CARLA SANTOS MEDEIROS

**Regeneração dos nervos da córnea anterior pós excimer laser
e reparação tecidual pós injúria endotelial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Programa de Oftalmologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcony Rodrigues de
Santhiago

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Medeiros, Carla Santos

Regeneração dos nervos da córnea anterior pós
excimer laser e reparação tecidual pós injúria
endotelial / Carla Santos Medeiros. -- São Paulo,
2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oftalmologia.

Orientador: Marcony Rodrigues de Santhiago.

Descritores: 1.Ceratectomia fotorrefrativa
2.Regeneração nervosa 3.Mitomicina C 4.Epitélio
posterior 5.Lâmina limitante posterior 6.Cicatrização
7.Opacidade da córnea

USP/FM/DBD-511/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Ao meu esposo **Felipe**,

A você, que sempre esteve ao meu lado em todos os passos desta trajetória, obrigada por me incentivar a realizar meus sonhos, por torná-los nossos e transformá-los em realidade.

Obrigada por me ajudar a enfrentar os momentos difíceis, por me confortar perante as angústias e por celebrar cada pequena conquista dessa jornada.

Obrigada por me inspirar com seu caráter, ética e competência, tornando-me uma profissional melhor e um ser humano mais forte.

Aos meus amados pais **Carlos Roberto e Márcia**, meus exemplos de dedicação, perseverança, resiliência e luta. Agradeço por todas as renúncias que fizeram em prol da minha educação e formação. Por todas as oportunidades, sacrifícios, suporte e incentivo para que eu realizasse meus sonhos. Pelo amor incondicional. Pelo exemplo de honestidade e humildade. Vocês são meu alicerce e meu maior orgulho.

À minha querida irmã **Camila**, minha grande companheira.

Obrigada por estar sempre disposta a me ouvir, me aconselhar, por sempre ter uma palavra de conforto e por dividir com alegria cada conquista dessa trajetória.

À minha sogra **Patrícia** por todos os conselhos profissionais e pessoais, pelas portas abertas e por todo incentivo e carinho.

Aos meus amados amigos e familiares, por compreenderem minha ausência em momentos tão importantes de suas vidas e por sempre me incentivarem a buscar meus sonhos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, mestre e amigo **Dr. Marcony Santhiago**.

É difícil colocar em palavras minha gratidão e admiração por esse profissional e ser humano ímpar. São muitos os agradecimentos que devo ao Dr. Marcony. Primeiramente, agradeço por ter acreditado em meus sonhos mesmo quando eram aspirações embrionárias de uma residente. Por todas as portas abertas e oportunidades decisivas em minha carreira. Pelos inúmeros ensinamentos em cirurgia refrativa, na ciência e na vida. Por ter me guiado durante minha trajetória, pelo incentivo a cada passo dado. Por me tornar uma “pensadora” e não apenas replicadora do conhecimento e informação.

Obrigada pelos exemplos de determinação, garra, dedicação e excelência que tanto me motivaram a ser uma pesquisadora crítica e “inquieta”, uma oftalmologista mais dedicada e um ser humano mais forte e determinado.

Ao Prof. **Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro**, coordenador da Pós-Graduação da área de oftalmologia da Universidade de São Paulo, por ter me acolhido como aluna da pós-graduação e pelo exemplo de competência e dedicação.

Ao **Dr. Steven E. Wilson** por tornar possível a realização desse projeto em parceria com a Universidade de São Paulo e por todo conhecimento compartilhado que tanto contribuiu para a minha formação como cirurgiã e cientista.

Aos professores da Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro **Carlos Roberto Paiva Gonçalves Neto, Patrícia Conti e Telémaco Boldrim**, representando todos os profissionais desta instituição, os quais me acolheram e tanto contribuíram para minha formação.

Aos professores **Paulo Polisuk, Marco Antônio Alves e Gustavo Novaes** que tanto contribuíram com seus ensinamentos para meus conhecimentos e minha formação em córnea e por despertar paixão por essa subespecialidade.

Aos meus amigos de pós-graduação **Natália Giacomini, Crislaine Serpe, Cláudio Trindade, Pedro Bertino** pela amizade, cumplicidade e pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos e colaboradores deste projeto **Gustavo K. Marino, Luciana Lassance, Thangavadivel Shanmugapriya, Paranamanda Saikia e Rodrigo Oliveira**, não apenas pela contribuição realizada por cada um de vocês neste

projeto, mas pelas inúmeras contribuições durante minha formação e pela amizade.

Aos amigos e funcionários do setor de cirurgia refrativa do Cole Eye Institute e do Core Lab da Cleveland Clinic Foundation por todo carinho, amizade e colaboração.

À amiga **Regina Ferreira de Almeida**, esse trabalho é fruto de sua dedicação, que não mede esforços para a excelência da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, por ir muito além de suas funções e por cuidar com tanto carinho de todos os detalhes da pós-graduação.

Epígrafe

"A força não provém da capacidade física. Provém de uma vontade indomável".

(Mahatma Gandhi)

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

	Lista de siglas e abreviaturas	
	Lista de símbolos	
	Lista de tabelas	
	Lista de figuras	
	Lista de gráficos	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVOS.....	06
2.1	Objetivos primários.....	07
2.2	Objetivos secundários.....	07
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	08
3.1	Origem e função dos nervos corneanos.....	09
3.2	Anatomia, Distribuição e Ultraestrutura.....	10
3.3	Importância vs. Lesão dos nervos vs. Repercussão clínica.....	11
3.4	Impacto e dano aos nervos após cirurgia refrativa. Ênfase à injúria cirúrgica aos nervos durante o PRK	11
3.5	Neurotoxicidade da MMC nos olhos e demais tecidos.....	12
3.6	Regeneração dos nervos da córnea após o PRK.....	13
3.7	Métodos de estudo da inervação da córnea.....	14
3.8	Lesão da córnea vs. Opacidade corneana.....	15
3.9	Causas de opacidade corneana, fatores determinantes para sua ocorrência e formação de cicatrizes anômalas.....	16
3.10	Apoptose do ceratócito como marco inicial da cascata de cicatrização.....	17
3.11	Miofibroblasto e seus precursores.....	19
3.12	Membrana basal do epitélio (MBE): o regulador crucial na resposta cicatricial da córnea.....	20
3.13	Membrana de Descemet, a membrana basal posterior da córnea e seu possível papel modulador sobre a cicatrização.....	21
4.	MÉTODOS.....	22
4.1	Tipo e objeto de estudo.....	23
4.2	Grupos de estudos e Procedimentos.....	24
4.3	Preparo das amostras e estudo imuno-histoquímico.....	29
4.4	Microscopia.....	34
4.5	Quantificação	35
4.6	Análise estatística.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1	Avaliação da coloração dos nervos da córnea na área central.....	38
5.2	Avaliação da Morfologia dos nervos da córnea através da IHC da Tubulina β -III em córneas submetidas ao PRK sem o uso de MMC.....	41
5.3	Avaliação dos efeitos precoce da cicatrização da córnea após injúria do endotélio com cânula romba.....	45

5.4	Avaliação dos efeitos da cicatrização da córnea um mês após injúria da córnea posterior.....	49
6.	DISCUSSÃO.....	53
6.1	Nervos da córnea e a cicatrização: dano e regeneração após fotoablação.....	54
6.2	Fibrose após injúria da córnea posterior.....	59
7.	CONCLUSÃO.....	65
8.	ANEXOS.....	68
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

α-SMA	Actina do músculo liso alfa
AchE	Acetilcolinesterase
ARVO	Associação para pesquisa em visão e oftalmologia, sigla derivada da língua inglesa (Association for Research in Vision and Ophthalmology)
CA	Califórnia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
Cat.	Número de Catálogo
Cels	células
D	Dioptrias
d	dia
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindole
DP	Desvio Padrão
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
hr(s)	hora(s)
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Ilinoís
IL-1	Interleucina-1
Kera	Keratocan
LASIK	Ceratômileusis in situ a laser, sigla derivada da língua inglesa (laser in situ keratomileusis)
LINE	Epiteliopatia neurotrófica induzida pós lasik, sigla derivada da língua inglesa (LASIK- induced neurotrophic epitheliopathy)
m	mês
MA	Massachusetts
Mag.	Magnificação
MBE	Membrana Basal do epitélio
MCIV	Microscopia Confocal in vivo
min(s)	minuto(s)
MMC	Mitomicina C
MN	Mineápolis
MO	Missouri

Na-K	Sódio-Potássio
NC	Carolina do Norte, sigla derivada da língua inglesa (North Carolina)
Nid-1	Nidogênio-1
NJ	Nova Jérsey, sigla derivada da língua inglesa (New Jersey)
NY	Nova Yorque, sigla derivada da língua inglesa (New York)
OCT	Temperatura de corte ideal, sigla derivada da língua inglesa (Optimal Cutting Temperature)
OR	Oregon
PA	Pensilvânia
PDGF	Fator derivado de plaquetas
PRK	Ceratectomia fotorrefrativa, sigla derivada da língua inglesa (photorefractive keratectomy)
PTK	Ceratectomia Fototerapêutica
SMILE	Extração de lentícula através de pequena incisão, sigla derivada da língua inglesa (Small Incision Lenticule Extraction)
St.	Saint Louis
TEM	Microscopia de transmissão eletrônica, sigla derivada da língua inglesa (Transmission electronic microscopy)
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TUNEL	Terminal deoxyribonucleotidyl transferase, sigla derivada da língua inglesa (mediated d-UTP-digoxigenin nick and labeling)
TX	Texas
Vim	Vimentina
Vs.	Versus
X	vezes

μm	micrômetro (10 ⁻⁶ m)
Kg	quilograma (10 ³ g)
kV	quilovolt (1.000 V)
M	concentração molar Mol
Mg	miligrama (10 ⁻³ g)
MI	milímetro (10 ⁻³ L)
Mm	milímetro (10 ⁻³ m)
mM	milimolar (10 ⁻³ mol/L)
mm²	milímetro quadrado
N	grupo amostral
Nm	nanômetro (10 ⁻⁹ m)
°C	oC graus Celsius
P	valor de p – probabilidade de significância
pH	poder de concentração de uma solução – ácida vs. Básica
V	Volt

Tabela 1	Número de animais compondo a amostra (n) nos diferentes grupos em cada um dos momentos de análise.....	25
Tabela 2	Média e desvio padrão dos valores referentes a área dos nervos ao longo dos tempos de estudo após diferentes injúrias.....	40
Tabela 3	Valores de p por grupo e por tempo de estudo após ANOVA.....	41

Figura 1	Coloração histoquímica através da Acetilcolinesterase (AchE) em córneas um dia após diferentes injúrias aos nervos.....	38
Figura 2	Coloração histoquímica através da Acetilcolinesterase em córneas analisadas em diferentes tempos após -9D PRK (Ceratectomia Fotorrefrativa) com e sem MMC (Mitomicina C).....	39
Figura 3	Coloração histoquímica através da Tubulina β -III evidenciando os nervos do plexo sub-basal ao longo dos diferentes tempos de estudo após o tratamento de -9.0 D através do PRK sem MMC.....	42
Figura 4	Coloração histoquímica através da Tubulina β -III evidenciando os nervos do estroma anterior, aproximadamente a 125 μ m ao longo dos diferentes tempos de estudo após o tratamento de -9.0 D através do PRK sem MMC.....	43
Figura 5	Coloração histoquímica através da Tubulina β -III evidenciando os nervos do estroma médio, aproximadamente a 250 μ m ao longo dos diferentes tempos de estudo após o tratamento de -9.0 D através do PRK sem MMC.....	44
Figura 6	Estudo imuno-histoquímico (IHQ) após 1 e 4 horas do dano isolado do endotélio da córnea através de cânula romba. Evidencia a expressão de Vimentina, Nidogênio-1 e TUNEL (deoxinucleotidil terminal transferase).....	46
Figura 7	Microscopia de transmissão eletrônica após injúria do endotélio isolada como cânula romba.....	48
Figura 8	Biomicroscopia por lâmpada de fenda 1 mês após injúria das camadas posteriores da córnea.....	49
Figura 9	Análise IHQ um mês após injúria das camadas posteriores da córnea e expressão α -SMA e Nidogênio-1.....	51
Figura 10	Análise IHQ um mês após injúria das camadas posteriores da córnea e expressão de α -SMA e keratocan.....	52

Medeiros CS. *Regeneração dos nervos da córnea anterior pós excimer laser e reparação tecidual pós injúria endotelial* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Objetivo: Determinar o processo cicatricial e regenerativo da córnea em suas diferentes camadas diante do dano cirúrgico, através da Ceratectomia Fotorrefrativa (PRK) nos terços anteriores ou injúria do complexo Descemet-endotélio no terço posterior.

Métodos: Córneas de coelhos foram utilizadas a fim de identificar os nervos presentes, evidenciados através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) da acetilcolinesterase (AChE) e expressos numericamente após quantificação automatizada pelo *software* Image-Pro. Os seguintes grupos foram incluídos nessa análise: remoção do epitélio com e sem Mitomicina (MMC) 0.02%, -9.0D PRK com e sem MMC. O dano e a regeneração dos nervos foram avaliados através da análise dos grupos após 1 dia, 1, 2, 3 e 6 meses. A morfologia e a distribuição dos nervos foram realizadas através do estudo da tubulina β -III, um marcador de microtúbulos presentes em neurônios. Na córnea posterior, a fim de identificar a ocorrência de apoptose após a injúria mecânica do endotélio através de uma cânula romba, cortes desse tecido foram avaliados por meio de técnicas de IHQ através do método de fragmentação do DNA por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL) e microscopia de transmissão eletrônica (TEM) após 1 e 4 horas. A ocorrência de fibrose subsequente à lesão da córnea posterior foi avaliada nos grupos submetidos à Descemetorréxis ou à injúria mecânica do endotélio isolado após 1 mês. O estudo imunohistoquímico para actina de músculo liso (α -SMA) permitiu identificar a presença de

miofibroblastos e a identificação morfológica da membrana de Descemet demonstrada através do Nidogênio-1 (Nid-1), tornando possível, portanto, a discriminação do papel das camadas posteriores no processo cicatricial da córnea. Olhos contralaterais foram incluídos como um grupo controle em todas as análises.

Resultados: Na face anterior da córnea, uma menor área do complexo nervoso foi observada um dia após o PRK associado ao uso da MMC ($p=0.0009$) quando comparado ao PRK sem o uso da medicação, que não se manteve após um mês ($p=0.9$). O PRK sem MMC demonstrou uma crescente capacidade regenerativa de seus nervos, que apresentaram valores comparáveis aos pré-operatórios após o terceiro mês. No entanto, tais fibras nervosas apresentaram uma morfologia aberrada mantida até a análise do mês seis. Na face posterior da córnea, apesar da presença de células TUNEL+ após 1 e 4 horas subsequentes ao dano mecânico do endotélio isolado, não houve a expressão de α -SMA no estroma posterior após um mês. A integridade estrutural da membrana de Descemet nesse grupo foi confirmada através do Nidogênio-1 (Nid-1), diferentemente do observado após o dano ao complexo Descemet-endotélio, em que houve ampla expressão de α -SMA identificando a presença de miofibroblastos e o consequente desenvolvimento de cicatrizes responsáveis pela perda de transparência na córnea.

Conclusão: O uso do excimer laser na superfície anterior causou prejuízo à inervação da córnea. Todavia, a capacidade regenerativa das fibras nervosas foi demonstrada ao longo dos meses, apesar da persistência de uma anômala arquitetura e redistribuição dos nervos mesmo após o sexto mês. A MMC revelou uma discreta e precoce propriedade neurotóxica quando combinada ao uso do

excimer laser, que não implica perda da segurança a médio/longo prazo do uso dessa droga na concentração e tempos utilizados nesse estudo. No terço posterior da córnea, a membrana de Descemet exibiu um importante papel modulador no processo de desenvolvimento de cicatrizes ou fibrose no estroma profundo. Uma vez lesada, torna constante o influxo de citocinas inflamatórias necessárias para a diferenciação e persistência do miofibroblasto. Tal processo mostrou-se análogo ao papel da membrana basal do epitélio como reguladora do processo de fibrose da córnea anterior.

Descritores: ceratectomia fotorrefrativa; regeneração nervosa; mitomicina C; epitélio posterior; lâmina limitante posterior; cicatrização; opacidade da córnea.

Abstract

Medeiros CS. *Regeneration of anterior corneal nerves post excimer laser and tissue repair after endothelial injury* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Purpose: To determine the wound-healing cascade and regeneration process of the cornea after surgical injury in its different layers, through Photorefractive Keratectomy (PRK) in the anterior thirds or Descemet-endothelium injury in the posterior third.

Methods: Rabbit corneas were used to identify the nerves present in the central area of this tissue by the immunohistochemistry (IHQ) technique of acetylcholinesterase (AChE) and their numerical quantification by Image-Pro software. The following groups were included in this analysis: Removal of epithelium with and without Mitomycin (MMC) 0.02 %, -9.0D PRK with and without MMC. Damage and nerve regeneration were assessed by analyzing the groups after 1 day, 1, 2, 3 and 6 months. The morphology and distribution of nerves along the corneal layers was performed through tubulin β -III study. At the posterior cornea, to distinguish the occurrence of apoptosis after the mechanical injury of the endothelium through a blunt cannula, sections of this tissue were evaluated by IHQ technique through DNA fragmentation by dUTP and deoxynucleotidyl terminal transferase (TUNEL) and electron transmission microscopy (TEM) after 1 and 4 hours. The occurrence of cornea fibrosis subsequent to posterior corneal injury was evaluated by the group undergoing Descemet membrane surgical removal or by the endothelium mechanical injury after 1 month. The immunohistochemical study for smooth muscle actin (α -SMA) allowed the identification of myofibroblasts and the structural integrity of

Descemet demonstrated by Nidogen-1 (Nid-1). Thus, making it possible to discriminate the role of the posterior layers during the corneal wound-healing process. Contralateral eyes were included as a control group in all analyzes.

Results: At the anterior surface of the cornea, a smaller area of the nervous complex was observed one day after PRK associated with the use of MMC ($p = 0.0009$) when compared to PRK without the association of the drug, which was not maintained after the first month ($p = 0.9$). The PRK without MMC demonstrated an increasing regenerative capacity of their nerves, which presented values comparable to preoperative measurements after the third month. However, morphological differences and an aberrant distribution of innervation were persistent. At the corneal posterior surface, despite the presence of TUNEL + cells after 1 and 4 hours subsequent to the mechanical damage of the isolated endothelium, there was no α -SMA expression in the posterior stroma after one month. The structural integrity of Descemet's membrane in this group was confirmed by Nidogen-1 (Nid-1). Differently from what was observed after damage to the Descemet membrane by its surgical removal, there was a large expression of α -SMA identifying the myofibroblasts and the consequent development of scars responsible for the loss of corneal transparency.

Conclusion: The excimer laser use on the anterior surface caused destruction to the corneal innervation. However, the regenerative capacity of nerve fibers was demonstrated over the months, despite the persistence of anomalous architecture and redistribution of the corneal nerves that persisted even after six months. MMC exhibited a moderate and early neurotoxic effect when combined with the excimer laser treatment at the concentration and time used in this study.

At the inferior third of the cornea, Descemet's membrane exhibited an important role during the modulation process of scarring or fibrosis in the deep stroma. Once damaged, a constant influx of inflammatory cytokines into the stroma was guaranteed and a differentiation and persistence of the myofibroblast occur. This process has been shown to be analogous to the role of the corneal epithelial basement membrane as a regulator of the anterior cornea fibrosis process.

Descriptors: photorefractive keratectomy; nerve regeneration; mitomycin; endothelium, corneal; descemet membrane; wound healing; corneal opacity.

1. Introdução

O processo de cicatrização da córnea compreende uma série de eventos que acontecem em cascata de forma a implicar a previsibilidade e a segurança das cirurgias corneanas, dentre elas a cirurgia refrativa e o transplante de córnea.¹

O desenvolvimento de opacidades de córnea secundárias ao trauma cirúrgico é uma temida complicação pelos cirurgiões. Nos últimos anos, a literatura vem acumulando um vasto conhecimento sobre o tema, principalmente após o advento da cirurgia refrativa na década de 1980, quando o uso do excimer laser foi difundido com finalidade de correção das ametropias corneanas.^{2,3}

Dentre as diversas técnicas de cirurgia refrativa, o PRK ou Ceratectomia Fotorrefrativa é um método consagrado devido a sua segurança e eficácia. Apesar da vasta popularização do Ceratomileusis *in situ* assistida a laser (LASIK), o PRK ainda detém grande espaço devido às inúmeras complicações decorrentes da confecção de um flap, como a superior ocorrência de sintomas de olho seco secundário ao LASIK e as alterações biomecânicas induzidas pelo flap.⁴

Com o avanço da tecnologia, a cirurgia refrativa vive um período de modernização e desenvolvimento de novas técnicas, como o SMILE, termo traduzido da língua inglesa “small incision lenticule extraction”. Essa cirurgia propõe a correção dos erros refracionais sem a confecção de um flap, evitando, portanto, eventuais complicações relacionadas a ele.⁵ Entretanto, já existem relatos na literatura que descrevem a ocorrência de complicações, tais como a ectasia após SMILE⁶ e a superior dificuldade de retratamentos após essa técnica⁷, fazendo com que o PRK mantenha-se como a técnica de escolha em diversas situações.

Todavia, a Ceratectomia Fotorrefrativa não é livre de complicações. A ocorrência de opacidades corneanas secundárias a essa técnica, conhecida como haze, consistia em uma das mais frequentes e temidas no passado. A partir de então, houve um grande esforço da comunidade científica a fim de melhor entender o processo de cicatrização da córnea subsequente ao PRK.⁸⁻¹²

O mecanismo que gera a perda de transparência da córnea após o PRK ocorre através da imperfeita regeneração da membrana basal do epitélio e o subsequente influxo de citocinas e fatores de crescimento que exercem um papel determinante sobre o caráter fibrótico (gerador de cicatrizes anômalas) da cicatrização da córnea.¹³

O uso da Mitomicina C associado às cirurgias de superfície com excimer laser decorreu-se da necessidade de modular a resposta cicatricial da córnea, a fim de diminuir a ocorrência de opacidades corneanas cicatriciais, que acarretavam a perda de transparência e consequente diminuição da acuidade visual. No entanto, as córneas em que a MMC foi usada como um adjuvante na prevenção ou tratamento da fibrose da córnea após PRK cursavam com uma extensa diminuição da população de ceratócitos no estroma anterior da córnea.¹⁴⁻¹⁶

Diante do já conhecido efeito deletério da MMC sobre os ceratócitos, viu-se a necessidade de lançar-se mão de protocolos para que a aplicação da mesma fosse realizada em determinada concentração e tempo de ação de acordo com as exigências individuais do paciente.¹⁵ Contudo, a segurança do uso dessa droga sobre os nervos corneanos foi pouco estudada.

Uma sólida rede de publicações permite-nos compreender o processo cicatricial em níveis celulares e moleculares a respeito de uma possível resposta

regenerativa *versus* uma resposta fibrótica perante uma lesão na superfície anterior da córnea.^{1,17,18} Porém, um maior esclarecimento a respeito do real impacto sobre a inervação da córnea submetida a uma lesão na superfície anterior é desejado, mais especificamente após técnicas de cirurgia refrativa, como o PRK, uma vez que se trata de uma cirurgia eletiva, em que o resultado visual e a precisão são imperativos.

Não menos importante, a compreensão sobre a reestruturação das fibras nervosas subsequente ao PRK necessita ser amplamente estudada, a fim de que se obtenha um melhor entendimento a respeito da eventual persistência de sintomas clínicos após o PRK, tais como ressecamento, dor, fotofobia, defeitos epiteliais persistentes, hipoestesia, turvação e flutuação da visão.¹⁹⁻²⁴

A membrana basal do epitélio possui um papel regulador sobre os eventos que culminarão com o desenvolvimento de cicatrizes na córnea, as quais resultam em baixa de visão dos pacientes devido à perda de transparência.^{1,17} Estudos mostraram que, após um processo infeccioso extenso na superfície anterior da córnea, o qual acarretou o desenvolvimento de fibrose, foi observado o dano ao complexo Descemet-endotélio conduzindo ao processo de fibrose no terço inferior da córnea.²⁵

Contudo, o entendimento sobre o processo de ocorrência de cicatrizes na parte posterior da córnea não é amplamente compreendido. Assim sendo, o presente estudo foi desenhado a fim de delimitar o papel de cada uma dessas estruturas após sua injúria de maneira isolada e o posterior processo cicatricial da córnea, sendo este reparador ou fibrótico.

2. Objetivos

Diante de uma vasta linha de pesquisa sobre o comportamento cicatricial da córnea subsequente a lesões na superfície deste tecido, pretende-se, com o presente estudo, preencher importantes lacunas no conhecimento para um melhor entendimento do processo cicatricial que ocorre nos terços anteriores deste órgão e que ainda persiste indevidamente compreendido, como a inervação da córnea. Assim como no outro extremo deste tecido, os eventos e mecanismos regulatórios do processo de cicatrização da córnea subsequente a lesões das camadas inferiores ainda são pouco esclarecidos.

Perante o contexto apresentado, este estudo possui como objetivos:

2.1 Objetivos primários:

- 1) Investigar o dano e eventual regeneração dos nervos da córnea pós-excimer laser aplicado à córnea através da Ceratectomia Fotorrefrativa.
- 2) Elucidar o papel do endotélio e membrana de Descemet na formação de cicatrizes ou fibrose da córnea posterior.

2.2 Objetivos secundários:

- 1) Avaliar o possível efeito tóxico do uso da Mitomicina C sobre os nervos da córnea.
- 2) Avaliar como ocorre o processo de regeneração dos nervos da córnea.
- 3) Avaliar se a injúria ao endotélio da córnea age como um gatilho à resposta cicatricial secundária ao trauma nessa camada, de maneira semelhante ao já conhecido processo que ocorre na superfície anterior da córnea.

3. Revisão da Literatura

3.1 Origem e função dos nervos corneanos

A córnea é uma das estruturas do corpo humano mais ricamente inervada, e tal suprimento é feito por meio de fibras sensórias e autonômicas.²⁶ Os nervos sensitivos, derivados do ramo oftálmico do nervo trigêmeo (V par craniano), correspondem à maior parte da inervação da córnea.²⁷ Os autonômicos, por sua vez, são divididos em fibras simpáticas, derivadas do gânglio cervical superior e parassimpáticas. Apesar de contribuírem com cerca de 10-15% da inervação da córnea em algumas espécies como gatos e ratos, a presença de nervos simpáticos em humanos é extremamente escassa. As fibras parassimpáticas, por sua vez, são originadas do gânglio ciliar e possuem sua existência controversa em córneas humanas.²⁶

Os nervos da córnea possuem uma variedade de funções sensitivas e eferentes. Estímulos mecânicos, térmicos ou químicos aos nervos são interpretados e traduzidos em sensações de dor, toque e temperatura.²⁴ Assim sendo, exercem papel essencial na defesa e funcionalidade dessa estrutura. Funções tróficas e moduladoras da córnea são peças-chave na resposta cicatricial desse tecido, uma vez que a integridade e a proliferação do epitélio estão relacionadas com tal efeito trófico dos nervos da córnea,²⁸ assim como o papel modulador sobre a produção de lágrimas e o reflexo do piscar desempenhado por tais fibras contribui para o funcionamento da superfície da córnea em homeostase.

3.2 Anatomia, Distribuição e Ultraestrutura

Importantes contribuições foram feitas ao longo dos anos de forma a obter uma descrição coerente sobre a distribuição da inervação da córnea.²⁹⁻³³

Os feixes nervosos penetram a córnea paralelamente à superfície em sua região periférica, mais especificamente no terço médio do estroma, ramificando-se em seguida de forma sucessiva e encerrando seu trajeto como terminações nervosas livres.²⁷ A cerca de 1 mm do limbo, os feixes nervosos perdem a mielina e o perineuro, fato que contribui para a transparência desse tecido. A relação entre os nervos da córnea e os demais componentes estruturais desse tecido já foi descrita. As fibras nervosas possuem proximidade anatômica dos ceratócitos, podendo ocasionalmente circundar esses nervos,²⁶ assim como os axônios são embebidos em matriz extracelular amorfa.

Os troncos nervosos de maior calibre estão localizados no terço médio e dividem-se em feixes menores à medida que vão percorrendo o estroma. Eventualmente, giram 90° de forma a ultrapassar toda a extensão do estroma anterior da córnea, onde se concentra a maior parte dos nervos do estroma, até alcançarem a camada de Bowman. Nesse momento, os nervos dividem-se em ramos menores e novamente giram 90° de forma a posicionarem-se em paralelo à superfície, formando o complexo plexo nervoso sub-basal, situado entre a camada de Bowman e membrana basal do epitélio.^{26,30} A partir do plexo sub-basal, os nervos ramificam-se ao longo do epitélio até atingirem a superfície ou terminam seu trajeto como uma terminação nervosa livre.³⁴

3.3 Importância vs. Lesão dos nervos vs. Repercussão clínica

A integridade e a função ótima dos nervos da córnea desempenham um papel crucial na proteção, equilíbrio e saúde da superfície ocular.¹⁹ Alterações estruturais dos nervos da córnea podem decorrer após infecções, doenças e traumas mecânicos ou pós-cirúrgicos da córnea, modificando, assim, radicalmente, o padrão morfológico e funcional dos nervos.

Com o advento da Cirurgia Refrativa, cirurgiões observaram o aumento da incidência de problemas de caráter transitório ou permanente relacionados à cirurgia, tais como: fotofobia, diminuição da sensibilidade corneana, dor severa, síndrome do olho seco, ceratite neurotrófica e defeito epitelial persistente.^{4,20,22-}

24,35

3.4 Impacto e dano aos nervos após cirurgia refrativa. Ênfase à injúria provocada aos nervos durante o PRK

Durante o PRK, uma complexa rede de trelas nervosas entre o epitélio e o plexo sub-basal é danificada no momento da remoção da camada epitelial, que consiste no primeiro passo dessa cirurgia. Posteriormente, durante o momento da fotoablação, o excimer laser é aplicado sobre a superfície estromal, lesando assim os nervos residentes nessa camada. O grau de dano sofrido pelos nervos estromais é diretamente proporcional à correção almejada pelo cirurgião; a correção de maiores erros refracionais acarretará ablações mais profundas.³⁶

A implementação do uso da MMC na cirurgia refrativa mudou o cenário da Ceratectomia Fotorrefrativa. A ação modulatória que essa droga exerce no processo cicatricial da córnea foi vital para que o PRK se tornasse uma cirurgia segura e eficaz. A modulação provocada por essa droga ocorre pela capacidade inibitória sobre a proliferação celular, geração e formação do miofibroblasto após o PRK, culminando com a drástica diminuição da incidência do haze.¹⁴ No entanto, a grande diminuição da população de ceratócitos no estroma anterior e a potencial toxicidade ao endotélio foram efeitos colaterais preocupantes após as ablações de superfície.¹⁵ Todavia, pouco é discutido e conhecido sobre os riscos da aplicação local da MMC durante o PRK e seu efeito sobre os nervos da córnea.

3.5 Neurotoxicidade da MMC nos olhos e demais tecidos

O caráter tóxico da MMC sobre os nervos periféricos já foi descrito em alguns órgãos. A aplicação tópica dessa medicação durante procedimentos no aparelho auditivo demonstrou uma perda auditiva neurosensorial, daí o caráter neurotóxico dessa droga sobre o nervo vestibulo coclear.³⁷ No tratamento do câncer de mama avançado, a MMC também provocou toxicidade aos nervos periféricos.³⁸ A diminuição na espessura das bainhas de mielina foi observada após o uso local da medicação em uma concentração equivalente a 0,7 mg/ml, a fim de prevenir a formação de cicatrizes epidurais pós-laminectomia, indicando um efeito adverso dessa medicação sobre os nervos periféricos.³⁹

Estudos revelaram o potencial neurotóxico da MMC sobre tecidos oculares.^{40,41} A aplicação conjuntival da MMC durante cirurgia filtrante revelou-se tóxica ao corpo ciliar. Quando usada em baixa concentração (0,05mg/ml), provocou efeito tóxico sobre os nervos desmielinizados. Por sua vez, quando usada em alta concentração (0,1mg/ml), obteve caráter destrutivo mesmo sobre nervos mielinizados, ou seja, mais resistentes.⁴⁰ Posteriormente, o mesmo autor revelou o caráter tóxico da medicação sobre o nervo óptico após procedimento para descompressão do nervo.⁴¹ O caráter dose-dependente da Mitomicina C e sua possível neurotoxicidade são pontos cruciais para que haja dano sobre nervos oculares e em outros tecidos.^{39,40}

3.6 Regeneração dos nervos da córnea após o PRK

Após o processo de lesão e degeneração dos nervos subsequente ao PRK, dá-se início à recuperação e reorganização das fibras nervosas corneanas. A literatura possui uma grande divergência com relação ao tempo necessário para haver a regeneração de tais nervos. Segundo alguns autores, o processo de recuperação do plexo sub-basal pode iniciar-se de maneira precoce, alguns dias após o PRK.^{42,43} Porém, transcorre-se de maneira lenta e complexa, fato que certamente contribui para a ocorrência de sintomas, tais como olho seco ou ceratite neurotrófica durante essa fase de incompleta reestruturação dos nervos, que pode estender-se em até cinco anos após o PRK.^{26,44} Entretanto, encontra-se descrito na literatura que a regeneração dos nervos após o PRK pode ocorrer entre 5 a 8 meses,^{42, 45-48} 1 ano,⁴⁹ 2 anos,^{50,51} 3 anos,⁵² ou 5 anos.⁴⁴

3.7 Métodos de estudo da inervação da córnea

O estudo dos nervos da córnea não é possível através de um simples exame de rotina sob a lâmpada de fenda. Devido a esse fato, surgiram diferentes técnicas para avaliação deles. Muito do nosso atual entendimento sobre morfologia e arquitetura dos nervos ocorreu por meio de métodos de coloração dessas estruturas com cloreto de ouro, acetilcolinesterase (AChE) ou outras técnicas de imuno-histoquímica (IHQ), através de cortes transversais associados ao microscópio óptico^{29,53,54} ou com o uso da microscopia eletrônica, que possibilitou o estudo de detalhes estruturais.³⁰

Um fator limitante no estudo dos nervos da córnea evidencia-se pelo fato de tais estruturas iniciarem sua degradação logo após a morte. Logo, seriam necessárias para o estudo córneas frescas, designadas a pacientes que necessitam do transplante de córnea. Assim sendo, a microscopia confocal *in vivo* (MCIV) difundiu-se e possibilitou a realização de grande parte das publicações hoje conhecidas no assunto. Essa técnica trouxe vasto conhecimento sobre a inervação da córnea, porém algumas desvantagens necessitam ser destacadas. Uma delas é a diminuição do contraste devido à luz de retro espalhamento originado a partir dos ceratócitos ativados e da alteração da matriz extracelular, que constituem o haze após o PRK. Tal fato poderia tornar a análise dos nervos mais dificultosa, especialmente quanto ao estudo de ramos pequenos e extremamente finos.^{30,54}

3.8 Lesão da córnea vs. Opacidade corneana

Além da função de proteção ocular, a córnea é responsável pela maior parte do poder refrativo dos olhos através da sua capacidade de transmitir o estímulo luminoso até a retina, onde a imagem será então formada.⁵⁵ Para que exerça tal função, a transparência da córnea é essencial. As opacidades corneanas correspondem à quarta causa de cegueira no mundo e são responsáveis por 10% das perdas visuais evitáveis em países subdesenvolvidos.^{56,57}

O processo de cicatrização da córnea envolve uma complexa cascata de eventos biológicos que visa reparar qualquer injúria sofrida por esse tecido, de modo a restabelecer suas funções fisiológicas e sua transparência. No entanto, a natureza e a gravidade dessas lesões podem levar à formação de cicatrizes, implicando eventual perda de transparência e baixa visual. Por conseguinte, a previsibilidade e a segurança de procedimentos de alta precisão, como o PRK ou transplantes lamelares, podem ficar comprometidas, uma vez que a transparência da córnea é um elemento chave para o sucesso de tais cirurgias.^{1,17,25} Diante desse cenário, o entendimento sobre essa complexa cascata de cicatrização torna-se necessário, uma vez que, mesmo diante de recursos cirúrgicos disponíveis para o tratamento da correção das opacidades anteriores da córnea, através da Ceratectomia Fototerapêutica (PTK) e do uso da MMC,⁵⁸ diante de um processo de fibrose do estroma profundo já estabelecido, a transparência do tecido só seria recuperada mediante um novo transplante.

3.9 Causas de opacidade corneana, fatores determinantes para sua ocorrência e a formação de cicatrizes anômalas

Alguns fatores são decisivos para a transparência da córnea e a manutenção dessa característica: a desmielinização dos nervos, a ausência de vasos sanguíneos e pigmentos, o perfeito funcionamento da bomba endotelial que regula a deturgescência da córnea, a estrutura e disposição das fibras de colágeno ou a ausência de dispersão luminosa pelas células da córnea.

As cicatrizes do estroma corneano são conhecidas como fibrose ou haze tardio, e geralmente ocorrem após trauma, infecções ou cirurgias na córnea envolvendo o epitélio e estroma subjacente⁵⁹⁻⁶³ ou estroma posterior e endotélio.²⁵ Alguns fatores comumente associados a tais opacidades corneanas incluem infecções do epitélio, estroma e/ou endotélio, queimaduras químicas ou térmicas, defeito epitelial persistente e trauma cirúrgico, como pode ocorrer na Ceratectomia Fotorrefrativa ou na interface doador-receptor após transplante penetrante.^{20,62-65} Demais fatores, tais como restrições dietéticas, variações genéticas e exposição ultravioleta devem ser considerados.⁶⁴

A completa regeneração da membrana basal do epitélio estrategicamente posicionada entre epitélio e estroma atua como uma estrutura reguladora sobre a função do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e derivado de plaquetas (PDGF), a interleucina-1 (IL-1) dentre outras citocinas e mediadores químicos. Tais fatores de crescimento e citocinas exercem um papel essencial ao definirem o papel regenerativo ou o processo fibrótico da cicatrização da córnea.^{1,17,59,63}

3.10 Apoptose do ceratócito como marco inicial da cascata de cicatrização

Os ceratócitos são as principais células que habitam o estroma da córnea. São estruturas quiescentes e transparentes que, após lesões corneanas, podem ser ativadas e até transformadas em miofibroblastos., influenciando, assim, na transparência desse tecido.⁶⁶

A apoptose dos ceratócitos residentes no estroma anterior da córnea é o primeiro evento a ocorrer após um dano ao epitélio, quase de maneira imediata a injúrias dessa camada.⁶⁷ Apoptose é uma forma de morte programada e involucional que produz mínimo dano ou inflamação aos tecidos adjacentes.⁶⁸ A integridade das membranas das células apoptóticas mantém-se de forma que ocorram as alterações nucleares, a condensação da cromatina, a redução do tamanho celular, a desintegração de organelas, tais como o retículo endoplasmático, e a formação de vesículas chamadas corpúsculos apoptóticos que podem ser fagocitados por macrófagos, de forma que a resposta inflamatória e a lesão de tecidos adjacentes sejam mínimas.⁶⁶ A técnica de escolha para a diferenciação da apoptose de necrose é a microscopia de transmissão eletrônica, sendo então escolhida para utilização no presente estudo.

Uma das etapas mais importantes da apoptose é a degradação do DNA, e uma das maneiras de identificá-la é por meio da técnica de TUNEL, termo derivado da língua inglesa que significa (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP-digoxigenin nick and labeling), que detecta as terminações OH do DNA expostas que ocorrem ao longo do processo.⁸ Existem uma ativação e desativação para que as células entrem em apoptose, que pode

decorrer por privação de fatores de crescimento ou pela estimulação de fatores pró-apoptóticos.

Citocinas pró-apoptóticas, incluindo IL-1, são produzidas por células epiteliais ou glândulas lacrimais. Subsequentemente, ligam-se a receptores ativados nos ceratócitos, se a integridade do epitélio e a membrana basal estiverem comprometidas.⁶⁷ A extensão e a localização do dano aos ceratócitos correlacionam-se com o tipo de lesão sofrida pelo epitélio, influenciando todos os eventos subsequentes a esse processo de cicatrização. Os ceratócitos vizinhos às áreas de apoptose são ativados, proliferam-se e iniciam o repovoamento do estroma anterior. A partir de então, dá-se origem aos fibroblastos, que, por fim, sofrem diferenciação ou não em miofibroblastos maduros.¹³

Vale ressaltar que tais ceratócitos ativados que originam os fibroblastos também sofrem gatilho a partir de lesões corneanas secundárias a doenças, infecções e cirurgias. O defeito persistente ou não da membrana basal do epitélio pode ser o estímulo para o desenvolvimento dessas células,²⁰ que são relativamente opacas devido a uma diminuição na expressão de proteínas cristalinas e pequena produção de matriz extracelular desordenada. Porém, tal opacidade possui caráter transitório. Assim sendo, o haze transitório, após o PRK, opacidades secundárias ao cross-linking da córnea ou abrasões corneanas de rápida resolução são atribuídos à formação do fibroblasto sem a posterior diferenciação em miofibroblastos.⁶⁹

3.11 Miofibroblasto e seus precursores

A opacidade da córnea decorrente do haze tardio ou fibrose decorre da presença de células contráteis denominadas miofibroblastos. Tais células possuem sua transparência diminuída devido à escassez na produção das proteínas cristalinas somada a uma ampla produção de matriz extracelular desordenada que altera toda a distribuição e o espaçamento das fibras de colágeno,¹⁰ impactando de maneira ampla a estruturação e o arranjo das fibras, gerando, conseqüentemente, a fibrose do estroma.¹

Os miofibroblastos podem ser derivados dos ceratócitos ou de células da medula óssea que penetram na córnea através da região do limbo.⁷⁰ TGF- β e IL-1 possuem papéis antagônicos na geração e persistência dos miofibroblastos. O TGF- β é responsável pelo desenvolvimento e persistência dos miofibroblastos, uma vez que bloqueia a IL-1 quando presente em quantidades suficientes.^{71,72} Por sua vez, a IL-1 estimula a apoptose do miofibroblasto.⁶⁷

O TGF- β é produzido no epitélio, assim como no estroma e no humor aquoso.⁷³

3.12 Membrana basal do epitélio (MBE): o regulador crucial na resposta cicatricial da córnea

Estruturada a partir de quatro componentes principais, Lamininas, Colágenos, Proteoglicanos (tais como Perlecan) e Nidogênios,⁷⁴⁻⁷⁶ a MBE é uma matriz extracelular altamente especializada que possui aproximadamente 50 a

100 nm. A análise ultraestrutural a partir de estudos de microscopia de transmissão eletrônica nos permitiu entender sua formação e funcionamento através de seu papel mediador. Acreditava-se que o epitélio era o responsável pela produção de tais componentes estruturais da MBE. Porém, estudos recentes demonstram que células estromais, tais como ceratócitos, participam na produção de tais componentes, como a Perlecan e Nidogênio-2.⁷⁶⁻⁷⁸

A visualização de defeitos em sua estrutura, a conseguinte correlação com a formação dos miofibroblastos e a desorganização da matriz extracelular determinaram o caráter regulatório da integridade dessa estrutura sobre a formação do haze ou fibrose.¹³ Perante uma lesão da córnea extensa e profunda, como no caso do PRK, com finalidade de corrigir grandes erros refrativos, mais ceratócitos sofrerão apoptose e uma menor produção de componentes estruturais da MBE culminará com a persistência do defeito dessa membrana, gerando, conseqüentemente, a manutenção da opacidade corneana em decorrência da formação de miofibroblastos.^{1,13,63,79}

3.13 Membrana de Descemet, a membrana basal posterior da córnea e seu possível papel modulador sobre a cicatrização

Recentemente, um estudo avaliou o processo de fibrose relacionado à geração do miofibroblasto na córnea secundário a um processo infeccioso.²⁵ A contaminação da superfície anterior da córnea através de *Pseudomonas Aeruginosa* gerou uma extensa e profunda lesão, provocando uma intensa fibrose na parte posterior da córnea. Por sua vez, tal opacificação mais profunda persistiu mesmo após a regeneração MBE e resolução da fibrose anterior,

sugerindo, assim, que, através de um possível dano ao complexo Descemet-endotélio, houve o influxo do TGF- β presente no humor aquoso para o estroma corneano e consequente desenvolvimento do miofibroblasto, resultando em um processo de fibrose no estroma posterior.²⁵

Diante desse cenário, surge a hipótese a respeito do possível papel regulador da membrana de Descemet com relação aos efeitos do TGF- β sobre os ceratócitos do estroma posterior, de maneira semelhante ao já descrito papel da membrana basal do epitélio como moduladora dos eventos da cicatrização.^{1,79}

A partir do modelo de fibrose associada à incompleta regeneração da MBE e do desenvolvimento dos miofibroblastos secundários a lesões epiteliais ou parenquimatosas, acredita-se ser um paradigma para o desenvolvimento do processo fibrótico em demais órgãos onde acontece um dano crônico ou defeitos de MBE subjacentes à patofisiologia da doença.^{17,59}

4. Métodos

O estudo em questão foi desenhado pelo Setor de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em parceria com o Cole Eye Institute – Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, EUA e executado no período de 2016 e 2018 nas dependências do Cole Eye Institute.

O estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) de Nível Superior através de bolsa de doutorado direto e doutorado sanduíche no exterior.

4.1 Tipo e objeto de estudo

O presente estudo possui caráter experimental e prospectivo. Foram utilizados 52 coelhos da espécie New Zealand White, do gênero feminino, de 12 - 15 semanas de vida e peso entre 2,5 - 3,0 kg. Todos os animais foram provenientes de Charles River Laboratory (OH, EUA). O estudo obteve aprovação prévia do Institutional Review Board (IRB) e Animal Control Committee, da Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, OH, EUA), assim como da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP em 07/12/2016. Todos os animais foram tratados de acordo com os protocolos da ARVO que delimita o uso de animais em pesquisas oftalmológicas e da visão.

A utilização da espécie em questão deveu-se ao fato de que coelhos possuem uma resposta cicatricial semelhante aos seres humanos, e de existir uma vasta literatura que corrobora tais similaridades, especialmente no processo de formação da fibrose⁵⁹ e quanto aos nervos da córnea⁵³. Muitos dos estudos

que contribuíram para nosso atual entendimento da anatomia e distribuição dos nervos foram desenvolvidos em tal espécie.^{28,34}

4.2 Grupos de estudos e procedimentos

Os 52 coelhos incluídos no estudo em questão foram alocados em seis grupos (Tabela 1): Remoção manual do epitélio com o uso da MMC, Remoção manual do epitélio sem o uso da MMC, -9.0 Dioptrias (-9.0D) PRK com o uso da MMC, -9.0D PRK sem o uso da MMC, Injúria do endotélio da córnea através do uso de cânula sem corte (romba), Descemetorréxis sem transplante endotelial. Os quatro primeiros grupos foram designados ao estudo dos dois terços anteriores da córnea com enfoque na inervação, e os dois últimos para o estudo no terço posterior da córnea, visando ao entendimento do processo de formação da fibrose corneana após injúria das camadas inferiores da córnea.

O olho contralateral do animal foi usado como controle. Os animais foram sacrificados e, após a remoção de suas córneas, as amostras foram analisadas em momentos diferentes, de acordo com as estruturas a serem estudadas. Em cada um dos grupos foram empregadas diferentes técnicas de coloração, imuno-histoquímica ou microscopia.

Anestesia geral foi realizada através de injeção intramuscular de Cloridrato de Quetamina (30 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (5 mg/kg). Anestesia tópica foi administrada, com Cloridrato de Proparacaína 0,5% (Akron Inc, Lake Forest, IL, EUA) 1 gota antes do início do procedimento em ambos os olhos. Analgesia no período pós-operatório consistia em administração oral de

Acetaminofeno diluído em água (200mg/100ml) por 10 d e injeção subcutânea de Buprenorfina (0,05 mg/kg), 2x ao dia durante os primeiros 5 d ou até que não houvesse sinais de dor.

Profilaxia antibiótica foi realizada por meio de administração tópica de Cloridrato de Ciprofloxacino 0,3% (Ciloxan, Alcon, Fort Worth, TX, EUA) 4x ao dia, durante 4 - 6 d ou até que o epitélio estivesse completamente cicatrizado.

A eutanásia dos animais foi realizada conforme o tempo de estudo de cada um dos grupos em questão (Tabela 1), através de injeção intravenosa de solução de eutanásia 100mg/kg (MERCK, Kenilworth, NJ, EUA) após o animal estar sob anestesia geral.

Tabela 1- Número de animais compondo a amostra (n) nos diferentes grupos em cada um dos momentos de análise

GRUPO	AMOSTRA (n)	MOMENTO DA ANÁLISE
Remoção do epitélio sem MMC (RE-MMC)	3	1d
Remoção do epitélio com MMC (RE+MMC)	3	1d
PRK sem MMC PRK-MMC)	3+3+3+3+4	1d, 1m, 2m, 3m, 6m
PRK com MMC (PRK+MMC)	3+3	1d, 1m
Injúria do endotélio isolada (IE)	6+6+6	1h, 4hrs, 1m
Injúria Descemet-endotélio (ID+E)	6	1m
Controle	52	1h, 4hrs, 1d, 1m, 2m, 3m, 6m

- Grupo Remoção do epitélio com e sem aplicação de MMC (RE+MMC) e (RE-MMC):

Após anestesia geral, um blefarostato foi posicionado no olho em estudo e realizada a remoção da camada epitelial da córnea manualmente nos 8mm de diâmetro centrais marcados no epitélio com violeta genciana, através do uso de lâmina Beaver #64 (Beaver, Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ, EUA). Três animais foram sacrificados após 1d do procedimento. Outros três foram submetidos à remoção do epitélio como descrito, seguido do tratamento com a MMC 0,02% (Intas Pharmaceutical LTD, Accord Health Care, Durham, NC, EUA). A medicação foi aplicada em uma esponja cilíndrica de 8 mm de diâmetro e 1 mm de espessura durante 30 segundos, seguida da remoção da droga através da irrigação de 3 ml de solução salina balanceada (BSS) (Alcon, Fort Worth, TX, EUA). Após retirada a esponja, os animais foram sacrificados 1d após o procedimento.

- Grupo -9.0D PRK com e sem aplicação de MMC (PRK+MMC) e (PRK-MMC):

Após anestesia geral, houve o posicionamento do blefarostato seguido da remoção manual do epitélio nos 8 mm centrais como anteriormente descrito. O excimer laser para ablação esférica de -9.0 D foi aplicado na região central do estroma, utilizando uma zona óptica de 6 mm de diâmetro e centrada sob a pupila usando o excimer laser VISX Star S4 IR (Abbot Medical Optics, Irvine, CA, EUA). O grupo onde o PRK foi estudado sem o uso da MMC foi avaliado após 1d, 1m, 2m, 3m e 6m. Cada período do presente grupo era composto por três

animais, exceto o período de seis meses, que era composto por quatro (Tabela 1).

Outros seis animais foram submetidos à aplicação da MMC após o PRK, sendo três deles avaliados após 1d e três após 1m. A MMC foi aplicada conforme descrito anteriormente após o excimer laser.

- Grupo descemetorhexis sem transplante endotelial (ID+E):

Após anestesia tópica, um blefarostato foi posicionado no olho e um círculo de 8 mm de diâmetro foi marcado na superfície do epitélio com violeta genciana. Uma incisão corneana periférica foi confeccionada com bisturi cirúrgico estéril 15 graus (Bausch & Lomb, Rochester, NY, EUA) e 0.3 ml de solução viscoelástica Healon OVD (Abbott Medical Optics Inc. Santa Ana, CA, EUA) injetado na câmara anterior. Um sinskey hook invertido (Katena, Denville, NJ, EUA) foi posicionado na câmara anterior e a descemetorréxis de 8 mm foi confeccionada sobre a área previamente delimitada. O volume de solução viscoelástica remanescente foi removido com cânula dupla via de irrigação e aspiração (Bausch & Lomb, Storz, Rochester, NY, EUA) e não foi realizado o transplante endotelial por finalidades do estudo. Uma sutura de córnea foi posicionada no local da incisão para que pudesse prevenir o extravasamento de líquido da câmara anterior.

O olho contralateral foi incluído como um olho controle que não foi submetido à injúria. Para fins comparativos, foi confeccionada uma incisão, inserido o sinskey hook invertido sem causar injúria e, por fim, confeccionada uma sutura corneana no local da incisão. Seis animais foram sacrificados após

1m e suas córneas retiradas e fixadas em bloco contendo OCT como descrito anteriormente.

- Grupo Injúria mecânica ao endotélio (IE):

Após anestesia tópica, um blefarostato foi posicionado, a área central de 8 mm de diâmetro delimitada com violeta genciana, incisão confeccionada e viscoelástico injetado na câmara anterior conforme descrito anteriormente. Uma cânula romba do tipo olive-tip (Beaver-Visitec, Becton-Dickinson, Franklin Lake, NJ, EUA) foi inserida na câmara anterior de forma que gentilmente tocasse o endotélio da córnea em movimentos contínuos ao longo da área de 8 mm centrais previamente demarcados, de forma a danificar de maneira branda o endotélio sem lesar a membrana de Descemet. A cânula de dupla via de irrigação e aspiração removeu a solução viscoelástica remanescente e uma sutura corneana foi confeccionada conforme previamente descrito.

Uma incisão periférica foi confeccionada no olho contralateral selecionado como controle, a solução viscoelástica foi injetada, a cânula romba inserida na câmara anterior de maneira que não houvesse toque no endotélio, o visco elástico foi aspirado da câmara anterior e trocado por BSS e a sutura corneana confeccionada no local da incisão, de forma a obter um olho sem injúria ao endotélio e que pudesse ser usado como controle. Os animais foram sacrificados após 1h, 4hrs e 1m, e suas córneas retiradas e fixadas em bloco contendo OCT (Optimal Cutting Temperature – temperatura de corte ideal) como descrito anteriormente. Cada período era composto por seis animais.

4.3 Preparo das amostras e estudo imuno-histoquímico

O botão córneo-escleral do olho em estudo e controle foi removido com tesoura Westcott, e as amostras que foram submetidas à injúria das camadas posteriores da córnea foram fixadas em bloco contendo líquido de conservação OCT e rapidamente congeladas com gelo seco e conservadas a -80°C, até que fossem feitos os cortes histológicos para estudo histoquímico. Por sua vez, os olhos que foram submetidos ao PRK ou a remoção manual do epitélio foram fixados e submetidos a método de coloração que será descrito a seguir.

- Método de avaliação dos nervos da córnea:

Os nervos da córnea foram destacados através de um método de coloração usando a acetilcolinesterase (AChE) através da técnica de Karnovsky-Roots da acetilcolinesterase.^{54,69} Após removido o botão córneo-escleral, a córnea foi brevemente enxaguada em D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Cat. D8662, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o tecido fixado em paraformaldeído 4% em 50mM Na-K tampão de fosfato (pH 7.2), solução de sacarose 8% por 30m. O complexo Descemet-endotélio foi removido antes da fixação, devido ao fato de que essa membrana possui uma coloração não específica pela AChE.⁵⁴

Posteriormente, a córnea permaneceu sob enxague durante a noite em solução tampão de fosfato de sódio 0.1 M a 4°C (pH 7.2). Um experimento preliminar, a fim de determinar se haveria um possível efeito da remoção do complexo Descemet-endotélio antes do processo de fixação sobre os nervos da

córnea, não encontrou diferença em área de nervos por mm² entre córneas controles em que o complexo Descemet-endotélio foi removido antes (18.4 ± 0.9) ou após a fixação (18.6 ± 0.5), N=3 em cada grupo ($p=0.4$).

No dia subsequente, as córneas foram pré-incubadas durante 7 hrs a 4°C em 10 ml de solução tampão de fosfato de sódio 0.1M (pH 5.5) contendo acetato de sódio 65mM, citrato de sódio 10mM, sulfato de cobre 4mM e ferricianeto de potássio 0.5mM. Subsequentemente, a solução anterior reage com iodeto de acetilcolina (1.0 mg/ml; Sigma-Aldrich) incubado durante 20-22 horas a 4°C. A enzima acetilcolinesterase, presente nos nervos da córnea, reage com o iodeto de acetilcolina e produz uma coloração de tonalidade terrosa aos nervos.⁵⁴

Após a incubação, as córneas foram enxaguadas durante 15 minutos em solução de sulfato de sódio 0.1mg/ml. Seguidamente ao enxague, o botão córneo-escleral foi colocado em solução de sulfeto de amônio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) preparada com 2 gotas de sulfeto de amônio em 10 ml de água destilada durante 30 min e então enxaguado por 2x durante 5 min. Quatro incisões radiais foram feitas a fim de aplanar a córnea, e as amostras foram então montadas com o epitélio para cima com solução de 1X PBS sobre lâminas de vidro para uso no microscópio (Superfrost plus, Cat. 255015, Thermo Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA) e uma fina lamínula posicionada sob a amostra.

A morfologia dos nervos foi estudada através de uma análise tridimensional combinada a um método de imuno-histoquímica usando a tubulina beta-III (β -III) já descrita na literatura.³¹ As córneas foram fixadas como já descrito anteriormente e sua região central cortada usando um trépano de 9 mm (Beaver-Visitec, Waltham, MA, EUA). O botão corneano foi lavado com PBS

0.1M contendo albumina de soro bovino 0.1% (PBS-BSA, Cat. 9048-46-8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 3x durante um intervalo de 24 hrs. As amostras foram incubadas e constantemente agitadas em solução com anticorpo monoclonal específico para a classe neuronal tubulina β -III (Tuj1, Cat. MMS-435P, Covance Antibody Services Inc, Berkeley, CA, EUA) em PBS 0.1M contendo soro de cabra normal 1.5% com Triton X-100 0.1% durante 72 hrs a 4°C. Em seguida, foram enxaguadas em PBS-BSA durante 24 hrs e então incubadas e constantemente agitadas em solução com anticorpo secundário Alexa Fluor® 568 cabra anti-camundongo IgG (Cat. A11004, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EUA) na diluição de 1:1500 em PBS 0.1M contendo soro de cabra normal 1.5% com Triton X-100 0.1% durante 24 hrs a 4°C. Finalmente, as amostras foram lavadas em solução de PBS-BSA durante 24 hrs e posteriormente montadas com solução contendo 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI), (Cat. H-1200, Vector Laboratories, CA, EUA) em lâminas de microscópio (Superfrost plus, Cat. 1255015, Thermo Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA) com o epitélio para cima e uma lamínula sobre a amostra.

- Método de avaliação fibrose e outros eventos secundários à injúria das camadas posteriores da córnea:

O ensaio TUNEL foi usado a fim de identificar a fragmentação do DNA associada à necrose ou apoptose. As secções de tecido corneano sobre a lâmina de microscópio foram fixadas em acetona a -20°C durante 2 min e secas em temperatura ambiente durante 5 min. As lâminas foram então colocadas em BSS, e o ensaio de fluorescência TUNEL foi realizado de acordo com protocolo do fabricante (ApopTag, Cat. S7165; Millipore Sigma, St. Louis, MO, EUA) como

previamente descrito.⁶⁸ Para o ensaio TUNEL combinado à IHC para o estudo da Vimentina (Vim) ou Nidogênio-1 (Nid-1) em tempos de análise precoces (1 e 4 hrs após dano do endotélio), o método TUNEL foi realizado primeiramente seguido do enxague das lâminas em PBS e posteriormente a IHC para Nid-1 ou Vim conforme descrito em Medeiros CS.⁶⁸

De maneira sumária, para a dupla coloração α -SMA+Nidogênio-1 (Nid-1), foi realizada a fixação das amostras em paraformaldeído 4% por 5 min, seguida de enxague durante 5 min e repetidas por 3x em 1X PBS e bloqueio com soro normal de burro a 5% (Cat. 017000121, Jackson Laboratories, ME, EUA) em 1X PBS durante 1 hr. Anticorpos primários foram diluídos em soro normal de burro a 5% e incubados durante 90 min em temperatura ambiente. As diluições dos anticorpos primários foram as seguintes: camundongo anti-humano α -SMA clone 1A4 (Cat. M-0851, Dako, Carpinteria, CA, EUA) diluição 1:50 combinado com cabra anti-humano nid-1/entactin anticorpo policlonal (Cat. AF 2570, R&D Systems, MN, EUA) diluição 1:50. Os anticorpos primários foram enxaguados 3x e os seguintes anticorpos secundários foram incubados com soro normal de burro a 5%: Alexa Fluor 568 burro anti-camundongo IgG (Cat. A10037, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EUA) diluição 1:100 combinado ao Alexa 488 burro anti-cabra IgG na diluição 1:250 (Cat. A11055, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EUA). Para finalizar, as lâminas foram lavadas por 3x e, após secas, montadas em solução contendo 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Cat. H-1200, Vector Laboratories, CA, EUA) que permite a visualização dos núcleos celulares.

Visando ao estudo IHC com dupla coloração para α -SMA+Keratocan (Kera), as lâminas após fixadas como descrito, foram enxaguadas com solução

de PBS/0.1% Tween-20 (PBST), seguido do bloqueio com soro normal de burro a 5% em PBS contendo 0.05% de NP-40 por 1 hr em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram incubadas durante a noite com o anticorpo cabra anti-Kera (cedido gentilmente pelo laboratório do Dr. Winston Kao) com diluição de 1:200 e anticorpo camundongo anti-humano α -SMA clone 1A4 como já descrito, em mesma solução usada para bloqueio à temperatura de 4°C. Após enxague, as lâminas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário Alexa 488 burro anti-cabra na diluição de 1:200 e Alexa 568 burro anti-camundongo diluído 1:100. As amostras foram enxaguadas por 3x em PBST e montadas usando DAPI.

Controles negativos de córneas submetidas a descemetorréxis foram incluídos em cada ensaio sem os anticorpos primários ou sem terminal desoxinucleotidil transferase(dT) e usando os respectivos anticorpos secundários. Para controle positivo, foram incluídos -9.0 PRK 1d após a cirurgia em cada ensaio de TUNEL, em que é possível ver células em apoptose no estroma anterior, -9.0 PRK após 30 d, quando acontece o pico de expressão do α -SMA,⁹ e é possível ver a expressão pelos ceratócitos de Kera, Vim⁶⁸ e estudar o complexo Descemet-endotélio por meio da expressão do Nid-1.⁶⁸

Sabendo que a microscopia de transmissão eletrônica é o método padrão-ouro para a diferenciação entre necrose e apoptose, essa técnica foi utilizada no presente estudo e as amostras preparadas como previamente descrito na literatura.⁶⁸ De maneira sucinta, uma amostra da córnea central submetida à injúria do endotélio isolada através da cânula romba (1 e 4 hrs) foi extraída (1 x 3 mm) e enxaguada por 3x em solução tampão de cacodilato de sódio 0.2 M por 5 min 4°C. Em seguida, foi fixada em solução de tetróxido de

ósio a 1% durante 1 hr e, em seguida, deu-se início ao processo de desidratação em soluções crescentes de etanol a 30% até 95%, durante 5 min cada a 4°C e seguido de 3 enxagues de 10 min em solução de etanol a 100%. Por fim, os espécimes foram embebidos em resina epóxi e cortados em amostras de 1 mm e posteriormente corados com azul de toluidina para observação em microscópio óptico. Através do uso de um ultramicrotomo, cortes ultrafinos de 85 nm foram realizados e corados com acetato de uranila (acetato de urânio) a 7% em metanol durante 50 min para o posterior estudo em microscópio de transmissão.

4.4 Microscopia

Córneas que foram preparadas usando o método de coloração da acetilcolinesterase foram fotografadas usando o estereomicroscópio Leica MZ16FA (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemanha). Já as amostras coradas com a tubulina β -III tiveram suas imagens através do microscópio confocal Leica SP8 (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemanha), e as montagens foram obtidas por meio do software Leica LAS-X.

Os cortes de córnea que foram submetidos à injúria na córnea posterior foram analisados e fotografados através do microscópio Leica DM5000 (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemanha).

O estudo das amostras com finalidade de identificação da presença de apoptose foi realizado usando o microscópio de transmissão eletrônica Philips CM12 operados a 60 kV (FEI, Hillsboro, OR, EUA).

4.5 Quantificação

- Quantificação computadorizada da área dos nervos

Os nervos localizados na área de fotoablação pelo excimer laser (6mm de diâmetro, área total 28.2mm²) e na área adjacente à zona óptica de tratamento foram avaliados usando o software Image-Pro (Media Cybernetics, Rockville, EUA). A fim de se usar a mesma área em todas as amostras, um círculo que representava a área de interesse, 9.4 mm de diâmetro, foi desenhado e salvo de modo a ser usado nas demais córneas. O círculo selecionado detinha uma área total de 69.3 mm². Posteriormente, um filtro foi aplicado de modo a converter a coloração para preto e branco a fim de aumentar o contraste e facilitar a quantificação. O software Image-Pro automaticamente quantificou a área dos nervos em mm² sobre a área de interesse previamente selecionada, de forma que os nervos se apresentassem em vermelho. A quantificação foi realizada de forma a calcular a área de dano sofrido pelos nervos da córnea após a remoção manual do epitélio, o PRK ou a MMC associada a esses passos cirúrgicos e a subsequente regeneração ao longo de um período de seis meses.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o software para análises estatísticas SAS® 9.4 (Cary, NC). Variâncias foram representadas através do desvio padrão da média (SD). Comparação estatística entre os grupos foi realizada usando

Análise de Variância (ANOVA) e comparações entre dois grupos, Teste T de Student assumindo variâncias desiguais (Satterthwaite) para as análises referentes à área dos nervos em mm² por grupos e momentos de análise (Tabela 3). O nível de significância estatística foi considerado quando o valor de p fosse menor que 0.01.

5. Resultados

5.1 Avaliação da coloração dos nervos da córnea na área central

Córneas submetidas à remoção manual cirúrgica do epitélio apresentaram uma menor densidade de nervos na região central da córnea após um dia do procedimento quando comparadas a olhos controle (Fig.1, Tab. 2 e 3), indicando que o debridamento cirúrgico dessa camada acarreta um leve prejuízo à população de nervos residentes na porção mais superficial da córnea. Por sua vez, o PRK revelou um extenso dano sobre a área submetida ao tratamento. Entretanto, foi observada uma progressiva regeneração da população de nervos da área central da córnea ao longo dos seis meses subsequentes ao PRK (Fig.1, Fig.2, Tab. 2 e 3) ao ser comparada a córneas controle.⁸⁰

Figura 1- Coloração histoquímica através da Acetilcolinesterase em córneas um dia após diferentes injúrias aos nervos. O grupo remoção do epitélio (RE) – MMC foi submetido ao debridamento cirúrgico desta camada sem o posterior uso da MMC. O grupo RE + MMC foi submetido ao uso da MMC 0.02% durante 30 segundos após debridamento do epitélio. O grupo Ceratectomia fotorefrativa (PRK) – MMC, foi submetido à correção de -9,0

dioptrias (D) sem o posterior uso da MMC. O grupo PRK + MMC foi submetido ao tratamento de -9,0 D seguido do uso da MMC conforme anteriormente descrito. Três córneas foram analisadas por grupo.

Figura 2- Coloração histoquímica através da Acetilcolinesterase em córneas analisadas em diferentes tempos após -9D PRK com e sem MMC. O grupo PRK + MMC-1m foi submetido ao PRK para a correção de -9.0 D seguido do tratamento com MMC na concentração de 0.02% durante 30 segundos e analisado após um mês da data da cirurgia. Os grupos PRK - MMC-1m, -2m, -3m e -6m foram olhos submetidos ao PRK para a correção de -9.0D sem o uso de MMC e analisados após um, dois, três e seis meses respectivamente após a cirurgia. Três córneas foram analisadas por grupo, nos diferentes tempos de estudo, com exceção do grupo de seis meses que foi composto por quatro olhos.

A área central de nervos evidenciada através da coloração de AchE aos 3 e 6 meses após PRK não revelou diferenças estatisticamente significantes ($p=0.05$) quando comparada a olhos do grupo controle (Tabela 3), embora houvesse uma tendência à ligeira inferioridade na densidade de fibras nervosas na região que primariamente foi submetida à fotoablação, que se concentrou,

majoritariamente, no nível dos nervos intraepiteliais (Fig. 3.F), assim como uma persistente morfologia aberrada e uma anormal distribuição das fibras nervosas em processo de reestruturação.⁸⁰

Tabela 2- Média e desvio padrão dos valores referentes à área dos nervos ao longo dos tempos de estudo após diferentes injúrias

Grupos	Controle	RE – MMC 1d	RE + MMC 1d	PRK– MMC 1d	PRK+ MMC 1d	PRK– MMC 1m	PRK+ MMC 1m	PRK– MMC 2m	PRK– MMC 3m	PRK– MMC 6m
Área dos nervos por mm ² (Média ± DP)	18.4 ± 0.9	16.9 ± 0.3	17.3 ± 0.4	11.2 ± 0.1	9.5 ± 0.6	14.1 ± 0.4	14.2 ± 0.3	15.3 ± 0.1	17.5 ± 0.4	17.6 ± 0.3

Os grupos foram submetidos a procedimentos conforme já descrito anteriormente.

A remoção manual do epitélio isoladamente ou associado ao uso da MMC um dia após o procedimento causou um semelhante impacto em relação à injúria causada aos nervos da córnea ($p=0.4$), indicando que o uso da MMC não acarretou danos adicionais aos nervos um dia após o debridamento epitelial (Fig.1, Tab. 2 e 3). Contudo, no contexto da injúria após PRK, o uso da MMC associado a essa técnica apresentou um dano adicional aos nervos da córnea um dia após a cirurgia ($p=0.0009$). No entanto, esse efeito neurotóxico da MMC não persistiu após um mês ($p=0.9$). Portanto, sua análise foi interrompida nos demais grupos de análise posteriores.⁸⁰

Tabela 3- Valores de p por grupo e por tempo de estudo após ANOVA

Grupos	Controle	RE – MMC 1d	RE + MMC 1d	PRK– MMC 1d	PRK+ MMC 1d	PRK– MMC 1m	PRK+ MMC 1m	PRK– MMC 2m	PRK– MMC 3m	PRK– MMC 6m
Controle		0.002	0.02	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.05	0.05
RE – MMC 1d			0.4	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.002	0.1	0.1
RE + MMC 1d				<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0002	0.6	0.5
PRK– MMC 1d					0.0009	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
PRK+ MMC 1d						<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
PRK– MMC 1m							0.9	0.01	<0.0001	<0.0001
PRK+ MMC 1m								0.01	<0.0001	<0.0001
PRK– MMC 2m									<0.0001	<0.0001
PRK– MMC 3m										0.9
PRK– MMC 6m										

Grupos foram submetidos a procedimentos conforme descrito anteriormente.

5.2 Avaliação da morfologia dos nervos da córnea através da IHC da Tubulina β -III em córneas submetidas ao PRK sem o uso de MMC

Um amplo dano aos nervos da córnea foi observado um dia após o PRK aos nervos da córnea situados ao nível do plexo sub-basal (Fig. 3.B). A cerca de 125 μ m de profundidade em relação à superfície, é possível observar o prejuízo às fibras nervosas no nível do estroma anterior (Fig. 4.B), assim como observado no estroma médio, aproximadamente a 250 μ m (Fig. 5.B) da superfície da córnea. Logo, ocorre uma extensa e profunda lesão da inervação da córnea após -9.0 D PRK, uma vez que a injúria provocada acomete desde os nervos mais

finos da superfície ocular até os troncos nervosos de maior calibre do estroma médio.

A degeneração nervosa foi observada além dos 6 mm da zona óptica de tratamento do excimer laser utilizada um dia após o PRK (Fig. 3.B, 4.B e 5.B), de maneira a danificar os nervos adjacentes à área de ablação do excimer laser, especialmente nas camadas mais superficiais do plexo sub-basal e estroma anterior (Fig. 3.B e 4.B).

Figura 3- Coloração histoquímica através da Tubulina β -III evidenciando os nervos do plexo sub-basal ao longo dos diferentes tempos de estudo após o tratamento de -9.0D através do PRK sem MMC. PRK – MMC significa a correção de -9.0 D esféricas sem o uso de MMC. Avaliados respectivamente após um dia (3.B), um mês (3.C), dois (3.D), três (3.E) e seis meses (3.F).

Figura 4- Coloração histoquímica através da Tubulina β -III evidenciando os nervos do estroma anterior, aproximadamente a 125 μ m ao longo dos diferentes tempos de estudo após o tratamento de -9.0D através do PRK sem MMC. PRK – MMC significa a correção de -9.0 D esféricas sem o uso de MMC. Avaliados respectivamente após um dia (4.B), um mês (4.C), dois (4.D), três (4.E) e seis meses (4.F).

Sinais de regeneração dos nervos subsequentes ao PRK foram observados após um mês, no nível do plexo sub-basal (Fig. 3.C), estroma anterior (Fig. 4.C) e até mesmo no estroma médio. Ramos colaterais foram originados a partir da borda da área lesada no plexo sub-basal e migraram perpendicularmente de forma a alcançar o plexo subepitelial e epitélio (Fig. 3.C, seta). Pequenos nervos tortuosos, apresentando múltiplas ramificações, e retorcidos foram observados, exibindo uma maior tendência de concentrarem-se às margens da ablação do excimer laser (Fig. 4.C e 5.C, setas).

Figura 5- Coloração histoquímica através da Tubulina β -III evidenciando os nervos do estroma médio, aproximadamente a 250 μ m ao longo dos diferentes tempos de estudo após o tratamento de - 9.0 D através do PRK sem MMC. PRK – MMC significa a correção de - 9.0 D esféricas sem o uso de MMC. Avaliados respectivamente após um dia (5.B), um mês (5.C), dois (5.D), três (5.E) e seis meses (5.F).

A regeneração dos nervos da córnea pode ser observada de maneira progressiva até o terceiro mês após o PRK (Fig. 3, 4 e 5), a qual, apesar de numericamente ter apresentado um platô em relação ao sexto mês (Tabela 2), uma melhor redistribuição dos nervos foi exibida quando comparada ao mês três. Todavia, tais córneas não alcançaram um padrão morfológico normal de inervação comparável a córneas controle mesmo após o sexto mês subsequente à cirurgia (Fig. 3, 4 e 5), principalmente em nível dos nervos intraepiteliais e do plexo sub-basal, em que foi mantida a tendência de restabelecimento da inervação a partir da confluência desses nervos obliquamente a fim de repovoar

a área de ablação, apesar da persistência de uma área central de escassez de inervação (Fig. 3.F).

Uma maior densidade de fibras foi observada no estroma anterior, sendo a camada que contribuiu de maneira mais expressiva para que a densidade dos nervos, três meses após o PRK, não representasse diferenças estatisticamente significantes dos olhos controle, demonstrando que a regeneração das fibras nervosas desta camada aconteceu de maneira mais acelerada e abundante em comparação às demais profundidades.⁸⁰

5.3 Avaliação dos efeitos precoces da cicatrização da córnea após injúria do endotélio com cânula romba

A análise IHC após uma e quatro horas da injúria mecânica do endotélio usando uma cânula romba (olive-tip) (Fig. 8.A) evidenciou, por meio do método TUNEL, combinado ao Nidogênio-1 usando dupla coloração, uma grande expressão dessa proteína no nível da membrana de Descemet (Fig. 6.C e D), exibindo sua integridade, e células no estroma TUNEL + após 1 e 4 horas da injúria do endotélio. A quantificação do número de células TUNEL+ após dano endotelial comparado a controles e à periferia da córnea que não sofreu qualquer dano encontra-se no artigo original sobre o tema.⁶⁸

Figura 6- Estudo imuno-histoquímico após 1 e 4 hrs da injúria do endotélio com cânula romba expressando TUNEL, Nidogênio-1 e Vimentina. A) Córnea controle evidenciando a membrana basal do epitélio e membrana de Descemet através da expressão de Nid-1 em verde (setas) e a morfologia normal dos núcleos das células do endotélio em azul através do DAPI, Mag. 10X. B) Córnea controle evidenciando a expressão da Vim em verde por células do estroma e célula TUNEL+ (vermelho) no epitélio demonstrando a constante renovação dessa camada (seta), Mag. 20x. C) 1 hr após a injúria do endotélio, houve a expressão de células TUNEL+ (em vermelho) no estroma posterior mesmo diante de uma Descemet íntegra (verde), Mag. 20x. D) Uma zona de transição entre uma área de endotélio íntegro à esquerda (observe a morfologia do núcleo das células do endotélio - cabeça de seta) e uma área onde houve o dano das células do endotélio à direita (observe a ausência de células do endotélio em azul). Uma correspondente zona de células TUNEL+ (seta) ocorreu acima da zona de injúria do endotélio, Mag. 20x. E) Zona de transição exibida na figura anterior. Porém, o Nid-1 (em verde) foi ocultado da composição a fim de obter uma melhor visualização das células em apoptose (TUNEL+, em vermelho) acima da área de lesão das células do endotélio (demonstrada através da ausência dessas células em azul), Mag. 20x. F) Expressão de Vim. e TUNEL 4 hrs após dano ao endotélio mostram que

muitas das células em apoptose expressam de maneira concomitante a Vim, Mag. 20x. G e H) Controles negativos do Nidogênio + TUNEL e Vim + TUNEL respectivamente, demonstrando a ausência de coloração inespecífica desses anticorpos, Mag. 20x.

A apoptose das células estromais foi observada em área acima da membrana de Descemet, apenas onde ocorreu a lesão das células do endotélio após 1 e 4 horas da injúria (Fig. 6.C e D). É possível observar uma área limítrofe onde não se observa a presença dos núcleos das células endoteliais e a subjacente presença de células em apoptose no estroma acima dessa zona de lesão endotelial após 4 horas (Fig. 6.D, seta). De maneira oposta, a área adjacente revelou a integridade dos núcleos de suas células endoteliais e a ausência de apoptose das células do estroma acima dessa zona de integridade nuclear (Fig. 6.D, cabeça de seta).

A microscopia de transmissão eletrônica ratifica a presença de células em apoptose subsequentes à lesão do endotélio após 1 e 4 horas, através da presença de corpos apoptóticos e condensação da cromatina, fenômeno característico do processo de apoptose (Fig. 7.A e B).⁶⁷ Os corpos apoptóticos são resquícios de citoplasma e organelas de uma célula em desorganização.

Figura 7- Demonstra a apoptose de células no estroma posterior da córnea após a injúria do endotélio. A) Exibe a presença de corpos apoptóticos (setas) ao redor de um núcleo celular com condensação de sua cromatina (CC). B) Após 4 hrs da injúria mecânica do endotélio, um processo semelhante é observado. As setas indicam a formação de corpos apoptóticos e a condensação da cromatina nuclear no estroma posterior.⁶⁸ C) Célula do estroma posterior da córnea apresentando uma normal organização estrutural, com uma heterogênea densidade do núcleo (n) e presença de organelas viáveis (cabeça da seta), ausência de alterações sugestivas de apoptose da célula.

O estudo, através da análise conjunta do método TUNEL e da proteína vimentina, demonstrou que muitas células em apoptose também expressaram vimentina, sugerindo que possivelmente tais células seriam ceratócitos ou fibroblastos por origem (Fig. 6.F). Por sua vez, as células estromais que expressam vimentina periféricas à injúria do endotélio não sofreram apoptose (Fig. 6.F, cabeça de seta).

A análise de olhos controle demonstra que tais córneas não sofreram qualquer injúria. O estudo IHC revela a estrutura e a morfologia de uma membrana de Descemet íntegra e a maior concentração da expressão do nidogênio-1 em estroma posterior (Fig. 6.A). A apoptose só foi vista nas células epiteliais como uma parte do ciclo celular normal e fisiológico dessas células que estão em constante renovação (Fig. 6.B).⁶⁸ A expressão de vimentina também foi observada, uma vez que ceratócitos ou fibroblastos em condições normais da córnea expressam tal proteína. (Fig. 6.B)

5.4 Avaliação dos efeitos da cicatrização da córnea um mês após injúria da córnea posterior

O edema inicial resultante da injúria da camada endotelial (Fig. 8.B) obteve progressiva melhora (Fig. 8.C) até sua completa resolução na quarta semana (Fig. 8.D).

Figura 8- Aspecto clínico da córnea através de biomicroscopia após injúria posterior. A) Cânula romba do tipo (olive-tip) usada para provocar o dano isolado da camada endotelial. B) Edema inicial na área central da córnea no terceiro dia após injúria do endotélio com cânula romba. C) Melhora quase completa do edema inicial após duas semanas da injúria do endotélio. D) Resolução do edema inicial após 30 dias do dano ao endotélio. E) Edema importante na área correspondente aos 8 mm da córnea central submetida à descemetorréxis 14 dias após lesão. F) Persistência da opacidade e fibrose do estroma da córnea 1 mês após injúria das camadas de Descemet e endotélio (Descemet-endo). Todas as fotos foram retiradas em lâmpada de fenda, Mag. 40X.

A integridade estrutural da membrana de Descemet nesse grupo foi evidenciada através da expressão de Nid-1 (Fig. 9.E), apesar do dano às células do endotélio, que, por sua vez, apresentaram uma morfologia alterada após um mês (Fig. 9.F, 10.F, cabeça de seta). A expressão de Kera, nesse mesmo grupo, aconteceu de maneira semelhante aos olhos controle. Um maior edema pode

ser observado no estroma dessas córneas (Fig. 10.E e F), porém o exame de biomicroscopia demonstra que tal edema não foi clinicamente significativo após um mês (Fig. 8.D).

Córneas controle que não sofreram qualquer injúria não demonstraram a ocorrência de fibrose devido à ausência de expressão da α -SMA (Fig. 10.A). As células do estroma, por sua vez, expressaram altos níveis de keratocan, o que as caracteriza como possíveis ceratócitos, células que povoam o estroma da córnea. A integridade da membrana de Descemet pode ser observada através da expressão de Nid-1 (Fig. 9.A), assim como na membrana basal do epitélio.

Em contraste ao que ocorreu com as córneas controle ou submetidas à injúria do endotélio, os animais que foram submetidos à excisão do complexo Descemet-endotélio desenvolveram opacidade ao longo dos 8 mm da córnea após 1 mês subsequente à lesão (Fig. 8.E e F). A análise IHC combinada do Nid-1 e α -SMA demonstrou a ausência da membrana de Descemet após a injúria e a grande expressão de α -SMA pelas células estromais acima da área submetida a descemetorréxis (Fig. 9.B, cabeça de seta), ao passo que, em área adjacente, onde a membrana de Descemet permaneceu aderida ao estroma, não houve o desenvolvimento de fibrose (Fig. 9.B, seta).

Figura 9- Análise imunohistoquímica 1 mês após injúria das camadas posteriores da córnea e expressão α -SMA e Nidogênio-1. A) Córnea controle, Mag. 20x. B e C) Córnea 1 mês após a injúria da Descemet, revelando a expressão de α -SMA em vermelho sob região onde houve a excisão do complexo Descemet-endothélio (cabeça de seta, observe a ausência da Descemet em verde) e ausência de expressão da α -SMA (em vermelho) sob a área onde a membrana de Descemet foi preservada em verde (seta), Mag. 10x e 20x respectivamente. D) Controle Negativo, Mag.10x. E e F) Córnea 1 mês após a injúria do endothélio, Mag. 20x, combinando α -SMA + Nid-1 + DAPI na primeira (E) e DAPI + α -SMA na última (F). Observe a membrana de Descemet em verde (E) e ausência de α -SMA em vermelho. Ao revelar a mesma córnea ocultando o Nid-1 da composição em F) ficam mais evidentes as alterações morfológicas sofridas pelas células endotheliais possivelmente regeneradas, apresentando aspecto hiperplásico (cabeça de seta).

O estudo imuno-histoquímico combinando α -SMA e Kera no grupo submetido à excisão Descemet-endothélio demonstrou que o estroma posterior da córnea foi povoado com uma zona de fibrose (Fig. 10.B, f) abaixo de uma zona estromal de expressão de keratocan (Fig. 10.B, k). A fibrose da córnea acontece na área onde o estroma encontra-se desnudo, sem a barreira exercida pela membrana de Descemet, ou seja, o processo de opacificação da córnea é coincidente com o processo de dano ao complexo Descemet-endothélio que ocorreu neste grupo através da descemetorréxis.

Figura 10- Análise imuno-histoquímica 1 mês após injúria das camadas posteriores da córnea e expressão de α -SMA e keratocan. A) Córnea controle demonstrando em verde uma expressão normal no estroma de keratocan. B e C) Córneas 1 mês após o dano do complexo Descemet-endotélio, Mag. 10 e 20x. É possível observar a expressão de α -SMA em vermelho no estroma posterior (f), acima da área submetida a descemetorréxis. Uma zona de transição é observada (*) onde não é observada a expressão de α -SMA ou kera em B. Em C) é possível observar zonas em que há regiões entremeadas de expressão de α -SMA e kera. D) Controle Negativo, Mag.20x. E e F) Córneas 1 mês após a injúria do endotélio isolada. Mag. 10 e 20x, respectivamente. Uma normal expressão de kera é observada, não havendo a expressão de α -SMA. A mudança da morfologia das células do endotélio foi observada através de seu aspecto hiperplásico (cabeça de seta).

Controles negativos, em que não houve a adição de anticorpos primários para Vim, Nid-1, na ausência da enzima terminal transferase (dT), α -SMA ou Kera foram realizados, comprovando a ausência de coloração inespecífica (Fig. 6.G e .H, 9.D, 10.D).

6. Discussão

6.1 Nervos da córnea e a cicatrização: dano e regeneração após fotoablação

Contribuições importantes vêm sendo feitas ao longo dos anos a fim de se obter uma descrição coerente a respeito da organização e distribuição dos nervos da córnea.^{19,26,27}

Como já exposto anteriormente, diferentes técnicas podem ser utilizadas para o estudo dos nervos da córnea. O presente estudo utilizou um estereomicroscópio, que permite a análise de amostras de tecidos de maior espessura, provendo assim a visualização da amplitude do prejuízo aos nervos relacionada à área de ablação do excimer laser. A coloração através da acetilcolinesterase foi usada para quantificar o dano nervoso após diferentes etapas cirúrgicas e suas combinações. A utilização de uma técnica de IHC que não fosse específica para um certo tipo de nervo foi desejada a fim de tornar possível a visualização de todo tipo de fibra nervosa presente no tecido. Tal característica é de extrema importância, uma vez que possibilita a identificação do maior número de nervos possível.⁵⁴ Assim sendo, a coloração através da AchE, combinada à imagem de espessura total da córnea, proporcionou imagens de alto contraste, evidenciando toda a rede de nervos desse tecido, aumentando assim a confiabilidade da análise quantitativa.

Um segundo método utilizado nesta pesquisa objetivou uma análise mais detalhada da morfologia dos nervos da córnea. A técnica de imunofluorescência foi utilizada a fim de detectar a tubulina β -III, que é uma subunidade da tubulina III. A tubulina β -III é uma proteína primariamente expressa por neurônios e possui uma propriedade de guiar e manter a estrutura do axônio. O uso do microscópio confocal para análise desta proteína permitiu

explorar as fibras nervosas ao longo de toda espessura da córnea e por suas diversas camadas, promovendo, dessa forma, um melhor entendimento do crescimento dos nervos e o repovoamento durante o processo de regeneração, uma vez que se tornou possível avaliar as modificações da estrutura dos nervos e sua arquitetura em diferentes profundidades. Os dados mais robustos providos a partir do emprego de dois métodos de microscopia distintos nos permitiu, no presente estudo, um melhor entendimento sobre a extensão da perda de inervação e o processo de remodelamento dos nervos da córnea após lesão.

Após o curto período de um dia, já foi possível observar a lesão dos nervos da córnea em todos os grupos analisados. Durante o debridamento cirúrgico do epitélio, as terminações nervosas livres e a complexa trama de nervos que compõem o plexo sub-basal foram degeneradas. Por sua vez, no decorrer da cirurgia de PRK, o tratamento com o excimer laser provoca um remodelamento do estroma da córnea e consequente lesão dos nervos além do diâmetro da zona óptica de tratamento e profundidade de ablação do excimer laser. Tal observação é compatível com o fenômeno de degeneração axonal retrógrada, uma vez que a ablação de terminações nervosas desencadeou um prejuízo que estende o dano à fibra nervosa ao longo de seu trajeto retrogradamente.⁸¹

Diferentemente de publicações anteriores que utilizaram o estudo do plexo subepitelial como material amostral para a análise dos nervos da córnea,^{48,51} a análise tridimensional ao longo da espessura total da córnea através do microscópio confocal mostrou uma maciça destruição dos nervos em todas as camadas onde tais estruturas estão presentes, ou seja, até o estroma médio. Entretanto, a extensão do dano aos nervos após PRK pode ser variável,

uma vez que possui correlação direta com o tamanho e profundidade da ablação.^{15,82} Zonas ópticas e graus da ametropia corrigida maiores implicarão danos superiores.⁸⁰

A neurotoxicidade associada ao uso da MMC foi anteriormente descrita em relação aos olhos e outros tecidos.³⁷⁻⁴¹ A literatura também dispõe de relatos que mostram uma resposta dose-dependente da MMC em relação ao dano sobre os nervos da córnea.^{39,40} O presente estudo mostrou um discreto efeito tóxico sobre os nervos da córnea no período pós-operatório precoce que não persistiu um mês após PRK com MMC 0.02%. Tal achado coincide com estudos que mostram a segurança a longo prazo do uso da MMC na córnea.⁸³ No entanto, tal efeito neurotóxico não foi observado quando o debridamento do epitélio foi associado ao tratamento com MMC, não intensificando o prejuízo aos nervos. Logo, o uso da MMC, após injúria da superfície da córnea, causou uma potencialização dos danos aos nervos somente quando associado ao uso do excimer laser, como no caso do PRK observado em nesse estudo.

A diferença da composição dos nervos do estroma e do epitélio é a hipótese mais aceita para justificar a maior sensibilidade apresentada pelos nervos estromais ao efeito neurotóxico da MMC quando comparados aos nervos do epitélio. Os últimos são privados da participação de células de Schwann compondo sua estrutura. O já descrito papel citotóxico da MMC parece ter influenciado um maior sofrimento dos nervos estromais.¹⁴

Relatos prévios demonstraram que a recuperação das fibras nervosas após o debridamento do epitélio em roedores ocorreu de maneira mais prolongada quando comparados à injúria aos nervos realizada através de um trépano que lesou a inervação correspondente aos nervos intraepiteliais.⁸⁴ A

prolongada recuperação dos nervos epiteliais descrita pelo autor está de acordo com os achados do presente estudo. No entanto, os possíveis efeitos tróficos do epitélio sobre o processo de injúria e nervos da córnea precisam ser mais bem elucidados.

A inicial desnervação sensorial precoce na área da ablação e a degeneração que se estendeu além da zona óptica observadas após o PRK foram seguidas por um período de recuperação e reorganização das fibras nervosas. No presente estudo, a área das fibras nervosas regeneradas na região central da córnea alcançou valores absolutos comparáveis aos pré-operatórios após três meses subsequentes ao PRK, assim como relatado em alguns estudos da literatura. No entanto, a literatura diverge de maneira considerável a respeito do tempo necessário para que haja a recuperação dos nervos da córnea após o PRK.^{43,47-52}

Tal divergência pode ser explicada através da discordância de métodos entre os estudos: quantitativos *versus* qualitativos, análise baseada na observação dos nervos do plexo sub-basal *versus* análise dos nervos de toda espessura da córnea, uso de diferentes técnicas de coloração dos nervos ou a ausência de colorações e o emprego de diferentes tipos de microscópios para a visualização dos nervos da córnea. A qualidade e a resolução da imagem dos nervos da córnea são cruciais para a realização de uma análise quantitativa acurada e, por conseguinte, para a reprodutibilidade dos resultados do estudo.

Um importante estudo em córneas de coelhos realizou valiosas contribuições para o atual entendimento sobre o processo de neuroregeneração após lesões da córnea.⁵³ O crescimento das fibras nervosas dispostas perpendicularmente a partir da borda da lesão foi um comportamento dos nervos

em regeneração descrito pela autora e em concordância com o padrão observado no presente estudo um mês após o PRK. Tais nervos orientados a partir da margem da cicatriz são os nervos primários a repovoar a córnea, migrando do plexo sub-basal ao longo do epitélio. O estroma anterior e até mesmo o estroma médio exibiram nervos nascentes, porém com notória morfologia aberrada. A inervação recente apresentava uma alta densidade de fibras nervosas rudimentares, com múltiplas ramificações e tortuosidade muito acentuada às margens da ablação. Essa tentativa precoce e imatura de recuperação das fibras nervosas originais da área da zona de ablação é característica de uma primeira fase da regeneração dos nervos.⁵³

Subsequentemente, tal inervação rudimentar entra em processo de degradação e inicia-se a concomitante recuperação dos segmentos terminais dos nervos previamente ablados, constituindo assim a segunda fase de regeneração, em que é possível observar vestígios dos nervos primários sendo substituídos por axônios terminais em crescimento, de maior densidade, menor comprimento e apresentando uma disposição oblíqua.^{28,53} A segunda fase de crescimento dos nervos é considerada o primeiro sinal de neurogênese.⁵³ Tal comportamento neuronal foi coincidente com o observado no presente estudo ao terceiro mês; no entanto, não foi completo até o sexto mês.

Através das imagens resultantes da análise com microscópio confocal, em que os nervos podem ser avaliados não apenas através da área, mas também em diferentes profundidades, constatou-se uma expressiva escassez de nervos intra-epiteliais na área correspondente à zona óptica do excimer laser. Em contrapartida, o estroma anterior foi o maior responsável pelo repovoamento da córnea central. A grande densidade de nervos regenerados que se

concentrou na profundidade aproximada de 125 μm contribuiu numericamente de maneira significativa para o repovoamento da córnea. Dessa forma, a redistribuição e o rearranjo dos nervos regenerados da córnea revelaram-se um processo não homogêneo e assimétrico, constatando que o remodelamento neural não foi efetivamente completo até o sexto mês.

O lento processo de neurorregeneração presente nos nervos intra-epiteliais e no plexo sub-basal pode ser decorrente da complexidade da densa rede de fibras nervosas que compõe essas estruturas, de maneira que um tempo prolongado possa ser necessário para que haja recuperação. Porém, estudos com maiores tempos de acompanhamento são primordiais para o esclarecimento desse processo. No entanto, evidências atuais sugerem que a interação entre a célula de Schwann e o nervo da córnea contribui com a restauração dos nervos do estroma, ao passo que uma deficiência de atividade trófica do epitélio mostrou-se a causa de uma incompleta regeneração dos nervos do epitélio ocorrido em um modelo de degeneração dos nervos usando técnica de queimadura ocular.⁸⁵

6.2 Fibrose após injúria da córnea posterior

É amplamente conhecido na literatura que, de maneira subsequente ao trauma no epitélio da córnea, diversos eventos serão desencadeados no estroma.^{66,67,86} Estudos demonstram que a apoptose seria o primeiro evento a ocorrer após traumas cirúrgicos, como no caso do PRK ou LASIK,⁹ sendo o pico de detecção das células em apoptose após 4 horas.^{9,66,68}

Na fase inicial do presente estudo, observou-se uma significativa apoptose das células do estroma posterior subsequente ao dano mecânico isolado do endotélio, de maneira semelhante ao já conhecido processo que ocorre no estroma anterior após trauma epitelial.^{9,68} Dessa forma, deu-se prosseguimento ao estudo a fim de esclarecer se os marcos anteriormente descritos da cascata de cicatrização, que ocorrem em resposta ao trauma na superfície ocular anterior, aconteceriam de maneira semelhante após trauma na superfície posterior da córnea. Dessa forma, seria possível um maior entendimento a respeito da geração e persistência de cicatrizes nas camadas posteriores da córnea.

A análise imuno-histoquímica dos animais submetidos ao trauma mecânico do endotélio mostrou que não houve a expressão de α -SMA, daí a ausência da geração de miofibroblastos nesse grupo após um mês. Clinicamente, esse resultado pode ser corroborado devido à recuperação da transparência da córnea após quatro semanas, através da resolução do edema de córnea inicial que foi observado após três dias da injúria ao endotélio.

O dano isolado do endotélio, uma vez que se manteve a integridade estrutural e funcional de barreira da membrana de Descemet, em somatório com a provável regeneração das células endoteliais, foi condição decisiva para que não houvesse o influxo de citocinas e fatores de crescimento em níveis suficientes para que fosse estabelecido um caráter fibrótico da cicatrização nesse grupo. Sendo assim, houve uma modulação da resposta cicatricial de caráter regenerativo em resposta ao dano da camada endotelial da córnea.

De maneira distinta do processo descrito anteriormente, o grupo submetido à excisão do complexo Descemet-endotélio desenvolveu cicatrizes

ao longo dos 8 mm da área em que a membrana foi retirada cirurgicamente. O estudo IHC revelou uma grande população de miofibroblastos no estroma posterior da córnea acima da área onde foi realizada a descemetorréxis. Logo, não houve a expressão do Nidogênio-1 abaixo da área de fibrose posterior, uma vez que o complexo Descemet-endotélio foi removido.

Dessa forma, o presente estudo demonstra, de maneira conclusiva, o papel crítico da membrana de Descemet em modular a geração dos miofibroblastos e a fibrose no estroma posterior. A excisão do complexo Descemet-endotélio serviu como gatilho para a formação da opacidade da córnea posterior ao longo da extensão de toda área onde essa membrana foi removida cirurgicamente.

Tais achados especificam a membrana de Descemet como a estrutura crítica na modulação da opacidade corneana posterior, de maneira equivalente ao papel regulador exercido pela membrana basal do epitélio sobre o estroma anterior.^{17,63,71} Tal modulação ocorre de maneira regulatória sobre o fluxo de fatores de crescimento como o (TGF β -1) e (PDGF), que podem estimular o desenvolvimento dos miofibroblastos a partir de ceratócitos, através dos fibroblastos da córnea,⁷² fibrócitos derivados da medula óssea⁷⁰ ou outros percussores.⁸⁷

Componentes específicos da Descemet ligam-se a fatores de crescimento pró-fibróticos, entre eles: perlecan (TGF- β 1, TGF- β 2, PDGF AA e PDGF BB), colágeno IV (TGF- β 1 e TGF- β 2), e nidogênio (PDGF AA e PDGF BB).⁸⁸ O humor aquoso é a fonte que conduz ao desenvolvimento de miofibroblasto.^{73,89}

Apesar da capacidade proliferativa das células do endotélio de coelhos⁹⁰ após a remoção da Descemet-endotélio, não foi observada a tendência de crescimento dessas células sobre a área de fibrose. A ausência dessa regeneração das células do endotélio persistiu até o quarto mês, quando usado um modelo animal para que pudesse ser estudada a fibrose da córnea após infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, cuja profundidade e extensão da lesão chegaram a alcançar a membrana de Descemet.²⁵ No entanto, quando não houve a lesão da Descemet, as células do endotélio apresentaram capacidade proliferativa.

Uma zona de transição foi observada no grupo submetido a descemetorréxis e não expressou Keratocan ou α -SMA. Tal zona é situada entre a área inferior de opacidade da córnea, onde há intensa expressão de α -SMA pelos miofibroblastos, e a área superior de intensa expressão de Keratocan pelas células estromais residentes da córnea. É possível que muitos dessas células que povoam a zona de transição sejam fibroblastos ou fibrócitos que posteriormente poderiam se diferenciar em miofibroblastos. Devido à menor concentração de TGF- β nessa área em níveis incapazes de manter a viabilidade do miofibroblasto, acontece a apoptose dele. Células como macrófagos e monócitos possivelmente habitam a zona de transição, porém não foram usados marcadores para detectá-los.

Assim sendo, a fibrose do estroma posterior é um processo dinâmico. A persistência ou o desaparecimento dos miofibroblastos nessa área é diretamente proporcional aos níveis de apoptose. Perante a ausência da Membrana de Descemet modulando a entrada de TGF- β a partir do humor aquoso, tal fator de

crescimento alcançou níveis estromais ótimos, de modo a garantir a viabilidade do miofibroblasto e, logo, a persistência da zona de fibrose no estroma médio e inferior. Em contrapartida, diante da regeneração do endotélio e integridade da membrana de Descemet, não houve apoptose, desenvolvimento de miofibroblastos ou cicatrizes.

Os resultados do presente estudo possuem importantes implicações na prática clínica, ressaltando o risco de desenvolvimento de cicatrizes corneanas (fibrose) após o uso da técnica de Descemetorréxis sem posterior transplante endotelial para o tratamento da doença de Fuchs.⁹¹ É importante ressaltar a maior predisposição ao desenvolvimento de fibrose que as córneas de coelhos possuem em relação a humanos. Um exemplo desse fato é a ocorrência de fibrose em 100% dos casos após a cirurgia de PRK sem o uso de MMC para a correção de -9,0D na área de ablação desses animais, enquanto em humanos, essa tendência é de 3-5%.^{18,71}

A literatura já relata a ocorrência de opacidade após a descemetorréxis sem o posterior transplante endotelial como possíveis complicações da técnica.

⁹¹ De maneira semelhante, estudos revelam o risco de fibrose posterior quando uma parte da superfície posterior da córnea recipiente não é aderida pelo tecido doador contendo a membrana de Descemet em casos de DMEK ou DSAEK.⁹²

Perante o papel modulador da membrana de Descemet na cicatrização da córnea e do risco de desenvolvimento de opacidades corneanas secundárias ao DMEK ou DSAEK no estroma posterior, o cirurgião deve estar atento e preconizar a completa adesão do enxerto a fim de cobrir todo o tecido de estroma

posterior exposto aos efeitos da influência de fatores de crescimentos e citocinas presentes no humor aquoso. Diante de um descolamento parcial ou total do enxerto, o tecido deve ser reposicionado ou um novo tecido doador implantado o quanto antes para que possa diminuir a chance de desenvolver fibrose da córnea posterior.

Apesar da divisão metodológica realizada neste estudo com relação à análise dos dois terços anteriores e posterior da córnea, o processo de cicatrização da córnea deve ser visto de maneira integral, uma vez que se trata de uma cascata de eventos complexos, mediados por inúmeras interações celulares, células epiteliais, estromais, endoteliais e derivadas do sistema imune. Assim como nervos, o filme lacrimal e o humor aquoso estão envolvidos no processo cicatricial secundário ao trauma. Portanto, o entendimento de seus mecanismos torna-se imperativo, uma vez que, processos infecciosos, inflamatórios ou trauma mecânico frequentemente envolvem mais de uma camada da córnea e, dessa forma, implica prejuízos à segurança e eficácia dos procedimentos ceratorefrativos de eleição, como a Ceratectomia fotorefrativa e os transplantes lamelares posteriores.

7. Conclusão

Existe um extenso processo de dano aos nervos da córnea subsequente ao PRK, que se evidenciou ocorrer além da zona de tratamento através de um processo de degeneração axonal retrógrada. A MMC apresentou uma potencialização ao dano à inervação da córnea somente quando associado ao dano prévio do excimer laser e apenas em períodos pós-operatórios precoces, já não persistindo seu dano neurotóxico após um mês.

O processo de neuroregeneração após a injúria provocada pelo PRK acontece de maneira lenta, de forma que, apesar do processo de remodelamento neural presente, ele não se concluiu até o sexto mês. A reestruturação dos nervos regenerados da córnea acontece de maneira anômala, corroborado através de arquitetura aberrada e morfologia imatura das novas fibras que são contrastantes as de nervos que não sofreram qualquer injúria. A redistribuição peculiar da inervação crescente, de maneira a poupar ou ao menos ocorrer de maneira retardada na zona de tratamento nas camadas epiteliais, pode estar relacionada à diferença de composição dos nervos intraepiteliais, que carecem de células de Schwann em sua formação. Porém tal correlação necessita ser mais bem estudada.

Por sua vez, as camadas posteriores da córnea diante de uma injúria revelou que a fibrose do estroma posterior é um processo dinâmico. A Membrana de Descemet mostrou-se como o maestro desse ciclo, de forma a orquestrar a entrada de TGF- β a partir do humor aquoso no estroma através de sua integridade anatômica e funcional, garantindo a viabilidade do miofibroblasto e, logo, a persistência da zona de fibrose no estroma médio e inferior.

Em contrapartida, perante a regeneração do endotélio e a ausência de prejuízo funcional ou estrutural da membrana de Descemet, o caráter fibrótico da cicatrização da córnea não é desencadeado, uma vez que não houve o desenvolvimento de miofibroblastos ou cicatrizes nas camadas inferiores na córnea, responsáveis pela opacificação e perda visual.

8. Anexos

Anexo A– Carta de aprovação quanto ao uso de animais

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“IMPACTO DA CORREÇÃO VISUAL COM EXCIMER LASER EM CORNEAS DE COELHOS”**, registrada com o nº 144/16, sob a responsabilidade de Marcony R Santhiago e Carla Santos Medeiros Conti, apresentado pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 07.12.2016

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 09-12-2016 Término: 30-06-2018
Espécie/linhagem/raça	Coelhos
Nº de animais	24
Peso/Idade	2,5 a 3,0 kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Cleveland Clinic

CEUA-FMUSP, 07 de Dezembro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9. Referências Bibliográficas

1. Medeiros CS, Marino GK, Santhiago MR, Wilson SE. The Corneal basement membranes and stromal fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(10):4044–4053.
2. McDonald MB, Frantz JM, Klyce SD, Beuerman RW, Varnell R, Munnerlyn CR, et al. Central Photorefractive Keratectomy for Myopia: The blind eye study. *Arch Ophthalmol*. 1990;108(6):799-808.
3. Aron-Rosa D, Carre F, Cassiani P, Delacour M, Gross M, Lacour B, et al. Keratorefractive surgery with the excimer laser. *Am J Ophthalmol*. 1985;100(5):741-742.
4. Ambrósio R, Tervo T, Wilson SE. LASIK-associated dry eye and neurotrophic epitheliopathy: pathophysiology and strategies for prevention and treatment. *J Refract Surg*. 2008;24(4):396-407.
5. Sekundo W, Kunert KS, Blum M. Small incision corneal refractive surgery using the small incision lenticule extraction (SMILE) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: results of a 6 month prospective study. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(3):335-339.
6. Moshirfar M, Albarracin JC, Desautels JD, Birdsong OC, Linn SH, Hoopes PC. Ectasia following small-incision lenticule extraction (SMILE): A review of the literature. *Clin Ophthalmol*. 2017;11:1683-1688.
7. Ivarsen A, Hjortdal JØ. Topography-guided Photorefractive Keratectomy for irregular astigmatism after small incision lenticule extraction. *J Refract Surg*. 2014;30(6):429-432.
8. Wilson SE. Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon: programmed cell death and wound healing. *J Refract Surg*. 1997;13(2):171-175.
9. Wilson SE. Keratocyte apoptosis in refractive surgery. *Contact Lens Assoc Ophthalmol J*. 1998;24(3):181-185.
10. Jester J V, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavanagh HD, Petroll WM, Piatigorsky J. The cellular basis of corneal transparency: evidence for “corneal crystallins.” *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 5):613-622.
11. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18(3):311-356.
12. Baldwin HC, Marshall J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. *Acta OphthalmolScand*. 2002;80(3):238-247.
13. Marino GK, Santhiago MR, Torricelli AAM, Santhanam A, Wilson SE. Corneal Molecular and Cellular Biology for the Refractive Surgeon: The Critical role of the epithelial basement membrane. *J Refract Surg*. 2016;32(2):118-125.
14. Santhiago MR, Netto M V, Wilson SE. Mitomycin C: Biological effects and use in refractive surgery. *Cornea*. 2012;31(3):311-321.
15. Netto MV, Mohan RR, Sinha MS, Sharma A, Gupta PC, Wilson SE. Effect of

- prophylactic and therapeutic mitomycin C on corneal apoptosis, cellular proliferation, haze, long-term keratocyte density in rabbits. *J Cataract Surg.* 2006;22(6):562-574.
16. Kim TI, Pak JH, Lee SY, Tchah H. Mitomycin C-induced reduction of keratocytes and fibroblasts after photorefractive keratectomy. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(9):2978-2984.
 17. Wilson SE, Marino GK, Torricelli AAM, Medeiros CS. Injury and defective regeneration of the epithelial basement membrane in corneal fibrosis: A paradigm for fibrosis in other organs? *Matrix Biol.* 2017;64:17-26.
 18. Torricelli AAM, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-Stromal injury. *Exp Eye Res.* 2016;142:110-118.
 19. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol.* 2014;59(3):263-285.
 20. Wilson SE, Medeiros CS, Santhiago MR. Pathophysiology of corneal scarring in persistent epithelial defects after PRK and other corneal injuries. *J Refract Surg.* 2018;34(1):59-64.
 21. Quinto GG, Camacho W, Behrens A. Post refractive surgery dry eye. *Curr Opin Ophthalmol.* 2008;19(4):335-341.
 22. Garcia R, Campello Horovitz RN, Torricelli AA, Mukai A, Bechara SJ. Improved evaluation of postoperative pain after Photorefractive Keratectomy. *Cornea.* 2016; 35(2):205-9.
 23. Garcia R, Torricelli AA, Mukai A, Pereira V, Bechara S. Predictors of early postoperative pain after Photorefractive Keratectomy. *Cornea.* 2016; 35(8):1062-68.
 24. Garcia R, de Andrade DC, Teixeira MJ, Nokazi SS, Bechara SJ. Mechanisms of corneal pain and implications for postoperative pain after laser correction of refractive errors. *Clin J Pain.* 2016; 32(5):450-8.
 25. Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, Lassance L, Thangavadivel S, Medeiros CS, et al. Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits. *Exp Eye Res.* 2017;161:101-105.
 26. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: Structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003;76(5):521-542.
 27. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res.* 2010;90(4):478-492.
 28. Beuerman RW, Schimmelpfennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol.* 1980;69(1):196-201
 29. Zander E, Weddell G. Observations on the innervation of the cornea. *J Anat.* 1951;85(1):68-99.
 30. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. 22. Ultrastructural organization of human corneal

- nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(4):476-488.
31. He J, Bazan NG, Bazan HEP. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp Eye Res*. 2010;91(4):513-523. d
 32. Al-Aqaba M a, Fares U, Suleman H, Lowe J, Dua HS. 20. Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(6):784-789.
 33. Marfurt CF, Kingsley RE, Echtenkamp SE. Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30(3):461-472.
 34. Rózsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*. 1982;14(2):105-120.
 35. Kohlhaas M, Draeger J, Bohm A, Lombardi M, Abbondanza M, Zuppardo M, et al. Aesthesiometry of the cornea after refractive corneal surgery]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1992;201(4):221-223.
 36. Netto MV, Mohan RR, Sinha S, Sharma A, Dupps W, Wilson SE. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res*. 2006;82(5):788-797.
 37. Moody MW, Lang H, Spiess AC, Smythe N, Lambert PR, Schmiedt RA. Topical application of mitomycin C to the middle ear is ototoxic in the gerbil. *Otol Neurotol*. 2006;27(8):1186-1192.
 38. Kornek G V, Haider K, Kwasny W, et al. Effective treatment of advanced breast cancer with vinorelbine, 5-fluorouracil and l-leucovorin plus human granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Cancer*. 1998;78(5):673-678. h
 39. Sui T, Zhang J, Du S, Su C, Que J, Cao X. Potential risk of mitomycin C at high concentrations on peripheral nerve structure. *Neural Regen Res*. 2014;9(8):821-827.
 40. Mietz H, Addicks K, Diestelhorst M, Krieglstein GK. Intraocular toxicity to ciliary nerves after extraocular application of Mitomycin C in rabbits. *Int Ophthalmol*. 1995;19(2):89-93.
 41. Mietz H, Prager TC, Schweitzer C, Patrinely J, James R, Valenzuela JR. Effect of mitomycin C on the optic nerve in rabbits.. *Br J Ophthalmol*. 1997;81(7):584-589.
 42. Tervo T, Moilanen J. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(3):339-358.
 43. Tervo K, Latvala TM, Tervo TMT. Recovery of Corneal Innervation Following Photorefractive Keratoablation. *Arch Ophthalmol*. 1994;112(11):1466-1470.
 44. Moilanen JAO, Vesaluoma MH, Müller LJ, Tervo TMT. Long-term corneal morphology after PRK by in vivo confocal microscopy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(3):1064-1069.
 45. Heinz P, Bodanowitz S, Wiegand W, Kroll P. In vivo observation of corneal nerve regeneration after photorefractive keratectomy with a confocal videomicroscope. *Ger J Ophthalmol*. 1997;5(6):373-377.
 46. Erie JC, Patel S V, Bourne WM. Aberrant corneal nerve regeneration after PRK.

- Cornea*. 2003;22(7):684-686.
47. Patel DV, McGhee CNJ. In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: A review. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(7):853-860. doi:10.1136/bjo.2008.150615.
 48. Kauffmann T, Bodanowitz S, Hesse L, Kroll P. Corneal reinnervation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis: an in vivo study with a confocal videomicroscope. *Ger J Ophthalmol*. 1996;5(6):508-512.
 49. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester J V. Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy: A 1-year confocal microscopic study. *Ophthalmology*. 2000;107(7):1235-1245.
 50. Frueh BE, Cadez R, Bohnke M. In vivo confocal microscopy after photorefractive keratectomy in humans. A prospective, long-term study. *ArchOphthalmol*. 1998;116:1425-1431.
 51. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(6):1059-1064.
 52. Linna T, Tervo T. Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res*. 1997;16(7):640-649.
 53. Rozsa AJ, Guss RB, Beuerman RW. Neural remodeling following experimental surgery of the rabbit cornea. *Investig Ophthalmol Vis*. 1983; 24:1033-51.
 54. Tervo T. Histochemical demonstration of cholinesterase activity in the cornea of the rat and the effect of various denervations on the corneal nerves. *Histochemistry*. 1976;47(2):133-143.
 55. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res*. 2015;49:1-16.
 56. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*. 2012;96:614-618.
 57. World Health Organization. Causes of blindness and visual impairment. Available at: <http://www.who.int/blindness/causes/en>. Accessed August 27, 2018.
 58. Wilson SE, Marino GK, Medeiros CS, Santhiago MR. Phototherapeutic Keratectomy: Science and Art. *J Refract Surg*. 2017. 33(3):203-210.
 59. Saikia P, Medeiros CS, Thangavadivell S and Wilson SE. Basement membranes in the cornea and other organs that develop fibrosis. *Cell and Tissue Research*. 2018.
 60. Rajan MS, Jaycock P, O'Brart D, Nystrom HH, Marshall J. A long-term study of photorefractive keratectomy: 12-Year follow-up. *Ophthalmology*. 2004;111(10):1813-1824.
 61. McClintic SM, Srinivasan M, Mascarenhas J, Greninger DA, Acharya NR, Lietman TM, et al. Improvement in corneal scarring following bacterial keratitis. *Eye*. 2013;27(3):443-446.

62. Siganos CS, Tsiklis NS, Miltsakakis DG, Georgiadis NS, Georgiadou IN, Kymionis GD, et al. Changing indications for penetrating keratoplasty in Greece, 1982-2006: A multicenter study. *Cornea*. 2010;29(4):372-374.
63. Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, Torricelli AAM, Wilson SE. Regeneration of defective epithelial basement membrane and restoration of corneal transparency after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg*. 2017;33(5).
64. Kuo IC, Lee SM, Hwang DG. Late-Onset Corneal Haze and Myopic Regression after Photorefractive Keratectomy (PRK). *Cornea*. 2004;23(4):350-355.
65. Gomes BAF, Smadja D, Espana EM, Ahn ES, Netto M V., Santhiago MR. Very late-onset corneal scar triggered by trauma after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(9):1694-1697.
66. Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(2):276-283.
67. Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res*. 1996;62(4):325-337.
68. Medeiros CS, Lassance L, Saikia P, Santhiago M, Wilson SE. Posterior stromal cell apoptosis triggered by mechanical endothelial injury and basement membrane component nidogen-1 production in the cornea. *Exp Eye Res*. 2018;172:30-35.
69. Xia Y, Chai X, Zhou C, Ren Q. Corneal nerve morphology and sensitivity changes after ultraviolet A/riboflavin treatment. *Exp Eye Res*. 2011;93(4):541-547.
70. Lassance L, Marino GK, Medeiros CS, Thangavadivel S, Wilson SE. Fibrocyte migration, differentiation and apoptosis during the corneal wound healing response to injury. *Exp Eye Res*. 2018;170:177-187.
71. Torricelli AAM, Singh V, Santhiago MR, Wilson SE. The corneal epithelial basement membrane: Structure, function, and disease. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(9).
72. Jester J V., Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGF β induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF β , PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res*. 2002;75(6):645-657.
73. Granstein RD, Staszewski R, Knisely TL, Zeira E, Nazareno R, Latina M, et al. Aqueous humor contains transforming growth factor-beta and a small (less than 3500 daltons) inhibitor of thymocyte proliferation. *J Immunol*. 1990;144(8):3021-3027.
74. Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(17):2879-2895.
75. Tuori A, Uusitalo H, Burgeson RE, Terttunen J, Virtanen I. The immunohistochemical composition of the human corneal basement membrane. *Cornea*. 1996;15(3):286-294.
76. Kohfeldt E, Sasaki T, Göhring W, Timpl R. Nidogen-2: A new basement membrane

- protein with diverse binding properties. *J Mol Biol.* 1998;282(1):99-109.
77. Torricelli AAM, Marino GK, Santhanam A, Wu J, Singh A, Wilson SE. Epithelial basement membrane proteins perlecan and nidogen-2 are up-regulated in stromal cells after epithelial injury in human corneas. *Exp Eye Res.* 2015;134:33-38.
 78. Saikia P, Thangavadivel S, Medeiros CS, Lassance L, de Oliveira RC, Wilson SE. IL-1 and TGF- β modulation of epithelial basement membrane components Perlecan and Nidogen production by corneal stromal cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(13):5589-5598.
 79. Torricelli AAM, Singh V, Agrawal V, Santhiago MR, Wilson SE. Transmission electron microscopy analysis of epithelial basement membrane repair in rabbit corneas with haze. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(6):4026-4033.
 80. Medeiros CS, Marino GK, Lassance L, Thangavadivel S, Santhiago MR, Wilson SE. The impact of Photorefractive Keratectomy and Mitomycin C on corneal nerves and their regeneration. *J Refract Surg.* 2018. doi:10.3928/1081597X-20181112-01
 81. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst.* 2002;7(1):13—27.
 82. De Felipe C, Belmonte C. c-Jun expression after axotomy of corneal trigeminal ganglion neurons is dependent on the site of injury. *Eur J Neurosci.* 1999;11(3):899-906.
 83. Gambato C, Miotto S, Cortese M, Ghirlando A, Lazzarini D, Midena E. Mitomycin C – Assisted Photorefractive Keratectomy in High Myopia : A Long-term Safety Study. 2011;30(6):641-645.
 84. Stepp MA, Tadvalkar G, Hakh R, Pal-Ghosh. Corneal epithelial cells function as surrogate schwann cells for their sensory nervs. *GLIA.* 2017;65(8):851–863.
 85. Chan KY, Jarvelainen M, Chang JH, Edenfield MJ. Edenfield MJ. A cryodamage model for studying corneal nerve regeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(10):2008-2021.
 86. Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(8):1582-1593.
 87. Bargagna-Mohan P, Ishii A, Lei L, Sheehy D, Pandit S, Chan G, et al. Sustained activation of ERK1/2 MAPK in Schwann cells causes corneal neurofibroma. *J Neurosci Res.* 2017;95(9):1712-1729.
 88. Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS, Furthmayr H. Models for the self-assembly of basement membrane. *J Histochem Cytochem.* 1986;34(1):93-102.
 89. Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D, Streilein JW. Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(8):2201-2211.
 90. Nakahori Y, Katakami C, Yamamoto M. Corneal endothelial cell proliferation and

- migration after penetrating keratoplasty in rabbits. *Jpn J Ophthalmol*. 1996;40:271
91. Iovieno A, Neri A, Soldani AM, Adani C, Fontana L. Descemetorhexis Without Graft Placement for the Treatment of Fuchs Endothelial Dystrophy: Preliminary Results and Review of the Literature. *Cornea*. 2017;36(6):637-641.
92. Müller TM, Verdijk RM, Lavy I, Bruinsma M, Parker J, Binder PS, et al. Histopathologic Features of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft Remnants, Folds, and Detachments. *Ophthalmology*. 2016;123(12):2489-2497.