RENATO AMBRÓSIO JÚNIOR

**Estudo laboratorial da cicatrização de córneas
humanas após debridamento epitelial**

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

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Newton Kara José

Co-orientador: Prof Dr. Milton Ruiz Alves

São Paulo

2004

Ao meu saudoso pai, Renato,

que com seu exemplo colocou-me neste caminho e
me guiará durante toda a minha vida.

À minha mãe, Vera,

que com sua força, coragem e amor,
ajuda-me a crescer, em todos os sentidos.

Toda a gratidão, reconhecimento e amor do seu filho.

Ao meu avô, Cimine,

quem me dá grande exemplo para, realmente, ser médico.

E às minhas queridas avós, Marieta e Maura,

a quem amo muito.

Ao meu avô, Vicente,

a quem conheci e aprendi a admirar

apenas através das memórias de meu pai e meus tios.

Ao meu irmão, Rodrigo,

amigo e colega de profissão,

com quem desejo estar sempre junto.

Aos pacientes

que, mesmo sem receber benefício algum,
generosamente aceitaram participar deste estudo.

Ao Professor Dr. Steven E. Wilson,

Pessoa admirável profissionalmente e pessoalmente pela sua dedicação à esposa e filhos. Um grande exemplo de competência, conhecimento e dedicação, com quem aprendi não somente Córnea e Cirurgia Refrativa, mas que colocou-me no caminho para ser um verdadeiro clínico-cientista.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Newton Kara José,

exemplo de dedicação, competência e liderança, com quem aprenderei sempre.

Ao Professor Dr. Milton Ruiz Alves,

modelo a ser seguido, pela fundamental ajuda ao desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Edméa Temporini,

pelas valiosas contribuições e orientações para o desenvolvimento desta tese.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Rodrigues Alves,

por seu incentivo à pesquisa científica e dedicação ao curso de pós-graduação.

À Srta. Regina de Almeida,

por sua sinceridade, amizade e grande apoio ao serviço de pós-graduação.

Ao Dr. Paulo César Fontes,

por sua amizade, consideração e apoio à minha vida profissional.

Ao Dr. David J. McIntyre,

exemplo em todos os sentidos, pelo seu constante estímulo e valiosos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Robert Kalina,

por entender a importância deste estudo e prestar sua fundamental colaboração.

Ao Professor Dr. Brian Syres,

por apoiar este estudo, ajudando a conseguir mais pacientes.

Ao Professor Dr. Melvin I. Freeman,

por sua inestimável amizade.

Ao Professor Dr. James Zieske,

por sua colaboração neste estudo, realizando as técnicas de Ki67 e SMA.

Ao casal Dan Possin e Dra. Jing Huang,
pelas valiosas colaborações na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Maurício Bastos Pereira,
por estar sempre disposto a colaborar com um amigo.

À Prof. Dra. Viviane Maria Montenegro Torres,
uma grande amiga, pela sua sinceridade e apoio.

Ao Professor Kimura,
pela sua amizade e carinho.

Ao Dr. Tadeu Cvintal,
por seus valiosos ensinamentos.

Aos Drs. Newton Kara José Jr., Samir Bechara, Ruth Santo, Fernando Cresta e todos os amigos e colegas da Universidade de São Paulo.

Aos Drs. Marcelo Vieira Netto, Laura M. Periman, Jikui Shen, Rajiv R. Mohan e Rahul R. Mohan e todos os amigos da Universidade de Washington.

Aos instrutores, amigos e colegas de residência do Instituto de Oftalmologia Tadeu Cvintal.

SUMÁRIO

Resumo	xiii
Summary	xv
I – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	7
II - REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 Aspectos anatomofisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal.....	9
2.2 Regeneração epitelial e cicatrização corneana	17
2.2.1 Apoptose dos Ceratócitos	28
2.2.2 Resposta Proliferativa	34
2.2.3 Formação de Miofibroblastos	35
III - CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
3.1 Tipo de Estudo	39
3.2 População e Amostra	39
3.3 Variáveis.....	41
3.4 Instrumentos.....	41
3.5 Procedimentos e Técnicas	42
IV – RESULTADOS.....	52
4.1. Análise Histopatológica	57
4.2. Análise Histoquímica e Imuno-Histoquímica	60
4.2.1 Ensaio do TUNEL.....	60
4.2.2 Ki 67	64
4.2.3 Formação de miofibroblastos – células positivas para SMA	67
4.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	68
4.4. Microscopia Confocal <i>in vivo</i>	71
V – DISCUSSÃO	76
VI – CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	117
APÊNDICE	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	58
Figura 2.....	58
Figura 3.....	59
Figura 4.....	59
Figura 5.....	61
Figura 6.....	61
Figura 7.....	62
Figura 8.....	62
Figura 9.....	63
Figura 10.....	65
Figura 11.....	65
Figura 12.....	66
Figura 13.....	69
Figura 14.....	69
Figura 15.....	70
Figura 16.....	70
Figura 17.....	73
Figura 18.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.....	22
Quadro 2.....	25
Quadro 3.....	55
Quadro 4.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
M	Molar
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
seg	Segundos
U	Unidades
UI	Unidades internacionais
%	porcentagem
=	igual a
OH ⁻	hidroxila terminal
DNA	Ácido desoxiribonucleico
OCT	molde para preservação por congelamento (<i>Optimal Culture Temperature</i>)
FL	Filme lacrimal
SMA	proteína actina músculo liso (<i>Smooth Muscle Actin</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
PBS	Solução salina em tampão fosfato
MgCl	Cloreto de Magnésio
H ₂ O	Água

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
BSS	solução balanceada (<i>balanced salt solution</i>)
WA	estado de Washington (Estados Unidos da América)
MA	estado de Massachussets (Estados Unidos da América)
EUA	Estados Unidos da América
Masc.	do sexo masculino
Fem.	do sexo feminino
PRK	Ceratectomia Fotorrefrativa (<i>Photorefractive Keratectomy</i>)
LASIK	<i>Laser in situ keratomileusis</i>
LASEK	Ablação de superfície com retalho epitelial (<i>Laser sub-epithelial keratomileusis</i>)

RESUMO

A cicatrização corneana, após trauma, é uma complexa sequência de eventos. Esta resposta é importante na fisiopatologia de diversas doenças e influencia os resultados de quaisquer procedimentos cirúrgicos realizados sobre a córnea, como transplantes e cirurgias refrativas. O conhecimento da sequência de eventos envolvidos na resposta cicatricial da córnea, tanto no nível celular quanto no molecular, é fundamental para elaborar estratégias, visando o seu controle. Muitos estudos envolvendo modelos animais ampliaram o conhecimento sobre a cicatrização corneana, porém a avaliação laboratorial de eventos da cicatrização na córnea humana normal não foi encontrada na literatura pesquisada. **Objetivo:** Verificar eventos cicatriciais precoces após debridamento epitelial central de córneas humanas. **Métodos:** Córneas normais de pacientes, com indicação cirurgia de enucleação para tratar tumores malignos, foram submetidas a debridamento do epitélio antes da cirurgia. Os eventos cicatriciais foram avaliados por meio de histologia e imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo anti-Ki67 e anticorpo anti proteína alfa actina do músculo liso (SMA), ensaio de TUNEL, microscopia eletrônica e microscopia confocal. **Resultados:** Seis córneas foram preservadas entre 30 minutos e 65 horas após debridamento epitelial. O filme lacrimal de uma córnea foi removido depois da enucleação, antes do debridamento. Células em apoptose no estroma anterior foram observadas em todos os casos debridados. Houve variação entre cada espécime no número de células em apoptose. Células

estromais em proliferação foram verificadas apenas no tempo de 65 horas. Miofibroblastos não foram encontrados. **Conclusões:** Após debridamento epitelial central, ceratócitos presentes na região estromal anterior de córneas humanas sofrem apoptose. Ceratócitos remanescentes da região posterior proliferam e migram para repovoar a área sem células. Os eventos observados em córneas humanas foram semelhantes aos descritos em animais.

SUMMARY

Corneal wound healing following trauma is a complex sequence of events. This response is important for the pathophysiology of several diseases, as well as, for the outcomes of any surgical procedure accomplished on the cornea, such as transplants and refractive surgeries. The knowledge of the sequence of events involved in the corneal wound healing, in the cellular and molecular level is fundamental to elaborate strategies, seeking for controlling this biological variable. Studies involving animal models enlarged the knowledge on corneal wound healing. The evaluation of these events in the normal human cornea was not done. **Objective:** To verify early events of corneal wound healing in human corneas after central epithelial scrape. **Methods:** Patients with normal corneas that needed surgery for removal the eye because of malignancy were consented to the study. Central epithelial scrape was performed at several time points prior to surgery. Preservation of the cornea was accomplished immediately after eye's removal. The corneas were studied by histology, TUNNEL, Ki67, SMA, electronic microscopy and confocal microscopy. **Results:** Six corneas were preserved from 30 minutes and 65 hours after epithelial scrape. The tear film of one cornea was removed after enucleation, before scrape. One cornea was not wounded. Cells undergoing apoptosis in the anterior stroma were observed in all of the scraped cases. Each specimen presented different number of cells undergoing apoptosis. Proliferation of stromal cells was observed only in the

time of 65 hours. Myofibroblasts were not identified. **Conclusions:** After epithelial injury, the anterior keratocytes undergo programmed cell death. The remaining posterior keratocytes proliferate and migrate to repopulate the depleted area. The events observed in human corneas were similar to the ones described in animals.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A reparação do tecido corneano após trauma, programado ou acidental, inicia-se com uma complexa seqüência de eventos que são extremamente bem organizados em níveis molecular e celular, compreendendo a resposta biológica para o reparo tecidual ou cicatrização corneana (WILSON, 1999; WILSON et al., 2001a; WILSON et al., 2003). Os eventos incluídos nesta resposta participam na fisiopatologia de diversas doenças, como o ceratocone (RABINOWITZ, 1998) e as ceratites infecciosas (PAVAN-LANGSTON, 1990), e também influenciam os resultados de quaisquer procedimentos cirúrgicos realizados sobre a córnea, como transplantes (WILSON e KAUFMAN, 1990) e cirurgias refrativas (WILSON et al., 2001b).

O advento das cirurgias refrativas, particularmente a ceratotomia radial, no final da década de 1970, resultou no aumento de pesquisas básicas sobre a cicatrização da córnea (GUIMARÃES et al., 1987; BINDER, 1989). Como as cirurgias refrativas são feitas em olhos sadios é fundamental conhecer a resposta biológica que ocorre após essas cirurgias. Estes

conhecimentos básicos influenciaram a avaliação de segurança e a aceitação das novas alternativas terapêuticas. O surgimento e a rápida popularização do Excimer laser, na segunda metade da década de 1980, aumentaram significativamente a previsibilidade das cirurgias refrativas (ARON-ROSA et al., 1985; MCDONALD et al., 1987) e o interesse por essa subespecialidade da Oftalmologia. A partir desta época, verifica-se um grande crescimento no volume de publicações científicas sobre a cicatrização corneana (WILSON, 1997, 1998; BALDWIN e MARSHALL, 2002; AMBROSIO et al., 2003a).

A resposta cicatricial da córnea varia em diferentes indivíduos, ou nos olhos de um mesmo paciente. A diversidade biológica desta resposta é apontada como um dos principais fatores limitantes para a previsibilidade e eficácia das cirurgias refrativas (BINDER, 1989; EIFERMAN, 1989; WILSON, 1997; HELENA et al., 1998; AMBROSIO e WILSON, 2001; WILSON et al., 2001b; AMBROSIO et al., 2002; BALDWIN e MARSHALL, 2002; WILSON, 2002; AMBROSIO et al., 2003a; AMBROSIO e WILSON, 2003b; MOHAN et al., 2003). A resposta cicatricial à ablação de tecidos corneanos, realizada como parte de procedimentos refrativos feitos com o Excimer laser (PTK, LASIK, LASEK e PRK) pode determinar resultados de hipo ou hipercorreções (MALDONADO-BAS e ONNIS, 1998; SHAH et al., 1998; ALIO et al., 2000; AMBROSIO et al., 2003a; AMBROSIO e WILSON, 2003a; AMBROSIO e WILSON, 2003b; FAGERHOLM, 2003). Alterações na resposta cicatricial corneana são, também, responsáveis por diversas complicações que podem ocorrer após essas cirurgias, como o infiltrado

inflamatório difuso da interface no LASIK (ALIO et al., 2000; AMBROSIO e WILSON, 2001; WILSON e AMBROSIO, 2002; AMBROSIO et al., 2003b), síndrome do olho seco (WILSON, 2001; WILSON e AMBROSIO, 2001; WILSON et al., 2002; AMBRÓSIO et al., 2003), indução de irregularidades (MOLLER-PEDERSEN et al., 1998; LINNA et al., 2000; MOLLER-PEDERSEN et al., 2000) e opacidade estromal (MEYER et al., 1996; MOLLER-PEDERSEN et al., 1998; FAGERHOLM, 2000).

A possibilidade de modulação da resposta cicatricial corneana vem sendo procurada por estudiosos de córnea e segmento anterior, em todo o mundo. Compreende-se por modulação da resposta cicatricial o ato de modificar etapas específicas dessa complexa seqüência de eventos, de modo a obter resultados mais previsíveis (WILSON, 1997). Esse tipo de abordagem permitirá melhorar significativamente a previsibilidade e segurança dos procedimentos cirúrgicos que envolvem a córnea. Além disso, será possível também atuar na patogênese de diversas doenças, como o ceratocone, retardando ou mesmo impedindo a sua evolução (WILSON, 1998; KIM et al., 1999a,b; KENNEY et al., 2000; KALDAWY et al., 2002; ZIANGIROVA e ANTONOVA, 2002; WOLLENSAK et al., 2004). O conhecimento e o controle da seqüência de eventos envolvidos na resposta cicatricial da córnea, tanto no nível celular quanto no molecular, é fundamental para elaborar estratégias, visando o seu controle (WILSON, 1997; WILSON et al., 2001b; AHMADI e JAKOBIEC, 2002; BALDWIN e MARSHALL, 2002; AMBRÓSIO et al., 2003a).

Diversos estudos envolvendo modelos animais ou culturas de células *in vitro* foram desenvolvidos para ampliar o conhecimento sobre a cicatrização corneana (AMBRÓSIO et al., 2002a). O modelo que utiliza coelhos está entre os mais empregados devido ao custo relativamente baixo, à praticidade de criação e manutenção dos animais em biotério e à semelhança anatômica com o olho humano (ALVES et al. 1994; AMM et al., 1996; KATO et al., 1999; PARK e KIM, 1999; WACHTLIN et al., 1999; NAKAMURA et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2003; MOHAN et al., 2003; WILSON et al., 2003b). Outros modelos que utilizam animais incluem roedores (ZIESKE, 2000; CHAKRAVARTI, 2001; ZIESKE et al., 2001; NAGANO et al., 2003), aves (GOMEZ et al., 2001; MERAYO-LLOVES et al., 2001; LEE et al., 2002) e até primatas (MARSHALL et al., 1988; DEL PERO et al., 1990; FANTES et al., 1990; MCDONALD et al., 1990; MELLES et al., 1998). Esses estudos permitem identificar a seqüência de eventos da cicatrização corneana, facilitando um raciocínio linear e didático a respeito dessa questão.

As pesquisas anteriores envolvendo córneas humanas limitaram-se a estudos histopatológicos e, em muitos casos, os espécimes eram obtidos *post mortem* por meio de banco de olhos (RUMELT et al., 2001; ANDERSON et al., 2002; NAOUMIDI et al., 2003; PALLIKARIS et al., 2003; PHILIPP et al., 2003). LATVALA et al. (1996) verificaram os efeitos do LASIK em córneas humanas removidas em decorrência de diferentes afecções, e KOCH et al. (1996) examinaram os resultados da termoceratoplastia por

laser (LTK), realizada um dia antes do transplante em córneas com ceratocone e distrofia endotelial de Fuchs.

O surgimento da microscopia confocal *in vivo* possibilitou a avaliação clínica da resposta celular em nível celular (BOHNKE et al., 1997; STEINERT, 1997; KAUFMAN et al., 1998; MOLLER-PEDERSEN et al., 1998c; BOHNKE e MASTERS, 1999; LINNA et al., 2000; BUHREN et al., 2002; VINCIGUERRA et al., 2002; BUHREN e KOHNEN, 2003; HARRISON et al., 2003; PEREZ-GOMEZ e EFRON, 2003; TERVO e MOILANEN, 2003). Porém, apesar de contribuir significativamente para a compreensão da cicatrização da córnea, a microscopia confocal *in vivo* não permite, ainda, a utilização associada de técnicas histoquímicas que auxiliem a determinar se a célula está em processo de apoptose, proliferação ou diferenciação.

A avaliação laboratorial de eventos da cicatrização na córnea humana normal não foi encontrada na literatura pesquisada. Esse trabalho estuda a fase precoce da resposta cicatricial corneana após o debridamento epitelial em humanos, num modelo que incluiu pacientes aos quais havia sido indicada cirurgia de enucleação ou exenteração.

1.1.OBJETIVOS

Verificar os seguintes eventos precoces da cicatrização corneana após o debridamento epitelial central de seres humanos:

- processo de morte celular programada (apoptose) dos ceratócitos da região estromal anterior;
- resposta celular proliferativa no epitélio e no estroma;
- formação de miofibroblastos no estroma.

II. REVISÃO DA LITERATURA

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos anatomofisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal

A córnea é um tecido transparente e avascular, em contato com o ambiente externo, que corresponde ao sexto anterior da túnica fibrosa ocular. Além de desempenhar uma função estrutural e de proteção do conteúdo intra-ocular, a córnea apresenta-se como a “janela” transparente do olho, através da qual a luz entra para formar a imagem retiniana que será transmitida ao sistema nervoso central, responsável pela interpretação da imagem. A interface entre o ar atmosférico e a superfície corneana, junto com o filme lacrimal (FL), provêem cerca de dois terços do poder convergente refrativo do olho humano (HELMHOLTZ, 1924) apud (KATZ e KRUGER, 2002). Esse fato faz com que a modificação das propriedades ópticas da córnea seja a estratégia mais utilizada na cirurgia refrativa (WARING, 1992, 1999; BELIN, 2002). Assim, a conservação da integridade e da transparência da córnea são fundamentais para manter o processo da visão (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001).

Apesar de ser um tecido avascular, a córnea apresenta-se como um tecido extremamente ativo. Sua nutrição vem do FL; da conjuntiva tarsal posterior das pálpebras; das arcadas vasculares, presentes no limbo, que são ramos da artéria ciliar anterior e do humor aquoso.

O FL proporciona à superfície ocular um ambiente úmido e promove nutrição, proteção e uma interface óptica homogênea. O FL fornece à córnea nutrientes e oxigênio, além de ter uma série de substâncias com propriedades bactericidas. Possui pH de aproximadamente 7,2, osmolaridade de 302 mOsm/l e um volume de 7,0 μ l (MATHERS et al., 1996). A espessura do FL é difícil de medir, porém, acredita-se que gire em torno de 10 micra (WANG et al., 2003).

Tradicionalmente, considera-se que o FL seja formado por três camadas: lipídica superficial (mais externa), aquosa intermediária e mucina basal em contato com o epitélio (ROLANDO e ZIERHUT, 2001). A camada de mucina é essencial para manter a lubrificação do epitélio da córnea e conjuntiva. Por meio das microvilosidades das células epiteliais da superfície, confere hidrofília à essência hidrofóbica da superfície ocular. Essa camada é formada pela secreção das células caliciformes da conjuntiva (DARTT, 2004). A camada aquosa é produzida pelas glândulas lacrimais principal e acessórias de Krause e Wolfring. Essa camada transporta nutrientes solúveis em água, substâncias bactericidas como lactoferrina, imunoglobulinas, lisozima, β -lisina e defensinas (HAYNES et al., 1999). Fatores de crescimento essenciais para determinar a proliferação e diferenciação do epitélio da superfície ocular, como fator de crescimento epidermal – EGF (*epidermal growth factor*), fator de

crescimento do hepatócito – HGF (*hepatocyte growth factor*) e fator de crescimento do ceratócito – KGF (*keratinocyte growth factor*) estão presentes na camada aquosa do FL (WILSON, 1991; LOHMANN et al., 1998; WILSON et al., 1999; FAGERHOLM, 2000; BALDWIN e MARSHALL, 2002). A camada lipídica é formada, essencialmente, pela secreção das glândulas de Meibomius, e sua função é retardar a evaporação, estabilizando o FL. Essas glândulas são ricamente enervadas e sua secreção pode ser modificada, qualitativa ou quantitativamente, por hormônios (SULLIVAN et al., 1999; SULLIVAN et al., 2002; SUZUKI et al., 2002a; SUZUKI et al., 2002b), por dietas (AMBRÓSIO et al., 2002c) e por ação de bactérias (SUZUKI et al., 2002a; SHINE et al., 2003). A disfunção das glândulas de Meibomius (DGM) pode resultar na instabilidade do FL e em alterações da superfície ocular (SMITH e FLOWERS, 1995).

Como parte do epitélio da superfície ocular, o epitélio corneano é do tipo pavimentoso estratificado, não-ceratinizado, e repousa sobre uma membrana basal composta basicamente de colágeno do tipo IV e proteínas da matriz extracelular. O epitélio da córnea tem características próprias que o distinguem do epitélio límbico e conjuntival (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001; LU et al., 2001). Ele é transparente, extremamente compacto, não possui células caliciformes e está longe de vasos sanguíneos. Desse modo, o epitélio da córnea compõe, junto com o FL, a superfície ideal do sistema óptico ocular.

O epitélio da córnea tem aproximadamente 50 µm de espessura e é formado por cinco a sete camadas de células: uma camada de células

colunares basais, duas ou três camadas de células intermediárias e duas ou três camadas de células superficiais (SMOLEK e KLYCE, 2002). As células mais superficiais são poligonais e achatadas, com poucas organelas citoplasmáticas. A espessura destas células é de 4 a 6 μm , na região dos núcleos, e 2 μm na periferia celular. Estas células apresentam microvilos, isto é, projeções na porção externa que determinam maior superfície de contato com a camada mucosa do FL (NISHIDA, 1998). Por serem parte da camada celular em contato com o meio externo, há um complexo sistema de adesão entre as células. A “*zônula ocludens*” funciona como uma barreira mecânica que protege a córnea e diminui a descamação prematura destas células. Durante o processo de descamação, os desmossomas entre as células diminuem ou desaparecem, facilitando o desprendimento da célula (WATSKY et al., 1999). As células intermediárias têm formato alongado com núcleo tipicamente ovalado, daí a designação de “aladas”. Estas células apresentam-se em duas ou três camadas que repousam sobre as células basais, aderentes entre si por meio de projeções citoplasmáticas periféricas denominadas desmossomas (WATSKY et al., 1999; SMOLEK e KLYCE, 2002). As células basais têm um aspecto colunar, com 18 a 20 μm de altura e 8 a 10 μm de diâmetro. A presença de núcleos redondos e uma maior quantidade de organelas citoplasmáticas diferenciam essas células. Na porção posterior, as células basais são planas e estão aderidas à membrana basal por um complexo sistema de hemidesmossomas (AZAR et al., 1989; GIPSON e INATOMI, 1995; ZAGON et al., 2001; ESPANA et al., 2003). Acredita-se que os grânulos de glicogênio presentes no citoplasma das

células basais servem como reserva energética para determinadas situações, como o reparo de um defeito epitelial, quando observa-se intensa atividade mitótica (LU et al., 2001).

As células epiteliais corneanas têm dois mecanismos principais para a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. O primeiro envolve interações moleculares entre receptores localizados na membrana celular epitelial e ligantes de células adjacentes ou da matriz extracelular. Três famílias de moléculas de adesão já foram identificadas: os N-CAM (cálcio-independentes), as caderinas (cálcio-dependentes) e as integrinas. O segundo mecanismo consiste no complexo de adesão à superfície corneana e está representado por junções especializadas do citoesqueleto das células epiteliais e da matriz extracelular estromal, em um complexo membrana basal / camada de Bowman / estroma (AZAR et al., 1989, 1992; ZAGON et al., 2001; ESPANA et al., 2003; AMBRÓSIO, 2003).

A densidade das terminações nervosas não-mielinizadas do epitélio corneal é 300 a 400 vezes maior do que a da epiderme, constituindo o tecido mais enervado, por milímetro quadrado, do corpo humano (TERVO e MOILANEN, 2003). Os nervos sensitivos derivam dos nervos ciliares do ramo oftálmico do nervo de trigêmio. Os nervos ciliares longos provêm o anel nervoso perilímbico, cujas fibras penetram a córnea radialmente no estroma periférico profundo, estendendo-se anteriormente, para formar o plexo sub-epitelial (MULLER et al., 1997; MULLER et al., 2003). As fibras nervosas perdem a camada de mielina depois de passar pela camada de Bowman – fibras nervosas do sistema autônomo simpático também foram descritas na

córnea (MULLER et al., 2003; TERVO et al., 2003). Os nervos corneanos têm, aparentemente, um efeito trófico para a manutenção do epitélio (WILSON, 2001; WILSON e AMBROSIO, 2001; AMBRÓSIO et al., 2003c). Estudos histoquímicos demonstraram a presença de receptores e neurotransmissores, como a substância P, peptídio relacionado ao gene da calcitonina – CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), polipeptídio intestinal vasoativo – VIP, catecolaminas e acetilcolina. Receptores β -adrenérgicos, relacionados com a produção de AMPc e permeabilidade das junções tipo *tight-junctions*, bem como receptores muscarínicos, responsáveis pela produção de GMPc, exercem importantes papéis na regulação da divisão e diferenciação celular (MULLER et al., 2003; TERVO e MOILANEN, 2003). A estimulação das terminações nervosas simpáticas retarda a cicatrização epitelial da córnea (MULLER et al., 2003; TERVO e MOILANEN, 2003). A depleção de neurotransmissores peptidérgicos, como a substância P, inibe a regeneração epitelial (MULLER et al., 2003).

Diferentemente do corneano, o epitélio límbico tem, aproximadamente, entre 10 e 12 camadas de células em espessura, melanócitos, células de Langerhans; além disso, mantém relação com as terminações em alça da rede vascular conjuntival (DUA et al., 1994). Como o epitélio da córnea, não tem células caliciformes. O estroma e epitélio límbicos formam elevações radiais fibrovasculares, denominadas de paliçadas de Vogt, presentes em toda a circunferência da córnea, porém mais bem definidas superior e inferiormente (DUA et al., 1994; KINOSHITA et al., 2001). A densidade das células basais é máxima na região das

paliçadas. A microscopia eletrônica mostra a heterogeneidade nas células epiteliais basais, que se encontram em diferentes estágios de diferenciação nessa região. As células epiteliais mais indiferenciadas são pequenas e redondas, apresentam pouco citoplasma e assemelham-se morfológicamente às células germinativas de outros tecidos (SANGWAN, 2001; BOULTON e ALBON, 2004).

O estroma é um tecido fibroso que compõe mais de 90% da espessura da córnea. O estroma é composto por um arranjo extremamente bem organizado de fibras colágenas e uma matriz extracelular de proteoglicanos, que são glicosaminoglicanos (GAGs) covalentemente aderidos a um núcleo proteico. Dez tipos diferentes de colágenos foram identificados no estroma tanto em formas fibrilares como não fibrilares). Os tipos mais importantes de colágeno são o I, III, V e VI (AHMADI e JAKOBIEC, 2002; KURPAKUS-WHEATER et al., 2001). Um arranjo distinto das fibras de colágeno pode ser observado à microscopia óptica na região mais anterior do estroma. A camada de Bowman não é exatamente uma membrana e sua função não está totalmente esclarecida (KIM et al., 1999c; WILSON e HONG, 2000).

Células estromais correspondem a menos que 3% de sua composição. Os ceratócitos, denominados fibroblastos corneanos quando em cultura de células, são as células mais predominantes. Outras células estão presentes no estroma, como células inflamatórias e outras células do sistema imune (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001). Os ceratócitos apresentam um arranjo tridimensional complexo por meio de filamentos

estruturais do citoesqueleto (NISHIDA et al., 1988). Os ceratócitos são responsáveis pela manutenção dos componentes da matriz estromal. Os ceratócitos sintetizam moléculas de colágeno e GAGs. Ao mesmo tempo, estas células sintetizam metaloproteinases (MMPs) ou gelatinases, que são enzimas capazes de degradar a matriz e o tecido extracelular (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001; SAIKA et al., 2002; SIVAK e FINI, 2002). O processo de homeostase depende de um balanço na síntese e degradação de matriz extracelular.

O tecido estromal é osmoticamente ativo e atrai água para o seu interior – cerca de dois terços da espessura corneana é água. As fibrilas do estroma têm uma orientação espacial específica, com espaços interfibrilares de aproximadamente 55 a 60 nm. Em 1957, MAURICE descreveu a necessidade dessa organização fibrilar para manter a transparência corneana. Para isso é preciso que esses espaços sejam cerca de dez vezes menores do que o comprimento de onda da luz visível (400 a 700 nm). Assim, a hidratação estromal deve ser constante, de modo a não interferir no arranjo das fibras colágenas (MAURICE, 1957).

O endotélio humano constitui-se de uma única camada de 400.000 a 500.000 células com 4 a 6 μm de altura e 20 μm de largura. As superfícies posteriores dessas células são predominantemente hexagonais quando observadas por meio de biomicroscopia, microscopia especular ou confocal. O endotélio humano não prolifera, bem como em outros mamíferos como primatas e felinos. Capacidade proliferativa foi observada no endotélio de coelhos *“in vivo”*. A capacidade proliferativa do endotélio humano foi

observada em cultura celular (JOYCE, 2003). Há fatores no humor aquoso ou no ambiente celular capazes de inibir a proliferação endotelial. A elucidação desses mecanismos terá grande impacto no tratamento de doenças que acometem o endotélio corneano. A contagem de células endoteliais diminui proporcionalmente à idade (EDELHAUSER, 2000).

As células endoteliais têm núcleo grande e organelas citoplasmáticas em abundância, como mitocôndrias, retículos endoplasmáticos, ribossomos livres e complexos de Golgi. O endotélio precisa dessa aparato celular para remover água da córnea e manter a hidratação estromal em torno de 78%. As células endoteliais dispõem de um sistema de transporte de íons que impede a entrada de água no estroma corneano por meio de uma bomba do tipo sódio/potássio ATPase, localizada na membrana basolateral dessas células (GEROSKI e EDELHAUSER, 1984; EDELHAUSER, 2000). Além da bomba do endotélio há uma barreira formada tanto pelo humor aquoso do próprio endotélio e pela membrana de Descemet, quanto pelo epitélio. Os defeitos epiteliais podem causar uma formação de edema estromal devido à perda de barreira que impede a entrada de fluidos do FL.

2.2 Regeneração epitelial e cicatrização corneana

A manutenção da integridade da superfície corneana é considerada o fator mais importante para conservar a transparência e as qualidades ópticas da córnea (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001; LU et al., 2001). O epitélio

corneano é parte integrante da superfície ocular e está em constante regeneração. Estima-se que o epitélio seja constantemente renovado a cada sete a dez dias (HANNA e O'BRIEN, 1960).

Células epiteliais da superfície são constantemente liberadas no filme lacrimal, sendo substituídas no processo de renovação por células que migram em direção à superfície das camadas basais do epitélio – estas são repostas por outras células basais que se movimentam do limbo em direção ao centro. Em 1983, THOFT e FRIEND sugeriram a hipótese “X, Y e Z”, na qual X representa a proliferação das células epiteliais basais; Y, a proliferação e migração centrípeta das células epiteliais límbicas; e Z, a perda celular epitelial da superfície. Para manter um estado de equilíbrio é necessário que $X + Y$ resultem em Z (KINOSHITA et al., 1983; THOFT e FRIEND, 1983).

Células germinativas estão normalmente presentes em tecidos que conservam a capacidade de auto-renovação. Essas células têm ciclo celular longo e grande potencial para a divisão celular, principalmente após a estimulação decorrente dos processos de cicatrização celular (TSENG, 1989). Depois da divisão, algumas células permanecem com ciclo celular longo e outras características germinativas, enquanto outras células, denominadas amplificadoras transitórias (CAT) passam a dividir-se mais rapidamente. Após esta divisão as CAT podem diferenciar-se em células pós-mitóticas (CPM) ou em células terminalmente diferenciadas (CTD) (TSENG, 1989).

O reservatório natural das células germinativas localiza-se no epitélio límbico. Estima-se que 30% das células basais do limbo são germinativas e estão nas cristas das paliçadas de Vogt (TSENG, 1989; DUA et al., 1994; KINOSHITA et al., 2002). Elas expressam a enzima α -enolase, têm inúmeros receptores para EGF, co-expressam queratina 19 e vimentina e não expressam os marcadores de diferenciação K3 e K12 (TSENG, 1989; KINOSHITA et al., 2002). Os fatores responsáveis pela manutenção da condição germinativa dessa população de células estão relacionados com a presença de vasos sangüíneos na região e com a composição da membrana basal do epitélio límbico (DUA et al., 1994).

Após a lesão epitelial corneana inicia-se o processo de cicatrização. Essencialmente, o reparo do defeito epitelial é a amplificação do processo fisiológico de regeneração. O processo de reepitelização começa imediatamente depois da lesão epitelial e envolve interações entre as células epiteliais, estromais, a glândula lacrimal e as células do sistema imunológico (LU et al., 2001; WILSON et al., 2001a).

O reparo do defeito epitelial da córnea pode ser dividido em três fases, de acordo com o tipo de fenômeno preponderante: migração, proliferação e adesão epitelial. Esses fenômenos são integrados e podem ocorrer simultaneamente. Porém, há uma ordem de acontecimentos e a contribuição de cada um varia segundo o tipo e a extensão da lesão (DUA et al., 1994; LU et al., 2002).

Nas primeiras quatro horas após a lesão epitelial, não há resposta proliferativa na região ferida. A área do defeito epitelial pode aumentar devido à perda celular ao redor da lesão (CROSSON et al., 1986).

Inicia-se a migração das células epiteliais na tentativa de fechar o defeito epitelial. As células na periferia da lesão tornam-se achatadas e suas membranas emitem processos digitiformes (*filopodia*) ou coraliformes (*lamellipodia*) que se estendem em direção à ferida (CROSSON et al., 1986). As proteínas intracelulares do tipo actina polimerizam-se para sustentar o movimento migratório que ocorre das porções celulares apicais às regiões basais (DUA et al., 1994). Há um aumento da concentração de fibronectina, fibrinogênio e fibrina, importantes nessa fase de adesão celular (LU et al., 2002; FILENIUS et al., 2003).

Em uma segunda fase, evidencia-se uma intensa atividade mitótica, com a participação de várias camadas celulares. O defeito epitelial é recoberto, inicialmente, por uma única camada de células, com empilhamento progressivo de camadas celulares que mantêm um aspecto alongado semelhante ao das células aladas e superficiais (LU et al., 2002). Uma vez recoberta a área lesada, a migração celular cessa e a resposta mitótica diminui consideravelmente (DUA et al., 1994; LU et al. 2002). Embora sejam eventos distintos e independentes, a migração e a proliferação celular completam-se durante a cicatrização corneana para promover o fechamento do defeito epitelial (DUA et al., 1994).

A cicatrização corneana estará concluída quando o epitélio estiver firmemente aderido ao tecido conectivo adjacente. As adesões permanentes

só serão formadas quando não houver mais defeito epitelial (DUA et al., 1994). Esse processo pode se prolongar durante meses, após a lesão (LU et al., 2002).

Durante o processo de reparo do epitélio corneano há uma complexa seqüência de eventos no estroma, que são regulados pelas interações entre células epiteliais, ceratócitos, nervos corneanos, glândulas lacrimais, filme lacrimal e células do sistema imunológico. Estas interações são mediadas por diversas citocinas e fatores de crescimento (WILSON et al., 1999c; WILSON et al., 2001a; AMBRÓSIO et al., 2002b). A córnea vem sendo considerada modelo para o estudo das interações que ocorrem entre tecidos epiteliais e mesenquimais (WILSON et al., 2003a).

O quadro n.º 1 resume a seqüência de eventos que seguem o trauma epitelial. A adequada caracterização destes eventos individualmente permite uma visão global da cascata da cicatrização corneana, facilitando o entendimento.

Quadro 1 – Cascata da Cicatrização Corneana após Lesão Epitelial

Adaptado de WILSON et al. (2001a,b)

Os acontecimentos relacionados à cicatrização corneana podem ser considerados em um contexto evolucionário para elaborar um sistema eficaz de defesa diante de diferentes formas de agressão (WILSON, 1998; WILSON et al., 2001a; AMBRÓSIO et al., 2002b). Os ceratócitos das camadas anteriores do estroma entram em processo de morte celular programada em resposta à infecção do epitélio corneano por HSV-1 (WILSON et al., 1997). Assim, forma-se um verdadeiro bloqueio à invasão viral, que depende de células vivas, prevenindo a penetração do vírus no interior do bulbo ocular e do sistema nervoso central. Enquanto camundongos normais sobrevivem ao contato com o vírus na superfície, camundongos geneticamente modificados, com defeito no processo de morte celular programada (STAT 1-null) morrem por encefalite herpética (WILSON, 1999; MOHAN et al., 2000a).

Após o trauma epitelial são liberados os fatores que desencadeiam diversos eventos estromais (WILSON et al., 1996; WILSON e KIM, 1998). A apoptose dos ceratócitos é o primeiro evento que ocorre depois da lesão epitelial. Tipos de trauma epitelial distintos determinam respostas quantitativa e qualitativamente diferentes (HELENA et al., 1997; HELENA et al., 1998; WILSON, 1998; KAPADIA et al., 1999; AMBRÓSIO et al., 2002a; AMBRÓSIO et al., 2002b). MOHAN et al. demonstraram, em coelhos, que a quantidade de apoptose é proporcional a eventos subseqüentes de proliferação das células estromais, infiltrado de células inflamatórias e formação de miofibroblastos (2003).

Diversas citocinas foram identificadas durante o processo cicatricial corneano e constituíram excelentes estratégias terapêuticas para a modulação dessa resposta (BALDWIN e MARSHALL, 2002; BAZAN e OTTINO, 2002). Essas moléculas têm a função de comunicadoras entre as células para determinar o seu comportamento biológico. As células permanecem inativas ou entram em proliferação, diferenciação, crescimento e até morte programada, de acordo com os estímulos das citocinas presentes nos tecidos (WILSON et al., 1996b; MOHAN et al., 1997; LOHMANN et al., 1998; MOHAN et al., 1998; MOLLER-PEDERSEN et al., 1998b; WILSON et al., 1999a; WILSON et al., 1999b; WILSON et al., 1999c; MOHAN et al., 2000b; WILSON e HONG, 2000; LU et al., 2001; MALTSEVA et al., 2001; TUOMINEN et al., 2001; WILSON et al., 2001a; AHMADI e JAKOBIEC, 2002; BALDWIN e MARSHALL, 2002; BAZAN e OTTINO, 2002; JESTER et al., 2002; WILSON et al., 2002; NAGANO et al., 2003; WILSON et al., 2003c). Classificam-se as citocinas em subclasses: fatores de crescimento; interferons; interleucinas; fatores de necrose tumoral e fatores estimuladores de colônias (BALDWIN e MARSHALL, 2002).

O quadro 2 resume os efeitos de diversas citocinas em diferentes respostas celulares das células epiteliais.

Quadro 2. Citocinas com seus respectivos efeitos na regeneração e cicatrização epitelial da córnea.

F. de crescimento /Citocina	Migração	Proliferação	Diferenciação
EGF	↑	↑	↓
b-FGF	↑	↑	↑
HGF	↑	↑	↑
IGF	↑	↑	↑
KGF	↑	↑	↑
NGF	↑	↑	
PDGF	↑		
TGF-α	↑	↑	
TGF-β1	↓	↓	↓
TNF	↑	↑	
IL-1α	↑	↑	↑
IL-6	↑		

EGF: fator de crescimento epidérmico; b-FGF: fator de crescimento fibroblástico básico; HGF: fator de crescimento do hepatócito; IGF: fator de crescimento tipo-insulina; KGF: fator de crescimento do queratinócito; NGF: fator de crescimento neural; PDGF: fator de crescimento derivado da plaqueta; TGF- α : fator transformante- α ; TGF- β 1: fator transformante- β 1; TNF: fator de necrose tumoral; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6. (Adaptado de GOMES et al., 2003)

WILSON et al. (1999) descreveram um aumento significativo na expressão de vários fatores de crescimento que modulam o crescimento epitelial, como o de crescimento do hepatócito – HGF (*Hepatocyte growth factor*) e o de crescimento epidérmico – EGF (*Epidermal growth factor*) logo após lesão epitelial. Coincidentemente, demonstrou-se um aumento da quantidade de HGF e outros fatores na lágrima durante a fase cicatricial precoce, após cirurgia de ablação de superfície (TUOMINEN et al., 2001). Até o aparecimento de ceratócitos ativados na superfície, as glândulas lacrimais são os principais fornecedores de fatores de crescimento, uma vez que os ceratócitos da superfície – os maiores responsáveis pela produção destes fatores – entram em morte celular programada depois da lesão epitelial (WILSON et al., 2001). Estes fatores exercem funções altamente específicas no restabelecimento da integridade da superfície ocular.

Células inflamatórias invadem o estroma corneano cerca de oito a doze horas após uma lesão epitelial (O'BRIEN et al., 1998; HONG et al., 2001; HUANG et al., 2003; MOHAN et al., 2003). Essas células originam-se nos vasos sangüíneos do limbo e do filme lacrimal. Algumas células de defesa podem ser encontradas na córnea normal em estado inativo, e podem ser ativadas com o estímulo adequado (QIAN e DANA, 2001). A função delas é essencialmente de defesa, porém, elas também são responsáveis pela limpeza (*clearance*) dos restos das células que sofreram apoptose. Pouco se sabia sobre quais células inflamatórias estavam envolvidas nesse processo. Entretanto, esses tipos celulares podem ser identificados por meio de técnicas imuno-histoquímicas específicas, como o

CD 11-B. Entre essas células podemos encontrar monócitos, granulócitos, células T e outras (HUANG et al., 2003). Diversas citocinas podem atrair as células inflamatórias para o local da agressão, onde são necessárias – o mecanismo de ativação nesse sistema é bastante complexo. As citocinas MCAF (*monocyte chemotactic and activating factor*) e G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) são produzidas pelos ceratócitos em resposta à IL-1 e ao TNF que são liberados pelas células epiteliais devido ao trauma (HONG et al., 2001). Esse é um dos exemplos mais importantes da existência de interações entre o epitélio e as células do sistema imunológico (WILSON et al., 2001). Não se conhece o mecanismo que faz com que as células inflamatórias desapareçam depois da resolução do processo cicatricial. Algumas células em apoptose podem ser observadas até três meses depois de PRK ou LASIK, sendo esta forma de eliminação celular a mais provável (MOHAN et al., 2002). Esse tipo de informação pode ser muito importante para determinar estratégias terapêuticas nos casos de ceratites infecciosa ou não infecciosa.

Com o fechamento do defeito epitelial há uma tendência a voltar ao estado normal. As células inflamatórias, os miofibroblastos formados e outras células envolvidas na resposta cicatricial tendem a desaparecer do estroma da córnea. O mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está totalmente elucidado. Os miofibroblastos podem diferenciar-se novamente em fibroblastos normais (transdiferenciação reversa), de acordo com os estímulos do meio (MALTSEVA et al., 2002). O processo de morte celular

programada é responsável, em parte, pela eliminação dessas células (MOHAN et al., 2003).

Com a resolução do processo cicatricial, os ceratócitos retornam a um estado inativo ou quiescente. A transparência corneana é, na maioria das vezes, restituída, e há uma tendência ao remodelamento estromal e a hiperplasia epitelial se regularizarem, determinando estabilidade refrativa (GUELL et al., 1999; LOHMANN et al., 1999).

2.2.1 Apoptose dos Ceratócitos

Em 1968, Claes Dohlman observou em coelhos, após lesão epitelial corneana e endotelial, o desaparecimento de ceratócitos do estroma subjacente. Durante duas décadas essa pesquisa permaneceu praticamente ignorada, até que Nakayasu (1988) e Campos et al. (1994) ratificaram tal conclusão em roedores e primatas, respectivamente. Naquela época, o desaparecimento de ceratócitos depois de uma lesão epitelial era atribuído a alterações osmóticas, térmicas, químicas e outras. Em 1996, Steven Wilson e colaboradores publicaram estudos em que demonstraram, por meio de técnicas de histoquímica e microscopia eletrônica, que os ceratócitos sofrem morte celular programada (apoptose) após lesão epitelial (WILSON et al., 1996).

A apoptose de ceratócitos ocorre imediatamente depois de um trauma epitelial e uma intrincada cascata de eventos segue-se a esse fenômeno. Devido à complexidade desses eventos, que podem ocorrer

simultaneamente, a apoptose de ceratócitos ocupa uma posição estratégica nessa cascata, oferecendo alternativa para a modulação da resposta cicatricial. Acredita-se que se esse evento se mantiver uniforme, a resposta subsequente terá menos variações entre indivíduos (WILSON, 1997).

A importância da apoptose como evento fundamental para manter o equilíbrio em sistemas multicelulares deve ser considerada diante de outra alternativa de morte celular. Basicamente, uma célula pode ser eliminada por meio de morte programada – apoptose ou patológica, de forma desorganizada – necrose (WYLLIE et al., 1980; GOLSTEIN, 1997; AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). Nos últimos anos, o estudo da apoptose vem sendo considerado um dos tópicos de maior interesse na biologia celular e molecular (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). Desde a sua definição morfológica, em meados dos anos 70, muito tem sido descoberto sobre a importância desse processo em diversos órgãos e sistemas (WYLLIE et al., 1980; AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999; LINDEN, 2000; WILSON, 2000; WILSON et al., 2002; GUIMARAES et al., 2003).

O processo de necrose ou morte celular patológica acontece em células que sofreram algum tipo de trauma. Após uma injúria não específica, seja química, física ou biológica, ocorrem inicialmente alterações na membrana citoplasmática que resultam na perda da seletividade de membrana causada por alterações na atividade de bombas iônicas ou mesmo por uma lesão estrutural (WILSON e KIM, 1998; AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999; KIM et al., 2000). Estas determinam

modificações osmóticas intracelulares que acarretam edema intracelular e o inchaço de organelas, como a mitocôndria, o que altera ainda mais a função celular. Ocorre, ainda, uma ativação desordenada de enzimas intracelulares, como hidrolases, fosfolipases, proteases, RNases, DNases que aceleram a degradação das estruturas celulares, principalmente o núcleo. Essas enzimas e o material intracelular extravasam para o tecido vizinho, o que estimula a resposta inflamatória. A intensidade desta resposta pode prejudicar os tecidos adjacentes.

A apoptose consiste numa seqüência de eventos regulados geneticamente de forma orquestrada, que levam à eliminação da célula de forma a não estimular os tecidos vizinhos. Durante o processo de apoptose, a integridade da membrana citoplasmática e das diversas organelas intracelulares, como a mitocôndria, permanece intacta, havendo, inicialmente, apenas alterações nucleares. Tipicamente há uma condensação da cromatina nuclear que coalesce em diversas massas que, futuramente, se transformarão em corpúsculos envolvidos por membrana. Posteriormente, diversas organelas, como o retículo-endoplasmático, começam a se desintegrar, formando bolhas que se fragmentam em pequenas vesículas que podem fundir-se com a membrana celular (WYLLIE et al., 1980; WILSON et al., 1996a; AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). Com isso há uma diminuição do volume citoplasmático, contração e encolhimento da célula. Diversos corpúsculos apoptóticos com organelas celulares que, muitas vezes, estão aparentemente intactas são formados. Esses corpúsculos apoptóticos são fagocitados principalmente por

macrófagos por meio de um processo denominado *clearance* que pode determinar a sua reciclagem. Assim, a estimulação de resposta inflamatória no tecido vizinho e a lesão tornam-se mínimas. Esses eventos podem ser bem caracterizados por meio de microscopia eletrônica de transmissão, considerado o melhor método para distinguir apoptose da necrose. Identifica-se apoptose, geralmente, por meio da técnica de TUNEL (*terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick and labeling*), que detecta as terminações OH- do DNA expostas que ocorrem durante o processo (MOHAN et al., 1997; WILSON, 1997; HELENA et al., 1998; WILLINGHAM, 1999; WILSON, 2000; BARRETT et al., 2001; MOHAN et al., 2003).

A apoptose é um processo que depende essencialmente de estimulação e de energia para eliminar a célula (WYLLIE et al., 1980; GOLSTEIN, 1997; AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). Há uma constante estimulação e desativação das células para que elas entrem em apoptose, o que pode ocorrer tanto pela privação de fatores estimuladores (de crescimento) celulares, quanto pela ativação de sistemas pró-apoptóticos. Este fato torna-se evidente no estudo da ativação das enzimas Caspases intracelulares que são fundamentais para o processo de morte celular programada. Estas enzimas são ativadas mesmo nas camadas mais profundas dos ceratócitos do estroma sob a área de lesão epitelial, onde não há apoptose (POSSIN et al., 2003).

Existem diversos mecanismos capazes de estimular uma célula a entrar em apoptose. Além da interleucina-1 alfa, outros sistemas

moleculares estão envolvidos e foram caracterizados: Fas/Fas-L, Fator de Necrose Tumoral (TNF) alfa e Proteínas Morfogências do Osso (BMP) 2 e 4 (WILSON et al., 1996b; MOHAN et al., 1997; MOHAN et al., 1998; KIM et al., 1999b; MOHAN et al., 2000b). Há redundância e interligação dos mecanismos estimuladores da apoptose. Por exemplo, os ceratócitos produzem normalmente FAS, mas não FAS-L. Ao serem estimulados com Interleucina 1 alfa, os ceratócitos passam a produzir FAS-L, determinando um mecanismo autócrino de suicídio. Isso pode ser visto num contexto evolutivo (MOHAN et al., 1997), uma vez que alterações nesse processo podem determinar uma significativa morbidade (WILSON e KIM, 1998; WILSON, 1999; MOHAN et al., 2000a).

Relatos sugeriram que as citocinas existentes na lágrima são essenciais para que a célula entre em apoptose (ZHAO et al., 2001; ZHAO e NAGASAKI, 2003). Entretanto, estudos envolvendo córneas enucleadas de coelhos e camundongos que foram posteriormente irrigadas e, então, desepitelizadas, demonstraram que há realmente interações epiteliais que determinam a morte das células da superfície estromal (WILSON e MOHAN, 2002).

O excesso ou a falta de apoptose estão relacionados a processos patológicos em diversas áreas da medicina (VERMES e HAANEN, 1994). Esse fato também é verdadeiro para a córnea. A opacidade corneana dos primeiros meses pós-operatórios de ablação de superfície desaparece gradativamente, sem deixar seqüelas. Entretanto, há casos em que a opacidade não some e assume um caráter instável e progressivo. Há

evidências de que defeitos na fase de eliminação dos miofibroblastos, por meio de apoptose, estejam relacionados a essa complicação (WILSON, 2002; AMBRÓSIO e WILSON, 2003). Por outro lado, também há evidências de que a exacerbação do processo de morte celular programada esteja relacionada ao desenvolvimento e à progressão do ceratocone (KIM et al., 1999c; ERIE et al., 2002; KALDAWY et al., 2002). Portanto, conclui-se que a apoptose dos ceratócitos é benéfica como mecanismo de defesa da córnea, mas pode determinar o desenvolvimento de doença se ocorrer de forma exacerbada (VERMES e HAANEN, 1994; AMBRÓSIO et al., 2002b).

HELENA (1998) demonstrou que a apoptose dos ceratócitos ocorre precocemente após vários tipos de trauma cirúrgico na córnea, sendo o primeiro evento detectável após PRK e LASIK. Entretanto, o tempo depois da cirurgia em que a detecção da apoptose por meio do TUNEL é mais intensa é em torno de 4 horas (WILSON et al., 1996a; HELENA et al., 1998; MOHAN et al., 2003). Há diferenças quantitativas em relação ao número de células em apoptose entre diferentes indivíduos submetidos à mesma cirurgia. Além disso, essas diferenças também são muito importantes em diversos tipos de cirurgias cerato-refrativas, como LASIK e PRK (MOHAN et al., 2003). No caso do PRK, observou-se uma resposta mais intensa e mais superficial devido à lesão do epitélio, enquanto que na cirurgia lamelar a resposta apoptótica é menos intensa e ocorre na interface, devido à ação de material celular proveniente do epitélio (possivelmente citocinas) que é arrastado até ele pela lâmina do microcerátomo, durante a criação do flap (MOHAN et al., 2003). É interessante notar que há mais apoptose na

periferia, na região da entrada do microcerátomo no epitélio corneano. A intensidade da apoptose pode determinar a intensidade dos eventos subseqüentes, culminando em hipo ou hipercorreção do erro refrativo ou em alteração de transparência da córnea (WILSON, 1997). Atualmente investe-se no desenvolvimento de um método farmacológico para bloquear de forma eficaz a apoptose dos ceratócitos (KIM et al., 2000).

2.2.2 Resposta Proliferativa

Zieske et al. (2001) demonstraram que após doze horas da lesão epitelial, as células estromais apresentam intensa proliferação (mitose). Essa resposta pode ser identificada por meio de técnica imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo anti-Ki67, proteína intranuclear de função ainda não totalmente definida, presente nas células que estão em processo de mitose (ZIESKE et al., 2001; CRESTA, 2002). Os ceratócitos em proliferação migram e preenchem a área despovoada de células, resultado da apoptose. O pico dessa resposta ocorre em torno de sete dias depois da cirurgia (MOHAN et al., 2003).

Alguns estudos que empregam a microscopia confocal também comprovam a resposta proliferativa após a queda no número de ceratócitos que ocorre na primeira semana pós-operatória (TERVO e MOILANEN, 2003).

As citocinas regulam a proliferação e migração dos ceratócitos depois da lesão epitelial. O fator de crescimento derivado das plaquetas – PDGF

(*Platelet-derived growth factor*) é uma citocina expressada no epitélio, especificamente na membrana basal. Receptores para PDGF estão presentes nos ceratócitos, sendo que há um efeito mitogênico e de quimiotaxia nessas células (ANDRESEN et al., 1997; ANDRESEN e EHLERS, 1998). A ação do PDGF nos ceratócitos é diferente, dependendo das concentrações existentes no meio (WILSON et al., 2001a; BALDWIN e MARSHALL, 2002).

Em estudo realizado em coelhos, observou-se que a resposta proliferativa após PRK e LASIK tem diferenças significativas, sendo mais intensa e mais superficial no PRK. Além disso, o volume de tecido removido por meio do Excimer laser continha mais células em proliferação (MOHAN et al., 2003).

2.2.3. Formação de Miofibroblastos

Dependendo da estimulação, os ceratócitos em proliferação podem originar miofibroblastos que são identificados pela expressão da proteína alfa actina do músculo liso – SMA (*smooth muscle actin*) (JESTER et al., 1995; MASUR et al., 1996). A diferenciação de miofibroblastos resulta de fatores do crescimento. Tipicamente há formação de miofibroblastos na presença de fator de crescimento de transformação beta – TGF-beta (*transforming growth factor*) (MASUR et al., 1996; JESTER et al., 1997; MOLLER-PEDERSEN et al., 1998b; MALTSEVA et al., 2001; JESTER et al., 2002). Ficou demonstrado, também, que pode haver diferenciação reversa

na presença de fator de crescimento de fibroblastos – FGF (*fibroblast growth factor*) (MALTSEVA et al., 2001).

As interações entre o epitélio e as células estromais que determinam a formação de miofibroblastos parecem ter uma relação importante com a regularidade e integridade da superfície, bem como o envolvimento da membrana basal do epitélio (STRAMER et al., 2003). LEE et al. encontraram menos TGF-beta em casos de ablação de superfície por meio da técnica de LASEK, que visa manter a integridade da membrana basal do epitélio, comparando com a técnica de debridamento tradicional (2002). Esta conclusão é um argumento para explicar a possível menor formação de opacidade no LASEK, comparando com o PRK tradicional (AMBRÓSIO e WILSON, 2003).

Os miofibroblastos são células maiores e menos transparentes do que os ceratócitos. Essa diferença está relacionada com a expressão citoplasmática de proteínas do tipo cristalinas (JESTER et al., 1999a; JESTER et al., 1999b). Assim, os miofibroblastos foram apontados como uma das causas de formação de opacidade ou *haze* (MOHAN et al., 2003). Além disso, os miofibroblastos têm intensa atividade metabólica, produzindo diversos fatores do crescimento, como o HGF e o KGF, que estimulam o processo proliferativo estromal e promovem hiperplasia epitelial, mecanismos considerados responsáveis pela regressão do efeito refrativo (LOHMANN et al., 1999). Os miofibroblastos também produzem e secretam colágeno e glicosaminoglicanos (GAGs). A produção desta matriz extracelular pode ocorrer de forma menos organizada, contribuindo para

diminuir a transparência corneana e induzir a irregularidade (WILSON et al., 2001).

Em estudo com coelhos, comparou-se a apoptose, resposta proliferativa e formação de miofibroblastos em olhos submetidos à criação de retalho e colocação intencional de epitélio na interface com olhos em que apenas se criou o retalho. Observou-se que a presença de epitélio determina maiores níveis de apoptose, proliferação celular e formação de miofibroblastos (WILSON et al., 2003b). Esses dados aumentam as evidências das interações entre o epitélio e as células estromais.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. TIPO DE ESTUDO

Realizou-se um estudo prospectivo de série de casos com intervenção na clínica de córnea e cirurgia refrativa do Departamento de Oftalmologia da Universidade de Washington, Seattle (WA, EUA). Os exames laboratoriais foram feitos no laboratório de pesquisas de córnea desse departamento e no laboratório de pesquisas de córnea do Instituto Schepens (*Schepens's Eye Research Institute*) em Harvard, Boston (MA, EUA).

2. POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população do estudo foi constituída por pacientes das clínicas de retina, oncologia e plástica ocular do Departamento de Oftalmologia da Universidade de Washington, aos quais havia sido indicada cirurgia para enucleação do bulbo ocular ou exenteração do conteúdo orbitário, visando tratar tumor intra-ocular maligno com segmento anterior normal.

Em reunião prévia solicitou-se aos responsáveis pelas clínicas que identificassem os pacientes nas condições acima descritas. Aqueles que quisessem participar do estudo deveriam ser encaminhados à clínica de córnea e cirurgia refrativa. Entre outubro de 2000 e setembro de 2002, nove

pacientes foram encaminhados e, depois de informados sobre o estudo, sete concordaram em fazer parte do estudo e assinaram o termo de consentimento (Anexo 1). Constituiu-se, assim, uma amostra de conveniência de tamanho sete (Quadro 3).

2.1. Critérios de Inclusão

- Indicação de enucleação ou exenteração para tratamento de tumor maligno intra-ocular ou intra-orbitário.
- Idade igual ou superior a dezoito anos.
- Córnea e segmento anterior sem anormalidades detectadas por exame biomicroscópico.

2.2. Critérios de Exclusão

- Presença de alterações corneanas ou em segmento anterior detectadas por exame biomicroscópico.
- Recusa em participar do estudo.

3. VARIÁVEIS

- 3.1.1. Tempo decorrido entre o debridamento epitelial e a preservação do botão córneo-escleral (em horas).
- 3.1.2. Células epiteliais em apoptose.
- 3.1.3. Células estromais em apoptose.
- 3.1.4. Células epiteliais em proliferação.
- 3.1.5. Células estromais em proliferação.
- 3.1.6. Presença de miofibroblastos.

4. INSTRUMENTOS

Identificou-se cada espécime córneo-escleral com um número dado de forma consecutiva e as análises foram feitas sem que se soubesse qual paciente havia doado o material. Os sistemas disponíveis nos microscópios ópticos (Nikon E600 e Nikon Eclipse E800) e no microscópio eletrônico de transmissão CM10 (Philips Electronics) forneceram as fotografias, cujos negativos foram revelados em *slides* de 35mm, digitalizados e processados em computador por meio do *software* Adobe Photoshop 6.0. Posteriormente esses arquivos foram armazenados de forma digital no computador, com *back-up* em *CD-Rom*.

Os arquivos com imagens geradas pelo exame de microscopia confocal *in vivo* também foram armazenados em computador, mantendo-se o *back-up* em *CD-Rom*.

5. PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

5.1. Técnica de debridamento epitelial

A técnica utilizada para o debridamento do epitélio corneano foi empregada de forma similar à utilizada durante a cirurgia PRK (*Photorefractive keratectomy* – Ceratectomia Foto-refrativa) antes da aplicação do Excimer laser para tratar erros refrativos (SHAH et al, 1998).

Após a anti-sepsia da pele periocular com Iodo Povidona a 5%, instilou-se uma gota de colírio de hidroclorito de proparacaína a 1% (Ophthaine™, Alcon) antes da colocação do blefarostato. Depois de irrigar a superfície ocular com solução salina balanceada (BSS), removeu-se o epitélio central da córnea de uma área de 7 mm de diâmetro com bisturi lâmina número 64 (Beaver; Becton-Dickinson) com a lâmina posicionada a 45° da superfície. Em seguida, utilizou-se uma esponja do tipo Merocel para remover os restos celulares na área do debridamento. Colocou-se, então, uma lente de contato gelatinosa do tipo Softlens 66 F/M (Bausch & Lomb) que permaneceu cobrindo a córnea até o momento da cirurgia para retirar o bulbo ocular. No final do procedimento instilou-se uma gota de colírio de ofloxacino a 0,3% (Ocuflox, Allergan) e instruiu-se o paciente a aplicar uma gota quatro vezes ao dia.

O paciente n.º 1, submetido ao debridamento epitelial quatro horas antes da remoção do bulbo ocular, queixou-se de desconforto, assim, instilou-se o colírio anestésico mais duas vezes antes da anestesia geral.

O paciente n.º 2, submetido ao debridamento epitelial 65 horas antes da enucleação, recebeu medicação antiinflamatória oral, rofecoxib

(Vioxx-merkSharp) na dose de 50 mg por dia. Os outros quatro pacientes foram submetidos ao debridamento epitelial sob anestesia geral e, no final do procedimento, não utilizaram lente de contato ou colírio antibiótico.

No paciente n.º 5, submetido à exenteração do conteúdo orbitário, o debridamento epitelial foi feito imediatamente antes do início das cirurgias neurológicas e de face. Em seguida realizou-se uma blefarorrafia para manter as pálpebras ocluídas. Oito horas após os procedimentos neurológicos e de face, procedeu-se à exenteração. A enucleação foi feita na peça cirúrgica depois da abertura da blefarorrafia.

Na córnea do paciente n.º 7, o debridamento epitelial foi feito depois da retirada do bulbo ocular. Irrigou-se o olho com 30 ml de solução BSS e, após o debridamento, manteve-se o bulbo ocular a 36°C durante 30 minutos, até o botão córneo-escleral ser retirado e preservado. Desse modo, evitou-se a interferência das lágrimas nos eventos cicatriciais que ocorrem nesse período.

5.2. Técnica de retirada do botão córneo-escleral

O procedimento de remover o botão córneo-escleral imediatamente após a enucleação atende às exigências do Banco de Olhos para preservar as córneas destinadas a transplantes. Esta técnica foi previamente descrita em vídeos por AMBRÓSIO et al. (1999; 2000).

O bulbo ocular enucleado era envolto em um filete de gaze dobrado na região do equador. Utilizou-se a face dorsal não cortante de bisturi lâmina 15 para expor a esclera e afastar o tecido conjuntival na região límbica. Em

seguida, com a face cortante do bisturi lâmina 15 fez-se na esclera, a 1,5 mm do limbo, um sulco perpendicular em toda a extensão de 360° do bulbo ocular. Esse sulco era aprofundado até a penetração no espaço supra-ciliar em uma única região, evitando perda de humor aquoso e desestabilização da câmara anterior. Depois de perfurar a esclera com uma tesoura do tipo Westcott completou-se a extirpação da córnea, incluindo o limbo.

5.3. Técnica inicial de fixação e preservação do botão córneo-escleral

As técnicas de preservação e fixação de espécime para estudo histoquímico seguiram os modelos utilizados pelo laboratório de pesquisas de córnea da Universidade de Washington (MOHAN et al., 2003; WILSON et al., 2003a,b), que preservam o tecido fresco, ou seja, sem fixação prévia. Depois de separar o botão córneo-escleral, colocava-se o espécime fresco no molde de 24mm X 24mm X 5mm com a face endotelial voltada para cima. Então, ele era cuidadosamente centralizado no molde de forma padronizada, visando facilitar o reconhecimento do seu posicionamento. Inicialmente, embebia-se o molde com o espécime em um composto OCT líquido (Sakura FineTek); em seguida, ele era rapidamente congelado em um recipiente com 2-metilbutano localizado dentro de um compartimento de aço inoxidável com nitrogênio líquido. Os blocos congelados de cada caso eram datados e identificados na face posterior do bloco com uma caneta especial. Depois de escrever essas informações em um pequeno saco plástico, nos quais os

blocos eram mantidos, estes permaneciam em *freezer* a -85°C até o momento dos cortes histológicos.

Para proceder aos estudos histoquímicos e de microscopia eletrônica de transmissão no mesmo espécime, colocava-se o botão córneo-escleral, imediatamente depois de obtê-lo, em uma solução com 4% de paraformaldeído durante quatro horas (POSSIN, 2002). Esse procedimento evitava dar ao tecido maior consistência, facilitando assim a sua divisão em duas metades, com lâmina de criostato (HM 505M, Mícron GmbH). A primeira metade era criogenicamente preservada em OCT líquido e armazenada a -85°C . A outra metade era processada para microscopia eletrônica de transmissão. Em seguida, colocava-se novamente o espécime em solução para fixação (fixação primária) com 2% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em um veículo de fosfato de sódio a 1,3 M, tamponada com 0.05% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para manter o pH controlado em 7,3, a 4°C por 24 horas. Posteriormente, o tecido era lavado duas vezes com o veículo, durante quinze minutos, em temperatura ambiente, e depois armazenado a 4°C em frasco contendo o mesmo veículo até o processamento, quando era mais uma vez fixado (fixação secundária) antes de ser submetido a cortes ultrafinos.

5.4. Estudo histológico, ensaio de TUNEL e estudos imuno-histoquímicos

Os blocos com o espécime eram retirados do freezer a -85°C e deixados por dez minutos no aparelho criostato (HM 505M, Mícron GmbH), cujo ambiente tinha a temperatura controlada a -20°C. Em seguida, o bloco era colocado no suporte metálico, de forma que o espécime ficasse posicionado adequadamente para o corte das seções. Para fixar o bloco no suporte utilizava-se o composto OCT líquido, sob a temperatura de -20°C, que demorava cerca de cinco minutos para se solidificar e tornar-se branco, demonstrando assim que o bloco estava adequadamente fixado ao suporte. Esse conjunto era, então, colocado em posição para a realização do corte, usando-se uma nova lâmina para cada bloco. Partindo-se do centro da córnea, obtinha-se seções corneanas de 7 µm de espessura que, em seguida, eram colocadas em lâminas de vidro de 25 mm x 75 mm x 1 mm (Superfrost Plus). O ideal era colocar de duas a três seções em cada lâmina, paralelamente. O microscópio óptico auxiliava a observar os *slides*, visando assegurar a integridade e regularidade dos cortes armazenados em uma caixa própria. Em seguida, os blocos eram novamente colocados no freezer a -85°C até o momento do processamento (MOHAN et al., 2003; WILSON et al., 2003a).

Coloração por Hematoxilina & Eosina e com corante azul de Richardsons foram realizadas em todos os espécimes para estudo histológico.

5.4.a. Ensaio de TUNEL

Utilizou-se o ensaio histoquímico do TUNEL para detectar a fragmentação do DNA associada ao processo de morte celular programada (apoptose). As lâminas contendo os cortes histológicos de 7µm de espessura eram retiradas do freezer a -85°C , em seguida, instilava-se uma gota de acetona em cada uma, fazendo-a escorrer sobre os cortes. As lâminas eram submetidas a uma temperatura de -20°C por dois minutos, e depois deixadas em temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente elas eram colocadas em frascos com uma solução balanceada. Prosseguia-se o ensaio de TUNEL fluorescente de acordo com técnica descrita por MOHAN et al. (1997, 2000, 2003) e segundo as instruções comerciais contidas nos protocolos ApopTag, S7165 (Intergen). As lâminas contendo os controles sabidamente positivos e negativos foram incluídas rotineiramente nas análises. Utilizou-se, para controle positivo, cortes de córnea de coelho submetido a PRK para alta miopia (-9.00 D), quatro horas antes do sacrifício, conforme descrito por MOHAN et al. (2003). Para o controle negativo, utilizou-se cortes de córnea de coelho que não sofreram nenhum tipo de cirurgia. As lâminas foram analisadas com o auxílio do microscópio fluorescente modelo E600 (Nikon) e os recursos desse microscópio permitiram obter fotografias.

5.4.b. Estudos imuno-histoquímicos

Para a realização das técnicas de imunofluorescência utilizadas na identificação de Ki67 e SMA, seis lâminas com dois a três cortes de tecido com 7µm de espessura de cada córnea do estudo foram enviadas ao laboratório de pesquisas de córnea do Instituto Schepens (*Schepens's Eye Research Institute*) em Harvard, Boston (MA, EUA). Os estudos de imunofluorescência foram feitos conforme a técnica previamente descrita e publicada por ZIESKE e WASSON (1993). Usou-se o anticorpo monoclonal anti-Ki67 da Zymed na concentração de 214,6 mg/L, com o período de incubação de duas horas, em temperatura ambiente.

O anticorpo monoclonal anti-SMA da DAKO foi empregado na concentração de 85 mg/L, com um período de incubação de uma hora, em temperatura ambiente.

Em ambas as técnicas, utilizou-se uma cobertura contendo DAPI (Vector Laboratories), um marcador nuclear ou iodeto de propidina. Lâminas com controles sabidamente positivos e negativos para Ki67 e SMA eram incluídas no ensaio, rotineiramente. Para o controle positivo de Ki67, utilizou-se cortes de córnea de coelho submetido a PRK para alta miopia (-9,00 D), 24 horas antes do sacrifício, conforme descrito por MOHAN et al. (2003). Para o controle positivo de SMA, utilizou-se cortes de córnea de coelho submetido a PRK para alta miopia (-9,00 D), três meses antes do sacrifício. Para o controle negativo, utilizou-se cortes de córnea de coelho que não sofreram nenhum tipo de cirurgia para ambas as técnicas.

Depois de terminados os estudos imuno-histoquímicos, observava-se as lâminas do estudo e controles com o auxílio do microscópio fluorescente modelo E800 (Nikon). Fotografias eram obtidas com os recursos digitais da SPOT câmera (MicroVideo).

5.4.c. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

Para o processamento de microscopia eletrônica, dividia-se novamente o tecido e cortava-se uma camada de cerca de 1,5 mm na região central. Esses fragmentos eram, mais uma vez, divididos e colocados em solução semelhante à utilizada na fixação primária, até prosseguir com a fixação secundária, feita com uma solução de OsO_4 a 1%, contendo fosfato tamponado a 1.0 M e controlando-se o pH em 7,3 por 45 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, os espécimes eram lavados três vezes, em solução tamponada de fosfato, e desidratados de forma progressiva em soluções alcoólicas. Os fragmentos eram, então, transferidos para o meio de *epoxy*, passando duas vezes por óxido de propileno – a formulação de Spurr foi usada para embeber o tecido (SPURR, 1969 apud WILSON, 2002; MOHAN et al., 2003). Os fragmentos eram montados em um molde plano e endurecidos em temperatura de 70°C por 24 horas, antes da realização dos cortes ultrafinos.

Seções de 1 μm de espessura eram obtidas para microscopia eletrônica de transmissão. Montava-se os cortes em grades cobertas por polivinil-butiral (Pioloform, Sigma) conforme descrito por descrito por

ROBARDS e WILSON (1993 apud WILSON, 2002; MOHAN et al., 2003), que eram preparados para observação, segundo a técnica clássica de REYNOLDS (1963 apud WILSON, 2002; MOHAN et al., 2003). O microscópio eletrônico modelo PW6020, CM10 (Philips Electronics) foi utilizado na observação dos cortes e seus recursos possibilitaram as fotografias. Cortes ultrafinos foram também destinados para microscopia óptica. Essas seções eram coradas com solução azul de Richardsons e observadas por meio do microscópio Nikon E600.

5.5. Microscopia Confocal ‘*in vivo*’

Realizou-se o exame de microscopia confocal *in vivo* nos dois pacientes submetidos ao debridamento ainda em vigília (pacientes n.º 1 e n.º 2). O exame biomicroscópico feito por meio de lâmpada de fenda antecedeu a microscopia confocal. Os pacientes eram conduzidos à sala de exames e posicionados no aparelho de microscopia confocal (Confoscan 2, Nidek). Na realização do exame de microscopia confocal empregou-se a técnica descrita por HARRISON e AMBRÓSIO (2003). Manteve-se a lente de contato para proteger a superfície, durante o exame, sendo que cada sessão de exame teve de duas a quatro passagens de cortes ópticos confocais, obtidos desde o plano endotelial até a visualização do reflexo da lente na superfície. O exame foi repetido duas vezes, em cada caso.

As imagens conseguidas por meio desse exame já estavam digitalizadas no programa NAVIS (Fortune Technologies / Nidek). O

examinador reavaliava os exames e as imagens mais interessantes eram salvas em CD Rom para estudo.

5.6. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados de maneira descritiva, categorizando-se as variáveis segundo a presença e a ausência dos achados. Devido ao tamanho reduzido da amostra, não houve estudos quantitativos ou estatísticos.

5.7. APROVAÇÃO DO ESTUDO

O protocolo deste estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – *CAPPesq* da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo n.º 704/02) e pelo Comitê de Revisão Institucional (*Institutional Review Board – IRB*) da Divisão de Assuntos Relacionados a Seres Humanos (*Human Subjects Division – HSD*) da Universidade de Washington (HSD n.º 99-2341-A 02 - *Early Wound Healing Response to Corneal Epithelial Scrape In Human*).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

As características demográficas dos pacientes, o diagnóstico do tumor intra-ocular ou intra-orbitário e o tempo decorrido entre o debridamento epitelial e a preservação do botão córneo-escleral estão no Quadro 3. A amostra constituiu-se de sete pacientes – quatro homens e três mulheres. A idade dos pacientes variou entre 41 e 68 anos de idade, média de 49,3 anos. Cinco pacientes foram submetidos à enucleação devido a melanoma uveal, sendo quatro casos de coróide e um caso de corpo ciliar. Dois pacientes submeteram-se à cirurgia para exenteração do conteúdo orbitário, causado por rinocarcinoma recorrente. Quatro procedimentos foram feitos nos olhos direitos e três nos olhos esquerdos.

Não se submeteu a córnea do paciente n.º 3 a debridamento epitelial corneano para servir como controle. Nos pacientes n.º 4, n.º 5, n.º 6 e n.º 7 o debridamento epitelial foi realizado sob anestesia geral. O paciente n.º 1 relatou desconforto moderado e precisou de colírio anestésico duas vezes

antes da cirurgia. O paciente n.º 2 não mencionou desconforto no período entre o debridamento epitelial e a cirurgia de enucleação.

Os botões córneo-esclerais dos pacientes n.º 1, n.º 2, n.º 3 e n.º 5 foram preservados frescos, ou seja, congelados em OCT sem fixação prévia, de acordo com técnica tradicional (MOHAN et al., 2003; WILSON et al., 2002). Já aqueles obtidos dos pacientes n.º 4, n.º 6 e n.º 7 foram previamente fixados e divididos para ser estudados através de microscopia eletrônica de transmissão e técnicas histoquímicas de acordo com POSSIN (2002).

O resumo dos achados mais importantes estão-se no Quadro 4.

**QUADRO 3 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES, DIAGNÓSTICO DA DOENÇA
E TEMPO DECORRIDO ENTRE O DEBRIDAMENTO E A PRESERVAÇÃO DO BOTÃO CÓRNEO-ESCLERAL**

Caso	SEXO	IDADE (anos)	DIAGNÓSTICO	TEMPO DECORRIDO ENTRE O DEBRIDAMENTO EPITELIAL E A PRESERVAÇÃO DO BOTÃO CÓRNEO-ESCLERAL (EM HORAS)
1	Masc.	68	Melanoma de Coróide	4 horas.
2	Masc.	48	Melanoma de Corpo Ciliar	65 horas
3	Fem.	46	Rinocarcinoma	Sem debridamento epitelial
4	Fem.	51	Melanoma de Coróide	1 hora
5	Fem.	54	Rinocarcinoma	8 horas
6	Masc.	56	Melanoma de Coróide	1 hora
7	Masc.	41	Melanoma de Coróide	Debridamento realizado após a retirada do globo ocular e lavagem com 30 ml de solução balanceada (BSS). O bulbo ocular foi colocação em estufa por 30 minutos até o momento da retirada e preservação do botão córneo-escleral.

Fonte : Departamento de Oftalmologia da Universidade de Washington, 2002.

QUADRO 4 –REALIZAÇÃO DE DEBRIDAMENTO E TEMPO DECORRIDO ENTRE O DEBRIDAMENTO E A PRESERVAÇÃO DO BOTÃO CÓRNEO-ESCLERAL; OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM APTOPOSE, EM MITOSE E MIOFIBROBLASTOS

Debridamento e tempo entre o debridamento e a preservação do botão córneo-escleral	Observações Histológicas	Células em processo de morte celular programada (apoptose)	Proliferação Celular (positivas para o Ki67)	Miofibroblastos
Sem debridamento epitelial	Córnea Normal	Poucas células positivas na região superficial do epitélio em descamação	Poucas células positivas na região límbica e na camada basal do epitélio	Ausência
Debridamento após Enucleação e Lavagem do Filme Lacrimal	Desepitelização central. Estroma e endotélio dentro da normalidade	Células positivas no estroma sob a área desepitelizada	Poucas células positivas no epitélio da região límbica.	Ausência
1 Hora pós Debridamento (Córnea nº 4)	Desepitelização central. Estroma e endotélio dentro da normalidade	Células positivas no estroma sob a área desepitelizada	Poucas células positivas no epitélio da região límbica	Ausência
1 Hora pós Debridamento (Córnea nº 6)	Desepitelização central. Estroma e endotélio dentro da normalidade	Células positivas no estroma sob a região desepitelizada	Células positivas no epitélio da região límbica	Ausência
4 Horas pós Debridamento	Desepitelização central. Estroma com edema leve. Endotélio dentro da normalidade	Células positivas no estroma sob a área desepitelizada	Poucas células positivas no epitélio da região límbica	Ausência
8 Horas pós Debridamento	Desepitelização central. Estroma e endotélio dentro da normalidade	Células positivas no estroma sob a região desepitelizada e na periferia sob o epitélio parcialmente destacado	Células positivas no epitélio da região límbica e na camada basal do epitélio na periferia da lesão	Ausência
65 Horas pós Debridamento	Fina camada de epitélio regenerando (cerca de 3-4 camadas) na area da lesão. Estroma e endotélio normais. Raras células inflamatórias.	Células positivas sob a camada de epitélio em regeneração.	Células positivas no epitélio da região límbica, na camada basal do epitélio em regeneração e no estroma, abaixo da região onde ocorreu morte celular programada.	Ausência

Fonte : Departamento de Oftalmologia da Universidade de Washington, 2002.

4.1. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os estudos histológicos, por meio de coloração Hematoxilina & Eosina (HE) e corante azul de Richardsons, foram feitos em todos os casos. A Figura 1 mostra o epitélio normal com uma célula em descamação, a camada de Bowman e o estroma anterior da córnea que não sofreu desepitelização (paciente n.º 3).

O exame histológico mostrou que a córnea do paciente n.º 3 (sem debridamento) era normal em todas as camadas. As córneas dos pacientes n.º 1, n.º 4, n.º 5, n.º 6 e n.º 7 apresentaram região central desepitelizada, com presença de epitélio íntegro na periferia. A córnea do paciente n.º 1 (quatro horas) apresentou discreto edema estromal e aumento da espessura. A córnea do paciente n.º 2 (65 horas) apresentou epitélio fino com empilhamento de três camadas celulares epiteliais em regeneração, sob a área que havia sido debridada. O endotélio corneano mostrou-se normal em todos os casos (Quadro 2, Figura 2, Figura 18 H).

Na figura 2 estão as descobertas histológicas (HE) do caso não desepitelizado dos pacientes n.º 1 e n.º 2. Os aspectos da região central desepitelizada dos pacientes n.º 4, n.º 5, n.º 6 e n.º 7 foram análogos (Figura 3).

No paciente n.º 4 observou-se, na periferia da região desepitelizada, o início da fase migratória com células da superfície epitelial, alongando-se e migrando em direção ao defeito epitelial (Figura 4). O estudo por meio da técnica de Ki67 mostrou que essas células não estavam em mitose (Figura 11).

Figura 1: Microscopia óptica do espécime contendo epitélio, camada de Bowman e estroma superficial da região central da córnea nº 3 (sem debridamento) (Azul de Richardson, 600X).

Figura 2: Microscopias ópticas dos espécimes contendo a região central da córnea dos casos nº 1 (4 horas - B), nº 2 (65 horas - C) e nº 3 (Controle - A). A. Epitélio e estroma anterior normais da córnea que não foi debridada; B. estroma superficial da região central debridada; C. epitélio em regeneração e estroma anterior (Hematoxilina & Eosina, 200X).

Figura 3: Microscopia óptica do espécime contendo o estroma superficial da região central debridada da córnea nº 4 (Azul de Richardson, 400X).

Figura 4: Microscopia óptica do espécime contendo epitélio, camada de Bowman e estroma superficial da região periférica adjacente à área debridada da córnea nº 4 (Azul de Richardson, 400X).

4.2. ANÁLISE HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.2.1. Ensaio do TUNEL

Todas as córneas que sofreram debridamento epitelial apresentaram células positivas para a técnica de TUNEL na região estromal anterior sob a área debridada, incluindo o caso em que o olho foi removido e irrigado com BSS para remover o filme lacrimal, antes da desepitelização (paciente n.º 7).

As Figuras 5 e 6 mostram as conclusões do ensaio de TUNEL do caso não desepitelizado dos pacientes n.º 1 e n.º 2. A Figura 5 corresponde à técnica sem corante nuclear e a Figura 6 mostra o uso do DAPI como corante nuclear adjuvante.

Diferenças no número de células em apoptose foram observadas entre cada espécime. Na Figura 7 estão as diferenças entre os achados das córneas dos pacientes n.º 4 e n.º 6. A córnea do paciente n.º 5 apresentou maior número de células positivas (Figura 8). Nessa córnea, notou-se células positivas também em algumas regiões periféricas sob o epitélio íntegro (Figura 9).

Observou-se raras células epiteliais positivas para a técnica de TUNEL no epitélio do paciente n.º 3 (sem debridamento – Figura 6A), bem como na periferia epitelial íntegra dos pacientes n.º 1 e n.º 5.

Figura 5: Microscopias ópticas fluorescentes dos espécimes contendo a região central da córnea dos casos nº 1 (4 horas - B), nº 2 (65 horas - C) e nº 3 (Controle - A). (TUNEL marcado exclusivamente com rodamina em vermelho, 200X).

Figura 6: Microscopias ópticas fluorescentes dos espécimes contendo a região central da córnea dos casos nº 1 (4 horas - B), nº 2 (65 horas - C) e nº 3 (Controle - A). (Marcação Dupla: TUNEL - marcado com rodamina em vermelho/DAPI - azul, 200X).

Figura 7: Microscopias ópticas fluorescentes dos espécimes contendo a região central debridada da córnea dos casos n° 4 (A) e n° 6 (B). O debridamento ocorreu 1 hora antes da preservação. Nota-se diferença no número de células positivas (em apoptose ou morte celular programada) (TUNEL marcado exclusivamente com rodamina em vermelho, 200X).

Figura 8: Microscopia óptica fluorescente do espécime contendo a região central debridada da córnea do caso no 5. O debridamento ocorreu 8 hora antes da preservação. Nota-se grande número de células positivas (em apoptose ou morte celular programada) (TUNEL marcado exclusivamente com rodamina em vermelho, 200X).

Figura 9: Microscopia óptica fluorescente do espécime contendo a região periférica não debridada da córnea do caso nº 5. Nota-se algumas células positivas sob o epitélio periférico intacto (TUNEL marcado exclusivamente com rodamina em vermelho, 200X).

4.2.2. Ki 67

A Figura 10 mostra as descobertas da técnica de imuno-histoquímica com anticorpo anti-Ki 67 dos pacientes n.º 1, n.º 2 e n.º 3. Para o registro fotográfico utilizou-se marcador verde para indicar as células positivas para o Ki 67 e corante vermelho de iodeto de propidina como marcador nuclear. Nota-se uma célula positiva na região basal do epitélio da córnea não debridada (Figura 10 A). No paciente n.º 1 não se observou sinal positivo para o Ki 67 no estroma (Figura 10 B). No paciente n.º 3 notou-se a presença de diversas células positivas sob a área que havia perdido os núcleos devido à apoptose no estroma anterior. Células positivas são observadas no epitélio em regeneração (Figura 10 C).

A Figura 11 mostra a periferia do epitélio com células da superfície epitelial alongando-se e migrando em direção ao defeito epitelial. A ausência de células positivas para o Ki 67 demonstra que não há mitose nessa primeira fase de regeneração epitelial.

As córneas debridadas apresentaram mais células em mitose na região límbica do que a córnea não debridada. A Figura 12 mostra células positivas no epitélio da região límbica na periferia do espécime do paciente n.º 1, em que diversas células em processo de mitose foram evidenciadas. Não se observou células positivas no epitélio na região próxima ao debridamento.

Figura 10: Microscopias ópticas fluorescentes dos espécimes contendo a região central da córnea dos casos n° 1 (4 horas - B), n° 2 (65 horas - C) e n° 3 (Controle - A). (Marcação Dupla: Ki-67 - marcado em verde/Iodeto de Propidina - vermelho, 200X).

Figura 11: Microscopia óptica fluorescente do espécime contendo epitélio da região periférica adjacente à área debridada da córnea n° 4. Nota-se ausência de células em proliferação positivas para o Ki-67 (Marcação Dupla: Ki-67 - marcado em verde/ DAPI - azul, 200X).

Figura 12: Microscopia óptica fluorescente do espécime contendo epitélio da periférica adjacente à área debridada da córnea nº 1. Nota-se várias células em proliferação positivas para o Ki-67 (Marcação Dupla: Ki-67 - marcado em verde/Iodeto de Propidina - vermelho, 200X).

4.2.3. Formação de miofibroblastos – células positivas para SMA

O SMA é um marcador de miofibroblastos (JESTER et al., 1996; MASUR et al., 1996; PETRIDOU et al., 2000). Não foram observadas células positivas para actina de músculo liso (SMA) em nenhum caso nem houve evidência de formação de miofibroblastos nas córneas estudadas.

4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os espécimes dos pacientes n.º 4, n.º 6 e n.º 7 foram estudados através de microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se diversas células em processo de morte celular programada (apoptose) na região estromal anterior em todas as córneas estudadas. O número de células em apoptose foi maior no paciente n.º 6.

As Figuras 13 a 16 mostram sinais clássicos de apoptose nos ceratócitos superficiais sob a área desepitelizada (WILSON et al., 1996):

- condensação da cromatina nuclear
- formação de corpúsculos apoptóticos
- formação de bolhas intra-citoplasmáticas
- encolhimento do citoplasma celular
- fragmentação da célula

Figura 13: Microscopia eletrônica de transmissão contendo ceratócito em processo de morte celular programada (apoptose) a cerca de 50µm da superfície debridada da córnea no 4. Nota-se condensação da cromatina nuclear, formação de corpúsculos apoptóticos e de vacúolos e bolhas citoplasmáticas (MET, 5200X).

Figura 14: Microscopia eletrônica de transmissão contendo ceratócito em fase tardia de apoptose no estroma superficial, a cerca de 25µm da superfície debridada da córnea nº 6. Nota-se formação de grandes bolhas citoplasmáticas, fragmentação da célula e encolhimento (MET, 7500X).

Figura 15: Microscopia eletrônica de transmissão contendo ceratócito em processo de morte celular programada no estroma superficial, a cerca de 50µm da superfície debridada da córnea nº 7. Nota-se condensação da cromatina nuclear, fragmentação do citoplasma, formação de corpúsculos apoptóticos e de vacúolos citoplasmáticos (MET, 7500X)

Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão contendo ceratócito em processo de morte celular programada no estroma superficial, adjacente à camada de Bowman da superfície debridada da córnea nº 7. Nota-se, fragmentação do citoplasma, encolhimento da célula e formação de corpúsculos apoptóticos. Condensação da cromatina nuclear é observada logo abaixo desses eventos (MET, 5200X).

4.4. MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Os pacientes n.º 1 e n.º 2, submetidos à desepitelização em vigília, foram submetidos ao exame de microscopia confocal *in vivo*.

A biomicroscopia do olho do paciente n.º 1 (quatro horas) mostrou leve lacrimejamento reflexo, sem injeção conjuntival nem lente de contato em posição. Era possível perceber um discreto edema estromal. Por meio do exame de microscopia confocal *in vivo*, observou-se ausência do epitélio corneano sob a imagem de hiper-reflexão da lente de contato. Na região estromal anterior sob a área desepitelizada notou-se uma desorganização da morfologia dos ceratócitos, com perda da imagem característica dos núcleos celulares (Figura 17 A e B). Os ceratócitos das camadas mais profundas estavam normais (Figura 17 C). As dobras no estroma foram observadas por edema extracelular (Figura 17 D) e o endotélio estava normal.

O olho do paciente n.º 2 (65 horas) mostrou, por meio de biomicroscopia, lente de contato em posição, ausência de hiperemia conjuntival ou secreção. Notou-se um epitélio fino em regeneração, com o padrão classicamente descrito como “em redemoinho” (DUA et al., 1996). Não se observou defeito epitelial, utilizando-se luz azul de cobalto após a instilação de 1 gota de fluoresceína sódica a 1%. Por meio da microscopia confocal *in vivo*, percebeu-se células epiteliais superficiais alongadas (Figuras 18 A e B). O padrão típico das células basais foi observado (HARRISON et al., 2003), havendo nessa região estruturas com hiper-

reflexão de formato dendrítico (Figura 18 C). Essas células são compatíveis com células do sistema imunológico (KAUFMAN et al., 1998; BOHNKE e MASTERS, 1999; TERVO e MOILANEN, 2003). Na região estromal anterior, sob o epitélio em regeneração, notou-se células desorganizadas com núcleo não evidenciado (Figura 18 D). Células em proliferação com evidência de mitose foram observadas no estroma posterior (Figuras 17 E, F e G). Os ceratócitos posteriores e o endotélio (Figura 18 H) estavam normais.

Figura 17: Imagens do exame de microscopia confocal “in vivo” da córnea do caso nº 1. A e B. Corte óptico da região estromal anterior. Nota-se desorganização celular e perda da imagem característica dos núcleos celulares dos ceratócitos em processo de apoptose. C e D. Cortes ópticos da região estromal média a respectivamente 322 e 529 μm da superfície no Z-scan, evidenciando ceratócitos normais. Dobras no estroma são observadas em camadas mais profundas (D).

O olho do caso nº 2 (65 horas), apresentava à biomicroscopia, ausência de hiperemia conjuntival ou secreção e lente de contato em posição. Observou-se um epitélio em regeneração fino, com o padrão classicamente descrito como “em redemoinho”. Não foi demonstrado defeito epitelial utilizando-se luz azul de cobalto após instilação de 1 gota de fluoresceína sódica a 1%. Por meio da microscopia confocal “in vivo”, observou-se células epiteliais superficiais alongadas (Figura 18 A e B). O padrão típico das células basais foi observado (HARRISON e AMBRÓSIO, 2003), havendo nessa região, estruturas com hiper-reflexão de formato dendrítico (Figura 18 C). Essas células são compatíveis com células do sistema imunológico (KAUFMAN et al. 1999; AMBRÓSIO e HARRISON, 2002; TERVO et al., 2003). Na região estromal anterior sob o epitélio em regeneração, notou-se células desorganizadas com núcleo não evidenciado (Figura 18 D). Células em proliferação com evidência de mitose foram observadas no estroma posterior (figura 17 E e F). Os ceratócitos posteriores (figura 18 G) e o endotélio (figura 18 H) mostravam-se normais.

Figura 18: Imagens do exame de microscopia confocal “in vivo” da córnea do caso nº 2. A e B. Corte óptico da superfície evidenciando células epiteliais superficiais alongadas. C. Camada de células basais com estruturas apresentando hiper-reflexão de formato dendrítico. D. Corte óptico da região estromal anterior a 118 µm no Z-scan. Nota-se desorganização celular e perda da imagem característica dos núcleos celulares dos ceratócitos em processo de apoptose. E, F e G. Cortes ópticos da região estromal anterior a respectivamente 135, 169 e 220 µm da superfície no Z-scan, evidenciando ceratócitos em proliferação com evidência de mitose. H. Corte óptico do endotélio normal.

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo laboratorial realizado sobre a resposta cicatricial após debridamento epitelial central em córneas humanas sem anormalidades detectadas ao exame de biomicroscopia. A utilização de córneas humanas nesta investigação só foi possível pela concordância de pacientes com indicação de enucleação e/ ou exenteração para tratamento de malignidade intra-ocular ou intra-orbitária. Estudos anteriores envolveram pacientes com córneas alteradas ou portadoras de doenças, com indicação de transplante penetrante ou mesmo enucleação (LATVALA et al., 1996; KOCH et al., 1996). Este estudo, inédito, utilizou microscopia eletrônica e técnicas histoquímicas para detectar apoptose, proliferação celular e miofibroblastos em córneas humanas submetidas a debridamento epitelial realizado horas antes da cirurgia.

Modelos de experimentação em animais vêm sendo utilizados com o objetivo de elucidar a seqüência de eventos envolvidos na cascata da cicatrização corneana (AMBRÓSIO et al., 2002a). Em estudos feitos com coelhos (HELENA et al. 1998; MOHAN et al., 2003; WILSON et al., 2003) e roedores (ZIESKE et al., 2001; POSSIN et al. 2003), verificou-se que a apoptose dos ceratócitos é o primeiro evento observado após qualquer tipo de trauma epitelial. Em seguida, ocorre resposta proliferativa dos ceratócitos

localizados na região subjacente à área em que ocorreu apoptose. Posteriormente, células estromais podem transformar-se em miofibroblastos, tornando-se maiores, menos transparentes e com atividade metabólica mais intensa do que os ceratócitos normais. A necessidade de saber os eventos que ocorrem na córnea humana para contribuir no desenvolvimento de estratégias para controlar a cicatrização.

As avaliações histopatológicas realizadas nas córneas submetidas a debridamento epitelial central (pacientes n.º 1, n.º 2, n.º 4, n.º 5, n.º 6 e n.º 7), mostraram presença de camada de Bowman, ausência de epitélio na região central e epitélio íntegro na periferia (Quadro 3, Figuras 2 e 3).

A partir de 1 hora (paciente n.º 4) observou-se, na periferia da região desepitelizada, células da superfície alongando-se em direção ao defeito epitelial (Figura 4). O estudo por meio da técnica de Ki-67 mostrou que as células epiteliais não estavam em mitose (Figura 11), o que caracteriza a fase de migração. Nessa fase, observou-se células em proliferação na região límbica (Figura 12).

Na córnea avaliada 65 horas após o debridamento (paciente n.º 2), notou-se a presença de epitélio fino, em regeneração, composto de três camadas celulares (Figura 2 C). Por meio da técnica de Ki-67 identificou-se células em proliferação neste epitélio (Figura 10 C).

O ensaio de TUNEL e a microscopia eletrônica de transmissão têm sido utilizados para verificar a apoptose de ceratócitos (WILSON et al., 1996; HELENA et al., 1998; MOHAN et al., 2003). Células positivas para a técnica de TUNEL na região estromal anterior, sob a área debridada, foram

encontradas em todas as córneas submetidas a debridamento epitelial. Diferenças no número de células em apoptose foram observadas entre cada espécime (Figuras 5 a 10). Este fato pode expressar a variabilidade biológica entre indivíduos, bem como as diferenças entre tempos nos quais o fenômeno foi avaliado. A influência da variabilidade biológica entre indivíduos é mostrada na Figura 7, na qual observa-se diferenças no número de células em apoptose 1 hora após o debridamento epitelial central. Como a apoptose dos ceratócitos é o primeiro evento detectável da cascata da cicatrização corneana após trauma epitelial, pode-se supor que os eventos subsequentes serão diferentes em cada caso.

O maior número de ceratócitos em apoptose foi verificado na córnea do paciente n.º 5, analisada oito horas após o debridamento epitelial (Figura 8). Em coelhos, o número máximo de ceratócitos em apoptose, detectados pelo ensaio de TUNEL, ocorreu quatro horas após o trauma epitelial (HELENA et al., 1998; MOHAN et al., 2003). Em seres humanos essa evolução no tempo e seu significado ainda são desconhecidos. Este estudo mostrou que o maior número de ceratócitos em apoptose ocorre após oito horas do debridamento epitelial, em córnea que também tinha ceratócitos em apoptose em algumas regiões periféricas, sob o epitélio íntegro. Tal fato pode ter sido causado por uma maior predisposição individual ao fenômeno (Figura 9).

Células epiteliais superficiais em apoptose foram verificadas nos pacientes n.º 1, n.º 3 e n.º 5. Essas descobertas são compatíveis com a hipótese de que a morte celular programada contribui para o processo de

eliminação que ocorre fisiologicamente durante a regeneração epitelial (REN e WILSON, 1994, 1996; GAO et al., 1997; LU et al., 2001; WILSON et al., 2001a).

Os espécimes dos pacientes n.º 4, n.º 6 e n.º 7 também foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), cujo resultado está de acordo com o ensaio de TUNEL. Foram observadas diversas células em processo de morte celular programada na região estromal anterior pela verificação dos eventos morfológicos celulares típicos da apoptose: condensação da cromatina nuclear, formação de corpúsculos apoptóticos e de bolhas intracitoplasmáticas, encolhimento do citoplasma celular e fragmentação da célula (Figuras 13 a 16).

Neste estudo, desenvolveu-se uma técnica de preservação do espécime que permitiu avaliar a apoptose por meio de MET e da técnica histoquímica em um mesmo espécime (POSSIN et al., 2003). A técnica descrita neste estudo pode ter, no futuro, utilidade clínica para distinguir processos patológicos corneanos. Nos trabalhos existentes, espécimes diferentes eram submetidos exclusivamente a uma ou outra técnica (MOHAN et al, 2003; WILSON et al., 1996, 2003). O ensaio de TUNEL detecta as terminações OH^- que se formam durante a fragmentação do DNA que ocorre no processo de morte celular programada. Esse fenômeno pode, também, ocorrer durante a necrose, uma forma desorganizada e não programada de morte celular. Recentemente demonstrou-se que as células em necrose são falsamente detectadas pelo ensaio de TUNEL (KIM et al., 2000; MOHAN et al., 2003) por meio de MET. Embora o ensaio de TUNEL

apresente vantagens para estudos quantitativos de contagem de células positivas, a análise morfológica por meio de MET é fundamental para confirmar o processo de morte celular programada – apoptose (WILSON, 2003).

Atribui-se às diversas citocinas presentes no epitélio e no filme lacrimal o estímulo para uma célula entrar em apoptose. A hipótese de o filme lacrimal ser fundamental para ocorrer apoptose foi levantada por ZHAO et al. (2001). As citocinas existentes no filme lacrimal exercem um papel importante no processo cicatricial, porém, credita-se às interações do epitélio com o estroma, pelo menos na fase precoce, um papel mais determinante (WILSON et al., 1999, 2001, 2002).

Estudos realizados em coelhos e camundongos mostraram que o filme lacrimal não é indispensável para ocorrer apoptose (WILSON, 2002b). Na córnea do paciente n.º 7, a irrigação com BSS para remover o filme lacrimal, antes da desepitelização, não impediu a apoptose, detectada tanto pelo ensaio de TUNEL quanto por meio de MET (Figuras 15 e 16) após debridamento epitelial. Esta conclusão permite supor que em seres humanos a presença da lágrima não é indispensável para o processo de apoptose.

Para verificar a proliferação celular no epitélio e no estroma, utilizou-se a técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti-Ki67, pois esta é uma técnica considerada padrão ouro (ZIESKE et al 2001; MOHAN et al., 2003; WILSON et al., 2003). A Figura 10 A mostra uma célula positiva na região basal da córnea não debridada. Este achado ilustra uma das etapas de renovação do epitélio corneano. Para HANNA et al. (1961), o ciclo de

renovação epitelial (*epithelial turnover*) dura de sete a dez dias. Não se observou fenômeno de proliferação celular no estroma dos casos estudados entre 1 hora e 8 horas após debridamento (Figura 10 B). Na avaliação feita 65 horas após debridamento, verificou-se células em processo de mitose no estroma anterior, subjacente à área em que ocorreu apoptose de ceratócitos (Figura 10 C).

Os miofibroblastos são células maiores e menos transparentes do que os ceratócitos normais. Para detectar a presença de miofibroblastos, utilizou-se o marcador anti-SMA, de acordo com estudos realizados por MASUR et al. (1996) e JESTER et al. (1999a,b). Não foram identificados miofibroblastos em nenhum espécime, de forma semelhante a que ocorre em animais de experimentação, onde miofibroblastos normalmente aparecem no estroma 72 horas após lesão epitelial. (MASUR, et al, 1996; JESTER, et al., 1999a,b; MOHAN et al., 2003).

O emprego da microscopia confocal *in vivo* permitiu observar, nas córneas dos pacientes n.º 1 e n.º 2, uma desorganização da morfologia dos ceratócitos com perda da imagem característica dos núcleos celulares na região estromal anterior (Figuras 17 A e B, Figura 18 D). Embora estas descobertas sugiram a presença de células em apoptose, ainda não é possível identificar esse fenômeno exclusivamente por meio de microscopia confocal *in vivo*, devido às limitações da técnica (TERVO et al., 2003). Os ceratócitos das camadas mais profundas e o endotélio estavam normais, em ambos os casos (Figuras 17 C e D; Figura 18 H).

No paciente n.º 2 observou-se, ainda, que o epitélio em regeneração estava fino, com o padrão classicamente descrito como “em redemoinho” (DUA et al., 2000). Células com formato dendrítico foram notadas na camada basal do epitélio em regeneração (Figura 18 C) e também no estroma (Figura 18 D). Estudos recentes descreveram a importância dessas células no processo de apresentação de antígenos na córnea normal e após trauma (HAMRAH et al., 2002, 2003). Células estromais com evidência de mitose foram identificadas a 135, 169 e 220 μm da superfície (Figuras 18 E, F e G). Estes achados são compatíveis com os encontrados na avaliação feita por meio da técnica imuno-histoquímica para Ki-67 (Figura 10 C).

Esta pesquisa sugere que, na resposta cicatricial precoce, as córneas humanas apresentam eventos semelhantes aos observados em córneas de animais de experimentação, como coelhos e roedores (MOHAN et al., 2003; ZIESKE et al., 2001). A utilização de córneas humanas normais no modelo apresentado abre novos caminhos para pesquisas sobre a cicatrização da córnea.

A apoptose de ceratócitos, que ocorre imediatamente após trauma epitelial, representa o primeiro evento de uma complexa cascata de cicatrização, constituindo-se em alvo estratégico para a modulação dessa resposta (WILSON, 1997, 1999; AMBRÓSIO e WILSON, 2002; AMBRÓSIO et al. 2003a,b,c). O achado desse fenômeno em córneas humanas no presente estudo mantém essa hipótese.

O estudo de córneas humanas nessas condições foi aprovado pelas comissões de ética da Universidade de São Paulo e da Universidade de

Washington. No futuro, esta metodologia poderá ser reproduzida para avaliar eventos da cicatrização corneana em um maior número de pacientes e com seguimentos mais prolongados. Mas para isso será necessário desenvolver modelos que não afetem a qualidade de vida, nem apresentem riscos aos voluntários. Outras formas de trauma epitelial deverão ser estudadas em seres humanos, como ablação epitelial por meio do Excimer laser, criação de retalho lamelar com microceratômico, criação de *flap* epitelial após a aplicação de álcool, bem como a adição do Excimer laser em modo fotorefrativo no estroma para reprodução completa das técnicas PRK, LASIK e LASEK. O modelo desta investigação poderá, também, ser utilizado para testar novas estratégias para controlar a resposta cicatricial corneana, como o uso de enzimas moduladoras da apoptose que atualmente estão sendo estudadas por WILSON et al..

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Realizou-se investigação em seres humanos para verificar eventos de cicatrização corneana precoce após debridamento epitelial. Nas condições deste estudo, verificou-se:

- Presença de ceratócitos em processo de morte celular programada (apoptose) na região estromal anterior nas córneas debridadas. O número de células em apoptose variou entre indivíduos, sendo esse número maior na avaliação feita após oito horas do debridamento.
- Presença de resposta celular proliferativa no epitélio em regeneração e no estroma anterior subjacente à área em que houve apoptose, após 65 horas do debridamento epitelial.
- Até 65 horas, ausência de formação de miofibroblastos no estroma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, A.J.; JAKOBIEC, F.A. Corneal wound healing: cytokines and extracellular matrix proteins. **Int Ophthalmol Clin**, v. 42, n.3, p. 13-22, 2002.
- ALIÓ, J.L.; PEREZ-SANTONJA, J.J.; TERVO, T.; TABBARA, K.F.; Vesaluoma, M.; Smith, R.J.; Maddox, B.; Maloney, R.K. Postoperative inflammation, microbial complications, and wound healing following laser in situ keratomileusis. **J Refract Surg**, v. 16, n.5, p. 523-38, 2000.
- ALVES M.R.; MATTAR, D.B.; MILANI, J.A.A.; SILVA, M.H.T. Estudo comparativo da reparação do epitélio corneano após trauma planejado, em coelhas. **Arq. Bras. Oftalmol**, v. 57, p. 134-6, 1994
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n.9, p. 1053-61, 1999.
- AMBRÓSIO, R., JR.; MORO, F.; NETTO, M.V.; LAMBERT, L.C.; CVINTAL, T. Experimental Exercises in Cataract Surgery using Human Eyes from the Eye Bank (vídeo). Video Competition - International Society of Refractive Surgery Annual Meeting (premiado como primeiro lugar na categoria educacional). Orlando, 1999. Clinoptics - São Paulo. 1999a.
- AMBRÓSIO, R., JR.; MORO, F.; NETTO, M.V.; LAMBERT, L.C.; CVINTAL, T. Exercícios Experimentais em Cirurgia da Catarata utilizando Olhos Humanos de banco de olhos (vídeo). Festival de Vídeos - Alcon. Congresso Internacional das Sociedades Brasileiras de Catarata e Implantes e de Cirurgia Refrativa de 2002 (premiado como Grande Campeão). São Paulo, Clinoptics - São Paulo. 1999b.

AMBRÓSIO, R., JR.; MORO, F.; NETTO, M.V.; MAGALHÃES, R.O.; LAMBERT, L.C. Dissecção Anatômica do Globo Ocular Humano (vídeo). Festival de Vídeos do Congresso Internacional da Sociedade Brasileira de Oftalmologia de 2000 (premiado como primeiro lugar). Rio de Janeiro, Clinoptics - São Paulo. 2000a.

AMBRÓSIO, R., JR.; MORO, F.; NETTO, M.V.; MAGALHÃES, R.O.; LAMBERT, L.C. Human Eye Dissection: combining anatomy demonstration and surgical training (vídeo). Video Competition - International Society of Refractive Surgery Annual Meeting (premiado como primeiro lugar na categoria educacional). Dallas, 2000. Cinoptics - São Paulo. 2000b.

AMBRÓSIO, R., JR.; WILSON, S.E. Complications of laser in situ keratomileusis: etiology, prevention, and treatment. **J Refract Surg**, v. 17, n.3, p. 350-79, 2001.

AMBRÓSIO, R., JR.; HARRISON, D.A. Confocal Microscopy in Refractive Surgery. **Rev Refract Surg**, v. 3, n.5, p. 34-7, 2001.

AMBRÓSIO, R., JR.; PERIMAN, L.M.; NETTO, M.V.; MOHAN, R.R.; MOHAN, R.R.; POSSIN, D.; HUANG, J.; SHEN, J.; KALINA, R.; WILSON, S.E. The Relevance of Corneal Wound Healing after Refractive Surgery. American Academy of Ophthalmology 2002 Joint Meeting - Video Session ("Best of Show" Award). Orlando. 2002a.

AMBRÓSIO, R., JR.; RUIZ-ALVES, M.; KARA-JOSÉ, N.; WILSON, S.E. Apoptose dos ceratócitos e sua importância em cirurgia refrativa. **Sinopse de Oftalmologia**, v. 4, n.4, p. 408-13, 2002b.

AMBRÓSIO, R., JR.; STELZNER, S.; BOERNER, C.; HONAN, P.; MCINTYRE, D.J. Nutritional Treatment of Dry Eye: Lipids. **Rev Refract Surg**, v. 3, n.3, p. 29-35, 2002d.

AMBRÓSIO, R. Corneal Epithelium Adhesion Complex. **Rev Refract Surg**, v. 4, n.5, p. 26-8, 2003

AMBRÓSIO, R., JR.; WILSON, S.E. LASIK vs LASEK vs PRK: advantages and indications. **Semin Ophthalmol**, v. 18, n.1, p. 2-10, 2003a.

AMBRÓSIO, R., JR.; WILSON, S.E. Wound Healing after Hyperopic Corneal Surgery: Why is Regression greater in Hyperopia? In: Koch, D.D. **Hyperopia and Presbyopia**. New York, Marcel Dekker, Inc., 2003b. p.173-88.

AMBRÓSIO, R., JR.; NETTO, M.V.; WILSON, S.E.; ALVES, M.R. Cicatrização da córnea pós-lasik e ablação de superfície. In: Alves, M.R., Chamon, W., Nose, W. **Cirurgia Refrativa**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2003a. p.108-16.

AMBRÓSIO, R., JR.; PERIMAN, L.M.; NETTO, M.V.; WILSON, S.E. Bilateral marginal sterile infiltrates and diffuse lamellar keratitis after laser in situ keratomileusis. **J Refract Surg**, v. 19, n.2, p. 154-8, 2003b.

AMBRÓSIO, R., JR.; PERIMAN, L.M.; WILSON, S.E. Dry Eye after LASIK. In: Burrato, L. & Brint, S. **Custom LASIK: Surgical Techniques and Complications**. Thorofare, SLACK Inc., 2003c. p.335-42.

AMM, M.; WETZEL, W.; WINTER, M.; UTHOFF, D.; DUNCKER, G.I. Histopathological comparison of photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbits. **J Refract Surg**, v. 12, n.7, p. 758-66, 1996.

ANDERSON, N.J.; EDELHAUSER, H.F.; SHARARA, N.; THOMPSON, K.P.; RUBINFELD, R.S.; DEVANEY, D.M.; L'HERNAULT, N.; GROSSNIKLAUS, H.E. Histologic and ultrastructural findings in human corneas after successful laser in situ keratomileusis. **Arch Ophthalmol**, v. 120, n.3, p. 288-93, 2002.

ANDRESEN, J.L.; EHLERS, N. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. **Curr Eye Res**, v. 17, n.1, p. 79-87, 1998.

ANDRESEN, J.L.; LEDET, T.; EHLERS, N. Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. **Curr Eye Res**, v. 16, n.6, p. 605-13, 1997.

ARON-ROSA, D.; CARRE, F.; CASSIANI, P.; DELACOUR, M.; GROSS, M.; LACOUR, B.; OLIVIO, J.C.; TIMSIT, J.C. Keratorefractive surgery with the excimer laser. **Am J Ophthalmol**, v. 100, n.5, p. 741-2, 1985.

AZAR, D.T.; SPURR-MICHAUD, S.J.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. Decreased penetration of anchoring fibrils into the diabetic stroma. A morphometric analysis. **Arch Ophthalmol**, v. 107, n.10, p. 1520-3, 1989.

AZAR, D.T.; SPURR-MICHAUD, S.J.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. **Arch Ophthalmol**, v. 110, n.4, p. 537-40, 1992.

-
- BALDWIN, H.C.; MARSHALL, J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 80, n.3, p. 238-47, 2002.
- BARRETT, K.L.; WILLINGHAM, J.M.; GARVIN, A.J.; WILLINGHAM, M.C. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. **J Histochem Cytochem**, v. 49, n.7, p. 821-32, 2001.
- BAZAN, H.; OTTINO, P. The role of platelet-activating factor in the corneal response to injury. **Prog Retin Eye Res**, v. 21, n.5, p. 449-64, 2002.
- BELIN, M.W. Evaluating emerging refractive technologies. **Int Ophthalmol Clin**, v. 42, n.4, p. 1-18, 2002.
- BINDER, P.S. Barraquer lecture. What we have learned about corneal wound healing from refractive surgery. **Refract Corneal Surg**, v. 5, n.2, p. 98-120, 1989.
- BOULTON, M.; ALBON, J. Stem cells in the eye. **Int Journ Bioch & Cell Biol**, in press. 2003.
- BOHNKE, M.; MASTERS, B.R. Confocal microscopy of the cornea. **Prog Retin Eye Res**, v. 18, n.5, p. 553-628, 1999.
- BUHREN, J.; CICHOCKI, M.; BAUMEISTER, M.; KOHNEN, T. Diffuse lamellar keratitis after laser in situ keratomileusis. Clinical and confocal microscopy findings. **Ophthalmologe**, v. 99, n.3, p. 176-80, 2002.
- BUHREN, J.; KOHNEN, T. Corneal wound healing after laser in situ keratomileusis flap lift and epithelial abrasion. **J Cataract Refract Surg**, v. 29, n.10, p. 2007-12, 2003.

CAMPOS, M.; RAMAN, S.; LEE, M.; MCDONNELL, P.J. Keratocyte loss after different methods of de-epithelialization. **Ophthalmology**, v. 101, n.5, p. 890-4, 1994a.

CAMPOS, M.; SZERENYI, K.; LEE, M.; MCDONNELL, J.M.; LOPEZ, P.F.; MCDONNELL, P.J. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. **Arch Ophthalmol**, v. 112, n.2, p. 254-60, 1994b.

CHAKRAVARTI, S. The cornea through the eyes of knockout mice. **Exp Eye Res**, v. 73, n.4, p. 411-9, 2001.

CRESTA, F. Avaliação da cinética do epitélio corneano de coelhas com marcadores de proliferação celular. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: 2002.

CROSSON, C.E.; KLYCE, S.D.; BEUERMAN, R.W. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 27, n.4, p. 464-73, 1986.

DARTT, D.A. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. **Exp Eye Res**, v. 78, n.2, p. 173-85, 2004.

DEL PERO, R.A.; GIGSTAD, J.E.; ROBERTS, A.D.; KLINTWORTH, G.K.; MARTIN, C.A.; L'ESPERANCE, F.A., JR.; TAYLOR, D.M. A refractive and histopathologic study of excimer laser keratectomy in primates. **Am J Ophthalmol**, v. 109, n.4, p. 419-29, 1990.

DOHLMAN, C.H.; GASSET, A.R.; ROSE, J. The effect of the absence of corneal epithelium or endothelium on the stromal keratocytes. **Invest Ophthalmol**, v. 7, n.5, p. 520-34, 1968.

- DUA, H.S.; GOMES, J.A. Clinical course of hurricane keratopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 84, n.3, p. 285-8, 2000.
- DUA, H.S.; GOMES, J.A.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **Br J Ophthalmol**, v. 78, n.5, p. 401-8, 1994.
- DUA, H.S.; SINGH, A.; GOMES, J.A.; LAIBSON, P.R.; DONOSO, L.A.; TYAGI, S. Vortex or whorl formation of cultured human corneal epithelial cells induced by magnetic fields. **Eye**, v. 10 (Pt 4), p. 447-50, 1996.
- EDELHAUSER, H.F. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. **Cornea**, v. 19, n.3, p. 263-73, 2000.
- EIFERMAN, R.A. Corneal wound healing and the future of refractive surgery. **Refract Corneal Surg**, v. 5, n.2, p. 73-4, 1989.
- ERIE, J.C.; PATEL, S.V.; MCLAREN, J.W.; NAU, C.B.; HODGE, D.O.; BOURNE, W.M. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study(a). **Am J Ophthalmol**, v. 134, n.5, p. 689-95, 2002.
- ESPANA, E.M.; GRUETERICH, M.; MATEO, A.; ROMANO, A.C.; YEE, S.B.; YEE, R.W.; TSENG, S.C. Cleavage of corneal basement membrane components by ethanol exposure in laser-assisted subepithelial keratectomy. **J Cataract Refract Surg**, v. 29, n.6, p. 1192-7, 2003.
- ESTIL, S.; KRAVIK, K.; HAASKJOLD, E.; REFSUM, S.B.; BJERKNES, R.; WILSON, G. Pilot study on the time course of apoptosis in the regenerating corneal epithelium. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 80, n.5, p. 517-23, 2002.

- FAGERHOLM, P. Wound healing after photorefractive keratectomy. **J Cataract Refract Surg**, v. 26, n.3, p. 432-47, 2000.
- FAGERHOLM, P. Phototherapeutic keratectomy: 12 years of experience. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 81, n.1, p. 19-32, 2003.
- FANTES, F.E.; HANNA, K.D.; WARING, G.O., 3RD; POULIQUEN, Y.; THOMPSON, K.P.; SAVOLDELLI, M. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. **Arch Ophthalmol**, v. 108, n.5, p. 665-75, 1990.
- FARRIS, R.L. - Abnormalities of the Tears and Treatment of Dry Eyes. In: Kaufman, H.B. ,Barron, B.A. ,McDonald, M.B. **The Cornea Second Edition on CD Rom**. Portland, Butterworth-Heinemann, 1999.
- FILENIUS, S.; TERVO, T.; VIRTANEN, I. Production of fibronectin and tenascin isoforms and their role in the adhesion of human immortalized corneal epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n.8, p. 3317-25, 2003.
- GAO, J.; GELBER-SCHWALB, T.A.; ADDEO, J.V.; STERN, M.E. Apoptosis in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. **Cornea**, v. 16, n.2, p. 200-8, 1997.
- GEROSKI, D.H.; EDELHAUSER, H.F. Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 25, n.9, p. 1056-60, 1984.
- GIPSON, I.K.; INATOMI, T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 6, n.4, p. 3-10, 1995.

- GOLSTEIN, P. Controlling cell death. **Science**, v. 275, n.5303, p. 1081-2, 1997.
- GOMEZ, S.; HERRERAS, J.M.; MERAYO, J.; GARCIA, M.; ARGUESO, P.; CUEVAS, J. Effect of hyaluronic acid on corneal haze in a photorefractive keratectomy experimental model. **J Refract Surg**, v. 17, n.5, p. 549-54, 2001.
- GUELL, J.L.; LOHMANN, C.P.; MALECAZE, F.A.; JUNGER, J.; MULLER, A.; DENEUVILLE, S. Intraepithelial photorefractive keratectomy for regression after laser in situ keratomileusis. **J Cataract Refract Surg**, v. 25, n.5, p. 670-4, 1999.
- GUIMARAES, C.A.; BENCHIMOL, M.; AMARANTE-MENDES, G.P.; LINDEN, R. Alternative programs of cell death in developing retinal tissue. **J Biol Chem**, v. 278, n.43, p. 41938-46, 2003.
- GUIMARÃES, R.Q.; GRUPENMACHER, F.; PEREIRA, R.A.; ARAÚJO, R.G. Previsibilidade na Ceratotomia Radial. In: Guimarães RQ, A.C., Ambrósio R. - **Cirurgia Refrativa**. Rio de Janeiro, Ed. Pirâmide., 1987. p.93-100.
- HANNA, C.; O'BRIEN, J.E. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. **Arch Ophthalmol**, v. 64, p. 536-9, 1960.
- HARRISON, D.A.; JOOS, C.; AMBRÓSIO JR, R. Morphology of corneal Basal epithelial cells by in vivo slit-scanning confocal microscopy. **Cornea**, v. 22, n.3, p. 246-8, 2003.
- HAYNES, R.J.; TIGHE, P.J.; DUA, H.S. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. **Br J Ophthalmol**, v. 83, n.6, p. 737-41, 1999.

-
- HELENA, M.C.; BAERVELDT, F.; KIM, W.J.; WILSON, S.E. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 39, n.2, p. 276-83, 1998.
- HELENA, M.C.; FILATOV, V.V.; JOHNSTON, W.T.; VIDAURRI-LEAL, J.; WILSON, S.E.; Talamo, J.H. Effects of 50% ethanol and mechanical epithelial debridement on corneal structure before and after excimer photorefractive keratectomy. **Cornea**, v. 16, n.5, p. 571-9, 1997.
- HELMHOLTZ, H. **Treatise on Physiological Optics**. New York, Dover, 1924.
- HONG, J.W.; LIU, J.J.; LEE, J.S.; MOHAN, R.R.; WOODS, D.J.; HE, Y.G.; WILSON, S.E. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n.12, p. 2795-803, 2001.
- HUANG, J.; POSSIN, D.; KNOWN, R.; AMBRÓSIO, R. JR.; WILSON, S.E. Characterization of Inflammatory Cell Infiltration in Rabbits Following PRK and LASIK. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Fort Lauderdale. Program number 4235. 2003.
- JESTER, J.V.; BARRY-LANE, P.A.; CAVANAGH, H.D.; PETROLL, W.M. Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. **Cornea**, v. 15, n.5, p. 505-16, 1996.

- JESTER, J.V.; BARRY-LANE, P.A.; PETROLL, W.M.; OLSEN, D.R.; CAVANAGH, H.D. Inhibition of corneal fibrosis by topical application of blocking antibodies to TGF beta in the rabbit. **Cornea**, v. 16, n.2, p. 177-87, 1997.
- JESTER, J.V.; HUANG, J.; PETROLL, W.M.; CAVANAGH, H.D. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. **Exp Eye Res**, v. 75, n.6, p. 645-57, 2002.
- JESTER, J.V.; MOLLER-PEDERSEN, T.; HUANG, J.; SAX, C.M.; KAYS, W.T.; CAVANGH, H.D.; PETROLL, W.M.; PIATIGORSKY, J. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 5), p. 613-22, 1999a.
- JESTER, J.V.; PETROLL, W.M.; BARRY, P.A.; CAVANAGH, H.D. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 36, n.5, p. 809-19, 1995.
- JESTER, J.V.; PETROLL, W.M.; CAVANAGH, H.D. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. **Prog Retin Eye Res**, v. 18, n.3, p. 311-56, 1999b.
- JOHNSON, D.H.; BOURNE, W.M.; CAMPBELL, R.J. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. **Arch Ophthalmol**, v. 100, n.12, p. 1942-7, 1982.
- JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. **Prog Retin Eye Res**, v. 22, n.3, p. 359-89, 2003.

-
- KALDAWY, R.M.; WAGNER, J.; CHING, S.; SEIGEL, G.M. Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. **Cornea**, v. 21, n.2, p. 206-9, 2002.
- KAPADIA, M.S.; MEISLER, D.M.; WILSON, S.E. Epithelial removal with the excimer laser (laser-scrape) in photorefractive keratectomy retreatment. **Ophthalmology**, v. 106, n.1, p. 29-34, 1999.
- KATO, T.; NAKAYASU, K.; HOSODA, Y.; WATANABE, Y.; KANAI, A. Corneal wound healing following laser in situ keratomileusis (LASIK): a histopathological study in rabbits. **Br J Ophthalmol**, v. 83, n.11, p. 1302-5, 1999.
- KATZ, M.; KRUGER, P.B. The Human Eye as an Optical System (Chapter 33). Tasman, W.; JAEGER, E.A. **Duane's Ophthalmology on CD-ROM**. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Inc., 2002.
- KAUFMAN, S.C.; MAITCHOUK, D.Y.; CHIOU, A.G.; BEUERMAN, R.W. Interface inflammation after laser in situ keratomileusis. Sands of the Sahara syndrome. **J Cataract Refract Surg**, v. 24, n.12, p. 1589-93, 1998.
- KENNEY, M.C.; BROWN, D.J.; RAJEEV, B. Everett Kinsey lecture. The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. **Ciao J**, v. 26, n.1, p. 10-3, 2000.
- KIM, W.J.; HELENA, M.C.; MOHAN, R.R.; WILSON, S.E. Changes in corneal morphology associated with chronic epithelial injury. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 40, n.1, p. 35-42, 1999a.

- KIM, W.J.; MOHAN, R.R.; WILSON, S.E. Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 40, n.7, p. 1364-72, 1999b.
- KIM, W.J.; RABINOWITZ, Y.S.; MEISLER, D.M.; WILSON, S.E. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. **Exp Eye Res**, v. 69, n.5, p. 475-81, 1999c.
- KIM, W.J.; MOHAN, R.R.; WILSON, S.E. Caspase inhibitor z-VAD-FMK inhibits keratocyte apoptosis, but promotes keratocyte necrosis, after corneal epithelial scrape. **Exp Eye Res**, v. 71, n.3, p. 225-32, 2000.
- KINOSHITA, S.; ADACHI, W.; SOTOZONO, C.; NISHIDA, K.; YOKOI, N.; QUANTOCK, A.J.; OKUBO, K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. **Prog Retin Eye Res**, v. 20, n.5, p. 639-73, 2001.
- KINOSHITA, S.; FRIEND, J.; THOFT, R.A. Biphasic cell proliferation in transdifferentiation of conjunctival to corneal epithelium in rabbits. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 24, n.8, p. 1008-14, 1983.
- KOCH, D.D.; KOHNEN, T.; ANDERSON, J.A.; BINDER, P.S.; MOORE, M.N.; MENEFEE, R.F.; VALDERAMMA, G.L.; BERRY, M.J. Histologic changes and wound healing response following 10-pulse noncontact holmium:YAG laser thermal keratoplasty. **J Refract Surg**, v. 12, n.5, p. 623-34, 1996.
- KURPAKUS-WHEATER, M.; KERNACKI, K.A.; HAZLETT, L.D. Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. **Prog Histochem Cytochem**, v. 36, n.3, p. 185-259, 2001.

- LATVALA, T.; BARRAQUER-COLL, C.; TERVO, K.; TERVO, T. Corneal wound healing and nerve morphology after excimer laser in situ keratomileusis in human eyes. **J Refract Surg**, v. 12, n.6, p. 677-83, 1996.
- LEE, J.B.; CHOE, C.M.; KIM, H.S.; SEO, K.Y.; SEONG, G.J.; KIM, E.K. Comparison of TGF-beta1 in tears following laser subepithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy. **J Refract Surg**, v. 18, n.2, p. 130-4, 2002a.
- LEE, J.B.; JAVIER, J.A.; CHANG, J.H.; CHEN, C.C.; KATO, T.; AZAR, D.T. Confocal and electron microscopic studies of laser subepithelial keratomileusis (LASEK) in the white leghorn chick eye. **Arch Ophthalmol**, v. 120, n.12, p. 1700-6, 2002b.
- LINDEN, R. The anti-death league: associative control of apoptosis in developing retinal tissue. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 32, n.1, p. 146-58, 2000.
- LINNA, T.U.; VESALUOMA, M.H.; PETROLL, W.M.; TARKKANEN, A.H.; TERVO, T.M. Confocal microscopy of a patient with irregular astigmatism after LASIK reoperations and relaxation incisions. **Cornea**, v. 19, n.2, p. 163-9, 2000.
- LOHMANN, C.P.; HOFFMANN, E.; REISCHL, U. [Epidermal growth factor (EGF) in tears in excimer laser photorefractive keratectomy. Responsible for postoperative refraction and "haze"?]. **Ophthalmologe**, v. 95, n.2, p. 80-7, 1998.
- LOHMANN, C.P.; REISCHL, U.; MARSHALL, J. Regression and epithelial hyperplasia after myopic photorefractive keratectomy in a human cornea. **J Cataract Refract Surg**, v. 25, n.5, p. 712-5, 1999.

-
- LU, L.; REINACH, P.S.; KAO, W.W. Corneal epithelial wound healing. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n.7, p. 653-64, 2001.
- MALDONADO-BAS, A.; ONNIS, R. Results of laser in situ keratomileusis in different degrees of myopia. **Ophthalmology**, v. 105, n.4, p. 606-11, 1998.
- MALTSEVA, O.; FOLGER, P.; ZEKARIA, D.; PETRIDOU, S.; MASUR, S.K. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n.11, p. 2490-5, 2001.
- MARSHALL, J.; TROKEL, S.L.; ROTHERY, S.; KRUEGER, R.R. Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using an excimer laser. **Ophthalmology**, v. 95, n.10, p. 1411-21, 1988.
- MASUR, S.K.; DEWAL, H.S.; DINH, T.T.; ERENBURG, I.; PETRIDOU, S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n.9, p. 4219-23, 1996.
- MATHERS, W.D.; LANE, J.A.; ZIMMERMAN, M.B. Tear film changes associated with normal aging. **Cornea**, v. 15, n.3, p. 229-34, 1996.
- MAURICE, D.M. The structure and transparency of the cornea. **J Physiol**, v. 136, n.2, p. 263-86, 1957.
- MCDONALD, M.B.; BEUERMAN, R.; FALZONI, W.; RIVERA, L.; KAUFMAN, H.E. Refractive surgery with the excimer laser. **Am J Ophthalmol**, v. 103, n.3 Pt 2, p. 469, 1987.

- MCDONALD, M.B.; FRANTZ, J.M.; KLYCE, S.D.; SALMERON, B.; BEUERMAN, R.W.; MUNNERLYN, C.R.; CLAPHAM, T.N.; KOONS, S.J.; KAUFMAN, H.E. One-year refractive results of central photorefractive keratectomy for myopia in the nonhuman primate cornea. **Arch Ophthalmol**, v. 108, n.1, p. 40-7, 1990.
- MELLES, G.R.; EGGINK, F.A.; LANDER, F.; PELS, E.; RIETVELD, F.J.; BEEKHUIS, W.H.; BINDER, P.S. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. **Cornea**, v. 17, n.6, p. 618-26, 1998.
- MERAYO-LLOVES, J.; YANEZ, B.; MAYO, A.; MARTIN, R.; PASTOR, J.C. Experimental model of corneal haze in chickens. **J Refract Surg**, v. 17, n.6, p. 696-9, 2001.
- MEYER, J.C.; STULTING, R.D.; THOMPSON, K.P.; DURRIE, D.S. Late onset of corneal scar after excimer laser photorefractive keratectomy. **Am J Ophthalmol**, v. 121, n.5, p. 529-39, 1996.
- MIYAMOTO, T.; SAIKA, S.; YAMANAKA, A.; KAWASHIMA, Y.; SUZUKI, Y.; OHNISHI, Y. Wound healing in rabbit corneas after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. **J Cataract Refract Surg**, v. 29, n.1, p. 153-8, 2003.
- MOHAN, R.R.; HUTCHEON, A.E.; CHOI, R.; HONG, J.; LEE, J.; AMBROSIO, R., JR.; ZIESKE, J.D.; WILSON, S.E. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. **Exp Eye Res**, v. 76, n.1, p. 71-87, 2003.
- MOHAN, R.R.; KIM, W.J.; CHEN, L.; WILSON, S.E. Bone morphogenic proteins 2 and 4 and their receptors in the adult human cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 39, n.13, p. 2626-36, 1998.

- MOHAN, R.R.; LIANG, Q.; KIM, W.J.; HELENA, M.C.; BAERVELDT, F.; WILSON, S.E. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. **Exp Eye Res**, v. 65, n.4, p. 575-89, 1997.
- MOHAN, R.R.; KIM, W.J.; STARK, G.R.; WILSON, S.E. Defective keratocyte apoptosis in response to epithelial injury in stat 1 null mice. **Exp Eye Res**, v. 70, n.4, p. 485-91, 2000a.
- MOHAN, R.R.; KIM, W.J.; WILSON, S.E. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n.6, p. 1327-36, 2000b.
- MOLLER-PEDERSEN, T.; CAVANAGH, H.D.; PETROLL, W.M.; JESTER, J.V. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. **Cornea**, v. 17, n.6, p. 627-39, 1998a.
- MOLLER-PEDERSEN, T.; CAVANAGH, H.D.; PETROLL, W.M.; JESTER, J.V. Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but not regression of photoablative effect following PRK. **Curr Eye Res**, v. 17, n.7, p. 736-47, 1998b.
- MOLLER-PEDERSEN, T.; LI, H.F.; PETROLL, W.M.; CAVANAGH, H.D.; JESTER, J.V. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 39, n.3, p. 487-501, 1998c.
- MOLLER-PEDERSEN, T.; CAVANAGH, H.D.; PETROLL, W.M.; JESTER, J.V. Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy: a 1-year confocal microscopic study. **Ophthalmology**, v. 107, n.7, p. 1235-45, 2000.

MULLER, L.J.; VRENSEN, G.F.; PELS, L.; CARDOZO, B.N.; WILLEKENS, B. Architecture of human corneal nerves. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 38, n.5, p. 985-94, 1997.

MULLER, L.J.; MARFURT, C.F.; KRUSE, F.; TERVO, T.M. Corneal nerves: structure, contents and function. **Exp Eye Res**, v. 76, n.5, p. 521-42, 2003.

NAGANO, T.; NAKAMURA, M.; NAKATA, K.; YAMAGUCHI, T.; TAKASE, K.; OKAHARA, A.; IKUSE, T.; NISHIDA, T. Effects of substance P and IGF-1 in corneal epithelial barrier function and wound healing in a rat model of neurotrophic keratopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n.9, p. 3810-5, 2003.

NAKAMURA, K.; KUROSAKA, D.; BISSEN-MIYAJIMA, H.; TSUBOTA, K. Intact corneal epithelium is essential for the prevention of stromal haze after laser assisted in situ keratomileusis. **Br J Ophthalmol**, v. 85, n.2, p. 209-13, 2001.

NAKAYASU, K. Stromal changes following removal of epithelium in rat cornea. **Jpn J Ophthalmol**, v. 32, n.2, p. 113-25, 1988.

NAOUMIDI, I.; PAPADAKI, T.; ZACHAROPOULOS, I.; SIGANOS, C.; PALLIKARIS, I. Epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis: a histopathologic study in human corneas. **Arch Ophthalmol**, v. 121, n.7, p. 950-5, 2003.

NISHIDA, T.; UEDA, A.; FUKUDA, M.; MISHIMA, H.; YASUMOTO, K.; OTORI, T. Interactions of extracellular collagen and corneal fibroblasts: morphologic and biochemical changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen matrix. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 24, n.10, p. 1009-14, 1988.

- NISHIDA, T. - Basic Science: Cornea. In: Krachmer, J.H. ,Mannis, M.J. ,Holland, E.J. ,Palay, D.A. - **Cornea: Fundamentals of Cornea and External Disease**. St Louis, Mosby, 1998. p.Chapter 1.
- O'BRIEN, T.P.; LI, Q.; ASHRAF, M.F.; MATTESON, D.M.; STARK, W.J.; CHAN, C.C. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. **Arch Ophthalmol**, v. 116, n.11, p. 1470-4, 1998.
- PALLIKARIS, I.G.; NAOUMIDI, II; KALYVIANAKI, M.I.; KATSANEVAKI, V.J. Epi-LASIK: comparative histological evaluation of mechanical and alcohol-assisted epithelial separation. **J Cataract Refract Surg**, v. 29, n.8, p. 1496-501, 2003.
- PARK, C.K.; KIM, J.H. Comparison of wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbits. **J Cataract Refract Surg**, v. 25, n.6, p. 842-50, 1999.
- PAVAN-LANGSTON, D. Herpes simplex virus ocular infections: current concepts of acute, latent and reactivated disease. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 88, p. 727-96, 1990.
- PEREZ-GOMEZ, I.; EFRON, N. Change to corneal morphology after refractive surgery (myopic laser in situ keratomileusis) as viewed with a confocal microscope. **Optom Vis Sci**, v. 80, n.10, p. 690-7, 2003.
- PETRIDOU, S.; MALTSEVA, O.; SPANAKIS, S.; MASUR, S.K. TGF-beta receptor expression and smad2 localization are cell density dependent in fibroblasts. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n.1, p. 89-95, 2000.

- PHILIPP, W.E.; SPEICHER, L.; GOTTINGER, W. Histological and immunohistochemical findings after laser in situ keratomileusis in human corneas. **J Cataract Refract Surg**, v. 29, n.4, p. 808-20, 2003.
- POSSIN, D. Nova forma de preservação do tecido para microscopia eletrônica e histoquímica. comunicação pessoal para AMBRÓSIO, JR., R. Seattle, WA. University of Washington. 2002.
- POSSIN, D.E.; HUANG, J.; AMBRÓSIO, JR. R.; WILSON., S.E. Activation of Caspase-3 in the Cornea after Epithelial Scrape Injury. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Fort Lauderdale.
- QIAN, Y.; DANA, M.R. Molecular mechanisms of immunity in corneal allotransplantation and xenotransplantation. **Expert Rev Mol Med**, v. 3, p. 1-21, 2001.
- RABINOWITZ, Y.S. Keratoconus. **Surv Ophthalmol**, v. 42, n.4, p. 297-319, 1998.
- REN, H.; WILSON, G. The effect of ultraviolet-B irradiation on the cell shedding rate of the corneal epithelium. **Acta Ophthalmol (Copenh)**, v. 72, n.4, p. 447-52, 1994.
- REN, H.; WILSON, G. Apoptosis in the corneal epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 37, n.6, p. 1017-25, 1996.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol**, v. 17, p. 208-12, 1963.
- ROBARDS, A.W.; WILSON, A.J. - **Procedures in Electron Microscopy**. New York, Wiley, 1993.

- ROLANDO, M.; ZIERHUT, M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. **Surv Ophthalmol**, v. 45 Suppl 2, p. S203-10, 2001.
- RUMELT, S.; COHEN, I.; SKANDARANI, P.; DELAREA, Y.; BEN SHAUL, Y.; REHANY, U. Ultrastructure of the lamellar corneal wound after laser in situ keratomileusis in human eye. **J Cataract Refract Surg**, v. 27, n.8, p. 1323-7, 2001.
- SAIKA, S.; OHNISHI, Y.; OOSHIMA, A.; LIU, C.Y.; KAO, W.W. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. **Cornea**, v. 21, n.2 Suppl 1, p. S23-9, 2002.
- SANGWAN, V.S. Limbal stem cells in health and disease. **Biosci Rep**, v. 21, n.4, p. 385-405, 2001.
- SHAH, S.S.; KAPADIA, M.S.; MEISLER, D.M.; WILSON, S.E. Photorefractive keratectomy using the summit SVS Apex laser with or without astigmatic keratotomy. **Cornea**, v. 17, n.5, p. 508-16, 1998.
- SHINE, W.E.; MCCULLEY, J.P.; PANDYA, A.G. Minocycline effect on meibomian gland lipids in meibomianitis patients. **Exp Eye Res**, v. 76, n.4, p. 417-20, 2003.
- SIVAK, J.M.; FINI, M.E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Prog Retin Eye Res**, v. 21, n.1, p. 1-14, 2002.
- SMITH, R.E.; FLOWERS, C.W., JR. Chronic blepharitis: a review. **Ciao J**, v. 21, n.3, p. 200-7, 1995.

- SMOLEK, M.K.; KLYCE, S.D. - Cornea (Chapter 8). Tasman, W.; Jaeger, E.A. **Duane's Ophthalmology on CD-ROM**. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Inc., 2002.
- SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J Ultrastruct Res**, v. 26, n.1, p. 31-43, 1969.
- STEINERT, R.F. Wound healing anomalies after excimer laser photorefractive keratectomy: correlation of clinical outcomes, corneal topography, and confocal microscopy. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 95, p. 629-714, 1997.
- STRAMER, B.M.; ZIESKE, J.D.; JUNG, J.C.; AUSTIN, J.S.; FINI, M.E. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n.10, p. 4237-46, 2003.
- SULLIVAN, D.A.; KRENZER, K.L.; SULLIVAN, B.D.; TOLLS, D.B.; TODA, I.; DANA, M.R. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 40, n.6, p. 1261-5, 1999.
- SULLIVAN, D.A.; YAMAGAMI, H.; LIU, M.; STEAGALL, R.J.; SCHIRRA, F.; SUZUKI, T.; KRENZER, K.L.; CERMAK, J.M.; SULLIVAN, R.M.; RICHARDS, S.M.; SCHAUMBERG, D.A.; DANA, M.R.; SULLIVAN, B.D. Sex steroids, the meibomian gland and evaporative dry eye. **Adv Exp Med Biol**, v. 506, n.Pt A, p. 389-99, 2002.
- SUZUKI, T.; SANO, Y.; SASAKI, O.; KINOSHITA, S. Ocular surface inflammation induced by *Propionibacterium acnes*. **Cornea**, v. 21, n.8, p. 812-7, 2002a.

- SUZUKI, T.; SULLIVAN, B.D.; LIU, M.; SCHIRRA, F.; RICHARDS, S.M.; YAMAGAMI, H.; SULLIVAN, D.A. Estrogen and progesterone effects on the morphology of the mouse meibomian gland. **Adv Exp Med Biol**, v. 506, n.Pt A, p. 483-8, 2002b.
- TERVO, T.; MOILANEN, J. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. **Prog Retin Eye Res**, v. 22, n.3, p. 339-58, 2003.
- THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 24, n.10, p. 1442-3, 1983.
- TSENG, S.C. Concept and application of limbal stem cells. **Eye**, v. 3 (Pt 2), p. 141-57, 1989.
- TUOMINEN, I.S.; TERVO, T.M.; TEPPONEN, A.M.; VALLE, T.U.; Gronhagen-Riska, C.; Vesaluoma, M.H. Human tear fluid PDGF-BB, TNF-alpha and TGF-beta1 vs corneal haze and regeneration of corneal epithelium and subbasal nerve plexus after PRK. **Exp Eye Res**, v. 72, n.6, p. 631-41, 2001.
- VERMES, I.; HAANEN, C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. **Adv Clin Chem**, v. 31, p. 177-246, 1994.
- VINCIGUERRA, P.; TORRES, I.; CAMESASCA, F.I. Applications of confocal microscopy in refractive surgery. **J Refract Surg**, v. 18, n.3 Suppl, p. S378-81, 2002.

- WACHTLIN, J.; LANGENBECK, K.; SCHRUNDER, S.; ZHANG, E.P.; HOFFMANN, F. Immunohistology of corneal wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. **J Refract Surg**, v. 15, n.4, p. 451-8, 1999.
- WANG, J.; FONN, D.; SIMPSON, T.L.; JONES, L. Precorneal and pre- and postlens tear film thickness measured indirectly with optical coherence tomography. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n.6, p. 2524-8, 2003.
- WARING, G.O., 3rd. Making sense of keratospeak. IV. Classification of refractive surgery, 1992. **Arch Ophthalmol**, v. 110, n.10, p. 1385-91, 1992.
- WARING, G.O., 3rd. A cautionary tale of innovation in refractive surgery. **Arch Ophthalmol**, v. 117, n.8, p. 1069-73, 1999.
- WATSKY, M.A.; OLSEN, T.W.; EDELHAUSER, H.F. - Cornea and Sclera. In: Kaufman, H.B. ,Barron, B.A. ,McDonald, M.B. **The Cornea Second Edition on CD Rom**. Portland, Butterworth-Heinemann, 1999.
- WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **J Histochem Cytochem**, v. 47, n.9, p. 1101-10, 1999.
- WILSON, S.E.; KAUFMAN, H.E. Graft failure after penetrating keratoplasty. **Surv Ophthalmol**, v. 34, n.5, p. 325-56, 1990.
- WILSON, S.E. Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. **Am J Ophthalmol**, v. 111, n.6, p. 763-5, 1991.

-
- WILSON, S.E.; HE, Y.G.; WENG, J.; LI, Q.; MCDOWALL, A.W.; VITAL, M.; CHWANG, E.L. 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**, v. 62, n.4, p. 325-7, 1996a.
- WILSON, S.E.; LI, Q.; WENG, J.; BARRY-LANE, P.A.; JESTER, J.V.; LIANG, Q.; WORDINGER, R.J. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 37, n.8, p. 1582-92, 1996b.
- WILSON, S.E. Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon: programmed cell death and wound healing. **J Refract Surg**, v. 13, n.2, p. 171-5, 1997.
- WILSON, S.E.; PEDROZA, L.; BEUERMAN, R.; HILL, J.M. Herpes simplex virus type-1 infection of corneal epithelial cells induces apoptosis of the underlying keratocytes. **Exp Eye Res**, v. 64, n.5, p. 775-9, 1997.
- WILSON, S.E. Everett Kinsey Lecture. Keratocyte apoptosis in refractive surgery. **Claio J**, v. 24, n.3, p. 181-5, 1998.
- WILSON, S.E.; KIM, W.J. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 39, n.2, p. 220-6, 1998.
- WILSON, S.E. Stimulus-specific and cell type-specific cascades: emerging principles relating to control of apoptosis in the eye. **Exp Eye Res**, v. 69, n.3, p. 255-66, 1999.

-
- WILSON, S.E.; CHEN, L.; MOHAN, R.R.; LIANG, Q.; LIU, J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. **Exp Eye Res**, v. 68, n.4, p. 377-97, 1999a.
- WILSON, S.E.; LIANG, Q.; KIM, W.J. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 40, n.10, p. 2185-90, 1999b.
- WILSON, S.E.; LIU, J.J.; MOHAN, R.R. Stromal-epithelial interactions in the cornea. **Prog Retin Eye Res**, v. 18, n.3, p. 293-309, 1999c.
- WILSON, S.E. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. **Cornea**, v. 19, n.3 Suppl, p. S7-12, 2000.
- WILSON, S.E.; HONG, J.W. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. **Cornea**, v. 19, n.4, p. 417-20, 2000.
- WILSON, S.E. Laser in situ keratomileusis-induced (presumed) neurotrophic epitheliopathy. **Ophthalmology**, v. 108, n.6, p. 1082-7, 2001.
- WILSON, S.E.; AMBRÓSIO, R., JR. Laser in situ keratomileusis-induced neurotrophic epitheliopathy. **Am J Ophthalmol**, v. 132, n.3, p. 405-6, 2001.
- WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; AMBRÓSIO, R., JR.; HONG, J.; LEE, J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. **Prog Retin Eye Res**, v. 20, n.5, p. 625-37, 2001a.

WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; HONG, J.W.; LEE, J.S.; CHOI, R. The wound healing response after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy: elusive control of biological variability and effect on custom laser vision correction. **Arch Ophthalmol**, v. 119, n.6, p. 889-96, 2001b.

WILSON, S.E. Analysis of the keratocyte apoptosis, keratocyte proliferation, and myofibroblast transformation responses after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 100, p. 411-33, 2002.

WILSON, S.E.; AMBRÓSIO, R., JR. Sporadic diffuse lamellar keratitis (DLK) after LASIK. **Cornea**, v. 21, n.6, p. 560-3, 2002.

WILSON, S.E.; MOHAN, R.R. Activation of Keratocyte Apoptosis in Response to Epithelial Scrape Injury Does Not Require Tears. IOVS - E-letters to the editor. <http://www.iovs.org/cgi/eletters/42/8/1743#43>. 2002

WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; HONG, J.; LEE, J.; CHOI, R.; LIU, J.J. Apoptosis in the cornea in response to epithelial injury: significance to wound healing and dry eye. **Adv Exp Med Biol**, v. 506, n.Pt B, p. 821-6, 2002.

WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; AMBRÓSIO, R., JR Corneal injury. A relatively pure model of stromal-epithelial interactions in wound healing. **Methods Mol Med**, v. 78, p. 67-81, 2003a.

WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; HUTCHEON, A.E.; AMBRÓSIO, R., JR; ZIESKE, J.D.; HONG, J.; LEE, J. Effect of ectopic epithelial tissue within the stroma on keratocyte apoptosis, mitosis, and myofibroblast transformation. **Exp Eye Res**, v. 76, n.2, p. 193-201, 2003b.

- WILSON, S.E.; NETTO, M.; AMBRÓSIO, R., JR. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. **Am J Ophthalmol**, v. 136, n.3, p. 530-6, 2003c.
- WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; WILSCH, M.; SEILER, T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. **Cornea**, v. 23, n.1, p. 43-9, 2004.
- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; RUTH, T.B.; MCLAUGHLIN, P.J. Epithelial adhesion complexes and organ culture of the human cornea. **Brain Res**, v. 900, n.2, p. 205-13, 2001.
- ZHAO, J.; NAGASAKI, T. Lacrimal gland as the major source of mouse tear factors that are cytotoxic to corneal keratocytes. **Exp Eye Res**, v. 77, n.3, p. 297-304, 2003.
- ZHAO, J.; NAGASAKI, T.; MAURICE, D.M. Role of tears in keratocyte loss after epithelial removal in mouse cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n.8, p. 1743-9, 2001.
- ZIANGIROVA, G.G.; ANTONOVA, O.V. The causes of necrobiosis and apoptosis of corneal epithelial cells during primary acquired keratoconus. **Izv Akad Nauk Ser Biol**, n.5, p. 517-21, 2002.
- ZIESKE, J.D.; WASSON, M. Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. **J Cell Sci**, v. 106 (Pt 1), p. 145-52, 1993.

ZIESKE, J.D. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair. **Prog Retin Eye Res**, v. 19, n.3, p. 257-70, 2000.

ZIESKE, J.D.; GUIMARAES, S.R.; HUTCHEON, A.E. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. **Exp Eye Res**, v. 72, n.1, p. 33-9, 2001.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

FORRESTER, J.; DICK, A.; McMENAMIN, P.; LEE, W. The Eye: Basic Sciences in Practice. Londres, WB Saunders, 1996.

BELFOR JR., R.; KARA-JOSÉ, N. Córnea. Clínica – Cirúrgica. São Paulo, Roca. 1996.

GOMES, J.A.P.; PIRES, R.T.F.; RUIZ-ALVES, M.; NETTO, A.L. Doenças da Superfície Ocular. Diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2003.

CHANDLER, J.W.; SUGAR, J.; EDELHAUSER, H.F. External Diseases: Cornea, Conjunctiva, Sclera, Eyelids, Lacrimal System. Philadelphia, Mosby, 1994.

KAUFMAN, H.B.; BARRON, B.A.; MCDONALD, M.B. Cornea and Sclera. The Cornea Second Edition on CD Rom. Portland, Butterworth-Heinemann, 1999.

KRACHMER, J.H.; MANNIS, M.J.; HOLLAND, E.J.; PALAY, D.A. Cornea. Text and Atlas. St Louis, Mosby, 1998.

TASMAN, W.; JAEGER, E.A. Duane's Ophthalmology on CD-ROM. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Inc., 2002.

ALVES, M.R.; CHAMON, W.; NOSE, W. Cirurgia Refrativa. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2003.

CUNHA, A.C. Estrutura e Apresentação de Dissertações e Teses. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação, 1996.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO UNIVERSIDADE DE WASHINGTON
(TRADUÇÃO)

Resposta cicatricial precoce da córnea após debridamento epitelial em humanos

Investigadores:

Nome	Posição	Dept.	Telefone
Steven E. Wilson, MD	Professor & Chair	Dept. of Ophthalmology	(206) 543-7250
Devin A. Harrison, MD	Assistant Professor	Dept. of Ophthalmology	(206) 685-1969
Jeehee Kim, MD	Assistant Professor	Dept. of Ophthalmology	(206) 685-1969
Renato Ambrósio, Jr., MD	Refractive Surgery Fellow	Dept. of Ophthalmology	(206) 543-7711

Telefone de emergência: (206) 598-6190 — Solicite o oftalmologista de plantão.

Declaração dos Investigadores:

Estamos pedindo a você para participar de uma pesquisa, e o objetivo deste documento é fornecer as informações necessárias para que você possa decidir se deseja ou não fazer parte desse estudo. Por favor, leia o texto cuidadosamente e depois pergunte o que quiser saber a respeito da pesquisa. Aliás, é exatamente isso que gostaríamos que você fizesse. Por exemplo, quais são os possíveis riscos e benefícios, seus direitos como voluntário, e qualquer outra questão sobre a pesquisa que este documento não tenha deixado claro. Depois que todas as suas dúvidas tiverem sido esclarecidas, você poderá decidir se quer participar do estudo ou não. Este processo é chamado termo de consentimento informado.

PROPÓSITO E BENEFÍCIOS

O propósito deste estudo é entender o processo cicatricial da córnea no olho humano que ocorre após a remoção do epitélio da superfície, ou a "pele" do globo ocular. Esse procedimento seria executado de forma semelhante aos procedimentos cirúrgicos refrativos sobre a córnea, também chamados "cirurgia ocular a laser para correção de erros refrativos". Esperamos que este estudo nos possibilite compreender melhor a resposta cicatricial corneana no olho humano, o que nos permitirá regular essa variável. Essa regulação terá um impacto positivo nos procedimentos cirúrgicos que envolvem a córnea e também nas diversas doenças que envolvem a córnea, como o ceratocone. Acrescentamos, ainda, que você não terá qualquer benefício pessoal direto por participar desta pesquisa.

PROCEDIMENTOS

Estamos pedindo a você que participe deste estudo porque foi diagnosticado um tumor maligno intra-ocular, como um melanoma ou de um tumor de órbita que requer a remoção do seu olho para tratamento. Além disso, sua córnea (a janela clara localizada na frente do olho) é normal no olho que precisará ser removido. Se você concordar em participar neste estudo, pediremos que permita ao Dr. Steven E. Wilson, MD, Professor Titular de Oftalmologia ou um dos co-investigadores listados, realizar um procedimento que consiste na remoção de uma quantia pequena de "pele" da superfície (epitélio) da córnea do seu

olho. Este epitélio será removido de algum ponto entre imediatamente após, 1 hora e 72 horas antes da cirurgia para retirar o seu olho, que será feita sob anestesia de gota (tópica) com Ophthaine™ (colírio anestésico). Você permanecerá acordado durante o procedimento, que normalmente é adotado em pacientes submetidos a cirurgia a laser como ceratectomia foto-refrativa (PRK). A remoção do epitélio é executada com uma espátula e é completamente indolor. Em seguida, insere-se uma lente de contato de bandagem para cobrir e proteger a superfície, tornando-a mais confortável, e aplica-se um antibiótico tópico, Ocuflax™, – você receberá um frasco deste medicamento para instilar uma gota, de quatro em quatro horas, até a remoção do olho operado. Se você fizer parte de um dos grupos superiores a 48 horas antes da retirada do olho, nós faremos visitas regulares para examinar a córnea e garantir que não há infecção. Assim, no dia da cirurgia para remover seu olho, visando tratar a doença de base, a córnea será analisada. Além do exame tradicional com a lâmpada de fenda, faremos o exame de microscopia confocal, que permite avaliar a estrutura corneana, em nível celular. Isto demora, aproximadamente, de dois a cinco minutos e requer uma sonda pequena que entra em contato com a superfície da lente de contato colocada depois de remoção do epitélio. Durante este procedimento, instila-se um anestésico de gota para evitar qualquer dor ou desconforto. Posteriormente você seguirá para a área operacional, onde será preparado para a cirurgia. Nenhum destes procedimentos terá qualquer efeito na cirurgia ou no resultado final do tratamento.

Depois que o seu olho com o tumor tiver sido retirado, a córnea será separada e preservada para estudo no laboratório. Todo o tecido que contiver o tumor será enviado à Patologia para diagnóstico definitivo, sem prejudicar a conduta da sua doença de base. Assim, apenas a córnea será retida para atingir o objetivo dessa pesquisa.

RISCOS, ESTRESSE OU DESCONFORTO

O procedimento para remover o epitélio corneano é idêntico ao feito em pacientes que se submetem à correção dos erros refrativos (necessidade de usar óculos) através do laser. É completamente indolor devido à aplicação de um anestésico tópico. No período pós-remoção do epitélio, os sintomas variam desde irritação mínima e lacrimejamento até dor severa. Tipicamente, a lente de contato funciona como uma bandagem e o colírio antibiótico deverá ser colocado quatro vezes por dia. Além disso, você receberá uma medicação oral, analgésica e anti-inflamatória, chamada Vioxx, que tem sido muito eficaz em reduzir a dor de pacientes submetidos à cirurgia com o laser. Medicamentos à base de codeína, uma potente substância semelhante à morfina, estarão disponíveis, se necessário. Essa medicação pode causar náuseas caso seja tomada com o estômago vazio. Você não terá nenhuma despesa com esses medicamentos.

Como qualquer procedimento cirúrgico, há risco de infecção. O uso de gotas antibióticas quatro vezes por dia limitam esta possibilidade, mas há uma chance muito pequena de uma infecção na córnea. Entretanto, mesmo neste caso a cirurgia não será afetada e não será necessário um tratamento adicional. Você precisará chegar 1 hora antes da cirurgia.

OUTRAS INFORMAÇÕES

Depois que a sua córnea foi examinada com o microscópio confocal e o tecido córneo, preservado para análise histológica, os dados serão identificados por um número ou código – sua identidade não será revelada. As informações referentes à análise de sua córnea serão utilizadas para ajudar a explicar as fases da resposta curativa durante as primeiras

72 horas após a remoção epitelial. Estes dados podem ser usados em artigos científicos sobre a resposta cicatricial no olho humano.

Você pode recusar-se a participar ou retirar-se do estudo a qualquer hora, sem qualquer penalidade nem perda de benefícios aos quais você tem direito. A participação no estudo é gratuita e, se precisar, analgésicos serão fornecidos a você. Na hipótese, bastante remota, de uma infecção, você receberá todos os cuidados e medicamentos sem custo algum. Depois que o olho for retirado, nenhum procedimento ou tratamento referentes ao estudo serão necessários.

Investigador - assinatura

Nome

Data

A declaração do paciente:

O estudo descrito acima foi devidamente explicado e eu não tenho nenhuma dúvida sobre os procedimentos envolvidos. Consinto em participar deste estudo, voluntariamente, eu oportunidade para fazer perguntas. Caso eu tenha dúvidas sobre a pesquisa, estas serão respondidas, antes, por um dos investigadores listados acima. Se eu tiver perguntas sobre meus direitos como um assunto de pesquisa, poderei contatar a Universidade de Washington – Divisão de Assuntos Humanos, (206) 543-0098 durante o expediente normal de trabalho. Eu receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento.

Assinatura do Paciente

Nome

Data

Cópias para: Paciente e Investigadores (RAJr e SEW)