária, estas membranas estão sendo amplamente utilizadas para fins reparativos em pálpebra, córnea e esclera. Na busca da reconstrução anatômica e retorno funcional da estrutura, destacam-se: o periósteo autólogo (KOENING; KAUFMAN, 1983), o pericárdio eqüino conservado em glicerina (BARROS; ALVARENGA; STOPIGLIA, 1985; BARROS; BURNIER JUNIOR; RIGUEIRO; MALERBA; SAFATLE, 1990; BARROS; LAUS; MORALES; FERREIRA; SAFATLE, 1996; BARROS; SAFATLE; MALERBA; BURNIER JÚNIOR, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; TEIXEIRA, 2000), pericárdio de cão (KAVINSKI, 1980), membrana amniótica eqüina (BARROS; GARCIA; LAUS; FERREIRA; SALLES GOMES, 1995; GODOY, 2001), peritônio de cão (GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996), cápsula renal eqüina (LAUS; GALERA; SCHOCKEN-ITURRINO; CAVASSANI; ANDRADE, 1999), túnica vaginal autógena (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000) e submucosa intestinal (FEATHERSTONE; SANSOM, 2000; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; LEWIN, 1999).

Spoor, Ramocki e Cowden (1989) citaram a utilização de tecidos autólogos como a membrana mucosa, cartilagem auricular, periósteo, fáscia lata e gordura dérmica com o objetivo de impedir as perfurações corneanas e esclerais.

A busca na reconstrução anatômica, é evidenciada na oftalmologia humana, para a reparação da córnea, conjuntiva e pálpebras. Destacam-se, neste grupo: a fáscia lata e mucosa oral na reconstrução palpebral (MATSUMOTO; NAKANISHI;

URANO; KUBO; NAGAE, 1999), mucosa nasal em simbléfaro (KUCKELKORN; SCHRAGE; REDBRAKE; KOTTEK; REIM, 1996), mucosa oral em córnea (HEHER; KATOWITZ, 1997) e a membrana amniótica em córnea (AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999; AZUARA-BLANCO; PILLAI; SARHAN; DUA, 1998; GABRIC; MRAVICIC; DEKARIS; KARAMAN; MITROVIC, 2000; KIM; TSENG, 1995; KRUSE; ROHRSCHEIDER; VÖLCKER, 1999; LEE; TSENG, 1997; PARIDAENS; BEEKHUIS; VAN DER BOSCH; REMEYER; MELLES, 2001; PIRES; TSENG; PRABHASAWAT; PUANGSRICHARERN; MASKIN; KIM; TAN, 1999; SHIMAZAKI; YANG; TSUBOTA, 1997; SORSBY; HAYTHORNE; REED, 1947; SRIDHAR; BANSAL; SANGWAN; RAO, 2000; TSUBOTA; SATAKE; OHYAMA; TODA; TAKANO; ONO; SHINOZAKI; SHIMAZAKI, 1996), conjuntiva (DE RÖTH, 1940; TSENG; PRABHASAWAT; LEE, 1997) e na bolha filtrante de olhos com glaucoma (BARTON; BUDENZ; KHAW; TSENG, 1997; FUJISHIMA; SHIMAZAKI; SHINOZAKI; TSUBOTA, 1998).

Como meio de preservação das membranas biológicas, o glicerol, ou glicerina, tem-se mostrado bastante eficiente, sendo há muito utilizado para tal fim. Teixeira (2000, p. 57) relatou que o precursor no uso da glicerina como meio de preservação foi Pigossi¹⁸ em 1967, que conservou a dura mater mantendo-a neste meio a 98% em temperatura ambiente.

Mackie (1997) descreveu que a glicerina a 85% foi introduzida como meio de preservação em 1984 no *Red Cross Hospital* mostrando sua superioridade à criopreservação. O autor informou que este meio é satisfatório na preservação de membrana biológica por suas características bactericidas, antivirais e de manutenção da integridade morfológica da estrutura.

¹⁸ PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação da dura-mater**: estudo experimental. 1967. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1967.

A glicerina a 98% em temperatura ambiente é amplamente utilizada como meio de preservação de vários tipos de membranas biológicas, como pericárdio, peritônio e membrana fetal. Isto se deve ao fato de apresentar custo baixo e fácil transporte quando comparado a outros meios (ALVARENGA, 1992¹⁹ apud OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998).

Barros, Safatle, Malerba e Burnier Júnior (1995) recomenda que a estocagem das membranas biológicas na glicerina a 98% deve ser de no mínimo 30 dias, com período máximo de manutenção indeterminado.

2.4.1 Membrana amniótica

As membranas fetais são compostas pelo córion, membrana alantóide, membrana amniótica e saco vitelino. A membrana amniótica merece destaque quanto sua origem embriológica, características histológicas e função por mostrar-se favorável na cirurgia reconstrutiva, em particular, na reconstrução da superfície ocular.

2.4.1.1 Embriologia, histologia e função da membrana amniótica

¹⁹ ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membrana biológica em cirurgia. 1992, São Paulo. In: SEMANA DE CIENCIAS E TECNOLOGIA AGROPECUARIA DA FACULDADE DE CIENCIAS AGRARIAS E VETERINARIAS DA UNESP, 1992, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1992. v. 1, p. 33-42.

Das membranas fetais, a membrana amniótica é a que mais vem sendo explorada pela oftalmologia humana e veterinária, além de outras especialidades. Isto se deve às numerosas características benéficas desta membrana que vinham sendo buscadas para as doenças da superfície ocular, principalmente.

Atualmente a membrana amniótica vem sendo amplamente explorada para fins reconstrutivos e como substrato de lesões da superfície ocular, e mais recentemente, como meio de cultivo celular para células precursoras da córnea, através de fragmento do limbo.

Neste contexto, torna-se importante conhecer a formação, estrutura histológica e funções desta membrana.

A placenta do cão é classificada como zonária anular completa, endotélio-coriônica e lamelar, apresentando hematomas marginais na extensão da cinta placentária. A vascularização da placenta é realizada por vasos funiculares, artérias e veias (AMBRÓSIO, 2001).

As membranas fetais (ou extra-embrionária) são em número de quatro. De fora para dentro estão dispostas em: córion, membrana alantóide, membrana amniótica e saco vitelínico. Estas membranas têm como função: proteger o feto, transferir nutrientes da mãe para o feto, eliminar produtos fetais e sintetizar enzimas e hormônios. As membranas fetais são eliminadas no momento do parto. O embrião é protegido intimamente pela membrana amniótica e alantóide (ROBERTS, 1979).

A membrana amniótica se forma entre o 13º e o 16º dia após a concepção nos ovinos, bovinos, eqüinos, suínos, caninos e felinos. É uma estrutura de origem ectodérmica (ROBERTS, 1979) e é desprovida de vasos (ECKSTEIN; KELLY, 1977). É formada, primeiramente por dois folhetos (falso âmnio e âmnio verdadeiro) que envolvem o embrião. Entre o embrião e a membrana amniótica encontra-se um

espaço, conhecido como espaço amniótico, o qual é preenchido pelo líquido amniótico.

A bolsa alantóidea é composta por dois folhetos, o interno e o externo. O folheto interno apresenta-se unido ao âmnio interno, formando o alanto-âmnio. O folheto externo do alantóide junta-se ao âmnio externo (falso âmnio ou córion primitivo) resultando no alanto-córion.

Entre o alanto-córion e o alanto-âmnio encontra-se o espaço alantóide. Estas estruturas juntam-se mais adiante, aos vasos umbilicais, formando uma única estrutura, o cordão umbilical (GRUNERT; BIRGEL, 1982).

A membrana alantóide forma-se entre a segunda e terceira semana de gestação. Ela é de origem endodérmica, coberta por uma capa vascular de mesoderma esplacnopleural. O folheto externo é ricamente vascularizado. Seus vasos vascularizam todo o córion e quase todo o âmnio (GULAMHUSEIN; BECK, 1975²⁰; MOSSMAN, 1987²¹ apud AMBROSIO, 2001). O folheto interno, que se funde com a membrana amniótica, é desprovido de vasos (ROBERTS, 1979).

A membrana amniótica humana é resistente e transparente (ROBERTS, 1979). Esta membrana é composta de uma simples camada de células colunares firmemente aderida à camada mais interna, mesenquimal, que contém grande quantidade de colágeno (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; POLLARD; AYE; SYMONDS, 1976). A membrana amniótica é composta, além de colágeno do tipo IV e V, por laminina (SHIMAZAKI; YANG; TSUBOTA, 1997). Apresenta membrana basal espessa e uma matriz avascular (GOMES; KOMAGOME; SANTOS; CHAVES; CUNHA; FREITAS, 1999). A superfície apical das células amnióticas tem muitas

²⁰ GULAMHUSEIN, A.P.; BECK, F. Development and struture of the extraembryonic membranes of the ferret. A light microscopy and ultrastrutural study. **Journal of Anatomy**, v. 120, p. 349-365, 1975.

²¹ MOSSMAN, H.J.W. **Vertebrate fetal membranes**. 1987, p. 251-255.

microvilosidades, cujas bases apresentam processos celulares que se estendem na membrana basal em podócitos. Os processos celulares basais apresentam junções tipo hemidesmossomos que aderem a membrana basal com os tonofilamentos e a membrana basal subjacente é parcialmente amorfa e microfibrilar. O citoplasma contém muitas vesículas pinocitóticas, organelas em abundância incluindo retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os núcleos apresentam uma configuração irregular e com indentações na membrana nuclear. Os nucléolos são sempre grandes e homogêneos, sugerindo atividade nucleolar. A ultra-estrutura do epitélio da membrana amniótica tem muitas funções especializadas, entre elas destacam-se: como epitélio de revestimento, como atividade epitelial secretória e como intenso transportador intercelular e transcelular (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999).

Segundo Shimazaki; Shinozaki e Tsubota (1998) o epitélio da membrana amniótica sobrevive até 70 dias após sua preservação em DMSO. Dua e Azuara-Blanco (1999) notaram que depois de congelada a -70° por seis meses a um ano, as células epiteliais da membrana amniótica apresentam-se muito vacuolizadas, mas mantêm-se aderidas à membrana basal e mesenquimal.

Shimazaki, Yang e Tsubota (1997) relataram que as células epiteliais da membrana amniótica produzem fatores de crescimento tal como fator de crescimento do fibroblasto básico e fator transformador de crescimento- β . Estes fatores de crescimento podem modular a proliferação e diferenciação dos fibroblastos estromais. O mesmo autor referiu-se a outras características apropriadas para aplicação da membrana amniótica na superfície ocular: facilidade na obtenção da membrana amniótica, a não expressão de antígenos leucocitários, propriedade antimicrobiana e efeito antiadesivo. Azuara-Blanco, Pillai e Dua (1999) reafirmaram tais propriedades e reforçaram uma característica importante que é a

ausência de imunogenicidade. Lee e Tseng (1997) afirmam ainda que a membrana basal da membrana amniótica facilita a migração de células epiteliais, promove a diferenciação epitelial e previne a apoptose epitelial. Os mesmos autores teorizam que o fator crucial para o sucesso do transplante é o fato da membrana amniótica apresentar a membrana basal espessa e por ter a matriz estromal avascular.

As características da membrana amniótica canina, com relação as suas estruturas histológicas, fisiológicas e imunológicas ainda não foram descritas na literatura, mas acredita-se que se aproximem da membrana amniótica humana.

2.4.1.2 Membrana amniótica em cirurgias oculares reparadoras

Os primeiros relatos do uso da membrana amniótica como material biológico foi descrito por Davis²², em 1910 (apud DUA; AZUARA-BLANCO, 1999, p. 748) e Sabella²³, em 1913 (apud OLIVEIRA, ALVARENGA, 1998, p. 623), na reconstrução cirúrgica da pele.

Desde então o emprego cirúrgico da membrana amniótica vem sendo amplamente explorado. Atualmente vem sendo empregada em feridas, úlceras e queimaduras de pele, reconstituição da vagina, reparação de onfalocele e como adesivo em procedimentos cirúrgicos do abdome, cabeça e pelve (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999).

E em 1940, De Röth descreveu, pela primeira vez, a aplicação da membrana amniótica para fins reparadores da superfície ocular onde foi inicialmente aplicada

²² DAVIS, J. W. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. **Johns Hopkins Medical Journal.**, v. 15, p. 307, 1910.

na correção de defeitos conjuntivais. O autor descreveu que o material ideal para o transplante de conjuntiva deveria ser fino, transparente, liso, estéril e de tamanho apropriado. Estas características foram apontadas, pelo autor, para a membrana amniótica na recuperação de falhas conjuntivais, porém os resultados foram pouco alentadores.

Alguns anos se passaram e Sorsby e Symons²⁴ (1946 apud SORSBY; HAYTHORNE; REED, 1947, p. 409) reafirmaram os benefícios dos transplantes de membrana amniótica no tratamento de queimadura química ocular e Sorsby, Haythorne e Reed (1947) puderam confirmar os resultados favoráveis em 28 olhos tratados por esta técnica.

Embora nos anos 40, tivessem sido relatados os benefícios da membrana amniótica no tratamento de várias doenças da superfície ocular, seu uso foi temporariamente abandonado (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999).

Durante muitos anos a membrana amniótica foi esquecida e somente em 1995, Kim e Tseng reiniciaram estudos da aplicação dessas membranas para fins reconstrutivos em queimaduras da superfície ocular em coelhos, cujos resultados foram bons, mostrando que a membrana amniótica facilita a epitelização por substituir algumas propriedades da membrana basal corneana.

Tsubota, Satake, Ohyama, Toda, Takano, Ono, Shinozaki e Shimazaki (1996) utilizaram transplantes de membrana amniótica e de limbo seguidos, e tarsorrafia associando ainda o soro autólogo, como substituto da lágrima, em pacientes com penfigóide cicatricial e Síndrome de Stevens-Johnson ocular. Os autores obtiveram resultados favoráveis e concluíram que estes procedimentos associados são benéficos para a reconstrução da superfície ocular.

²³ SABELLA, N. Use of fetal membranes in skin grafting. **Medical Records**, v. 83, p. 478-80, 1913.

²⁴ SORSBY, A.; SYMONS, H. M. **British Journal of Ophthalmology**, V. XXX, p. 337, 1946..

No ano seguinte surgiram mais alguns relatos referentes à aplicação da membrana amniótica. Lee e Tseng (1997) aplicaram a membrana amniótica como substrato para úlceras epiteliais persistentes em onze pacientes. Destes, dez apresentaram total cicatrização da lesão e pôde-se concluir que a membrana poderia ser um substrato alternativo para as reparações dos defeitos epiteliais persistentes.

Tseng, Prabhasawat e Lee (1997) estudaram a aplicação de transplante de membrana amniótica na reconstrução de defeitos conjuntivais, sendo em sete olhos por excisão de grande área da conjuntiva e em nove olhos para correção de cicatrizes ou simbléfaros. Os autores puderam constatar o sucesso do procedimento em nove olhos, melhora parcial em dois olhos, formação cística em dois olhos e falha do transplante em três olhos concluindo que a membrana amniótica funcionava como substrato alternativo para estes defeitos conjuntivais.

Shimazaki, Yang e Tsubota (1997) utilizaram a membrana amniótica para a reconstrução da superfície ocular em sete olhos de seis pacientes com queimadura química ou térmica. Estes olhos foram submetidos à excisão do tecido cicatricial da superfície ocular e em seguida receberam transplante de membrana amniótica e límbico. Os pacientes foram avaliados quanto à reconstrução da superfície ocular e acuidade visual, manifestando resultados satisfatórios. Os autores puderam constatar ainda, a ausência de rejeição dos implantes e de formação de fibrose.

No mesmo ano a busca da reconstrução da superfície ocular com a membrana amniótica pôde ser mostrada com sucesso por Gray, Prabhasawat e Tseng e por Puangsricharern e Pariyakanok.

Andrade (2003) estudou proteoglicanos e proteínas da córnea em olhos de coelhos submetidos experimentalmente à queimadura química e deficiência límbica

e tratados com transplante de membrana amniótica, obtendo como resultado redução do defeito epitelial corneano, redução na concentração de proteoglicanos nos olhos tratados ou não com membrana amniótica e que das glicosaminoglicanas identificadas na córnea foram o dermatam sulfato e o queratansulfato.

O papel exercido pelos fatores de crescimento na reconstrução da superfície ocular com o uso de membrana amniótica foi estudado por Sato, Shimazaki, Shinozaki e Tsubota (1998). Os autores demonstraram, por imunohistoquímica, que o TGF- β 1 e HGF estão distribuídos no epitélio e estroma da membrana amniótica e o TGF- β 2 e bFGF estão distribuídos apenas no epitélio. Ao mesmo tempo, avaliaram estes fatores em membranas preservadas e constataram que houve diminuição em 50% dos fatores de crescimento nestas.

Estudos foram realizados com o objetivo de constatar alterações histológicas pela aplicação da membrana amniótica preservada na esclera de coelho. Kubodera, Sato, Shimazaki e Tsubota (1998) constataram o desaparecimento do epitélio em três semanas e completa absorção da membrana em dois meses após sua implantação. Concluíram que o epitélio da membrana amniótica permanece viável por até um mês por apresentar abundância em fatores de crescimento como o bFGF, TGF- β e HGF, que são importantes na reconstrução da superfície ocular.

Azuara-Blanco, Pillai, Sarhan e Dua (1998) estudaram o transplante de membrana amniótica em pacientes humanos com defeito epitelial persistente após abscesso corneano. Os autores dividiram os pacientes em três grupos: para impedir perfurações, em perfurações recentes e em simbléfaro. A cicatrização foi mostrada de maneira satisfatória no primeiro e ultimo caso, e considerada ineficiente em pacientes com perfurações.

A aplicação de várias camadas de membrana amniótica foi estudada por Kruse, Rohrschneider e Völcker (1999) em úlcera refratária profunda. As úlceras foram preenchidas com dois ou mais fragmentos de membrana amniótica e então a úlcera e as adjacências foram cobertas com um fragmento maior. Avaliaram a integridade do epitélio e estroma, além da opacidade e aparência dos implantes durante um período de doze meses, concluindo que este é um procedimento alentador para cura das úlceras profundas. Tseng (1999) discutindo sobre este procedimento justificou que a membrana basal da membrana amniótica pode prolongar a meia vida das células progenitoras epiteliais; o aumento da ação epitélio-promotor é favorecido pela membrana amniótica que pode servir de suporte para os fatores de crescimento; a matriz do estroma da membrana amniótica exclui as células inflamatórias, contém várias formas de inibidores de proteases e supressão de TGF β e proliferação e diferenciação miofibroblástica de fibroblastos da córnea e limbo normais, e fibroblastos conjuntivais. Resultados favoráveis relacionados a aplicação destas múltiplas camadas também foram encontrados por Hanada, Shimazaki, Shimmura e Tsubota (2001).

Confirmando os resultados anteriores, Prabhasawat, Tesavibul e Komolsuradej (2001) compararam a aplicação de uma única e múltiplas camadas, obtendo sucesso relacionado à cicatrização epitelial em cerca de 82% com os dois tratamentos.

Solomon, Meller, Prabhasawat, John, Espana, Steuhl e Tseng (2002) descrevem o transplante de membrana amniótica em várias camadas em perfurações corneanas, descemetoceloses e úlceras profundas de 34 pacientes humanos. Sucesso foi relatado em 82,3% com completa epitelização da lesão. Os autores relacionam este sucesso às características da membrana amniótica em

suprimir a inflamação e promover a epitelização. Informam que sua matriz estromal suprime a expressão de certas citocinas inflamatórias que são oriundas do epitélio da superfície ocular, incluindo a interleucina-1 α e interleucina-1 β , interleucina-2, interleucina-8, interferon- δ e FNT- α . Associado a isto, a membrana amniótica apresenta várias formas de inibidores de proteases e é capaz de excluir células inflamatórias por facilitar a rápida apoptose.

Gomes, Komagome, Santos, Chaves, Cunha e Freitas (1999) descreveram os benefícios do transplante da membrana amniótica associada ao transplante de limbo em pacientes humanos com ceratoconjuntivite cicatricial. Os autores obtiveram 80% de sucesso na reconstrução da superfície ocular. Apontaram estes resultados benéficos ao fato da membrana amniótica apresentar membrana basal espessa e propriedades antiinflamatórias, antiapoptótica e de inibir a cicatrização que provavelmente está relacionada à presença e/ou inibição da fatores de crescimento, como TGF- β 1 e 2, bFGF e HGF.

Pires, Tseng, Prabhasawat, Puangsricharn, Maskin, Kim e Tan (1999) aplicaram o transplante de membrana amniótica em olhos humanos com ceratite bolhosa. Dentre os pacientes, 90% apresentavam dor no pré-operatório com remissão deste sintoma após o procedimento. Houve sucesso relacionado à cicatrização do defeito em 90% dos casos. Os autores atribuíram este sucesso ao fato da membrana amniótica ter fornecido um novo substrato, por meio de sua membrana basal e matriz estromal avascular. A membrana basal é apontada como capaz de facilitar a migração de células epiteliais, reforçando a adesão das células do epitélio basal, promover a diferenciação epitelial e prevenir a apoptose.

O transplante de membrana amniótica demonstra efeitos satisfatórios, também, nas úlceras neurotróficas (CHEN; PIRES; TSENG, 2000) assim como nos

pterígios recorrentes e prevenção de simbléfaro (GABRIC; MRAVICIC; DEKARIS; KARAMAN; MITROVIC, 2000) e quando associados com transplante de limbo, também em pterígeo recorrente associado com simbléfaro (SHIMAZAKI; SHINOZAKI; TSUBOTA, 1998).

Sridhar, Bansal, Sangwan e Rao (2000) aplicaram transplante de membrana amniótica em olhos com queimadura química e térmica na fase aguda da lesão. Os autores observaram o aumento da epitelização, redução da inflamação e da cicatriz, melhora da acuidade visual e prevenção da ocorrência da conjuntivalização. Este procedimento deve ser levado em consideração diante de lesões por queimaduras na fase aguda. Meller, Pires, Mack, Figueiredo, Heiligenhaus, Park, Prabhasawat, John, Mcleod, Steuhl e Tseng (2000) confirmaram os efeitos benéficos da membrana amniótica nesta fase, embora se deva levar em consideração que somente a membrana amniótica não seja suficiente para prevenir o desenvolvimento de deficiência limbares.

Síndrome de Stevens-Johnson é uma enfermidade vesicular severa da pele e das mucosas, e está associada à hipersensibilidade a alguns fármacos ou à infecção prévia, podendo surgir casos idiopáticos (DANTAS, 1999). O envolvimento ocular é manifestado por cicatriz conjuntival extensa, simbléfaro, olho seco, deficiência de células límbicas e associado às deformidades das margens palpebrais (HONAVAR; BANSAL; SANGWAN; RAO, 2000). Com intuito de se promover alívio dos sintomas pela reconstrução da superfície ocular nesta doença, Honavar, Bansal, Sangwan e Rao (2000) realizaram transplante de membrana amniótica em dez pacientes com a síndrome na fase crônica. Os autores obtiveram como resultado reduções da vascularização, inflamação e cicatriz em uma a seis semanas em todos os

pacientes. Houve completa epitelização da córnea entre uma e seis semanas, obtendo favorável reconstrução da superfície ocular.

A membrana amniótica, também parece desempenhar função importante em pacientes na fase aguda com Síndrome de Stevens-Johnson. John, Foulks, John, Cheng e Hu (2002) realizaram em um grupo na fase aguda desta doença, recobrimento com membrana amniótica em toda a superfície ocular, exceto a córnea, incluindo as pálpebras em sua face interna e externa. Em outro grupo, procedeu apenas o recobrimento das pálpebras superior e inferior. Em ambos os grupos, os autores puderam constatar resultados positivos e salientaram que não há relato do tratamento com a membrana amniótica nesta fase da doença, mas acreditam que possa prevenir principalmente a cegueira nestes pacientes.

Nas cirurgias de entrópio cicatricial, a membrana amniótica mostra-se favorável quando aplicada na fenda palpebral, possibilitando a aceleração da epitelização do tarso exposto. Ti, Tow e Chee (2001) mostraram, através da citologia de impressão, que após três semanas de pós-operatório houve diminuição da inflamação com concomitante aumento no número de células escamosas metaplásticas com grau variável de queratinização.

Em perfurações corneanas a associação de adesivo tecidual (cianoacrilato) e membrana amniótica permitiram a completa epitelização da lesão em relato de caso apresentado por Su e Lin (2000). Com o mesmo intuito, Duchesne, Tahi e Galand (2001) associaram adesivo de fibrina (Tissucol®) em perfurações corneanas de dois milímetros de diâmetro, o que se mostrou benéfico para a cicatrização das lesões, bem como no controle da dor.

Paridaens, Beekhuis, van der Bosch, Remeyer e Melles (2001) obtiveram resultados satisfatórios com a aplicação de membrana amniótica, em lesões

extensas da conjuntiva, por excisão de melanoma maligno. Shields, Shields e Armstrong (2001) realizaram transplante de membrana amniótica associado à crioterapia e aplicação tópica de mitomicina em defeitos de conjuntiva e de córnea produzidos pela excisão de melanoma, observando eficiência da combinação da terapêutica. Espana, Prabhasawat, Grueterich, Solomon e Tseng (2002) utilizaram transplante de membrana amniótica após excisão de grandes neoplasias da superfície ocular, maior que 20mm², como neoplasia intraepitelial conjuntiva, melanose primária adquirida e melanoma maligno. A superfície desnuda cicatrizou de forma rápida e completa em todos os casos estudados.

Diante do pterígio recorrente ou primário, Solomon, Pires e Tseng (2001) observaram que houve redução da recorrência. Os autores acreditam que isto se deva ao fato da membrana amniótica apresentar a matriz estromal que suprime a cicatriz e pelo efeito antiinflamatório promovido por esta membrana, apesar da literatura citar que o sucesso está relacionado com associação de corticóide ao procedimento cirúrgico.

Letko, Stechschulte, Kenyon, Sadeq, Romero, Samson, Nguyen, Harper, Primack, Azar, Grueterich, Dohlman, Baltatzis e Foster (2001) estudaram a implantação da membrana amniótica *inlay* e *overlay* em defeitos epiteliais persistentes de córneas humanas. Puderam constatar que não houve diferenças significantes relacionadas à cicatrização das lesões e quanto ao restabelecimento da visão.

Kim, Kim, Hahn e Park (2001) realizaram transplante de membrana amniótica em úlceras infectadas por *Staphylococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Acanthameba sp*, fungo ou herpesvírus e puderam avaliar estes pacientes por um período que variava de quatro a vinte oito meses. Constataram redução da inflamação ocular já nos

primeiros dias de pós-operatório e a cicatrização das úlceras corneanas. Os autores atribuíram este sucesso à propriedade da membrana amniótica por seu efeito inibidor na atividade proteinase, incluindo metaloproteinase de origem endógena e infecciosa.

Gris, Del Campo, Wolley-Dod, Güell, Bruix, Calatayud e Adán (2002) realizaram a implantação da membrana amniótica como lente de contato terapêutica em córneas de humanos com defeito epitelial, porém sem comprometimento do estroma. Os autores observaram efeito favorável com relação a epitelização da lesão epitelial assim como na proteção de enxertos favorecendo também a epitelização.

O efeito antiinflamatório da membrana amniótica foi mostrado por Shimmura, Shimazaki, Ohashi e Tsubota (2001), quando realizaram transplante de membrana amniótica em pacientes com defeito epitelial persistente. Observaram a ocorrência de um seqüestro infiltrado linfocitário no local do implante de membrana amniótica, cujo papel representa a propriedade antiinflamatória da membrana. Estas características puderam ser mostradas por Ma, Wang, Su e Tsai (2002) quando realizaram transplante de membrana amniótica em *melting* escleral e perfurações corneanas. Os autores puderam confirmar esta propriedade através da redução do *melting* com posterior cicatrização das lesões.

O uso de membrana amniótica não preservada foi mostrado com sucesso por Mejía, Santamaría e Acosta (2002) e Uçakhan, Köklü e Firat (2002). Os autores não constatarem a presença de infecção, inflamação, toxicidade ou alergia com a aplicação da membrana fresca. Adds, Hunt e Dart (2001) por sua vez, relataram a superioridade da membrana amniótica congelada em promover a reepitelização.

A membrana amniótica tem mostrado resultados satisfatórios na cirurgia reconstrutiva de bolhas filtrantes no glaucoma (BARTON; BUDENZ; KHAW; TSENG, 1997) ou colocada abaixo do *flap* escleral em trabeculectomias associadas ao uso de mitomicina. Neste último procedimento a efetividade da técnica deveu-se à diminuição da inflamação local com conseqüente manutenção da filtração (FUJISHIMA; SHIMAZAKI; SHINOZAKI; TSUBOTA, 1998).

Estudos voltados à remodelação estromal associada às cirurgias refrativas foram realizados por Choi, Kim, Wee e Lee (1998). Os autores estudaram o efeito da membrana amniótica em ceratectomia fotorrefrativa em 17 córneas de coelhos. Todos os animais apresentaram cicatrização epitelial em três dias em ambos os procedimentos. Constatou-se que o olho que recebeu a membrana amniótica apresentou redução da proliferação de ceratócitos e conseqüente redução de infiltrado inflamatório. Os autores acreditam que a membrana amniótica possa modular o fenômeno de apoptose após a ceratectomia fotorrefrativa. Com o mesmo objetivo, Woo, Kim, Kweon, Kim, Nam e Kim (2001) desenvolveram procedimentos parecidos e observaram que a regeneração estromal e a cicatrização epitelial ocorram com maior rapidez nos indivíduos que receberam a membrana amniótica, igualmente com menor infiltrado por células inflamatórias.

Muitos outros estudos surgiram e nos dias atuais busca-se o cultivo de células do limbo, utilizando a membrana amniótica como substrato, cuja finalidade é a expansão das *stem cells*. Objetiva-se com isso, transplantar estas células, já cultivadas na superfície ocular deficiente, em células precursoras de células corneanas (KOIZUMI; INATOMI; QUANTOCK; FULLWOOD; DOTA; KINOSHITA, 2000; TSAI; LI; CHEN, 2000).

Na oftalmologia veterinária, a implantação da membrana amniótica foi iniciada por Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Sales Gomes em 1995. Os autores utilizaram a membrana amniótica eqüina preservada em glicerina em 18 perfurações corneanas experimentalmente produzidas em cães. Observaram reestruturação da câmara anterior, com pressão intraocular normal e demais estruturas corneanas. Com base no estudo histopatológico, observaram integração da membrana amniótica com aspecto próximo a córnea normal, e restabelecimento das camadas da córnea. Os autores concluíram que a membrana amniótica pode ser usada como enxerto tectônico para as reparações de lesões corneanas no cão.

A capacidade angiogênica da membrana amniótica comparada ao pericárdio eqüino, foi estudada por Safatle em 1998 e constatou-se que ambas as membranas induzem à angiogênese, com efeito mais intenso e mais extenso com pericárdio eqüino.

A membrana fetal eqüina foi estudada por Godoy (2001) em ceratectomias lamelares de cães que observou a integração do implante à córnea já na fase inicial do período de observação, remanescendo apenas uma mácula residual, concluindo que a membrana fetal apresenta características favoráveis como membrana biológica para a reconstrução da córnea.

A membrana amniótica tem-se mostrado bastante benéfica para a reconstrução da superfície ocular na área médica, isto se deve a muitas das propriedades favoráveis desta estrutura que já são conhecidas, como a importância da membrana basal atuando como substrato na adesão e crescimento epitelial de células progenitoras, efeito antiinflamatório e antiaderente e a capacidade de promover a regeneração de nervos. Na medicina veterinária estas propriedades ainda não foram muito bem exploradas, assim como o desempenho da membrana

amniótica frente à membrana alantoamniótica na reconstrução da superfície ocular. Muitos esclarecimentos com relação aos benefícios da membrana amniótica ainda são necessários.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 20 animais da espécie canina, sem raça definida, machos ou fêmeas, adultos, peso corpóreo médio de 12 kg, fornecidos pelo Canil Central da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Previamente à seleção e definição dos grupos experimentais, os animais foram avaliados clinicamente e submetidos a exames oftalmológicos de rotina com auxílio de Lupa de Pala²⁵, Lanterna²⁶, Teste de Schirmer²⁷ e Oftalmoscopia Direta²⁸.

Todos os animais foram submetidos a banho com xampu neutro apropriado para cães. Em seguida, receberam uma dose de vacina contra cinomose, hepatite infecciosa, laringotraqueíte, parainfluenza e leptospirose²⁹ e uma dose de vacina anti-rábica³⁰, ambas por via subcutânea e, finalmente, duas doses de vermífugo³¹ oral com intervalo de 15 dias. Posteriormente, foram identificados, mantidos em canis individuais, recebendo água *ad libitum* e dieta comercial balanceada. Os procedimentos experimentais desenvolvidos foram seguidos de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

²⁵ OptiVisor - Optical glass binocular magnifier. Modelo nº DA 4 / Donegan Optical Company

²⁶ Mini Maglite® AAA / Mag Instrument. California - USA

²⁷ Schirmer Tear Test® / Schering-Plough Animal Health

²⁸ Oftalmoscópio direto - modelo 128 / Welch Allyn

²⁹ Galaxy DA2P+L® - Vacina contra cinomose, hepatite infecciosa, laringotraqueíte, parainfluenza e leptospirose canina/Fort Dodge Saúde Animal LTDA

³⁰ Rai-Vac I® - Vacina inativada contra raiva de cães e gatos/Fort Dodge Saúde Animal LTDA

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Constituíram-se dois grupos experimentais compostos por 10 animais. Cada grupo foi dividido em cinco subgrupos com dois animais para estudo aos dois, sete, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. Cada animal teve somente um dos olhos submetido à ceratectomia lamelar para aplicação do implante. Os animais do grupo um (GI) receberam o implante de membrana amniótica (MA) alógena e os animais do grupo dois (GII) receberam implante de membrana alantoamniótica (MAAM) alógena, ambas preservadas em glicerina a 98%.

3.3 OBTENÇÃO E PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA ALÓGENA

A MA alógena foi obtida a partir do útero de uma cadela durante o procedimento de cesariana com fetos a termo. Em condições estéreis, a MA juntamente com a membrana alantóide foram separadas das demais membranas fetais e lavada com solução fisiológica³² a 0,9%, para remoção dos coágulos. A MA foi então isolada da membrana alantóide e imersa em solução tampão fosfato estéril³³, contendo 1000UI/ml de penicilina G, 20mcg/ml de estreptomicina e 2,5mcg/ml de anfotericina B³⁴.

³¹ Bay-o-pet® - Drontal plus (praziquantel e palmoato de pirantel)/ Bayer SA - Saúde Animal

³² Solução Fisiológica - Cloreto de sódio 0,9%/Baxter Hospitalar LTDA

³³ Ophthalmos Formulas Oficiais LTDA

³⁴ Ophthalmos Fórmulas Oficiais LTDA

Em seguida a MA foi estendida sobre papel de filtro estéril, com sua face estromal voltada para o papel. O mesmo foi cortado em dimensões de dois centímetros por dois centímetros e imerso em glicerina a 98% como meio de estocagem e mantido em temperatura ambiente.

3.4 OBTENÇÃO E PREPARO DA MEMBRANA ALANTOAMNIÓTICA ALÓGENA

A MAAM alógena foi obtida a partir do útero de uma cadela durante o procedimento de cesariana com feto a termo. Em condições estéreis, a MAAM foi separada das demais membranas fetais e lavada com solução fisiológica a 0,9%, para remoção dos coágulos. A MAAM foi então imersa em solução tampão fosfato, contendo 1000UI/ml de penicilina G, 20mcg/ml de estreptomicina e 2,5mcg/ml de anfotericina B.

Em seguida a MAAM foi estendida sobre papel de filtro estéril com sua face amniótica voltada para o papel. Então, foi cortada em dimensões de dois centímetros por dois centímetros e imersa em glicerina a 98% como meio de estocagem e mantida em temperatura ambiente.

3.5 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICO E CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico foi realizado paralelamente a um estudo anestésico experimental³⁵. Previamente às condutas operatórias, observaram-se os cuidados relativos ao jejum hídrico de duas horas e jejum alimentar de seis ou 12 horas. Avaliaram-se frequência cardíaca e respiratória, grau de hidratação, coloração das mucosas e tempo de preenchimento capilar. Os animais foram pré-medicados com Acepromazina³⁶ na dose de 0,1mg/kg de peso corpóreo e Meperidina³⁷ na dose de 2,0mg/kg de peso corpóreo, ambos por via intramuscular. Após 15 minutos aproximadamente, realizou-se indução da anestesia com Propofol³⁸ na dose de 5,0 a 6,0mg/kg de peso corpóreo por via intravenosa. A manutenção em plano anestésico foi realizada pela indução da mistura de Halotano³⁹ em oxigênio a 100%. Durante todo o procedimento anestésico administrou-se Solução de Ringer com Lactato⁴⁰ no volume aproximado de 10,0ml/kg/hora, por cateter⁴¹ instalado na veia cefálica.

Estando os animais sob efeito de anestesia geral (terceiro estágio do segundo plano), com auxílio de equipamento para estereoscopia⁴² realizaram-se as condutas operatórias. Para tanto, os cães foram mantidos em decúbito lateral, sendo o olho operado escolhido aleatoriamente. Conduziu-se, então anti-sepsia periocular com

³⁵ NOGUEIRA, L. C.; CORTOPASSI, S. R.; INTELIZANO, T. R.; SOUZA, M. S. B. Efeitos do jejum alimentar pré-cirúrgico sobre a glicemia em cães. Enviado para publicação na **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**.

³⁶ Acepran® 0,2% / Univet AS - Indústria Veterinária

³⁷ Dolosal® - Cloridrato de Petidina / Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

³⁸ Diprivan® / AstraZeneca do Brasil LTDA

³⁹ Halothano / Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA

⁴⁰ Ringer com Lactato - Cloreto de sódio com lactato de sódio e associados estéril e apirogênico / Labormédica Indústria Farmacêutica LTDA

⁴¹ Cateter intravenoso – 0,86mmx25mm – DI: 0,64mm – 22Gx1” /Nipro Medical LTDA

⁴² Microscópio cirúrgico MC-M9 / DF Vasconcellos S.A.

solução de iodopirrolidona⁴³ na forma aquosa a 10%, proteção do campo operatório, segundo as técnicas habituais e lavagem do saco conjuntival com Solução Fisiológica a 0,9%. Em seguida efetuou-se blefarostase e fixação do globo ocular com um ponto escleroconjuntival com fio seda 4-0⁴⁴ em conjuntiva bulbar temporal superior. Com auxílio de trépano de cinco milímetros⁴⁵ de diâmetro aplicado sobre a córnea, produziu-se uma lesão lamelar superficial compreendendo epitélio e aproximadamente a metade da espessura do estroma, entre nove e 12 horas a quatro milímetros do limbo. A ceratectomia foi realizada com auxílio de uma lâmina número 15⁴⁶ montado em bisturi cabo número três.

Nos animais do GI, o local desnudo recebeu a MA previamente hidratada em Solução Fisiológica, com sua face epitelial voltada para cima. Nos animais do GII, o local desnudo recebeu a MAAM com a face do epitélio da MA voltado para cima, permanecendo o epitélio da membrana alantóide para baixo, ou seja, em contato com a córnea. Os implantes foram fixados à córnea com sutura em pontos isolados simples, perfurando totalmente o implante, mas não totalmente a córnea receptora, com náilon monofilamentar 8-0⁴⁷, encastado de fábrica com agulha cortante. Inicialmente aplicaram-se quatro pontos cardeais e posteriormente, os demais necessários para fixação adequada do implante à córnea, totalizando em média, oito a 12 pontos. No período trans-operatório, a córnea e o implante, foram irrigados com Solução Fisiológica estéril a 0,9%.

⁴³ PVP-Iodo antisséptico aquoso / Brasilíquidos Produtos Farmacêuticos / Comercial Bono LTDA

⁴⁴ Seda 4-0 oftálmica - seda preta trançada, com agulha 3/8 / Ethicon – Johnson & Johnson Produtos Profissionais LTDA.

⁴⁵ Trépano cirúrgico 5mm / Instrumentos Cirúrgicos J. Petrovich

⁴⁶ Lâmina de bisturi nº 15 – aço carbono – estéril /Huaiym méd - Wiltex®

⁴⁷ Mononylon Ethilon 8-0, agulha 1/4 / Ethicon – Johnson & Johnson Produtos Profissionais LTDA.

No período de pós-operatório imediato, aplicou-se Cloridrato de Tramadol⁴⁸ por via intramuscular na dose de 1mg/kg para fins de analgesia e o antibiótico Tobramicina⁴⁹ na forma de colírio no olho operado.

Como medida pós-operatória de manutenção, efetuou-se no olho operado, a intervalos de doze horas, limpeza com auxílio de gaze e solução fisiológica a 0,9% estéril, e subseqüentemente, aplicação do antibiótico Tobramicina na forma de colírio, para fins profiláticos. Para que fatores comportamentais relativos a automutilação não interferissem com a evolução dos implantes, os animais foram mantidos, durante todo o experimento, com "colar protetor" ou Elizabetano e mantidos em canis individuais.

3.6 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO

3.6.1 Avaliação clínico-oftalmológica

O estudo clínico foi realizado em 10 olhos com implante de MA alógena e 11 olhos com implante de MAAM, também alógena, totalizando 20 cães. Os animais foram submetidos a exame ocular com lupa de pala e fonte de luz, avaliando-se fotofobia e blefarospasmo, secreção ocular, congestão conjuntival, transparência, neovascularização e pigmentação da córnea, bem como viabilidade, permanência e transparência dos implantes além de outros possíveis achados clínicos. Para tanto,

⁴⁸ Tramal®100 / Searle

⁴⁹ Tobradex suspensão oftálmica estéril – Alcon Laboratórios do Brasil LTDA

os parâmetros de avaliação adotados foram subjetivamente classificados em: (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso.

Acompanhou-se a evolução clínica inicialmente decorridas 24 horas do ato cirúrgico e, na seqüência, a cada 48 horas até o término do período de observação de cada grupo.

3.6.2 Avaliação morfológica

3.6.2.1 Microscopia óptica de luz

Após os períodos de observação pré-determinados, os animais foram submetidos à eutanásia. Esse procedimento foi realizado com tranquilização inicial a base de Acepromazina na dose de 0,2mg/kg por via intravenosa, após 15 minutos, seguiu-se da aplicação intravenosa de Pentobarbital Sódico⁵⁰ na dose de 12,5mg/kg até promover plano anestésico do terceiro estágio em quarto plano e, finalmente de Cloreto de Potássio⁵¹ suficiente para promover parada cardiorrespiratória. Só então o olho receptor do implante foi enucleado e fixado em Formaldeído⁵² em solução tamponada a 10%. Após um período mínimo de 72 horas, a córnea foi separada em dois fragmentos, ambos fixados em Álcool 70°⁵³, incluída em parafina⁵⁴, cortada a

⁵⁰ Hypnol / Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA

⁵¹ Cloreto de potássio 19,1% / Darrow

⁵² Formol - solução 10% / Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA

⁵³ Álcool Zulu absoluto 99,3° INPM / Companhia Nacional do Álcool

⁵⁴ Parafina / Petrobrás

uma espessura de 5µm em micrótomo⁵⁵, fixada e corada por Hematoxilina-Eosina (H.E)*, *Periodic Acid-Schiff* (PAS)* e Tricrômio de Masson (TM)*, e analisada ao microscópio de luz⁵⁶. Avaliaram-se o implante e as áreas adjacentes, por parâmetros referentes a epitelização do implante, infiltrado por células inflamatórias, neovascularização, edema, fibrose e incorporação do implante.

3.6.3 Avaliação estatística

Foi aplicado o “Teste de Wilcoxon” para amostras não paramétricas dependentes, compreendendo todos os parâmetros clínicos-oftalmológicos avaliados quantitativamente, em cada período de avaliação.

⁵⁵ Micrótomo / R.JUNG - Heidelberg

* Corantes Merck

⁵⁶ Microscópio Óptico - Leica

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICO-OFTALMOLÓGICA

O exame clínico-oftalmológico de 20 olhos com implante alógeno de membrana amniótica (GI) e membrana alantoamniótica (GII) conservadas em glicerol, foram fundamentados na avaliação quanto quemose, congestão conjuntival, grau de fotofobia e blefarospasmo, tipos e graus de secreção ocular, edema e neovascularização de córnea e viabilidade e transparência do implante.

4.1.1 Quemose

Quemose foi observada em todos os olhos com involução do processo já no segundo dia de observação.

4.1.2 Congestão

Congestão em conjuntiva bulbar superior foi observada com grau que variava de leve a intenso na primeira semana de pós-operatório, ocorrendo regressão

progressiva até sua ausência na sexta semana de pós-operatório em ambos os grupos.

4.1.3 Grau de fotofobia e blefarospasmo

Fotofobia e o blefarospasmo manifestaram-se de formas intensas em um animal do GII (7) até o segundo dia de pós-operatório. Ocorreu de forma moderada em sete animais do GI (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10) e em cinco animais do GII (2, 3, 5, 9 e 10) e de forma leve em três animais do GI (1, 8 e 9) e em quatro animais do GII (1, 4, 6 e 8). Ausência total foi constatada já na segunda semana em quatro animais do GI (7, 8, 9 e 10), onde perdurou até o final do período de observação. No GII observou-se ausência do quadro na terceira semana de pós-operatório em três animais (8, 9 e 10), onde perdurou até o final do período de observação e em um animal (7) manifestou-se com intensidade leve na terceira e quarta semanas de pós-operatório (APÊNDICES A e B) (Figura 1).

4.1.4 Tipos e graus de secreção ocular

Secreções foram avaliadas de forma qualitativa e quantitativa para os tipos: seroso, seromucoso, mucoso, mucopurulento e purulento. Predominou o tipo mucoso no decorrer dos períodos de observação. A forma purulenta não foi

observada, no decorrer do experimento, em nenhum dos dois grupos. No GI observou-se, na primeira semana, o tipo seroso em três animais (3, 5 e 7), seromucoso em um animal (9), mucoso em cinco animais (1, 2, 4, 6 e 10), mucopurulento em um animal (8). Nos dois animais com período de observação de sessenta dias (9 e 10), a secreção predominou na forma mucosa. Em um animal, com período de observação de trinta dias (8) iniciou-se na forma mucopurulenta e tornou-se mucosa na terceira semana de observação. No outro animal (7), com período de observação de trinta dias, iniciou-se na forma serosa e progrediu para seromucosa na terceira semana, e perdurou até o final do experimento nesta forma. No GII, a secreção predominou na forma mucosa e progrediu assim, até ausentar-se (na quinta semana). Nos dois animais com período de observação de sessenta dias (9 e 10) mostrou-se ausente na quinta semana e em um com trinta dias (8), mostrou-se ausente na terceira semana. No outro animal com período de observação de trinta dias, (7) iniciou com serosa progrediu para seromucosa, tornando-se novamente serosa até o final do período de observação (APÊNDICES C e D) (Figuras 2 e 3).

4.1.5 Edema

Edema de córnea, mostrando-se na forma de opacidade, concentrou-se ao redor da área que recebeu o implante. Predominou o grau leve no GI e grau moderado no GII, tendendo à diminuição progressiva no decurso do período de observação. No GI constatou-se ausência em três olhos 24 horas após a

implantação (1, 2 e 9), grau leve em seis olhos (3, 5, 6, 7, 8 e 10), grau moderado em um olho (4). Ocorreu diminuição progressiva no decurso do tempo, onde se constatou ausência na segunda semana em dois olhos (8 e 9) e na sexta semana no outro animal com avaliação de sessenta dias (10). Nos animais do GII, constatou-se 24 horas do pós-operatório, grau leve em três olhos (1, 5 e 8) e grau moderado em sete olhos (2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10). Ocorreu diminuição progressiva, evidente, em dois olhos (7 e 10) já na segunda semana para graus mais leves. Sua ausência, pôde ser constatada na quinta semana em um dos olhos de avaliação de sessenta dias (10) e na sexta semana no outro olho, também com período de avaliação de sessenta dias (9) (APÊNDICES E e F) (Figura 4).

4.1.6 Neovascularização

Os primeiros sinais de neovascularização foram manifestados já no terceiro dia de pós-operatório em alguns olhos nos dois grupos. Nos animais do GI, foi constatado com início no terceiro dia em um olho (3), quarto dia em um olho (8), quinto dia em três olhos (4, 5 e 6), sexto dia em dois olhos (7 e 9), no sétimo dia em um olho (10) e ausência de neovascularização nos dois olhos cujo período máximo de observação foi de dois dias (1 e 2). Nos animais do GII, foi constatado com início no terceiro dia em dois olhos (5 e 10), no quarto dia em quatro olhos (3, 6, 7 e 9), no quinto dia em dois olhos (4 e 8) e ausência de neovascularização nos dois olhos cujo período de máximo de observação foi de dois dias (1 e 2). A partir daí pode-se observar nos dois grupos que ocorreu intensificação do processo na segunda,

terceira e quarta semanas de observação e houve diminuição progressiva nos períodos mais tardios. Pode-se observar que tal alteração não se manifestou homogeneamente entre os animais. Nos animais do GI observou-se que em dois olhos se tornaram moderados na quarta semana (9 e 10). Nos demais olhos dos dois grupos o processo se manifestou de forma muito semelhante, com os vasos tornando-se mais calibrosos e diminuíram em intensidade no decorrer do tempo, embora não se ausentaram totalmente. Pode-se observar que este fenômeno ocorria com a mesma intensidade junto ao implante (APÊNDICES G e H) (Figura 5).

4.1.7 Viabilidade e transparência do implante.

A incorporação do implante à córnea mostrou-se evidente nos dois grupos, com transparência progressiva, porém permanecendo áreas de opacidade similares nas duas formas de implantes.

A manipulação e aplicação do implante foram semelhantes com as duas membranas, permitindo bom manuseio durante sua aplicação e em nenhum dos grupos houve perda do implante no período de pós-operatório.

Fenômenos como pigmentação corneana não foram observados, até o período máximo de observação, em ambos os grupos.

Observou-se granuloma junto ao fio de sutura nos locais em que os pontos persistiram, embora, a maior parte desses tivesse sido eliminada naturalmente no decorrer dos períodos de observação.

As ilustrações clínicas referentes aos períodos de observação (dois, sete, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório) encontram-se a seguir (Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Figura 1 – Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso) de fotofobia/blefarospasmo em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.

Figura 2 - Representação gráfica da avaliação clínica quanto ao tipo de secreção ocular em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos (0 – ausente, 1 – serosa, 2 – seromucosa, 3 – mucosa, 4 – mucopurulenta, 5 – purulenta). São Paulo, SP, 2003.

Figura 3 - Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso) de secreção ocular em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.

Figura 4 - Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva do edema (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso) em córneas de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.

Figura 5 - Representação gráfica da avaliação clínica quanto à quantificação subjetiva (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso) de neovascularização em olhos de cães submetidos à ceratoplastia com implante de MA e MAAM alógenos. São Paulo, SP, 2003.

Figura 6 – Imagem fotográfica da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se aposição da membrana no local da ceratectomia, opacidade do implante e edema adjacente, presença dos pontos de sutura e congestão conjuntival.

Figura 7 – Imagem fotográfica da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se aposição da membrana no local da ceratectomia, opacidade do implante e edema adjacente, presença dos pontos de sutura e congestão conjuntival.

Figura 8 – Imagem fotográfica da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se edema da córnea adjacente ao implante, presença de neovascularização iniciando-se nas proximidades do limbo e invadindo o local do implante e a presença dos pontos de sutura.

Figura 9 – Imagem fotográfica da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se edema da córnea adjacente ao implante, presença de neovascularização iniciando-se nas proximidades do limbo e invadindo o local do implante e a presença dos fios de sutura.

Figura 10 – Imagem fotográfica da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se neovascularização da córnea e de todo o implante, edema adjacente ao implante, presença de pontos de sutura e granuloma de fio.

Figura 11 – Imagem fotográfica da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se neovascularização da córnea e do implante vindos do limbo, edema adjacente ao implante e presença dos pontos.

Figura 12 – Imagem fotográfica da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se neovascularização da córnea, opacidade na região do implante e presença de granuloma de fio.

Figura 13 – Imagem fotográfica da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se neovascularização da córnea, opacidade na região do implante e presença de granulomas de fio.

Figura 14 – Imagem fotográfica da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se neovasos vindos do limbo, opacidade na região do implante e presença de granulomas de fio.

Figura 15 – Imagem fotográfica da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se neovascularização da córnea e no local do implante, opacidade na região do implante e presença de granulomas de fio.

4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Foram avaliados os fenômenos de epitelização, infiltrado leucocitário (polimorfonucleares e mononucleares), neovascularização, edema estromal, fibrose e incorporação do implante, aos dois, sete, 15, 30 e 60 dias após a aplicação do implante de membrana amniótica (GI) e membrana alantoamniótica (GII) em córneas receptoras. Os apêndices I e J mostram a descrição dos fenômenos observados. (Figuras 16 – 25)

Epitelização total foi observada a partir do 15º dia nos dois animais do GI (5 e 6) e a partir do sétimo dia nos dois animais do GII (3 e 4). Nos animais, cujo período de observação foi mais longo, pôde-se constatar epitelização completa em todos os olhos (GI: 7, 8, 9 e 10; GII: 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

Epitélio atrófico foi constatado nos dois grupos, o quadro manifestou-se aos sete dias em um animal do GI (4) e em dois animais do GII (3 e 4) e aos 60 dias em dois animais do GII (9 e 10).

Acantose foi constatada ao redor do fio de sutura remanescente. No GI foi observado em um olho aos dois dias (1), aos 15 dias em dois olhos (5 e 6), aos 30 dias em um olho (7) e aos 60 dias em um olho (9). No GII este fenômeno foi constatado aos dois dias em um olho (1), aos 15 dias em um olho (5).

Epitélio normal foi observado aos 30 dias em dois olhos (7 e 8) do GII e aos 60 dias em um dos animais (10) do GI e em dois olhos (9 e 10) do GII.

Infiltração por células inflamatórias caracterizou-se pela presença de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares nos momentos clássicos da resposta inflamatória. Observou-se aos dois dias predominância de células

polimorfonucleares em quantidade semelhante nos dois grupos. Aos sete dias houve, juntamente à presença das células polimorfonucleares, a manifestação de células mononucleares, representadas por linfócitos, em dois olhos (3 e 4) do GI e em um olho (4) do GII. Neste mesmo período pôde-se constatar que em um olho (4) do GI a presença das células polimorfonucleares era menos intensa, quando comparada ao outro animal do mesmo período de observação. Aos 15 dias observou-se a presença de polimorfonucleares em quantidade menor, quando comparado ao período de observação anterior no GI (5 e 6). Neste período observou-se, também, a presença de linfócitos nos dois olhos (5 e 6) do GI e nos dois olhos (5 e 6) do GII. Aos 30 dias, observou-se reação tipo corpo estranho em um olho (8) do GI e em um olho (7) do GII. Pôde-se observar raros linfócitos em um olho (7) do GI. Observaram-se células polimorfonucleares em pequena quantidade em um olho do (8) do GII. Observou-se a presença de histiócitos em um dos animais (8) do GI. Aos 60 dias observou-se presença de reação tipo corpo estranho em dois olhos (9 e 10) do GI e em um olho (10) do GII. Em um olho do GI esta reação era ao redor do fio de sutura remanescente (10), e em um olho do GII, também era ao redor do fio de sutura (10). Em um dos olhos (9) do GII observou-se raras células inflamatórias e ausência de reação inflamatória neste período.

Neoformação vascular ocorreu a partir do limbo e direcionou-se em sentido ao local do implante. Aos dois dias apresentava-se ausência de neoformação vascular nos animais dos dois grupos experimentais. Aos sete dias observou-se a presença de neovasos em um olho (3) do GI e nos dois olhos (3 e 4) do GII e ausência em um olho (4) do GI. Aos 15 dias este processo se aproximava do implante e o vascularizava, mostrando-se de maneira semelhante nos dois grupos e em grande

quantidade. Aos 30 dias pôde-se observar a presença menor de neoformação vascular nos dois grupos, porém mais profundos em um olho (8) do GI. Aos 60 dias houve presença de poucos vasos neoformados em todos os olhos do GI e GII. Pôde-se constatar em um olho (9) do GII que estes vasos também se pronunciavam ao redor do fio de sutura remanescente.

Edema estromal foi observado aos dois dias de pós-operatório nos dois grupos experimentais. Aos dois dias observou-se, no GI, a presença de edema estromal nos dois olhos (1 e 2) porém em um olho de forma menos expressiva (2) quando comparado ao outro olho do mesmo grupo. No GII os dois olhos (1 e 2) apresentavam o fenômeno, mas em um olho (1) o edema se manifestava na periferia da lesão. Nesses dois olhos pôde-se constatar a presença de vacuolização endotelial de forma semelhante. Aos sete dias os dois olhos (3 e 4) do GI apresentavam edema, mas de forma mais sutil, quando comparados aos olhos do período de observação anterior. No GII o fenômeno não foi constatado no estroma, mas era evidente no epitélio dos dois olhos desse mesmo período (3 e 4). Nesses olhos pôde-se observar a presença de vacuolização endotelial de forma semelhante e o mesmo pôde-se constatar em um olho (3) do GI. Aos 15 dias observou-se edema epitelial intracelular e extracelular com vacuolização endotelial nos dois olhos do GI (5 e 6) e em um olho também apresentava edema na periferia da lesão (6). No GII pôde-se observar edema epitelial com vacuolização endotelial nos dois animais desse grupo (5 e 6). Aos 30 dias observou-se edema estromal apenas em um olho do GII (7). Edema epitelial na periferia da lesão esteve presente em um olho do GI (7) e nesse mesmo olho pôde-se constatar também, vacuolização endotelial. Em um animal do GII (8) edema e vacuolização endotelial estavam menos expressivos, quando comparados aos animais do período de observação anterior, do mesmo

grupo. Aos 60 dias foi observado edema estromal e vacuolização endotelial em todos animais dos dois grupos experimentais. Edema epitelial foi constatado em apenas um olho do GI (9). Ceratócitos compactados foram observados em um olho do GI (10).

Fibrose foi observada aos quinze dias nos animais do GI e somente aos trinta dias nos animais do GII. No GI constatou-se, aos quinze dias, a presença de maior quantidade de fibroblastos em um olho (5) quando comparado ao outro olho do mesmo período de observação (6). Aos 30 dias evidenciou-se a marcante proliferação de colágeno em um olho do GI (7). No mesmo período, nos animais do GII (7 e 8) verificou-se a presença de fibrose, porém menos expressiva. Aos 60 dias notou-se, no GI, fibrose no terço médio do estroma nos dois animais (9 e 10) e manteve-se presente também nos dois animais do GII (9 e 10).

Adesão parcial do implante à córnea pôde-se observar nos períodos mais precoces, dois dias de pós-operatório, em um animal do GI (2) e em um animal do GII (1). Aos sete dias, pode-se observar o implante totalmente aderido nos dois grupos, embora em um animal do GI (4), algumas áreas permaneceram sem aderência. Nesse mesmo período em um animal do GII (3) não se identificava mais o implante. A partir dos 15 dias de pós-operatório não se reconhecia mais o implante em todos os animais do GI (5, 6, 7, 8, 9 e 10) e em todos do GII (5, 6, 7, 8, 9, e 10), por estarem totalmente incorporados.

O “seqüestro” foi definido como presença de epitélio envolvendo o implante. Foi observado em três animais do GI em dois animais aos sete dias (3 e 4) e em outro animal aos 30 dias (7).

Endoteliose foi observada em dois animais do GI (5 e 6) aos 15 dias de pós-operatório, porém tal fenômeno não foi observado em nenhum outro animal ou período dos grupos experimentais em estudo.

Figura 16 – Fotomicrografia da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A - inflamação intensa aguda (HE, 400X) e B -.adesão do implante sem epitilização (HE, 100X).

Figura 17 - Fotomicrografia da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A –inflamação por polimorfonucleares e linfócitos não muito intensos, presença se seqüestro (HE, 400X), B – inflamação por polimorfonucleares, totalmente epitilizado e presença de epitélio infiltrando-se por baixo do implante (HE, 400X), C – neovascularização, presença de fio de sutura, epitélio infiltrando-se ao redor do fio de sutura e edema estromal (HE, 400X) e D – neovascularização importante (HE, 400X)

Figura 18 - Fotomicrografia da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – acantose, fibrose, epiteliação total do implante, neovascularização intensa e inflamação (HE, 200X) e B – neovascularização intensa (HE, 400X).

Figura 19 - Fotomicrografia da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – não se reconhece o implante (HE, 100X) e B –fibrose superior e edema inferior (TM, 100X).

Figura 20 - Fotomicrografia da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MA alógena. Observa-se em A – epitélio normal (PAS, 200X) e B – presença de reação tipo corpo estranho pela presença de fios de sutura (HE, 400X).

Figura 21 - Fotomicrografia da córnea aos 2 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – inflamação com predominância de polimorfonucleares (HE, 400X) e B – incorporação parcial do implante com parte não aderida (HE, 100X).

Figura 22 - Fotomicrografia da córnea aos 7 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – epitélio atrófico e totalmente epitelizado (HE, 400X) e B – inflamação aguda e neovascularização (HE, 200X).

Figura 23 - Fotomicrografia da córnea aos 15 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – não se reconhece o implante e neovascularização intensa (HE, 100X) e B – edema estromal com fibras totalmente compactadas (HE, 200X).

Figura 24 - Fotomicrografia da córnea aos 30 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – epitélio normal, neovascularização e inflamação crônica (HE, 200X), B – reação tipo corpo estranho, incorporação total do implante, edema estromal inferior, fibrose superior, neovascularização e endoteliose (HE, 100X), C – comparação entre a fibrose (superior) e edema (inferior) e presença de neovascularização (TM, 100X) e D – fibrose superior e edema inferior (TM, 200X).

Figura 25 - Fotomicrografia da córnea aos 60 dias após ceratoplastia lamelar com implante de MAAM alógena. Observa-se em A – epitélio normal e neovascularização superior (HE, 400X) e B – edema estromal inferior e fibrose superior (HE, 400X).

4.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

B Aplicação do *Teste de Wilcoxon* para duas amostras dependentes, referentes aos achados macroscópicos entre os olhos que receberam MA e MAAM, para todos os parâmetros clínicos avaliados em cada período de observação (1, 2, 7, 15, 22, 30, 37, 44, 51 e 60 dias de pós-operatório). Mostrou-se significância ($p < 0,05$) para os seguintes parâmetros e período de observação: edema aos sete dias, grau de secreção no primeiro dia e tipo de secreção aos 30 dias.

5 DISCUSSÃO

A superfície ocular, por ser a porção mais exposta do bulbo ocular, está sempre predisposta à agressões advindas do meio externo, que podem prejudicar a função visual. Dentre as enfermidades que comprometem a visão, destacam-se as ceratites ulcerativas, tidas como as mais comuns das doenças oculares que afligem o cão (WHITLEY; GILGER, 1999). Neste contexto, surgiu o interesse na busca de novas perspectivas na reconstrução da córnea, cuja integridade é fundamental para o desempenho de sua função.

A busca para tratamento da ceratite ulcerativa foi descrita pela primeira vez por Galen (A.D. 131 a 210) e em seguida por Aetius (A.D. 502 a 575) (apud TAHIJA; CHANDLER, 1990, p. 33). Com o passar dos anos, novas descobertas ocorreram. Surgiu, então, a necessidade de se trocar parte ou toda córnea danificada, por uma outra estrutura transparente e funcional. O início da busca da reconstrução da superfície ocular deu-se por Pellier de Quengsy⁵⁷ (1789 apud PATON, 1955, p. 4), seguido de muitos outros pesquisadores que procuraram o objetivo. Em 1952, Stocker⁵⁸ (apud BORUCHOFF; THOFT, 1984, p. 645) relatou o primeiro sucesso da ceratoplastia no tratamento do edema corneano.

Muitos estudos referentes à materiais de sutura, tipos de sutura, adesivos, recobrimentos e implantes conjuntivais, implantes autólogos, alógenos e xenógenos e materiais sintéticos surgiram, com muitos sucessos e insucessos. Os benefícios das membranas biológicas, foram relatados. Entre elas o periósteo autólogo

⁵⁷ QUENGSY, G. P. **Précis au cours d'Opérations sur la chirurgie des yeux**. Paris: Didot, 1789.

⁵⁸ STOCKER, F. W. Successful corneal graft in a case of endothelial and epithelial dystrophy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 35, p. 349, 1952.

(KOENING; KAUFMAN, 1983), o pericárdio de eqüino (BARROS; ALVARENGA; STOPIGLIA, 1985; BARROS; BURNIER JUNIOR; RIGUEIRO; MALERBA; SAFATLE, 1990; BARROS; LAUS; MORALES; FERREIRA; SAFATLE, 1996; BARROS; SAFATLE; MALERBA; BURNIER JÚNIOR, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; TEIXEIRA, 2000), pericárdio de cão (KAVINSKI, 1980), membrana amniótica eqüina (BARROS; GARCIA; LAUS; FERREIRA; SALLES GOMES, 1995; GODOY, 2001), peritônio de cão (GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996), cápsula renal eqüina (LAUS; GALERA; SCHOCKEN-ITURRINO; CAVASSANI; ANDRADE, 1999), túnica vaginal autógena (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000) e submucosa intestinal (FEATHERSTONE; SANSOM, 2000; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; LEWIN, 1999).

Atualmente, os estudos com utilização de implante ou transplante de membranas biológicas intensificaram-se de maneira otimista, mérito este dado em grande parte pela membrana amniótica, cujas características e propriedades benéficas foram amplamente relatadas. Enquanto De Röth, em 1940, aplicou-a pela primeira vez na reparação de simbléfaro e defeitos conjuntivais, foi somente em 1995, que Kim e Tseng a utilizaram na reconstrução da superfície ocular em queimaduras do olho de coelhos e no mesmo ano na oftalmologia veterinária, Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes aplicaram-na em perfuração experimental de córnea de cães.

Os estudos na Medicina Veterinária retornaram em 2001 com Godoy, que aplicou a membrana amniótica juntamente com o envoltório fetal em lesões lamelares de córneas de cães, encontrando resultados favoráveis com relação à reconstrução da córnea lesada.

Diante dos fatos demonstrados na Medicina Humana com relação às propriedades da membrana amniótica no que tange a sua atividade antimicrobiana e antiadesiva (SHIMAZAKI; YANG; TSUBOTA, 1997), ausência de imunogenicidade (AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999), de facilitação da migração de células epiteliais, promoção da diferenciação epitelial e por apresentar a membrana basal espessa (LEE; TSENG, 1997) acredita-se que membrana amniótica de cães tenha propriedades semelhantes às humanas, muito embora estudos referentes a estes fatores ainda não foram realizados em cães.

Frente aos apontamentos feitos por De Röth (1940), o material ideal para o transplante deveria ser fino, liso, estéril e de tamanho apropriado, características estas demonstradas pela membrana amniótica, buscou-se então desenvolver o estudo para fins reparativos em córneas de cães.

A disposição das membranas fetais difere entre as espécies. Nos cães ela é alantoamnio e nos humanos ela é corioamnio (GRUNERT; BIRGEL, 1982). Na Medicina Humana, a membrana amniótica é aplicada à superfície ocular isolada das demais membranas fetais, córion, alantóide e saco vitelínico, e com seu lado estromal em contato com a superfície ocular, o que promove melhor aderência (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999).

Neste experimento, buscou-se estudar a real necessidade de se aplicar a membrana amniótica isolada das demais membranas fetais. Para tanto, realizou-se estudo comparativo em ceratectomia lamelares de córnea de cães entre o implante com membrana aminótica (Grupo I) e com membrana alantoamniótica (Grupo II) alógenas preservadas em glicerina 98%, avaliando-se no período de pós-operatório seu comportamento clínico e morfológico durante até 60 dias.

A evolução do processo de cicatrização corneano com membranas biológicas em cães quando submetidos a processos reparativos foram descritos por Barros, Alvarenga e Stopiglia (1985); Barros, Burnier Júnior, Rigueiro, Malerba e Safatle (1990); Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995); Barros, Laus, Morales, Ferreira e Safatle (1996); Barros, Safatle, Malerba e Burnier Júnior (1995); Barros, Safatle e Rigueiro (1997); Galera, Laus e Ferreira (2000); Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996); Godoy (2001); Laus, Galera, Schocken-Iturrino, Cavassani e Andrade (1999); Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996); Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997); Teixeira (2000), embora haja diferenciação quanto ao comportamento do processo em relação à localização e profundidade do implante, acarretando diferentes graus de deficiência visual.

Os grupos experimentais foram dispostos dois a dois, como proposto por Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996) e Teixeira (2000) em estudos com implante de peritônio homólogo e pericárdio eqüino, respectivamente, em ceratoplastias lamelares em olhos de cães.

Segundo normas para a experimentação oftalmológica seguindo critérios da *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*, comprometeu-se apenas um dos olhos de cada animal, para que fenômenos relacionados ao trauma cirúrgico e à evolução do processo de cicatrização não interferissem com a visão e conseqüentemente com a qualidade de vida dos animais no pós-operatório. Então, realizou-se o estudo comparativo entre os grupos compostos de diferentes animais.

As ceratectomias lamelares superficiais procederam-se com uso de instrumental específico, utilizando-se trépano de 5mm de diâmetro considerando as referências bibliográficas apresentadas com implantes em lesões lamelares de

córnea (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996; LAUS; ROSSI; SOUZA; BARROS; MORALES, 1993; LAUS; SOUZA; MORALES; ANDRADE; FIGUEIREDO; SANTOS; VALERI, 1996; MORALES; LAUS; SOUZA; SANTOS; FIGUEIREDO; VALERI, 1996; SOUZA; LAUS; MORALES; FIGUEIREDO; MAIA; VALERI, 1997). Embora exista a possibilidade de se promover lesões com profundidades padronizadas, com o uso de trépano associado a um guia (NOSÉ; NOSÉ, 1996), a profundidade das lesões foi estimada de maneira subjetiva em todos os procedimentos, buscando-se mimetizar as lesões ulcerativas que ocorrem no dia-dia de rotina oftalmológica veterinária (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; BRIGHTMAN; MCLAUGHLIN; BROGDON, 1989; GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996; LAUS ROSSI; SOUZA; BARROS; MORALES; 1993; LAUS; SOUZA; MORALES; ANDRADE; FIGUEIREDO; SANTOS; VALERI, 1996; MORALES; LAUS; SOUZA; SANTOS; FIGUEIREDO; VALERI, 1996; SOUZA; LAUS; MORALES; FIGUEIREDO; MAIA; VALERI, 1997).

A forma de preservação ou conservação da membrana amniótica pode ser realizada por imersão e manutenção em glicerina 98% em temperatura ambiente (BARROS; GARCIA; LAUS; FERREIRA; SALLES GOMES, 1995; GODOY, 2001; OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998), em glicerina 100% a 4°C (KIM; TSENG, 1995), em DMSO (dimetil sulfoxido) a -70°C (AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999; FUJISHIMA; SHIMAZAKI; SHINOZAKI; TSUBOTA, 1998; SHIMAZAKI; YANG; TSUBOTA, 1997), em meio Eagle modificado de Dulbecco associado com a mesma parte de glicerina e mantida em temperatura a -20°C (WOO; KIM; KWEON; KIM; NAM; KIM, 2001) ou a -70°C (TSENG; PRABHASAWAY; LEE, 1997) ou a -80°C (LEE; TSENG, 1997), e utilizando-a fresca ou refrigerada a -4°C por até 24 horas

(MOREIRA; OLIVEIRA, 2000). Neste estudo, fez-se opção pela conservação das membranas amnióticas e alantoamnióticas em glicerina a 98% em temperatura ambiente, por ser um meio de fácil obtenção, fácil transporte e custo baixo.

O procedimento cirúrgico com aplicação de membrana amniótica e alantoamniótica alógena na córnea baseou-se na metodologia clássica, referente à magnificação com microscópio cirúrgico, instrumental para microcirurgia e síntese com fio sintético monofilamentar (GILGER; WHITLEY, 1999).

O fio de sutura utilizado foi o mononáilon 8-0, assim como indica a literatura para microcirurgias oftalmológicas, embora se recomende também a poliglactina 910 e PDS e espessuras variando entre 7-0 e 10-0 (BRIGHTMAN; MCLAUGHLIN; BROGDON, 1989; GILGER; WHITLEY, 1999). Esta opção pelo mononáilon 8-0 foi tomada frente aos custos elevados da poliglactina 910 e a facilidade do manuseio com mononáilon que permite fácil passagem pelos tecidos.

As suturas foram realizadas com pontos simples separados, não perfurantes totais, embora a literatura, também recomende as suturas contínuas (GILGER; WHITLEY, 1999). O não sepultamento dos pontos deveu-se à manobra de síntese indicada na literatura veterinária (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; BRIGHTMAN; MCLAUGHLIN; BROGDON, 1989; GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996; GILGER; WHITLEY, 1999; LAUS, 1994; LAUS; ROSSI; SOUZA; BARROS; MORALES, 1993; LAUS; SOUZA; MORALES; ANDRADE; FIGUEIREDO; SANTOS; VALERI, 1996; MORALES; LAUS; SOUZA; SANTOS; FIGUEIREDO; VALERI, 1996; SOUZA; LAUS; MORALES; FIGUEIREDO; MAIA; VALERI, 1997) diferente daquela indicada pela literatura humana, a qual argumentou-se que a exposição dos nós poderia perpetuar a reação inflamatória corneana (MOREIRA; BELFORT JR., 1996), muito embora o fio utilizado,

mononáilon 8-0, apresenta calibre que pode ser muito traumático para o sepultamento, então optou-se por manter os nós expostos.

A síntese dos implantes à córnea foi executada como indicado na literatura por Gilger e Whitley (1999), com pontos simples separados e não perfurante total e optou-se pela não remoção dos pontos no decorrer do período de avaliação, para evitar que manobras referentes à retirada dos pontos não interferissem ou mascarassem dados clínicos pesquisados. A literatura recomenda, entretanto, a retirada dos pontos com quatro a seis semanas de pós-operatório, por sua permanência provocar neovascularização tardia (BRIGHTMAN; MCLAUGHLIN; BROGDON, 1989). Observou-se a presença de granuloma de fio nos pontos remanescentes, uma vez que a maioria dos pontos caíram, o que provavelmente não teria ocorrido caso os pontos tivessem sido removidos.

A automutilação é comumente observada em traumas oculares, cujo desconforto e dor são evidenciados nas primeiras semanas, sendo responsável por acidentes variados. Como medida pós-operatória, foi estabelecido o uso de colar protetor ou Elizabetano para que fatores comportamentais, relativos a automutilação, não interferissem na evolução do pós-operatório. O mesmo procedimento foi instituído por Barros, Safatle e Rigueiro (1997); Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996); Laus (1994); Laus, Rossi, Souza, Barros e Morales (1993); Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996); Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997).

A higienização da córnea e saco conjuntival foi realizada a cada 12 horas com a finalidade da remoção de secreções que por ventura ocorressem.

A aplicação de antimicrobiano de amplo espectro de ação foi estabelecida como terapia profilática com a finalidade de impedir a invasão bacteriana secundária, uma vez que a própria lesão tecidual e a proximidade com a microflora ocular poderiam propiciar infecção secundária (KERN, 1990; NASISSE, 1985; WHITLEY; GILGER, 1999), muito embora os cuidados referentes à anti-sepsia tenham sido instituídos. A opção pelo antibiótico, na apresentação de solução, deu-se ao fato que as soluções produzem maior concentração do fármaco, quando comparado à pomada, no filme lacrimal segundo Regnier (1999), pela facilidade de administração e por mostrar maior conforto para o paciente.

Os períodos de avaliação clínica e morfológica foram adotados baseados na evolução clássica da cicatrização da córnea com enxertos de membrana biológica, como apresentado por Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995), Barros, Safatle e Rigueiro (1997); Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996); Godoy (2001); Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996); Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) e Teixeira (2000).

Os fenômenos clínicos encontrados neste estudo foram similares àqueles descritos em observações realizadas com procedimentos semelhantes com implantação de membranas biológicas (BARROS; GARCIA; LAUS; FERREIRA; SALLES GOMES, 1995; BARROS; SAFATLE; MALERBA; BURNIER JÚNIOR, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996; GODOY, 2001; LAUS; GALERA; SCHOCKEN-ITURRINO; CAVASSANI; ANDRADE, 1999; LAUS; SOUZA; MORALES; ANDRADE; FIGUEIREDO; SANTOS; VALERI, 1996; MORALES; LAUS; SOUZA; SANTOS;

FIGUEIREDO; VALERI, 1996; SOUZA; LAUS; MORALES; FIGUEIREDO; MAIA; VALERI, 1997; TEIXEIRA, 2000).

Quemose e congestão em conjuntiva bulbar superior evidenciadas no pós-operatório imediato, traduzem o trauma ocorrido, devido à aplicação ponto de reparo conjuntivo-escleral, para a fixação e manutenção do bulbo ocular durante o trans-operatório, concordando com achados semelhantes descritos por Godoy (2001) e Teixeira (2000).

A manifestação de fotofobia e blefarospasmo, secreção ocular, edema e neovascularização ocorreram com intensidades compatíveis com os achados em pós-operatório de ceratoplastias e permitiram a mensuração subjetiva propiciando a transcrição para quadros e gráficos, e avaliação estatística conforme descrições realizadas por Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Sales Gomes (1995), Barros, Safatle e Rigueiro (1997); Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996); Godoy (2001); Laus (1994); Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996); Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997); Teixeira (2000).

Fotofobia e blefarospasmo ocorreram em todos os animais nos períodos mais precoces devido ao estímulo e exposição das terminações nervosas da córnea em consequência da ceratectomia (KERN, 1990; NASISSE, 1985), com o fio de sutura irritando a conjuntiva palpebral produzindo desconforto (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997) e à presença dos fios e nós sem seu sepultamento, promovendo estimulação dos nervos corneanos sensoriais, cujo achado é freqüente em ceratoplastias lamelares e penetrantes (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996; KERN, 1990; LAUS; GALERA; SCHOCKEN-ITURRINO;

CAVASSANI; ANDRADE, 1999; LAUS; ROSSI; SOUZA; BARROS; MORALES, 1993; LAUS; SOUZA; MORALES; ANDRADE; FIGUEIREDO; SANTOS; VALERI, 1996; MORALES; LAUS; SOUZA; SANTOS; FIGUEIREDO; VALERI, 1996; SCHOENAU; PIPPI; SCHOSSLER, 1993; SOUZA; LAUS; MORALES; FIGUEIREDO; MAIA; VALERI, 1997). Com a evolução do processo de cicatrização da córnea, proliferação epitelial e conseqüente recobrimento de parte dos pontos remanescentes, houve diminuição do fenômeno, não ocorrendo diferenciação significativa entre os dois implantes, embora tenha sido mais duradouro no Grupo II, que permaneceu até a segunda semana em todos os animais.

Tipos e graus de secreção observados, predominou na forma mucosa e com tendência a diminuir no decorrer do tempo. A avaliação quantitativa deu-se de forma subjetiva, manifestando-se de leve a moderado em ambos os procedimentos, porém mais intenso no Grupo I, ainda que tenha sido evidente, quantitativamente, que o grau de secreção foi mais suave no Grupo II quando comparado ao Grupo I, logo evidenciada a ausência do quadro na quinta semana no Grupo II. Este quadro está relacionado aos processos conjuntivais e corneanos por estímulo das células caliciformes (WHITLEY; GILGER, 1999) comum às afecções ulcerativas da córnea (KERN, 1990; STARTUP, 1984). Da mesma forma, o achado foi enfatizado em trabalhos precursores sobre ceratoplastia com uso de implante com peritônio homólogo (GARCIA; BARROS; LAUS; FERREIRA; SAFATLE, 1996), membrana fetal xenógena (GODOY, 2001) e pericárdio xenógeno (TEIXEIRA, 2000).

Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) descreveram como fenômeno comum em ceratoplastias com implantes de córnea e conjuntiva, ambos autólogos. A manifestação da secreção mucopurulenta, e sendo amenizada posteriormente

para mucosa, como foi observado em dois animais do Grupo I, pode ser devido à propriedade antimicrobiana desempenhada pela membrana amniótica (MOREIRA; OLIVEIRA, 2000; SHIMAZAKI; YANG; TSUBOTA, 1997), assim como pela utilização de antimicrobiano (tobramicina) no pós-operatório.

Quanto ao processo de cicatrização, observou-se, à microscopia óptica de luz, total epitelização aos sete dias de pós-operatório no Grupo II e o mesmo fenômeno ocorreu apenas aos 15 dias no Grupo I, embora a presença de epitélio atrófico já tenha sido observada aos três dias no Grupo II e aos sete dias no Grupo I. Achados mais precoces, foram descritos por Teixeira (2000), que encontrou a total epitelização aos três dias de pós-operatório em córneas de cães que receberam implantes de pericárdio eqüino. Não obstante, a cicatrização ocorreu em etapas fundamentais, como referido por Kern (1990) e Nasisse (1985), onde descrevem que o processo de epitelização inicia-se logo após a ocorrência da lesão, iniciando-se com o achatamento das células epiteliais da camada basal e, em seguida, o deslizamento das células adjacentes, cuja finalidade é o de recobrir o defeito.

O fenômeno conhecido como acantose, cuja denominação deve-se ao aumento da espessura do epitélio, ocorre devido ao aumento da atividade mitótica das células da camada basal que migram da periferia (ALVES; SANTOS, 1999), foi encontrado no local dos pontos e na extremidade do leito receptor. O achado também condiz com o processo de cicatrização normal, cuja capacidade mitótica das células epiteliais inicia-se nas primeiras horas após a ocorrência da lesão corneana. Embora tenha sido encontrado em todos os períodos no Grupo I e aos dois, 15 e 30 dias de pós-operatório, provavelmente este fenômeno tenha sido manifestado pela presença dos pontos remanescentes.

A manifestação da presença de células epiteliais envolvendo o implante, formando como se fosse um “sanduíche”, epitélio envolvendo o implante, é denominada de seqüestro do implante, foi observada em apenas três dos animais do Grupo I, aos sete e 30 dias de pós-operatório. Informação similar foi descrita por Teixeira (2000) com a aplicação de implante de pericárdio em lesões lamelares. Este achado pode ter sido desencadeado no decorrer do procedimento de síntese do implante à córnea, pela penetração da agulha e fio de sutura levando consigo células epiteliais por sob a membrana. A mesma justificativa pôde ser concedida à presença da epitelização abaixo do fio de sutura e da invaginação do epitélio ao redor do fio de sutura em dois animais do Grupo II, aos dois e 30 dias de pós-operatório, respectivamente.

A cicatrização da córnea ocorre de maneira diferente, quando a lesão é superficial ou profunda. As lesões epiteliais reparam-se por migração e mitose das células epiteliais adjacentes, e se resolvem em um período curto de tempo (KERN, 1990, WILKIE; WHITTAKER, 1997). Já as lesões estromais têm reparação mais lenta, podendo demorar meses. Iniciam-se por deslizamento epitelial e proliferação de fibroblastos (KERN, 1990) e pode ser acompanhada por neoformação vascular, advinda dos vasos do limbo (MILLER, 2001) e na dependência do tipo e da duração da lesão (SPENCER, 1996; STARTUP, 1984), como foi igualmente demonstrado neste estudo.

A córnea é um tecido avascular como conseguinte sua cicatrização é única. A estimulação e a regulação do processo de cicatrização é realizada, em parte, por fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento fibroblástico básico e fator de crescimento fibroblástico β -1 (CAMERON, 1997), advindos da lágrima e vasos límbicos (SWANK; HOSGOOD, 1996).

A resposta inflamatória está estreitamente interligada ao processo de reparação. A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora, cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular. A reação inflamatória a uma lesão tecidual ocorre imediatamente após a agressão (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999). A infiltração de células inflamatórias caracteriza-se pela invasão de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares originados do filme lacrimal (MILLER, 2001; PEIFFER; NASISSE; COOK; HARLING, 1987) e oriundos de vasos límbicos após a ocorrência da lesão tecidual, cujo objetivo é promover o debridamento proteolítico, caracterizando a resposta inflamatória aguda do processo de reparação da córnea (SPENCER, 1996). Sequencialmente surgem macrófagos provenientes dos vasos límbicos, assim como macrófagos teciduais derivados de células estromais, promovendo o debridamento celular e a angiogênese. Evidências experimentais sugerem que antígenos associados a macrófagos possam ser importantes para o início da estimulação de elementos linfocitários (SPENCER, 1996).

As citocinas são proteínas produzidas por muitos tipos de células, em particular os linfócitos e macrófagos, mas também por células endoteliais, epiteliais e conjuntivais e têm papel importante nas inflamações agudas e crônicas. Neste contexto, têm função de estimular a movimentação leucocitária, a quimiotaxia e têm grande importância no processo inflamatório (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999). Inicialmente as citocinas, como a interleucina-1 e interleucina-6, podem ser liberadas das células do tecido que está sofrendo a reação inflamatória. Os linfócitos e as células mononucleares que chegam ao local da inflamação, podem ser ativados por antígenos e, conseqüentemente, liberar suas próprias citocinas, que estimulam ainda mais a migração celular por ação do endotélio. A interleucina-8 é mediadora

da angiogênese e promotora da quimiotaxia leucocitária. Estudos mostram que esta interleucina é liberada na matriz corneana extracelular e age na modulação da reparação corneana, atuando no crescimento dos vasos límbicos que progridem para a lesão (STRIETER; KUNKEL; ELNER; MARTONYI; KOCH; POLVERINI; ELNER, 1992).

Neste estudo, o infiltrado de células inflamatórias ocorreu seqüencialmente como os eventos clássicos descritos na literatura. Os leucócitos polimorfonucleares já eram evidenciados no segundo dia de pós-operatório em ambos os Grupos, representando a resposta imediata, ou seja, a fase inflamatória aguda. O mesmo achado foi confirmado por Barros, Safatle, Malerba e Burnier Júnior (1995) e Teixeira (2000) com pericárdio xenógeno, Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995) com membrana amniótica xenógena, Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996) com implante de peritônio alógeno e Godoy (2001) com membrana fetal xenógena.

A diminuição dos leucócitos polimorfonucleares foi constatada aos sete dias de pós-operatório, onde houve a manifestação de alguns leucócitos mononucleares, representados, neste período, por linfócitos, exceto em um animal do Grupo II. A substituição de células polimorfonucleares por mononucleares, que objetiva promover a fagocitose dos restos celulares, foi mais evidenciada aos 15 dias, constatando-se tendência à cronicidade do processo. Sua manifestação, neste estudo, desenvolveu-se de forma semelhante no dois grupos experimentais.

A inflamação crônica, propriamente dita, foi evidenciada aos 30 dias quando já não se observava presença de leucócitos polimorfonucleares no Grupo I e um animal do Grupo II e no outro animal do Grupo II ainda persistia a presença de alguns polimorfonucleares. Este processo ainda estava presente até os 60 dias de

pós-operatório nos dois animais do Grupo I e em um animal do Grupo II, concentrando-se na região dos pontos e ao redor de vasos, provavelmente, em resposta ao resquício de fio de sutura remanescente. Evolução similar foi descrita por Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996) em que observou em implantes de autólogos de córnea e conjuntiva pediculado a substituição gradativa das células polimorfonucleares por mononucleares e quantitativamente desaparecendo à medida que se instaurava a fase proliferativa do processo cicatricial.

A neovascularização é manifestada durante os processos ulcerativos da córnea (HELPER, 1989; KERN, 1990, LAFORGE, 1993; LAFORGE, 1997, STARTUP, 1984) assim como em outras enfermidades corneanas (NASISSE, 1985). Este fenômeno pode ser considerado como parte da resposta inflamatória da reparação. Não é normalmente vista durante a fase inicial da inflamação, embora os estímulos iniciais para promover o desenvolvimento desta resposta já tenham ocorrido. Este fenômeno parece ser estimulado por vários fatores, dentre eles edema, infiltração celular, necrose tecidual, alteração do pH, modificação no processo oxidativo e liberação de enzimas por células inflamatórias (SPENCER, 1996). Inicialmente, a reação vascular pela inflamação corneana se manifesta por hiperemia perilimbar e estes neovasos que surgem do limbo próximo ao local da lesão, terminam superficialmente quando estiverem associados à camada sub-epitelial, e tendem a aprofundar-se quando o estroma estiver envolvido. Os neovasos progridem 1mm ao dia (JOBIM, 1983; NASISSE, 1985) e sua manifestação, quando de intensa, é indicativo de cronicidade do processo (NASISSE, 1985).

No presente estudo o início da neoformação vascular foi observado clinicamente aos três dias de pós-operatório nos dois grupos experimentais, muito embora em um animal do Grupo I, tenha se manifestado mais tardiamente, aos sete dias de pós-operatório, concordando com achados revelados em estudo desenvolvido por Godoy (2001) em que utilizou membrana fetal xenógena em córneas de cães. A ocorrência deste fenômeno em períodos precoces confirma os apontamentos feitos por Naumann e Sautter (1988) e Koch (1992) que levantaram a hipótese de que os fatores angiogênicos químicos são liberados já nas primeiras horas após a lesão e Rocheles (1984 apud NAUMANN; SAUTTER, 1988) descreveu que os mediadores inflamatórios atuam significativamente no desenvolvimento da neoformação vascular por ativação das citomembranas, induzindo a síntese de prostaglandinas que são dependentes da cicloxigenase, promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

O processo da neoformação vascular foi também evidenciado com início aos três dias de pós-operatório nos estudos desenvolvidos por Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996) onde utilizaram implantes de córnea e conjuntiva e Teixeira (2000) com implante de pericárdio. E mais tardiamente, aos sete dias, em estudos com membrana amniótica mostrados por Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995) e membrana fetal por Godoy (2001). Em nosso estudo, a neoformação vascular manifestou-se de forma intensa em ambos os grupos na segunda semana mantendo-se desta forma até a quarta semana onde se pôde constatar início da remissão do processo, embora tenha permanecido com grau leve até o final do período de observação. Achados similares foram descritos por Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996) com implante de peritônio; Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996) com implante de

córnea e conjuntiva; Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996) com implante de conjuntiva; Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) com implante de córnea e conjuntiva e Teixeira (2000) com implante de pericárdio. Embora Godoy (2001) tenha descrito já a ausência de neovascularização em períodos mais precoces, aos 30 dias de pós-operatório, com uso de implante de membrana fetal xenógena.

Assim como a inflamação torna-se mais branda com a evolução do processo, a vascularização tende a retroceder e clinicamente torna-se menos notável, podendo remanesecer “vasos fantasmas” por muito tempo (SPENCER, 1996). O mesmo processo foi apresentado com evolução muito semelhante a este estudo por Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995) com implante de membrana amniótica; Godoy (2001) com implante de membrana fetal; Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996) com implante de córnea e conjuntiva pediculada; Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) com implante de córnea e conjuntiva livre; Teixeira (2000) com implante de pericárdio ou ocorrendo mais tardiamente, aos 20 dias, com manifestação exuberante, como relatado por Barros, Safatle e Rigueiro (1997) e Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996), embora utilizando diferentes membranas biológicas, pericárdio e peritônio respectivamente.

Brightman, MacLaughlin e Brogdon (1989) observaram neovascularização intersticial na primeira semana, ocorrendo o desaparecimento do processo em três semanas após a administração de acetato de triancinolona. Este achado demonstra o desempenho dos corticosteróides em promover a inibição da vascularização da córnea, o que pode ser benéfico quando se pretende promover o controle da vascularização (NASISSE, 1985). Outros agentes também inibem a neovascularização, como a fotocoagulação a laser (REED; FROMER;

KLINTWORTH, 1975) e agentes antiinflamatórios não esteróides tópicos (FRUCHT; ZAUBERMAN, 1984; ROBIN; REGIS-PACHECO; KASH, 1985). Slatter e Hakanson (1993) descrevem que os antiinflamatórios não esteróides tópicos, como o flurbiprofeno, inibem a regeneração do estroma corneano, similarmente a prednisolona tópica. Neste estudo os antiinflamatórios poderiam ser benéficos, muito embora, procurou-se não utilizar fármacos ou procedimentos que pudessem mudar a evolução do processo de cicatrização das ceratoplastias. Por meio da microscopia óptica, pôde-se conferir que neste estudo, o fenômeno de neovascularização progrediu ao mesmo tempo da observação clínica em ambos os grupos.

Safatle (1998) ao estudar a angiogênese da membrana amniótica comparada ao pericárdio em implantes interlamelares em córneas de ratos, constatou que ambas as membranas promoveram neovascularização a partir de três dias após a implantação, mantendo-se até os 60 dias, porém de forma mais duradoura e intensa com implante de pericárdio, afirmando o menor potencial angiogênico da membrana amniótica. Constatou-se, ainda que aos 15 dias a neovascularização atingiu seu grau máximo. Achado similar foi constatado neste estudo não diferindo, quanto à intensidade e o período de observação, com as duas membranas observadas.

O fenômeno de endoteliose, caracterizado pela proliferação de células endoteliais para a formação de um novo vaso, foi observado aos 15 dias de pós-operatório nos dois animais do Grupo I e em nenhum animal do Grupo II, fenômeno este não relatado em estudos realizados com membranas biológicas por Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995); Barros, Safatle, Malerba e Burnier Júnior (1995), Barros, Safatle e Rigueiro (1997); Barros, Safatle e Rigueiro (1999); Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996); Godoy (2001); Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996); Morales, Laus, Souza, Santos,

Figueiredo e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) e Teixeira (2000).

Opacidade da córnea é caracterizada pela perda da transparência, parcial ou completa, podendo resultar da alteração na hidratação da córnea ou de presença de exsudato inflamatório (HELPER, 1989). Inúmeros processos avulsivos da córnea e exposição do estroma estão relacionados com a opacidade. Este fenômeno é justificado quando se depara com grandes perdas de áreas epiteliais e ocorre intensificação do processo, caso haja grande destruição tecidual ou em decorrência de uveíte ou glaucoma (NASISSE, 1985).

Tanto o epitélio quanto o endotélio são responsáveis por manter a desidratação relativa ou a deturgescência da córnea (PEIFFER; NASISSE; COOK; HARLING, 1987). O edema da córnea pode resultar do afluxo de fluido para o epitélio ou estroma. A transparência da córnea depende de sua estrutura física e do mecanismo que previne a super hidratação (WHITLEY; GILGER, 1999). O edema secundário à lesão da córnea é restrito ao estroma superficial e as áreas imediatamente adjacentes da lesão (PEIFFER JR.; WILCOCK; DUBIELZIG; RENDER; WHITELEY, 1999).

O comprometimento do epitélio manifesta-se com finas vesículas intraepiteliais e do estroma e aparece como uma nébula difusa (SPENCER, 1996). Com a quebra da barreira epitelial, comum em lesões superficiais, há absorção de água do filme lacrimal (PEIFFER; NASISSE; COOK; HARLING, 1987); as lesões com danos do estroma anterior e médio, absorvem fluido, em parte, dos vasos límbicos, e lesões com envolvimento endotelial, absorvem fluido do humor aquoso (SPENCER, 1996).

Clinicamente, o edema foi observado nas adjacências das áreas de aplicação dos implantes e mostrou-se evidente nas primeiras 24 horas de pós-operatório nos dois grupos experimentais, com redução progressiva do quadro no decurso da evolução do processo, podendo-se constatar transparência total da córnea na sexta semana de avaliação, embora a redução fosse evidente já na terceira semana. Relatos relacionados a este processo puderam ser descritos por Barros, Safatle e Rigueiro (1997) quando utilizaram implantes com pericárdio e constataram o início da opacidade com 24 horas de pós-operatório e desaparecimento do quadro aos 15 dias. Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996) observaram em olhos com implante de peritônio que o quadro não se manifestou de forma comum a todos os pacientes, muito embora, dois animais o tenham manifestado de forma bastante evidente.

Referente à histopatologia, a opacidade da córnea é manifestada por edema epitelial e estromal de acordo com achados encontrados por Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) e Teixeira (2000) com implantes de conjuntiva, córnea e conjuntiva e pericárdio respectivamente e edema endotelial encontrado neste estudo, muito embora a literatura não cita esta ocorrência. O edema intracelular epitelial é a primeira manifestação histológica caracterizada por palidez perinuclear e distensão das células epiteliais, facilmente detectado na camada basal. No edema intercelular, o fluido acumula-se entre a membrana plasmática da porção basal das células epiteliais adjacentes.

Neste estudo, o edema epitelial foi observado intra e extracelular manifestando-se aos 15 dias de pós-operatório e perdurando de forma mais branda até o final do período de observação no Grupo I. Manifestação similar ocorreu no

Grupo II, embora mais precocemente, aos sete dias de pós-operatório, e progrediu até os 30 dias de pós-operatório. Achados, cujos períodos foram semelhantes com início aos sete dias e término aos 30 dias de pós-operatório, foram descritos com a aplicação de implante de pericárdio por Teixeira (2000).

O edema estromal é manifestado por aumento da espessura como resultado do acúmulo de fluido entre as lamelas, podendo ocorrer inchaço dos ceratócitos e, na fase inflamatória aguda, pelo influxo das células inflamatórias. Durante a avaliação histopatológica, podem ocorrer erros de interpretação de leitura, confundindo-se as separações lamelares como edema estromal. O edema estromal verdadeiro é, melhor, avaliado pela comparação da espessura, da intensidade de eosinofilia e da birrefringência da porção do estroma corneano normal comparado ao edemaciado. A córnea edemaciada é mais espessa, menos eosinofílica e menos birrefringente (SPENCER, 1996). Neste estudo foi avaliada principalmente a espessura que caracterizou o edema. A manifestação do edema estromal iniciou aos dois dias de pós-operatório e perdurou até aos 60 dias de pós-operatório nos dois grupos experimentais. Evidências similares foram descritas por Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996); Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) e Teixeira (2000) com uso de implante de conjuntiva, córnea e conjuntiva e pericárdio, respectivamente.

O colágeno das lamelas do estroma edemaciado estará desorganizado, pelo comprometimento de seu metabolismo e nutrição. Mucoproteína e glicoproteína da substância fundamental podem sofrer alterações secundárias, modificando o índice de refração (SPENCER, 1996), embora isto aconteça, nós não avaliamos tais componentes, mas foi evidenciada a desorganização das fibras estromais.

O grau de opacidade e a deficiência visual parecem estar relacionados com o número e concentração de células inflamatórias, sua localização a presença ou ausência de vascularização ou necrose estromal induzida por enzimas ou por depósito de cálcio (SPENCER, 1996). Com base nesta descrição, pôde-se justificar a manifestação de opacidade na córnea entre a primeira e a segunda semanas (sete e 15 dias) de pós-operatório, período em que ocorreu intensa infiltração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares e a vascularização também intensa observadas nos dois grupos aos 15 dias de pós-operatório, embora, comparativamente, tenha ocorrido de forma mais expressiva no Grupo II.

A manifestação do edema endotelial, caracterizado por vacuolização das células endoteliais esteve presente a partir do sétimo dia no Grupo I e do segundo dia de pós-operatório no Grupo II. Em ambos os grupos o fenômeno perdurou até o final do período de observação, aos 60 dias. Achados similares não foram relatados pelos autores em estudos de ceratoplastia lamelar.

Alguns dos fatores de crescimento que estimulam a angiogênese também estimulam a fibrose. O crescimento de vasos é acompanhado pela migração e ativação de fibroblastos derivados dos ceratócitos estromais e fibroblastos vindos dos vasos límbicos (PEIFFER JR.; WILCOCK; DUBIELZIG; RENDER; WHITELEY, 1999). Na fase proliferativa, secretam colágeno promovendo maior resistência à área reparada (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999; KERN, 1990; NASISSE, 1985). Neste estudo, a manifestação de fibrose iniciou-se, no Grupo I, aos 15 dias de pós-operatório, concomitante à manifestação da intensa neovascularização, enquanto no Grupo II o achado ocorreu mais tardiamente, aos 30 dias de pós-operatório. O fenômeno perdurou até o final do período de avaliação, aos 60 dias de pós-operatório nos dois grupos estudados. Achados similares foram descritos por Barros,

Safatle e Rigueiro (1997) e Teixeira (2000) com implantes de pericárdio xenógeno e Souza, Laus, Morales, Figueiredo, Maia e Valeri (1997) com implantes autólogos de córnea e conjuntiva. Também aos 15 dias, Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995), em estudos com implante de membrana fetal em lesões de córnea penetrante, descreveram evidente proliferação de fibroblastos que perduraram até aos 60 dias de pós-operatório. Laus, Souza, Morales, Andrade, Figueiredo, Santos e Valeri (1996) estudando ceratoplastia lamelar com córnea e conjuntiva constataram a presença de fibrose já aos sete dias de pós-operatório com diminuição gradual do processo aos 30 e 60 dias de pós-operatório.

No que diz respeito à opacidade remanescente do local que recebeu o implante, pode ser explicado com base no processo de cicatrização, em cujo período, há migração e proliferação de fibroblastos com conseqüente produção de colágeno. O reparo das lesões estromais resulta em desorganização e diâmetro desiguais das fibras de colágeno o que se traduz em perda da transparência da córnea (PEIFFER; NASISSE; COOK; HARLING, 1987; SLATTER, 1992). O colágeno produzido nesta fase possui diâmetro maior e as fibras de colágeno individuais são mais variáveis quanto ao calibre. O resultado deste processo é a perda da transmissão de luz, que deveria ser homogênea, sendo facilmente identificado clinicamente (CAMERON, 1997). Muito embora as novas proteoglicanas que diferem na característica e proporção, tendem a ligar-se mais firmemente à água, resultando em excessiva hidratação do tecido cicatrizado e no espessamento irregular das novas fibras de colágeno, somando-se a opacificação do tecido (CAMERON, 1997). Associado a isto, Fukuda, Chikama, Nakamura e Nishida (1999) descrevem que a membrana basal da membrana amniótica apresenta distribuição

de colágeno semelhante à da conjuntiva, mas não a existente na córnea, resultando em diferenciação quanto ao seu arranjo.

Estudos referentes a este fenômeno, com aplicação de outros tipos de membranas, confirmaram ou contrariaram evidências encontradas neste experimento. Garcia, Barros, Laus, Ferreira e Safatle (1996) quando utilizaram implantes de peritônio em ceratectomias lamelares descreveram opacidades aos 60 dias de observação. Barros, Safatle e Rigueiro (1997) com uso de pericárdio em lesões penetrantes notaram, aos 70 dias, parcial opacidade periférica ao local que recebeu o implante. Os mesmos autores, em 1999, utilizando o mesmo tipo de membrana em lesões lamelares, constataram que aos 100 dias, o local que havia recebido o implante estava totalmente desopacificado. Morales, Laus, Souza, Santos, Figueiredo e Valeri (1996), utilizando implantes conjuntivais livres e pediculados em ceratectomias lamelares, observaram a diminuição da opacidade do local que recebeu o implante, com maior precocidade com o uso da conjuntiva livre.

No tocante à rejeição, o fenômeno não foi evidenciado neste estudo concordando com estudos realizados com implante de membrana amniótica e membrana fetal por Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995) e Godoy (2001), respectivamente. Visto que a manifestação da fase inflamatória do processo de cicatrização transcorreu de forma normal, como descrito na literatura, confirmando os relatos referentes ao transplante de membrana amniótica humana que apresenta ausência de rejeição imunológica (AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999).

Relativamente à incorporação do implante, neste estudo a mesma, foi clinicamente evidenciada em ambos os grupos. O quadro iniciou-se com ausência ou parcial adesão do implante à córnea e subsequente evolução para aderência

total. Aos sete dias de pós-operatório, em um animal do Grupo II, o implante já se encontrava incorporado à córnea, enquanto que no Grupo I ainda se encontrava área de não adesão do implante em um animal. O fenômeno de incorporação foi, somente, evidenciado aos 15 dias nos animais do Grupo I.

As córneas evoluíram para parcial transparência da área implantada, porém permanecendo com pequena opacidade até o final do período de avaliação nos dois grupos estudados. Godoy (2001) descreveu, em estudo com membrana fetal, a prevalência de mácula na região enxertada aos 60 dias de pós-operatório. Barros, Garcia, Laus, Ferreira e Salles Gomes (1995) estudando implantação de membrana amniótica em ceratectomia penetrante observaram que aos 30 dias de pós-operatório a área do implante já apresentava transparência parcial.

6 CONCLUSÕES

Com base nas avaliações clínicas e morfológicas, pôde-se admitir que:

- os implantes com membrana amniótica e membrana alantoamniótica alógenos evoluíram de forma semelhante segundo os parâmetros adotados para a análise comparativa;
- os implantes com membrana amniótica e alantoamniótica são bem tolerados e constituem-se em métodos de real valor na reparação da córnea lesada;
- as avaliações clínicas foram importantes para o estudo da reparação da córnea, cujos fenômenos foram ratificados pelo estudo morfológico;
- a glicerina 98% foi eficaz na preservação das membranas estudadas.

REFERÊNCIAS*

ADDS, P. J.; HUNT, C. J.; DART, J. K. G. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 85, p. 905-907, 2001.

ALVARENGA, J. **Substituição de segmento do colédoco de cães por preparado de pericárdio homólogo conservado em glicerina: estudo experimental**. 1977. 102 f. Tese (Livre docência em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

ALVES, M. R.; KARA-JOSÉ, N. Edema corneano. In: BELFORT JR, R.; KARA-JOSÉ, N. **Córnea clínica-cirúrgica**. São Paulo: Roca, 1996a. p. 16-25.

ALVES, M. R.; KARA-JOSÉ, N. Reepitelização. In: BELFORT JR, R.; KARA-JOSÉ, N. **Córnea clínica-cirúrgica**. São Paulo: Roca, 1996b. p. 27-32.

ALVES, M. R.; NAKASHIMA, Y. Lesões traumáticas do segmento anterior. In: LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C. N.; ALVES, M. R. **Doenças externas oculares e córnea**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1999. p. 385-410.

ALVES, M. R.; SANTOS, R. N. Doenças neoplásicas das pálpebras, do sistema de drenagem lacrimal, da conjuntiva e córnea. In: LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C. N.; ALVES, M. R. **Doenças externas oculares e córnea**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1999. p. 259-306.

AMBRÓSIO, C. E. **Microvascularização placentária em cães srd (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758)**. 2001. 84 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ANDRADE, A. L. **Efeitos da membrana amniótica humana sobre a cicatrização de córnea de coelhos submetidas a traumas mecânicos e químicos: aspectos clínicos, morfológicos e bioquímicos**. 2003. 253 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR – 6023, 2002.

* De acordo com “Diretrizes para apresentação de dissertação e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo”, São Paulo, 2002.

ANDRETTO, R.; GONZALES, J.; ANTUNES, A. M.; BORELLI, V.; FERNANDES FILHO, A.; ARAÚJO, N. S.; GUIDUGLI NETO, J. Reparo da aorta abdominal de cães com pericárdio conservado em glicerina. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 30., 1975, São Paulo, **Resumos...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1975.

ANDRETTO, R.; ORSO, J. M.; GUIDUGLI NETO, J.; DE VUONO, L.; ANTUNES, A. M.; BORELLI, V.; IWASAKI, M. Reparo da traquéia de cães com pericárdio de eqüino conservado em glicerina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA 2 JORNADA INTERNACIONAL DE PNEUMOLOGIA, 3., 1976, Salvador. **Resumos...** Salvador, 1976.

ANDREW, S. E.; GELATT, K. N. Erosiones corneales persistentes en los perros. **Waltham Focus**, London, v. 11, n. 1, p. 10-15, 2001.

AQUAVELLA, J. V.; CERRO, M.; MUSCO, P. S.; UEDA, S.; DE PAOLIS, M. D. The effect of a collagen bandage lens on corneal wound healing: a preliminary report. **Ophthalmic Surgery**, Thorofare, v. 18, n. 8, p. 570-572, 1987.

AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 83, p. 399-402, 1999.

AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; SARHAN, A.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 39, n. 4, p. S428, 1998.

BANKS, W. J. **Applied veterinary histology**. 3rd ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1993. p. 469-487.

BARNETT, K. C. The corneal ulcer. VI Surgical treatment. **The Journal of Small Animal Practice**. Oxford, v. 7, p. 275-277, 1966.

BARROS, P. S. M.; ALVARENGA, J.; STOPIGLIA, A. J. The use of pericardium in the correction of entropion and the filling of the canine orbital cavity following enucleation. **The Internacional Society of Veterinary Ophthalmology Newsletter**, v. 3, n. 1, p. 4, 1985.

BARROS, P. S. M.; BURNIER JUNIOR, M.; RIGUEIRO, M.; MALERBA, T. A.; SAFATLE, A. M. V. The repair of the sclera and third eyelid using heterologous pericardium. A experimental study. In: AMERICAN SOCIETY OF VETERINARY OPHTHALMOLOGY AND INTERNATIONAL SOCIETY OF VETERINARY

OPHTHALMOLOGY, 1990, San Francisco. **Program...** San Francisco: International Society of Veterinary Ophthalmology, 1990. p. 11-12.

BARROS, P. S. M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A.; SALLES GOMES, T. L. Preserved equine amniotic membran used in the repair of the cornea of the dog. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 36, n. 4, p. S982, 1995.

BARROS, P. S. M.; LAUS, J. L.; MORALES, A.; FERREIRA, A. L.; SAFATLE, A. M. V. Reparação experimental de lesões lamelares de esclera de cães com pericárdio xenólogo conservado. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 59, n. 5, p. 462-466, 1996.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; MALERBA, T. A.; BURNIER JÚNIOR, M. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprothesis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 251-255, 1995.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; RIGUEIRO, M. Uso do pericárdio de eqüino conservado em glicerina como enxerto penetrante da córnea de cães. Estudo experimental. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 138-141, 1997.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; RIGUEIRO, M. Experimental lamellar corneal graft in dog using preserved equine pericardium. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 304-307, 1999.

BARTON, K.; BUDENZ, D. L.; KHAW, P. T.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation in glaucoma surgery. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 38, n. 4, p. S473, 1997.

BISTNER, S. I. Ocular emergencies and trauma. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2nd ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. .v. 2, p. 1276-1292.

BLOGG, J. R.; DUTTON, A. G.; STANLEY, R. G. Use of third eyelid grafts to repair full-thickness defects in the cornea and sclera. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 25, p. 505-512, 1989.

BODAGHI, B.; LÉVY, C.; VOTAN, P.; HOANG-XUAN, T. Intérêt des colles cyanoacrylates dans les ulcères cornéens périphériques d'origine inflammatoire. **Journal Français d'Ophthalmologie**, Paris, v. 19, n. 2, p. 127-132, 1996.

BORUCHOFF, S. A.; THOFT, R. A. Lamellar and penetrating. In: SMOLIN, G.; THOFT, R. **Cornea**. 3rd. Boston: Little, Brown and Company, 1984. p. 645-665.

BRIGHTMAN, A. H.; MCLAUGHLIN, S. A.; BROGDON, J. D. Autogenous lamellar corneal grafting in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 195, n. 4, p. 469-475, 1989.

BRİK, D. Aplicação de película de celulose em lesões epiteliais da córnea. Estudo experimental comparativo. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 23-28, 1991.

BRISSON, B. A.; HOLMBERG, D. L. Use of pericardial patch graft reconstruction of the right atrium for treatment of hemangiosarcoma in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 218, n. 5, p. 723-725, 2001.

BROOKS, D. E. Canine conjunctiva and nictitating membrane. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 290-306.

CAMERON, J. D. Corneal reaction to injury. In: KRACHMER, J. H.; MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. **Cornea – fundamentals of cornea and external disease**. St. Louis: Mosby, 1997. p. 163-180.

CHAMPAGNE, E. S.; MUNGER, R. J. Multiple punctate keratotomy for the treatment of recurrent epithelial erosions in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 28, p. 213-216, 1992.

CHAVES, N. S. T.; BARROS, P. S. M.; MARTINS, A. F.; ARAÚJO, E. G.; ARAÚJO, L. F.; EURIDES, D.; JACOMINI, C. Z. O cão (*Canis familiaris*) como unidade experimental para as ceratoplastias xenógenas. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 3, n. 1, p. 95-97, 1997.

CHAVES, N. S. T.; BARROS, P. S. M.; MARTINS, A. F.; ARAÚJO, E. G.; ARAÚJO, L. F.; EURIDES, D.; SILVA, L. A. F. Estudo clínico dos olhos de cães tratados com ciclosporina "A" (2%) que receberam implantes de córneas de suínos. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 3, n. 1, p. 67-71, 1997.

CHEN, H-J.; PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 84, p. 826-833, 2000.

CHOI, Y. S.; 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**, New York, v. 17, n. 4, p. 389-395, 1998.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. p. 50-112.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; GANDOLFI, W.; ALESSI, A. C. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina. Estudo experimental. **Ars de Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, n. 2, p. 195-202, 1987

DANTAS, P. E. C. conjuntivites cicatriciais. In: LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C. N. ; ALVES, M. R. **Doenças externas oculares e córnea**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1999. p. 223-232.

DE RÖTH, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 23, p. 522-525, 1940.

DICE, P. F.; SEVERIN, G. A.; LUMB, W. V. experimental autogenous and homologous corneal transplantation in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Denver, v. 9, n. 3, p. 245-269, 1973.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 83, n. 6, p. 748-752, 1999.

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

ECKSTEIN, P.; KELLY, W. A. Implantation and development of the conceptus. In: COLE, H. H.; CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1977. p. 315-340.

ESPANA, E. M.; PRABHASAWAT, P.; GRUETERICH, M.; SOLOMON, A.; TSENG, S. C. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large

ocular surface neoplasias. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 86, n. 6, p. 640-645, 2002.

FEATHERSTONE; H.; SANSOM, J. Intestinal submucosa repair in two cases of feline ulcerative keratitis. **The Veterinary Record**, London, v. 29, n. 5, p. 136-138, 2000.

FEATHERSTONE; H.; SANSOM, J.; HEINRICH, C. L. The use of porcine small intestinal submucosa in ten cases of feline corneal disease. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 147-153, 2001.

FRUCHT, J.; ZAUBERMAN, H. Topical indometacin effect on neovascularization of the cornea and on prostaglandin E2 levels. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 68, p. 656-659, 1984.

FUJISHIMA, H.; SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrollable glaucoma. **Ophthalmic Surgery and Lasers**, Thorofare, v. 29, n. 5, p. 428-431, 1998.

FUKUDA, K.; CHIKAMA, T.; NAKAMURA, M.; NISHIDA, T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. **Cornea**, New York, v. 18, n. 1, p. 73-79, 1999.

GABRIC, N.; MRAVICIC, I.; DEKARIS, I.; KARAMAN, Z.; MITROVIC, S. Human amniotic membrane in the reconstruction of the ocular surface. **Documenta Ophthalmologica Advances in Ophthalmology**, Netherlands, v. 98, n. 3, p. 273-283, 2000.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L. Use of fresh autogenous vaginal tunic in the experimental lamellar keratoplasty in dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 475-479, 2000.

GARCIA, J. A.; BARROS, P. S. M.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; SAFATLE, A. M. V. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, p. 290-294, 1996. Suplemento.

GELATT, K. N. **Manual de oftalmologia veterinária**. Barueri: Editora Manole Ltda, 2003. 594p.

GILGER, B. C.; WHITLEY, R. D. Surgery of the cornea and sclera. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 675-700.

GODOY, C. A. L. **Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal eqüina como enxerto. Estudo experimental**. 2001. 84 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GOMES, J. A. P.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N.; CHAVES, A. P.; CUNHA, M. C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular nas ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 62, n. 5, p. 562-576, 1999.

GOMES, J. A. P.; LIMA, A. L. H.; ADAN, C. B. D. Avaliação da superfície ocular. In: LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C. N.; ALVES, M. R. **Doenças externas oculares e córnea**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1999. p. 57-109.

GRAY, T. B.; PRABHASAWAT, P.; TSENG, S. C. G. amniotic membrane transplantation before limbal stem cell allografts for ocular surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 38, n. 4, p. S511, 1997.

GRIS, O.; DEL CAMPO, Z.; WOLLEY-DOD, C.; GÜELL, J. L.; BRUIX, A.; CALATAYUD, M.; ADÁN, A. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. **Cornea**, New York, v. 21, n. 1, p. 22-27, 2002.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. **Obstetrícia veterinária**. Porto Alegre: Sulina Editora, 1982. p. 27-37.

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. 233 f. Tese (Doutorado em Oftalmologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1979.

GUM, G. G.; GELATT, K. N.; OFRI, R. Physiology of the eye. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 151-182.

HAKANSON, N. E.; MERIDETH, R. E. Conjunctival pedicle grafting in the treatment of corneal ulcers in the dog and cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 23, n. 6, p. 641-648, 1987.

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

HEHER, K. L.; KATOWITZ, J. A. Oral mucous membrane grafts for corneal protection to permit prosthetic shell wear. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, Hagerstown, v. 13, n. 1, p. 40-47, 1997.

HELPER, L. C. **Magrane's canine ophthalmology**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. 297 p.

HELPER, L. C.; BLOGG, R. A modified third eyelid flap procedure. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 19, n. 6, p. 955-956, 1983.

HONAVAR, S. G.; BANSAL, A. K.; SANGWAN, V. S.; RAO, G. N. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson Syndrome. **Ophthalmology**, Rochester, v. 107, n. 5, p. 975-979, 2000.

JOBIM, G. M. B. Ceratites ulcerativas. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 13, p. 31-34, 1983.

JOHN, T.; FOULKS, G. N.; JOHN, M. E.; CHENG, K.; HU, D. Amniotic membrane in the surgical management of acute toxic epidermal necrolysis. **Ophthalmology**, Rochester, v. 109, n. 2, p. 351-360, 2002.

KAVINSKI, L. C. Pericardium patch grafts for treatment of cornea lesions in dogs. In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 7., NATIONAL CONGRESS OF AVEPA, 14., 1980, Barcelona. **Proceedings...** p.17.

KERN, T. J. Ulcerative keratitis. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 643-665, 1990.

KHODADOUST, A. A. The allograft rejection leading cause of late failure of clinical corneal grafts. In: CIBA FOUNDATION GRAFT SYMPOSIUM, Elsevier, **Excerpta Medica**, 1973. p.151.

KIM, J. S.; KIM, J. C.; HAHN, T. W.; PARK, W. C. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. **Cornea**, New York, v. 20, n. 7, p. 720-726, 2001.

KIM, J. C.; TSENG, S. C. G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, New York, v. 14, n. 5, p. 473-484, 1995.

KIRSCHNER, S. E. Persistent corneal ulcers. What to do when ulcers won't heal. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 627-642, 1990.

KOCH, A. E. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, p. 1798-1801, 1992.

KOENING, S. B.; KAUFMAN, H. E. The treatment of necrotizing scleritis with an autogenous periosteal graft. **Ophthalmic Surgery**, Thorofare, v. 14, p. 1029-1032, 1983.

KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; QUANTOCK, A. J.; FULLWOOD, N. J.; DOTA, A.; KINOSHITA, S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. **Cornea**, New York, v. 19, n. 1, p. 65-71, 2000.

KRUSE, F. E.; ROHRSCHEIDER, K.; VÖLCKER, H. E. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. **Ophthalmology**, Rochester, v. 106, n. 8, p. 1504-1511, 1999.

KUBODERA, H.; SATO, H.; SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K. Histological changes after preserved human amniotic membrane transplantation in rabbits. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 39, n. 4, p. S429, 1998.

KUCKELKORN, R.; SCHRAGE, N.; REDBRAKE, C.; KOTTEK, A.; REIM, M. Autologous transplantation of nasal mucosa after severe chemical and thermal eye burns. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, Hvidovre, v. 74, p. 442-448, 1996.

KUDVA, V.; DESHPANDE, K. S. Experimental autogenous and homogenous lamellar corneal grafting in bovines. **The Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 60, p. 56-61, 1983.

LAFORGE, H. Diagnóstico y tratamiento de las úlceras corneales. **Waltham International Focus**, London, v. 3, n. 1, p 2-8, 1993.

LAFORGE, H. Ulcères de cornée. **Pratique Medicale et Chirurgicale de L'animal de Compagnie**, Paris, v. 32, n. S4, p. 113-127, 1997.

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. 71 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.

LAUS, J. L.; GALERA, P. D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; CAVASSANI, M. M.; ANDRADE, A. L. Bilateral lamellar keratoplasty in descemetocoele treatment in dog with botulism by use of equine renal capsule and conjunctival pedicle graft. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 355-359, 1999.

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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 30, p. 183-193, 1993. Suplemento.

LAUS, J. L.; SOUZA, M. S. B.; MORALES, A.; ANDRADE, A. L.; FIGUEIREDO, F.; SANTOS, J. M.; VALERI, V. Comparação entre ceratoplastias lamelares por enxertos autógenos livres, de córnea e pediculados de conjuntiva. Estudo experimental no cão (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 41-46, 1996.

LEE, S. H.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 123, n. 3, p. 303-312, 1997.

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

LEWIN, G. A. Repair of a full thickness corneoscleral defect in a German shepherd dog using porcine small intestinal submucosa. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 40, p. 340-342, 1999.

MA, D. H. K.; WANG, S. F.; SU, W. Y.; TSAI, R. J. F. Amniotic membrane graft for the management of sclera melting and corneal perforation in recalcitrant infectious scleral and corneoscleral ulcers. **Cornea**, New York, v. 21, n. 3, p. 275-283, 2002.

MACKIE, D. P. The euro skin bank: development and application of glycerol-preserved allografts. **The Journal of Burn Care & Rehabilitation**, Hagerstown, v. 18, n. 1, p. S7-S9, 1997.

MAGUEN, E.; NESBURN, A. B.; MACY, J. I. Combined use of sodium hyaluronate and tissue adhesive in penetrating keratoplasty of corneal perforations. **Ophthalmic Surgery**, Thorofare, v. 15, n. 1, p. 55-57, 1984.

MATSUMOTO, K.; NAKANISHI, H.; URANO, Y.; KUBO, Y.; NAGAE, H. Lower eyelid reconstruction with a cheek flap supported by fascia lata. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 103, p. 1650-1654, 1999.

MEJÍA, L. F.; SANTAMARÍA, J. P.; ACOSTA, C. Symptomatic management of postoperative bullous keratopathy with nonpreserved human amniotic membrane. **Cornea**, New York, v. 21, n. 4, p. 342-345, 2002.

MELLER, D.; PIRES, R. T. F.; MACK, R. J. S.; FIGUEIREDO, F.; HEILIGENHAUS, 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**, Rochester, v. 107, n. 5, p. 980-990, 2000.

MEUNIER, V. Brûlures chimiques de la cornée chez les carnivores domestiques. **Le Point Vétérinaire**, Paris, v. 32, n. 212, p. 40-41, 2001.

MILLER, W. M. Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs. **Veterinary Medicine**, Denville, p. 916-922, Oct. 1996.

MILLER, W. M. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 51-57, 2001.

MISHRA, G. C. Surgical management of corneal ulcers in equines. A case report. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 68, p. 969-970, 1991.

MISHRA, G. C.; REDDY, V. Lamellar homogenous corneal transplantation in mules. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 68, n. 4, p. 367-369, 1991.

MIZUNO, K.; HAYASAKA, S. Penetrating keratoplasty with use of adhesives and scleral strip in acute corneal perforation. **Ophthalmic Surgery**, Thorofare, v. 13, n. 6, p. 475-477, 1982.

MORALES, A.; LAUS, J. L.; SOUZA, M. S. B.; SANTOS, J. M.; FIGUEIREDO, F.; VALERI, V. Comparação entre enxertos autólogos livres e pediculados de conjuntiva no reparo de ceratectomias superficiais. Estudo experimental no cão (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 28-31, 1996.

MOREIRA, H.; BERFOR JR., R. In: BELFORT JR., R.; KARA-JOSÉ, N. **Córnea clínica-cirúrgica**. São Paulo: Roca. 1996. p. 471-479.

MOREIRA, H.; OLIVEIRA, C. S. Transplante de membrana amniótica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 303-305, 2000.

MORGAN, R. V. Ocular emergencies. **The Compendium on Continuing Education**, Baton Rouge, v. 4, n. 1, p. 37-45, 1982.

MOSCHOS, M.; DROUTSAS, D.; BOUSSALIS, P.; TSIOLIAS, G. Clinical experience with cyanoacrylate tissue adhesive. **Documenta Ophthalmologica**, v. 93, n. 3, p. 237-245, 1997.

MURPHY, C. J.; POLLOCK, R. V. S. The eye. In: EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 1009-1057.

NASSISE, M. P. Canine ulcerative keratitis. **The Compendium on Continuing Education**, Baton Rouge, v. 7, n. 9, p. 686-698, 1985

NAUMANN, G. O. H.; SAUTTER, H. Surgical procedures on the cornea. In: BLODI, F. C.; MACKENSEN, G.; NEUBAUER, H. **Surgical ophthalmology**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v. 1, p. 434-440.

NELSON, D. L., MACMILLAN, A. D. Doenças da córnea. In: KIRK, R. W. **Atualização terapêutica veterinária**. São Paulo: Manole, 1988. p. 808-817.

NOSÉ, W.; NOSÉ, R. A. M. Ceratoplastias e ceratectomias. In: BELFORT JR, R.; KARA-JOSÉ, N. **Córnea clínica-cirúrgica**. São Paulo: Roca, 1996. p. 493-504.

OLIVEIRA, V. A.; ALVARENGA, J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de eqüinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 623-628, 1998.

PANCHBHAI, V. S., KULKARNI, P. E. Lamellar corneal transplantation in buffalo calves (*Bubalus bubalis*) - I (Autogenous and Homogenous Grafts). **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 63, p. 737-740, 1986.

PARIDAENS, D.; BEEKHUIS, H.; van der BOSCH, W.; REMEYER, L.; MELLES, G. Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 85, n. 6, p. 658-661, 2001.

PARSHALL, C. J. Lamellar corneo-scleral transposition. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 9, p. 270-277, 1973.

PATON, R. T. History of corneal grafting. In: _____. **Keratoplasty**. New York: McGraw-Hill, 1955. p. 4-35.

PAULO, N. M. **Estudo comparativo entre membrana amniótica de eqüino preservada em glicerina a 98% e em ácido acético glacial a 0,25% no tratamento de feridas cutâneas experimentais no cão**. 1997. 62 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.

PEIFFER, R. L.; NASISSE, M. P.; COOK, C. S.; HARLING, D. E. Surgery of the canine and feline orbit, adnexa and globe part 6: surgery of the cornea. **Companion Animal Practice**, Santa Barbara, v. 1, n. 7, p. 3-13, 1987.

PEIFFER JR., R. L.; WILCOCK, B. P.; DUBIELZIG, R. R.; RENDER, J. A.; WHITELEY, H. E. Fundamentals of veterinary ophthalmic pathology. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. p. 355-385.

PEYRET, J. A. Uso del fibrinógeno humano concentrado en el cierre de heridas quirúrgicas oculares en el conejo. **Archivos de Oftalmología de Buenos Aires**, Buenos Aires, v. 61, p. 33-36, 1986.

PICKETT, J. P. Treating persistent corneal erosions with a crosshatch keratotomy technique. **Veterinary Medicine**, Denville, p. 561-572, June, 1995.

PIPPI, N. L.; SAMPAIO, A. J. S. A. Estudos preliminares sobre o comportamento do Biofill na ceratoplastia lamelar em coelhos. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 20, n. 3-4, p. 297-302, 1990.

PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G.; PRABHASAWAT, P.; PUANGSRICHARERN, V.; MASKIN, S. L.; KIM, J. C.; TAN, D. T. H. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 117, p. 1291-1297, 1999.

POLLARD, S. M.; AYE, N. N.; SYMONDS, E. M. Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 83, p. 470-477, 1976.

PORTNOY, S. L.; INSLER, M. S.; KAUFMAN, H. E. Surgical management of corneal ulceration and perforation. **Survey of Ophthalmology**, New York, v. 34, n. 1, p. 47-58, 1989.

POWELL, N. G. Cirurgia da córnea. In: BOJRAB, M. J. **Cirurgia dos pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986. p. 66-71.

POWER, W. J.; NEVES, R. A. Anatomia e fisiologia da córnea. In: BELFORT JR, R.; KARA-JOSÉ, N. **Córnea clínica-cirúrgica**. São Paulo: Roca, 1996. p. 3-15.

PRABHASAWAT, P.; TESAVIBUL, N.; KOMOLSURADEJ, W. Single and multiplayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 85, p. 1455-1463, 2001.

PUANGSRICHARERN, V.; PARIYAKANOK, L. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 38, n. 4, p. S511, 1997.

RANZANI, J. J. T.; GANDOLF, W.; FRANCO, M.; CASTRO, G. B.; NICOLETTI, J. L. M. Implante de pericárdio de equino preservado em glicerina em solução de continuidade de diafragma de cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 65-73, 1990.

RANZANI, J. J. T.; SAMPAIO, G. R.; FRANCO, M.; CASTRO, G. B. Aplicação de membrana biológica heteróloga conservada em glicerina, na reparação de lesão óssea em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 8, p. 35-45, 1996.

REDDY, C. V.; GUPTA, O. P.; CHARAN, K.; SING, G. R. Use of fresh and preserved bovine amnion in urinary bladder reconstruction in goats: gross histopathological and histochemical study. **The Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 69, n. 1, p. 12-15, 1999.

REED, J. W.; FROMER, C.; KLINTWORTH, G. K. Induced corneal vascularization remission with argon laser therapy. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 93, p. 1017-1019, 1975.

REGNIER, A. Antimicrobials, anti-inflammatory agents, and antiglaucoma drugs. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. p. 297-336.

RENWICK, P. Diagnosis and treatment of corneal disorders in dogs. **In practice**, London, v. 18, n. 7, p. 315-328, 1996.

ROBERTS, S. J. **Obstetrícia veterinária y patologia de la reproduccion**. Buenos Aires: Editora Hemisfério Sur, 1979. p. 50-53.

ROBIN, J. B.; REGIS-PACHECO, L. F.; KASH, R. L. The histopathology of corneal neovascularization. Inhibitor effects. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 103, p. 284-287, 1985.

ROCHA, H. Enxêrto de córnea (ceratoplastia). **Jornal Brasileiro de Cirurgia**, v. 1, n. 4, p. 446-459, 1962.

RYMER, S. Transplante de limbo. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 307-309, 2000.

SAFATLE, A. M. V.; **Estudo comparativo da capacidade angiogênica do pericárdio e da membrana amniótica de eqüino em córnea de ratos**. 1998. 92 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1998.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 31-150.

SANSOM, J.; BARNETT, K. Lentes de contacto blandas en pequeños animales. **Waltham Focus**, London, v. 7, n. 1, p. 21-23, 1997.

SATO, H.; SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St Louis, v. 39, n. 4, p. S428, 1998.

SCHOENAU, L. S. F.; PIPPI, N. L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 72, p. 49-53, 1993.

SCHOENAU, L. S. F.; PIPPI, N. L.; SCHOSSLER, J. E. V. Avaliação clínica preliminar do fechamento comparativo de incisões corneanas com sutura e Biofill (película celulósica). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 173-177, 1993.

SCHOR, P.; BERFORT JR., R. Metabolismo e bioquímica da córnea. In: BELFORT JR., R.; KARA-JOSÉ, N. **Córnea clínica-cirúrgica**. São Paulo: Roca, 1996. p. 41-50.

SEVERIN, G. A. **Veterinary ophthalmology**. 2nd ed. Colorado: Colorado State University, 1989. 294 p.

SHIELDS, C. L.; SHIELDS, J. A.; ARMSTRONG, T. Management of conjunctival and corneal melanoma with surgical excision, amniotic membrane allograft, and topical chemotherapy. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 132, n. 4, p. 576-578, 2001.

SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 82, 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**, Rochester, 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**, New York, v. 20, n. 4, p. 408-413, 2001.

SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 2. ed. Buenos Aires: Inter-médica Editorial, 1992. 739 p.

SLATTER, D.; HAKANSON, N. Cornea and sclera. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. v. 2, p. 1202-1225.

SOLOMON, A.; MELLER, D.; PRABHASAWAT, P.; JOHN, T.; ESPANA, M. E.; STEUHL, K-P.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocoeles, and deep ulcers. **Ophthalmology**, Rochester, v. 109, n. 4, p. 694-703, 2002.

SOLOMON, A.; PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. **Ophthalmology**, Rochester, v. 108, n. 3, p. 449-460, 2001.

SORSBY, A.; HAYTHORNE, J.; REED, H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 31, p. 409-418, 1947.

SOUZA, M. S. B.; LAUS, J. L.; MORALES, A.; FIGUEIREDO, F.; MAIA, J. S.; VALERI, V. Comparação experimental entre enxertos autógenos de córnea e conjuntiva no reparo de ceratectomias superficiais em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). Estudo clínico e morfológico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 225-231, 1997.

SPENCER, W. H. Cornea. In: _____. **Ophthalmic pathology**. 4th edition. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. v. 1, p. 157-333.

SPOOR, T. C.; RAMOCKI, J. M.; COWDEN, J. W. A periosteal-temporalis fascia pedicle flap for repairing impending ocular perforations and extruding keratoprotheses. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 108, n. 6, p. 704-708, 1989.

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

STARTUP, F. G. Corneal ulceration in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, London, v. 25, p. 737-752, 1984.

STRIETER, R.; KUNKEL, S. L.; ELNER, V. M.; MARTONYI, C. L.; KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J.; ELNER, S. G. Interleukin-8. A corneal factor that induces

neovascularization. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 141, n. 6, p. 1279-1284, 1992.

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

SWANK, A.; HOSGOOD, G. Corneal wound healing and the role of growth factors. **The Compendium on Continuing Education**, Baton Rouge, v. 18, n. 9, p. 1007-1017, 1996.

TAHIJA, S. G.; CHANDLER, J. W. Corneal ulceration: have we advanced in the last 20 years? **International Ophthalmology Clinics**, Boston, v. 30, n. 1, p. 33-35, 1990.

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 equino preservado em glicerina: avaliação clínica e morfológica.** 2000. 158 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000.

THOFT, R. A. Conjunctival transplantation. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 95, p. 1425-1427, 1977.

TI, S. E.; TOW, S. L. C.; CHEE, S. P. Amniotic membrane transplantation in entropion surgery. **Ophthalmology**, Rochester, v. 108, n. 7, p. 1209-1217, 2001.

TSAI, R. J. F.; LI, L. M.; CHEN, J. K. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. **The New England Journal of Medicine**, London, v. 343, p. 86-93, 2000.

TSENG, S. C. G. Discussion. **Ophthalmology**, Rochester, v. 106, n. 8, p. 1504-1511, 1999. Discussão sobre o texto dos autores: KRUSE, F. E.; ROHRSCHEIDER, K.; VÖLCKER, H. E. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. **Ophthalmology**, Rochester, v. 106, n. 8, p. 1504-1511, 1999.

TSENG, S. C. G.; PRABHASAWAT, P.; LEE, S. H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 124, n. 6, p. 765-774, 1997.

TSUBOTA, K.; SATAKE, Y.; OHYAMA, M.; TODA, I.; TAKANO, Y.; ONO, M.; SHINOZAKI, N.; SHIMAZAKI, J. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson Syndrome. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 122, p. 38-52, 1996.

TURNER, A. G.; BLOGG, J. R. Multiple striate keratotomy: a treatment for corneal erosions caused by epithelial basement membrane disease. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 75, n. 1, p. 27-30, 1997.

UÇAKHAN, Ö. Ö.; KÖKLÜ, G.; FIRAT, E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries. **Cornea**, New York, v. 21, n. 2, p. 169-172, 2002.

VAUGHAN, D.; ASBURY, T. A. **Oftalmologia geral**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1990. 438 p.

VIEIRA, L. A.; LIMA, A. L. H.; CUNHA, M.; MASCAVO, V. Conceitos básicos e clínicos de doenças externas e córnea. In: LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C. N.; ALVES, M. R. **Doenças externas oculares e córnea**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1999. p. 1-55.

WENDLER, M. E.; FALZONI, W. L.; FALZONI, R.; BELFORT JR., R. Adesivos teciduais no tratamento de perfuração corneana. Estudo comparativo em cobaias. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 138-140, 1983.

WHITLEY, R. D.; GILGER, B. C. Diseases of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 635-674.

WILKIE, D. A.; WHITTAKER, C. Surgery of the cornea. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 1067-1107, 1997.

WOLF, E. D. Conjunctival pedicle graft treatment for equine corneal ulcers. **International Society of Veterinary Ophthalmology (ISVO)**, Vienna, Austria, October 1-2, p. 19, 1991.

WOLFER, J.; GRAHN, B. Diagnostic ophthalmology. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 35, n. 2, p. 124-125, 1994.

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 remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 85, n. 3, p. 345-349, 2001.

Semanas Animais	1	2	3	4	5	6	7	8
10	2	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0				
7	2	0	0	0				
6	2	1						
5	2	1						
4	2							
3	2							
2*	2							
1*	1							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

APÊNDICE A – Demonstrativo dos graus de fotofobia/blefarospasmo de cães submetidos à ceratoplastia com MA alógena. São Paulo, SP, 2003

	1	2	3	4	5	6	7	8
Animais								
10	2	1	0	0	0	0	0	0
9	2	2	0	0	0	0	0	0
8	1	1	0	0				
7	3	2	1	1				
6	1	1						
5	2	1						
4	1							
3	2							
2*	2							
1*	1							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

APÊNDICE B – Demonstrativo dos graus de fotofobia/blefarospasmo de cães submetidos à ceratoplastia com MAAM alógena. São Paulo, SP, 2003

Semanas Animais	1	2	3	4	5	6	7	8
10	1 m	1 m	1 m	1 m	1 m	0	0	0
9	1 sm	1 mp	1 m	1 m	1 m	1 m	0	0
8	1 mp	1 mp	1 m	1 m				
7	3 s	2 s	1 sm	1 sm				
6	2 m	1 m						
5	2 s	1 sm						
4	2 m							
3	2 s							
2*	2 m							
1*	1 m							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

s - serosa

m - mucosa

sm – seromucosa

mp - mucopurulenta

p - purulenta

APÊNDICE C – Demonstrativo do grau e tipo de secreção ocular em cães submetidos à ceratoplastia com MA alógena. São Paulo, SP, 2003

Semanas Animais	1	2	3	4	5	6	7	8
10	2 m	2 m	1 m	1 m	0	0	0	0
9	2 m	2 m	2 m	1 m	0	0	1 m	0
8	1 m	1 m	0	0				
7	2 s	2 sm	1 s	1 s				
6	1 m	1 s						
5	2 sm	2 sm						
4	2 sm							
3	2 sm							
2*	2 sm							
1*	2 sm							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

s - serosa

m - mucosa

sm - seromucosa

mp - mucopurulenta

p – purulenta

APÊNDICE D – Demonstrativo do grau e tipo de secreção ocular em cães submetidos à ceratoplastia com MAAM alógena. São Paulo, SP, 2003

Semanas Animais	1	2	3	4	5	6	7	8
10	1	1	1	1	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0				
7	1	1	1	1				
5	1	1						
6	1	1						
4	2							
3	1							
2*	0							
1*	0							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

APÊNDICE E – Demonstrativo do grau de edema em córnea de cães submetidos à ceratoplastia com MA alógena. São Paulo, SP, 2003

Semanas Animais	1	2	3	4	5	6	7	8
10	2	1	1	1	0	0	0	0
9	2	2	2	1	1	0	0	0
8	1	1	1	1				
7	2	1	1	1				
6	2	2						
5	1	1						
4	2							
3	2							
2*	2							
1*	1							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

APÊNDICE F – Demonstrativo do grau de edema em córnea de cães submetidos à ceratoplastia com MAAM alógena. São Paulo, SP, 2003

Semanas Animais	1	2	3	4	5	6	7	8
10	0	3	3	2	3	2	1	1
9	1	2	3	2	1	1	1	1
8	1	3	3	3				
7	1	3	3	3				
6	1	3						
5	1	3						
4	1							
3	2							
2*	0							
1*	0							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

APÊNDICE G – Demonstrativo do grau neovascularização em córnea de cães submetidos à ceratoplastia com MA alógena. São Paulo, SP, 2003

Semanas Animais	1	2	3	4	5	6	7	8
10	1	3	3	3	3	2	1	1
9	1	3	3	3	2	1	1	1
8	2	3	3	3				
7	1	3	3	3				
6	1	3						
5	1	3						
4	1							
3	1							
2*	0							
1*	0							

* - avaliação clínica com até 48 horas de pós-operatório

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

APÊNDICE H – Demonstrativo do grau de neovascularização em córnea de cães submetidos à ceratoplastia com MAAM alógena. São Paulo, SP, 2003

(Continua)

Parâmetros	Epitelização sobre o implante	Células inflamatórias	Neovascularização	Edema estromal	Fibrose	Incorporação do implante	Observação
Grupo II Animais							
2 dias							
1	Ausente e acantose no local dos pontos	Polimorfonucleares (inflamação aguda)	Ausente	Presente	Ausente	Adesão do implante à córnea	-
2	Ausente	Polimorfonucleares (inflamação aguda)	Ausente	Presente (menos intenso que o animal 1)	Ausente	Adesão parcial da MA à córnea	Presença de pontos
7 dias							
3	Mais de uma camada de células epiteliais e células epiteliais sobre o implante	Polimorfonucleares e poucos linfócitos (inflamação aguda)	Presente e manifestação de vasos importantes	Presente, porém discreto e vacuolização endotelial	Ausente	Boa adesão do implante à córnea	Implante próximo ao limbo Seqüestro do implante
4	Camada epitelial, camada de epitélio atrófico	Polimorfonucleares em quantidade menos intensa (inflamação aguda) e presença de linfócitos	Ausente	Presente, porém discreto	Ausente	Implante aderido e com pequenas áreas não aderente	Presença de seqüestro do implante
15 dias							
5	Totalmente epitelizado e acantose epitelial	Polimorfonucleares (em quantidade menor) e presença de linfócitos (inflamação aguda, tendendo a cronificar e regenerativo)	Presente e em grande quantidade	Presença de edema epitelial (intra e extracelular) e vacuolização endotelial no local do implante	Presente (fibroblasto em maior quantidade que o animal 6)	Sim e não se reconhece o implante	Endoteliose
6	Totalmente epitelizado e acantose epitelial	Polimorfonucleares (quantidade menor) e presença de linfócitos (inflamação aguda e tendendo a cronificar e regenerativo).	Presente e em grande quantidade	Edema epitelial (intra e extracelular) e vacuolização endotelial no local do implante e edema perilesional	Presente	Sim e não se reconhece o implante	Endoteliose
30 dias							
7	Totalmente epitelizado, epitélio acantótico	Raros linfócitos (inflamação crônica)	Presente	Edema epitelial próximo ao implante e vacuolização endotelial	Presente e com proliferação de colágeno	Sim, porém a área foi identificada pelo seqüestro do implante	Presença de seqüestro do implante

(Conclusão)

Parâmetros	Epitelização sobre o implante	Células inflamatórias	Neovascularização	Edema estromal	Fibrose	Incorporação do implante	Observação
Grupo II Animais							
8	Totalmente epitelizado	Reação tipo corpo estranho – presença de histiócitos	Presente, mas em menor quantidade e mais profundos	Ausente e vacuolização endotelial	Presente	Sim e não se reconhece o implante	Presença de pontos
60 dias							
9	Epitélio acantótico	Presença de linfócitos (reação crônica tipo corpo estranho ao redor dos vasos) e polimorfonucleares.	Presente e em quantidade menor que o animal 10	Edema epitelial e estromal, e vacuolização endotelial	Presente na metade do estroma	Não se reconhece o implante	-
10	Epitélio normal	Reação inflamatória tipo corpo estranho na região dos pontos (inflamação crônica)	Presente e em quantidade moderada	Presente, manifestação de vacuolização endotelial (ceratócitos compactados)	Presente na metade do estroma	Não se reconhece o implante	-

APÊNDICE I – Descrição dos achados histopatológicos das córneas de cães que receberam implante de MA alógena. São Paulo, 2003.

(Continua)

Parâmetros	Epitelização sobre o implante	Células inflamatórias	Neovascularização	Edema estromal	Fibrose	Incorporação do implante	Observação
Grupo II Animais							
2 dias							
1	Acantose em uma extremidade e atrofia em outra extremidade	Polimorfonucleares (inflamação aguda)	Ausente	Presente (perilesional) e vacuolização endotelial	Ausente	Implante parcialmente aderido	-
2	Ausente	Polimorfonucleares (inflamação aguda)	Ausente	Presente e vacuolização endotelial	Ausente	Implante não aderido e presença de epitelização abaixo do fio	-
7 dias							
3	Totalmente epitelizado, Epitélio atrófico	Polimorfonucleares (inflamação aguda)	Presente próximo aos fios de sutura	Presente no epitélio e vacuolização endotelial	Ausente	Sim e não se identifica o implante	Implante próximo ao limbo
4	Epitelização total e Epitélio atrófico	Polimorfonucleares e presença de alguns linfócitos (inflamação aguda)	Presente próximo ao limbo	Presente no epitélio e estroma, e vacuolização endotelial	Ausente	Implante aderido	-
15 dias							
5	Totalmente epitelizado e Acatose epitelial	Polimorfonucleares. e linfócitos (inflamação aguda e crônica)	Presente e em quantidade intensa	Edema epitelial, vacuolização endotelial e hemácias no endotélio	Ausente	Sim e não foi possível identificar o implante	Reação granulomatosa
6	Totalmente epitelizado	Polimorfonucleares e linfócitos (inflamação aguda e crônica)	Presente e em grande quantidade	Presente no epitélio e vacuolização endotelial	Ausente	Sim e não se identifica o implante	-
30 dias							
7	Epitélio normal	Reação tipo corpo estranho ao redor dos vasos (inflamação crônica)	Presente	Presente e vacuolização endotelial	Presente e discreta	Totalmente incorporado	-
8	Epitélio normal	Polimorfonucleares (presença em pequena quantidade) (inflamação crônica)	Presente e em quantidade menos intensa	Epitélio menos vacuolizado e endotélio vacuolizado	Presente e discreta	Totalmente incorporado	Reação granulomatosa e polimorfonucleares ao redor do fio

Conclusão

Parâmetros	Epitelização sobre o implante	Células inflamatórias	Neovascularização	Edema estromal	Fibrose	Incorporação do implante	Observação
Grupo II Animais							
60 dias							
9	Epitélio normal e áreas de epitélio atrófico	Raras células inflamatórias e sem reação inflamatória	Presente e em quantidade discreta (um pouco ao redor do fio)	Presente e vacuolização endotelial importante	Presente	Totalmente incorporado	-
10	Epitélio normal e atrófico em algumas áreas	Reação tipo corpo estranho ao redor dos fios (inflamação crônica)	Presente e em quantidade menos intensa	Presente e vacuolização endotelial	Presente	Totalmente incorporado	-

*Seqüestro do implante = epitélio por cima e por abaixo do implante

**Vacuolização = edema endotelial.

APÊNDICE J – Descrição dos achados histopatológicos das córneas de cães que receberam implante de MAAM alógena. São Paulo, 2003.