

ANDREA BARBOSA DE AZEVEDO

**CERATOPLASTIA LAMELAR EM CÃES USANDO
MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA. ESTUDO CLÍNICO E
MORFOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros

São Paulo

2006

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

Elza
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
15/5/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.1680
FMVZ

Azevedo, Andréa Barbosa de
Ceratoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica
equina. Estudo clínico e morfológico / Andréa Barbosa de
Azevedo. – São Paulo: A. B. de Azevedo, 2006.
130 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia,
2006.

Programa de Pós-graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Córnea. 2. Cães. 3. Membrana amniótica. 4. Oftalmologia.
I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

PARECER

Interessado: Andréa Barbosa de Azevedo

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 396/2003, intitulado: "Ceratoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica eqüina. Estudo clínico e morfológico", no qual foram utilizados 16 cães, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Sérgio de Moraes Barros, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 23 de março de 2004

Prof^aDr^a Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Azevedo, Andréa Barbosa

Título: Cetatoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica eqüina. Estudo clínico e morfológico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____
Assinatura _____ Julgamento _____

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____
Assinatura _____ Julgamento _____

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____
Assinatura _____ Julgamento _____

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____
Assinatura _____ Julgamento _____

Prof.(a) Dr(a) _____ Instituição _____
Assinatura _____ Julgamento _____

*À Ana Carolina, minha filha, luz da minha vida, com
todo meu amor.*

Aos meus pais, Kleber e Rosa, meu amor e gratidão eternos por toda dedicação e apoio, sem os quais não teria chegado até aqui.

À Prof. Dra. Maria Aparecida Barbosa, minha tia, por seus exemplos e incentivos constantes durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros, pela orientação, confiança e apoio durante a realização deste trabalho. E por todo o aprendizado e crescimento profissionais obtidos durante este curso, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. José Luis Guerra pela imprescindível participação na análise morfológica, pela orientação e pela amizade, tão importantes ao longo deste projeto.

Dra. Walcy R. Teodoro, pela oportunidade concedida junto ao laboratório de matriz extracelular da Faculdade de Medicina da USP, por sua paciência e persistência diante das dificuldades encontradas durante a realização deste trabalho, minha imensa gratidão e eterna amizade.

À Angélica de Mendonça Vaz Safatle, pela amizade e por seus ensinamentos tão importantes na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani, por sua amizade e apoio sempre presentes, e por ter despertado em mim o interesse pela oftalmologia veterinária.

Aos meus queridos amigos Kátia Stracieri D'Oliveira, José Fernando Ibãnez e Karen Abrantes de Assunção, por sua amizade e apoios sempre tão constantes em minha vida.

Aos meus colegas e amigos da UNISA pela colaboração e compreensão durante a realização deste trabalho.

Às colegas Valéria Veras de Paula, Denise Aya Otsuki e à Profa. Denise Tabacchi Fantoni, pela realização dos procedimentos anestésicos deste experimento.

Aos biólogos do laboratório de matriz extracelular da Faculdade de Medicina da USP, Ana Paula Pereira Veloso, Cristiane Carla de Oliveira e Rodnei Francisco

Moutinho, pela colaboração durante os todos os procedimentos realizados no laboratório.

À médica veterinária residente do Hovet-USP Jessica Noel-Morgan pela ajuda na formatação do texto e pela correção do *Abstract*.

Ao funcionário José Miron Oliveira da Silva pelos cuidados com os animais.

A todos que de alguma forma colaboraram na realização deste projeto.

E àqueles que involuntariamente deram a vida para realização deste estudo, meu respeito e gratidão.

RESUMO

AZEVEDO, A. B. **Ceratoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica eqüina. Estudo clínico e morfológico.** [Lamellar keratoplasty of dogs using equine amniotic membrane. Clinical and morphological study]. 2006. 130f Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A membrana amniótica tem se consolidado no tratamento das afecções da superfície ocular. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e a eficácia do implante de MA eqüina, preservada em glicerina a 98%, na reparação de ceratoplastias lamelares em cães, por meio do estudo da avaliação clínica pós-operatória dos animais, do tempo de cicatrização, da reconstrução da arquitetura da córnea, da resposta inflamatória, e da composição colágena do estroma corneal no local do implante. Foram selecionados 12 cães, sem raça definida, machos ou fêmeas, divididos em quatro grupos de três, que tiveram tempos de observação distintos: 2, 7, 21 e 40 dias. Foi realizada ceratoplastia lamelar de 5 mm de diâmetro em um dos olhos de cada animal, seguida da aplicação do implante de membrana amniótica eqüina de 6 mm. Durante o período de observação, exame clínico oftalmológico foi realizado nos cães, com intervalos de 48 horas e ao final deste período, foram submetidos á eutanásia. Os olhos em estudo foram enucleados e fixados para posterior análise. Foram utilizados três métodos de coloração para o estudo histológico do tecido implantado: hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e picrossirius. Além disso, procedeu-se a imunomarcação para colágenos tipo I, III, e V, com uso de pepsina para digestão das fibras colágenas heterotípicas e exposição dos epítomos. Clinicamente os implantes foram completamente epitelizados em aproximadamente 10 dias, os neovasos

apresentaram involução progressiva a partir dos 20 dias de pós-operatório, estando ausentes ao final dos 40 dias de observação, restando apenas uma nébula no local da lesão. À microscopia óptica, observou-se resposta inflamatória moderada, presença de epitélio pavimentoso estratificado aos sete dias e epitelização completa aos 21 dias. Aos 40 dias a membrana basal do epitélio apresentou-se reconstituída. O colágeno tipo I teve sua expressão no estroma intensificada aos 21 dias de pós-operatório. O colágeno tipo III está presente na membrana amniótica, sua ausência no local do implante, aos 21 dias, mostrou remodelamento do tecido implantado. O colágeno tipo V, presente no estroma da córnea, teve sua expressão aumentada aos 7 e 21 dias, retornando à distribuição normal aos 40 dias de pós-operatório. Assim concluí-se que: a membrana amniótica eqüina é viável como implante em córnea de cão, sendo incorporada ao estroma, resultando em restabelecimento parcial da transparência no local de implante; o colágeno do tecido implantado é remodelado e substituído já aos 21 dias de pós-operatório; a pepsina foi eficiente na digestão das fibras e exposição dos epítomos dos colágenos nas fibras heterotípicas.

Palavras-chave: córnea, cães, membrana amniótica, oftalmologia

ABSTRACT

AZEVEDO, A. B. **Lamellar keratoplasty of dogs using equine amniotic membrane. Clinical and morphological study.** [Ceroplastia lamelar em cães usando membrana amniótica eqüina. Estudo clínico e morfológico]- 2006. 130f Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The amniotic membrane has consecrated itself in the treatment of ocular surface diseases. The objective of this study was to evaluate the efficiency and viability of the equine amniotic membrane graft, preserved in glycerin at 98%, in the lamellar keroplasty recovery in dogs. Evaluation was based on clinical post-surgical exam, healing time, corneal architectural reconstruction, inflammatory response and collagen composition of the corneal stroma at the graft site. Twelve mixed-breed, male and female dogs were divided into four groups of three dogs. Each group was submitted to different observation periods of 2, 7, 21 and 40 days. Each dog was submitted to a 5 mm lamellar keratoplasty in one eye, followed by a 6 mm equine amniotic membrane graft. Each animal was submitted to clinical ophthalmologic exam every 48 hours. At the end of the evaluation period, the animal was euthanized and the grafted eye was removed and fixated for posterior analysis. For the histological study of the tissue graft, three methods of coloration were used: hematoxylin eosin (HE), periodic acid of Schiff (PAS) and picrosirius. Immunolocalization for the collagen types I, III and V using pepsin for fiber digestion of heterotypic fibrils and epitope exposure, was made. Clinically, the grafts were completely epithelized in approximately 10 days and neovascularization regressed progressively 20 days after surgery, being completely absent after 40 days, when only a nebula remained at the graft site.

Optic microscopy revealed mild inflammatory response and presence of stratified pavement epithelium after 7 days and complete epithelization 21 days after surgery. At the end of 40 days the basal membrane was reconstituted. Type I collagen had its expression in the stroma intensified 21 days after the surgery. By day 21 the absence of collagen III in the corneal stroma showed graft remodeling, since this was formerly present in the amniotic membrane. The expression of type V fiber in the corneal stroma showed a mildly intensified expression at 7 and 21 days of observation, but returned to its normal distribution 40 days after surgery. Conclusion was that the equine amniotic membrane is a viable graft for the dog's cornea as it is incorporated to the stroma, resulting in partial transparency at the site of the graft. Twenty-one days after surgery, collagen from the graft is already remodeled and substituted. Pepsin is efficient for fiber digestion and collagen epitope exposure in heterotypical fibers.

Key words: cornea, dogs, amniotic membrane, ophthalmology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem fotográfica em trans-operatório, da ceratectomia lamelar de 5 mm realizada 2 mm do limbo na região temporal	62
Figura 2 – Imagem fotográfica mostrando posicionamento da membrana amniótica na superfície da área de ceratectomia lamelar	62
Figura 3 - Imagem fotográfica da córnea imediatamente após o procedimento cirúrgico: ceratectomia lamelar, implante da membrana amniótica eqüina e sutura com pontos simples separados na córnea.	62
Figura 4 – Imagem fotográfica da córnea aos 2 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se presença da MA, presença dos pontos de sutura e congestão conjuntival	75
Figura 5 – Imagem fotográfica aos 4 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se presença do implante parcialmente epitelizado, discreto edema de córnea na periferia da lesão, presença dos pontos de sutura conjuntiva congesta.	75
Figura 6 - Imagem fotográfica de 7 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se presença do implante de MA na córnea, pontos de sutura, formação da neovascularização periférica a partir do limbo, congestão conjuntival	75
Figura 7 – Imagem fotográfica aos 10 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se implante incorporado ao tecido e completamente epitelizado, neovasos atingindo área do implante , discreto edema na periferia da lesão e congestão conjuntival.	76
Figura 8 - Imagem fotográfica aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se implante totalmente incorporado ao tecido, neovasos invadindo terço lateral do implante, pontos de sutura já foram retirados.	76
Figura 9 – Imagem fotográfica aos 20 dias de dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se completa incorporação do implante à córnea, início da involução dos neovasos. Ausência de congestão conjuntival.	76
Figura 10 - Imagem fotográfica aos 20 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina Observa-se completa incorporação do implante à córnea, involução dos neovasos mais acentuada neste caso. Ausência de congestão conjuntival	77
Figura 11 - Imagem fotográfica aos 30 dias de pós-operatório. Observa-se implante totalmente incorporado à córnea, completa involução dos neovasos, nébula na região do implante.	77
Figura 12 – Imagem fotográfica aos 40 dias de dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se apenas nébula residual na região do implante	78
Figura 13 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 2 dias de evolução pós-operatória, mostrando interface do tecido implantado com estroma normal da córnea. O tecido implantado apresenta-se amorfo, com baixa celularidade e eosinófilo. Nota-se ainda formação de epitélio plano simples na superfície do tecido	

implantado (primórdios da epitelização). Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 40x.....	80
Figura 14 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando o tecido implantado, superfície com início de epitelização e presença de raros fibroblastos e polimorfonucleares. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 200 x.	80
Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 7 dias de evolução pós-operatória, mostrando extensão do tecido implantado com a superfície externa epitelizada, além da proliferação fibroblástica no tecido implantado. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 200 x.....	81
Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 7 dias de evolução pós-operatória, mostrando descolamento do tecido implantado, epitelização da superfície com epitélio pavimentoso pavimentoso estratificado e crescimento de epitélio entre o estroma e o implante (seta). Nota-se infiltrado inflamatório discreto com polimorfonucleares no tecido implantado. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 100 x.....	81
Figura 17 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 21 dias de evolução pós-operatória, mostrando a completa epitelização do implante, a angiogênese é evidente neste período de observação, implante já incorporado ao estroma da córnea, sendo que os feixes de fibras colágenas apresentam-se mais densamente distribuídos nesta fase. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 100 x.	82
Figura 18 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior evidenciando alto grau de angiogênese e a celularidade aumentada do estroma na região no estroma da córnea, onde são observados fibroblastos e fibrócitos. Coloração hematoxilina eosina. Aumento: 200 x.....	82
Figura 19 - Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior mostrando que ainda não foi possível evidenciar a membrana basal reconstituída aos 21 dias de pós-operatório. Coloração: PAS. Aumento: 400 x.	83
Figura 20 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 40 dias de evolução pós-operatória, mostrando tecido implantado incorporado, colagenizado e epitelizado. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 100 x.	83
Figura 21 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior evidenciando epitelização do tecido implantado, com arquitetura epitelial ainda não totalmente normalizada e presença de células poliédricas. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 400 x.....	84
Figura 22 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior evidenciando presença de membrana basal completamente reconstituída (seta). Coloração: PAS. Aumento: 400 x.	84
Figura 23 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de evolução pós-operatória, mostrando discreta diferença na distribuição das fibras colágenas na membrana amniótica implantada com relação ao estroma da córnea. Coloração: Picrossirius. Aumento: 200 x.	85

Figura 24 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de evolução pós-operatória, mostrando epitélio formado sob a membrana amniótica e o aspecto estroma da córnea e na membrana implantada. Coloração: Picrossirius. Aumento: 100 x.....	85
Figura 25 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de evolução pós-operatória, detalhe em maior aumento mostrando membrana amniótica incorporada ao estroma. Coloração: Picrossirius. Aumento: 400 x.....	85
Figura 26 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de evolução pós-operatória, detalhe em maior aumento mostrando membrana amniótica integrada ao estroma, não sendo mais possível delimita-la. Coloração: Picrossirius. Aumento: 100 x.	86
Figura 27 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de evolução pós-operatória, detalhe em maior aumento completa integração da membrana ao estroma, não sendo mais possível delimitar a área de implante. Coloração: Picrossirius. Aumento: 100 x.	86
Figuras 28 - Amostras de córnea normal imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando distribuição do colágeno tipo I no estroma. Aumento: 100 x.....	89
Figuras 29 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com distribuição homogênea no estroma da córnea e maior concentração na membrana amniótica. Aumento: 100x	89
Figura 30 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com distribuição homogênea no estroma da córnea e na membrana amniótica. Aumento: 100 x.	90
Figuras 31 e 32 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com maior expressão na região do implante. Aumento: 100 x e 200 x.	90
Figura 33 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com distribuição homogênea em todo estroma. Aumento: 100 x.	91
Figura 34 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua baixa concentração no estroma e discreto aumento da sua expressão na área receptora do implante. Aumento: 100x.....	91
Figuras 35 e 36 – Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua baixa concentração no estroma, intensa marcação na membrana amniótica e discreto aumento da sua expressão na área receptora do implante. Aumento: 100x.....	92

Figuras 37 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua tênue expressão no estroma. Aumento: 100x.....	92
Figura 38- Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua tênue expressão no estroma. Aumento: 200x.....	93
Figura 39 - Amostras de córnea normal imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando padrão de distribuição do colágeno tipo V no estroma. Aumentos: 100 x.	93
Figura 40 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando a membrana fortemente marcada na superfície e a distribuição homogênea deste colágeno no estroma, com discreto aumento de sua expressão no estroma próximo ao implante. Aumento: 100 x.....	94
Figuras 41 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando a membrana fortemente marcada na superfície e a distribuição homogênea deste colágeno no estroma, com discreto aumento de sua expressão no estroma próximo ao implante. Aumento: 100 x.....	94
Figuras 42 e 43 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando a distribuição homogênea deste colágeno no estroma, com discreto aumento de sua expressão no estroma próximo ao implante. Aumentos: 100 x e 200x.....	95
Figuras 44 e 45 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando distribuição homogênea deste colágeno no estroma. Aumento: 100 x.	95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Representação gráfica da evolução do fenômeno blefaroespasma, segundo a média de todos os animais submetidos a ceratoplastia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, durante o período pós-operatório.....	71
Gráfico 2 -	Representação gráfica da evolução do fenômeno fotofobia, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina	71
Gráfico 3 -	Representação gráfica da evolução do fenômeno secreção, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, segundo a média dos resultados observados em todos os animais avaliados.....	72
Gráfico 4 -	Representação gráfica da evolução do fenômeno congestão conjuntival, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, segundo a média dos resultados observados em todos os animais avaliados.....	72
Gráfico 5 -	Representação gráfica da evolução do fenômeno congestão quemose, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina.	73
Gráfico 6 -	Representação gráfica da evolução do fenômeno edema de córnea, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina	73
Gráfico 7 -	Representação gráfica da evolução do fenômeno neovascularização da córnea, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, segundo a média dos valores obtidos em todos os animais avaliados	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
EGF	fator de crescimento epidermal
FGFR	receptor do fator de crescimento fibroblástico
HGF	fator de crescimento dos hepatócitos
HGFR	receptor do fator de crescimento dos hepatócitos
HLA	antígenos leucocitários humanos
IL	interleucina
MA	membrana amniótica
mm	milímetro
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PEDD	fator de crescimento derivado do epitélio pigmentar
TGF	fator transformador do crescimento
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	ANATOMOFISIOLOGIA DA CÓRNEA	23
2.2	A ESTRUTURA COLÁGENA DA CÓRNEA.....	27
2.3	A CICATRIZAÇÃO DA CÓRNEA.....	33
2.4	MEMBRANA AMNIÓTICA	36
2.4.1	Estrutura	36
2.4.2	História e indicações de uso	38
2.4.3	Mecanismo de ação	40
2.4.4	Métodos de conservação da membrana amniótica	45
2.4.5	Aplicações clínicas e experimentais para o uso da membrana amniótica	46
3	OBJETIVOS	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1	ANIMAIS	58
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	59
4.3	OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	59
4.4	ANESTESIA GERAL INALATÓRIA E ANALGESIA.....	60
4.5	PROCEDIMENTO CIRURGICO	60
4.5.1	Ceratectomia lamelar	61
4.5.2	Sutura da membrana amniótica	61

4.6	AVALIAÇÃO CLÍNICA NO PÓS-OPERATÓRIO.....	63
4.7	ENUCLEAÇÃO E FIXAÇÃO DOS OLHOS.....	64
4.8	ANÁLISE MICROSCÓPICA DA CÓRNEA.....	64
4.8.1	Microscopia óptica	64
4.8.2	Imunomarcção para colágenos tipos I, III, V	65
5	RESULTADOS	67
5.1	AVALIAÇÃO CLÍNICO-OFTALMOLÓGICA	67
5.1.1	Blefaroespasm	67
5.1.2	Fotofobia	68
5.1.3	Secreção	68
5.1.4	Congestão conjuntival e quemose	69
5.1.5	Edema de córnea	69
5.1.6	Teste de fluoresceína	70
5.1.7	Neoformação vascular	70
5.2	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	78
5.2.1	Hematoxilina-eosina, Picrossírius, Ácido periódico de Schiff	78
5.2.2	Imunomarcção dos colágenos tipo I, III, V, na córnea	87
6	DISCUSSÃO	96
7	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

A reparação das lesões profundas da córnea é um desafio e tem sido objeto de pesquisa tanto na oftalmologia humana quanto na veterinária. Essas lesões necessitam de tratamento emergencial e exigem do profissional decisões rápidas na escolha da terapia clínica ou cirúrgica a ser utilizada. Em pequenos animais, várias são as técnicas cirúrgicas disponíveis para este fim: tarsorrafia temporária, enxertos conjuntivais, recobrimento com terceira pálpebra, transposição córneo-escleral, enxertos corneais homólogos, lentes de contato, retalhos sintéticos, entre outras (BARROS et al., 1995).

Membranas biológicas preservadas têm sido utilizadas em cirurgia veterinária com inúmeros objetivos. O transplante de membrana amniótica (MA) é objeto de extensa pesquisa em oftalmologia humana e veterinária, devido ao seu potencial na reconstrução da superfície ocular, apresentando-se, por suas propriedades, como uma alternativa viável para o tratamento dessas lesões. A aplicação da MA beneficia o processo de epitelização, facilitando a adesão e migração das células epiteliais basais, prevenindo a apoptose, além de reduzir os processos inflamatório, angiogênico e cicatricial; tem ainda atividade antimicrobiana comprovada e é imunologicamente inerte (GOMES et al., 1999). Além disso, embora algumas hipóteses estejam confirmadas por trabalhos recentes, não há consenso sobre o mecanismo exato pelo qual a MA estimula a epitelização das superfícies epiteliais lesadas. Os pesquisadores sugerem que novos estudos sejam realizados a fim de esclarecer todos os mecanismos envolvidos no processo de cicatrização da córnea, pós-transplante de MA. A MA eqüina é um tecido abundante, de fácil obtenção, fácil

manipulação, e não requer métodos especiais de conservação (BARROS et al., 1998) podendo, assim, representar uma alternativa viável no tratamento das úlceras profundas da córnea, em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA CÓRNEA

A superfície ocular é revestida pelo epitélio corneal, límbico e conjuntival, cada um com fenótipo celular distinto (PIRES et al., 1999). A córnea e a esclera formam a túnica fibrosa do bulbo ocular, sendo a área de transição, onde a esclera superficialmente recobre a córnea, denominada limbo (MARTIN, 2005). A córnea é a parte anterior, transparente e avascular da túnica fibrosa (HELPER, 1989), estando envolvida pelo humor aquoso e filme pré-corneal, dos quais depende seu metabolismo (SAMUELSON, 1999). Tem formato elíptico, com diâmetro horizontal maior que o vertical nos animais domésticos (SAMUELSON, 1999; SLATTER, 2001) e suas principais funções são a manutenção do formato do olho e proteção das estruturas intraoculares, além da convergência dos raios luminosos que nela incidem (DYCE, 1990; MARTIN, 2005). Nas espécies domésticas é responsável por 70 a 80% da capacidade de refração das estruturas oculares - aproximadamente 40 dioptrias (GLOVER; CONSTANTINESCU, 1997; HELPER, 1989; MARTIN, 2005; WARING, 1984). A transparência da córnea se deve à ausência de vasos e células, ausência de pigmentos, controle do conteúdo de água, manutenção da superfície lisa pelo filme pré-corneal (FPC), e organização regular e diâmetro das fibras colágenas (MARTIN, 2005; PIRES et al., 1999; SCHOENAU; PIPPI, 1993; SLATTER, 2001).

A espessura da córnea varia de acordo com a espécie animal (SLATTER, 2001), sendo em cães mais fina no centro que na periferia (AZEVEDO; RANZANI;

CROCCI, 2005; MARTIN, 2005), com medidas entre 0,6 e 0,95 mm (HELPER, 1989). O diâmetro médio da córnea do cão é de 8,5 mm, variando entre 13 e 17 mm no eixo horizontal e 12 e 16 mm no eixo vertical (MARTIN, 2005).

No cão a córnea é composta por cinco camadas: filme pré-corneal, epitélio, estroma, membrana de Descemet, e endotélio (SLATTER, 2001). A camada de Bowman, não é descrita nesta espécie (SHIVELY; EPLING, 1970).

O filme pré-corneal, de espessura de 6 a 7 microns, é composto por três camadas (lipídica, aquosa e mucosa), e embora não esteja presente nos cortes histológicos, é considerado como parte integrante da córnea, devido à sua importância na manutenção da integridade e transparência desta estrutura. (HELPER, 1989).

O epitélio é simples, escamoso e não queratinizado, e tem uma fina membrana basal (HELPER, 1989). É formado por três tipos celulares, com 4 a 12 células na sua espessura (MARTIN, 2005; SCHOENAU & PIPPI, 1993), sendo as mais internas colunares e poliédricas. As células mais superficiais são escamosas achatadas, cuja camada mais externa está em contato direto com o filme pré-corneal e apresenta superfície microplicada (MURPHY, 1993). As células basais fixam-se à membrana basal por hemidesmossomas (SHIVELY; EPLING, 1970; SLATTER, 2001). As células basais movem-se rostralmente, e se achatam progressivamente, no ciclo de renovação epitelial de aproximadamente sete dias (SCHOENAU; PIPPI, 1993)

O limbo é uma área rica em vasos e terminações nervosas, onde estão localizadas as células germinativas, principais responsáveis pela reposição celular no epitélio da córnea (DUA; FORRESTER et al., 1990).

O estroma, que corresponde a 90% da substância da córnea, é composto por fibrócitos, ceratócitos, colágeno e abundante matriz extracelular. As fibras colágenas são pequenas e arranjadas de maneira uniforme em lâminas. Todas as fibras em uma lâmina são paralelas entre si e com relação à superfície da córnea (MURPHY, 1993), entremeadas por linfócitos, macrófagos, neutrófilos (HELPER, 1989) e ceratócitos, que aparecem como células achatadas com núcleo fino e limites pouco definidos (SCHOENAU; PIPPI, 1993). A organização regular das fibras colágenas é uma das características responsáveis pela transparência da córnea, diferenciando-a da esclera e do colágeno cicatricial. Entre as fibras, além das células existe uma substância amorfa composta por proteoglicanas, principalmente glicosaminoglicanas representados pelo keratan sulfato e dermatan sulfato. (MARTIN, 2005).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio e vai se espessando com a idade. É composta principalmente por fibras colágenas finas, predominantemente do tipo IV (MARTIN, 2005). A membrana não cora pela fluoresceína, aparecendo como uma estrutura transparente e bolhosa no fundo de úlceras profundas.

O endotélio é uma única camada de células hexagonais, em contato com a câmara anterior, sendo células de alta atividade metabólica e que possuem grande número de mitocôndrias. Têm capacidade limitada de se multiplicar, variando com a espécie e com a idade do animal (SLATTER, 2001). A capacidade de regeneração é mínima em gatos e boa em cães jovens, sendo que em adultos se dá principalmente por migração e achatamento das células, mais que por mitose (MARTIN, 2005).

O suprimento de oxigênio da córnea vem do humor aquoso, do filme lacrimal, e dos plexos capilares límbicos e conjuntivais. O endotélio recebe a maior parte do oxigênio do humor aquoso, mas a maior fonte para o restante da córnea é o oxigênio atmosférico (SLATTER, 2001)

O metabolismo da glicose é a principal fonte de energia da córnea, que como um tecido avascular recebe nutrientes a partir dos vasos dos plexos perilimbais, humor aquoso e filme lacrimal (HELPER, 1989; MURPHY, 1993). A principal via metabólica é a de Embden-Meyerhof e o ciclo de Krebs, sendo um terço da glicose metabolizada pela via da hexose monofosfato (SLATTER, 2001).

A água penetra na córnea sob influencia da pressão intra-ocular, e é atraída pelo colágeno do estroma e pelos mucopolissacarídeos (SLATTER, 2001). O epitélio e o endotélio controlam a quantidade de água que penetra na córnea. (HELPER, 1989). No endotélio está a principal bomba ativa que tira água do estroma para o humor aquoso contra a pressão intra-ocular (PIO), que força água em direção a córnea. O epitélio também é importante no controle do conteúdo líquido e interferências no seu suprimento de oxigênio causam anaerobiose, o que leva ao acúmulo de ácido láctico e água (SLATTER, 2001).

A córnea, por ser uma estrutura rica em terminações nervosas, é extremamente sensível (HELPER,1989), sendo inervada por ramos dos nervos ciliares, que derivam do oftálmico e ramos do trigêmio (MURPHY, 1993). Os nervos são concentrados no estroma anterior e penetram no epitélio, que é o mais rico em terminações nervosas do corpo. As terminações nervosas são sensíveis à dor, pressão e temperatura (MARTIN, 2005).

O sistema de defesa não específico oferece proteção natural à córnea. É formado por barreiras anatômicas (superfícies epiteliais conjuntival e corneal), microbiota e lágrima. A microbiota é composta basicamente de bactérias gram positivas e funciona como proteção de duas formas: competindo com os agentes patológicos e produzindo substâncias anti-bacterianas. A estrutura física do filme lacrimal, assim como sua composição química, compõe uma barreira natural na superfície ocular. Antígenos da superfície ocular são processados pela conjuntiva, que em conjunto com a úvea, funcionam como tecido linfóide ativo no bulbo ocular (EICHENBAUM et al., 1987).

As respostas patológicas da córnea podem incluir várias combinações de edema, vascularização, pigmentação, acúmulos de células ou metabólitos, fibrose ou ulceração. Todas essas alterações resultam em perda de transparência e em última instância, de visão (MARRION, 2000).

2.2 A ESTRUTURA COLÁGENA DA CÓRNEA

O colágeno é a principal proteína da matriz extracelular, cuja função está relacionada às propriedades mecânicas e bioquímicas do tecido (HAY; REVEL¹, 1969 apud LINSENMAYER et al., 1986). O nome colágeno é um termo genérico usado para proteínas com estrutura característica em hélice tripla de peptídeos. Todos os membros da família colágeno têm esta estrutura supramolecular, mas o seu tamanho, função e distribuição nos tecidos podem variar. Mais de 26 tipos de

¹ HAY, E.D.; REVEL, J.P. Fine structure of developing avian cornea. Karger, basel (1969)

colágeno, geneticamente distintos, já foram descritos (GELSE et al., 2003), sendo que na córnea fetal e adulta foram caracterizados nove tipos, em várias espécies (QIAN ZHAN, 1995). As características das matrizes extracelulares são determinadas pela síntese, estrutura e deposição das moléculas colágenas e sua organização em macromoléculas. As fibrilas são organizadas em fibras, que por sua vez são organizadas em macroagregados tecido-específicos: lamelas (ossos e córnea), cabos (tendões e ligamentos) ou camadas irregulares (derme) (BIRK, 2001).

A membrana basal, localizada entre o epitélio e o estroma, é composta por várias proteínas da matriz extracelular, incluindo colágeno tipo IV (isoformas α 3 e 5), VI e VII, laminina, proteoglicanas (heparan sulfato), e componentes dos hemidesmossomas como a laminina 5 (BROOKS; OLLIVIER, 2004; FUKUDA et al., 1999; SAIKA et al., 1999)

A membrana de Descemet contém colágenos tipo I, III, IV, V, VI, e VIII; laminina, fibronectina e heparansulfato (BROOKS; OLLIVIER, 2004).

O colágeno fibrilar é o mais abundante no organismo (90%), e inclui os tipos I, II, III, V e XI (GELSE et al., 2003), são os maiores componentes de tecidos como a córnea, tendão, derme, osso e cartilagem. Esses colágenos possuem a tripla hélice formada pela repetição da seqüência GLY (GLICINA)-X-Y (BIRK, 2001), onde o X é sempre um aminoácido, e o Y é freqüentemente prolina ou hidroxiprolina (MICHELACCI, 2003). Sua função é manter a arquitetura dos órgãos e tecidos e lhes conferir resistência mecânica (CHANUT-DELALANDE et al., 2001).

O estroma da córnea possui fibras pequenas e uniformes em diâmetro, que são regularmente distribuídas ou organizadas em lamelas paralelas e ortogonais, estrutura que confere ao tecido resistência e transparência (BIRK, 2001; WHITE et al., 1997). A matriz extracelular no estroma é composta principalmente por colágeno tipo I, V, VI e XII, e glicosaminoglicanas (keratan sulfato e dermatan sulfato) (CONNON; MEEK, 2004). O principal colágeno é o tipo I, associado ao tipo V em fibras heterotípicas, sendo que a presença do V nas fibrilas é um fator que limita o seu crescimento (BIRK, 2001; LINSENMAYER et al., 1985; MEEK; BOOTE, 2003).

O tipo I é o colágeno mais abundante e melhor estudado, forma a matriz orgânica dos ossos e é o principal colágeno dos tendões, pele, ligamentos, córnea e muitos tecidos conjuntivos. É constituído por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$. Na maioria dos órgãos é responsável pela manutenção da tensão (GELSE et al., 2003).

O colágeno tipo V é formado por três cadeias α diferentes ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$), e tipicamente forma fibras heterotípicas com colágeno I e III, contribuindo na formação da matriz orgânica dos ossos, do estroma corneal e matriz intersticial de músculos, fígado, pulmões e placenta. Os domínios das hélices triplas ficam imunologicamente mascarados nos tecidos, pois estão localizados no centro das fibras (BIRK, 2001; GELSE et al., 2003). Um grande domínio amino terminal é processado apenas parcialmente após a secreção das fibrilas (GELSE et al., 2003), esses domínios amino do V ficam expostos na superfície da fibra pelas junções (“gaps”) entre as fibrilas (BIRK, 2001), o que parece ser um dos mecanismos controladores da estrutura, crescimento e diâmetro das fibras (GELSE et al., 2003; WHITE et al., 1997). Portanto, o tipo V, quando em associação com o tipo I, controla o diâmetro

das fibras, levando a formação de fibras pequenas, o que contribui para a transparência da córnea (CHANUT-DELALANDE et al., 2001; IAMAMURA et al., 2000; WHITE et al., 1997).

Linsenmayer et al. (1989) utilizaram a imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-tipo V, em cortes de córnea embrionária de aves. Testes iniciais não obtiveram reação, mas o pré-tratamento do tecido com ácido acético ou guanidina levou a imunofluorescência positiva. Assim, os autores sugeriram que o colágeno tipo V do estroma poderia ter seus epítomos mascarados pela associação com componentes não colágenos da matriz protéica, ou por uma organização supramolecular colágena. A guanidina e o ácido acético romperiam a estrutura supramolecular do colágeno. Associando este resultado a testes com pré-tratamento com colagenase específica para o tipo I, puderam concluir que as fibras colágenas do estroma corneal são heterotípicas, formadas por tipo I e V, e que os epítomos do V estão mascarados na fibrila tipo I. Colagenase específica para o tipo V foi usada por Linsenmayer et al. (1990) para demonstrar que, assim como os epítomos, os sítios de clivagem da fibrila V ficam mascarados pela interação com o colágeno tipo I, procedimento esse repetido por Birk em 2001.

O colágeno IV, principal componente das membranas basais, está presente na membrana basal epitelial e na membrana de Descemet, mas testes imunohistoquímicos têm demonstrado sua presença também no estroma (MURATA et al., 1989).

O colágeno tipo VI está presente na córnea humana, mas em pequenos filamentos dispostos entre as fibras e provavelmente interagindo com outros componentes da matriz extrafibrilar para estabilizar a organização das fibras. O tipo

XII tem sido localizado periodicamente entre as fibras, mas sua função ainda não é conhecida (MEEK; BOOTE, 2003). No entanto, Lisenmayer et al. (1986) sugerem que este colágeno pode participar do controle da atividade dos fibroblastos, principalmente pela sua adesão aos tecidos, característica importante para migração e diferenciação celular.

Murata et al. (1989) observaram a presença de grande quantidade de colágeno tipo VI entre as lamelas do estroma corneal bovino, formando filamentos próximos das fibras estriadas e em regiões próximas dos queratócitos; sua função pode ser estrutural, relacionada ao controle da organização das fibras e, provavelmente, também à função dos fibroblastos.

Os colágenos tipo XII e XIV são do tipo *facit*, estão na superfície das fibras, onde interagem com proteínas do estroma corneal (MICHELACCI, 2003). O tipo XIII está próximo das membranas celulares, e em córneas humanas sua presença é demonstrada no terço posterior do estroma, mas sua função precisa ainda não está determinada (MEEK; FULLWOOD, 2001). Os Colágenos tipo XV e XVIII estão localizados no epitélio da córnea e na membrana de Descemet, ambos participando do mecanismo local de controle da angiogênese no tecido normal e durante a cicatrização. O tipo XV também está presente no estroma MICHELACCI, 2003; SAIKA et al., 2004).

A presença do colágeno III ainda é controversa. Segundo Meek e Boote (2003), o tipo III está presente na córnea em quantidades ainda não definidas, mas tem sido demonstrado em córneas humanas adultas. White et al. (1997) estudaram a organização do colágeno tipo V e III em córneas humanas e bovinas, por imunohistoquímica e não encontraram reatividade para o tipo III no estroma corneal

adulto, somente na região subepitelial do limbo e na esclera. Porém localizaram este tipo de colágeno na córnea fetal ou em córneas lesadas. Cintron et al. (1988), Featherstone et al. (2001) e Michelacci (2003) descrevem que o tipo III está presente em pequenas proporções no estroma corneal, e que aumenta durante a cicatrização, inflamação e outros processos patológicos. Sua presença em córneas fetais também é confirmada por Bem-Zvi² et al. (1986 apud WHITE et al., 1997, p 166) e Cintron et al. (1988).

Ainda como parte da matriz extracelular as proteoglicanas são indispensáveis para a estrutura das fibras colágenas no estroma. Proteoglicanas são macromoléculas compostas por um núcleo protéico associado a cadeias de glicosaminoglicanas (MICHELACCI, 2003). As mais importantes encontradas no estroma da córnea e esclera são lumican (keratan sulfato) e decorin (dermatan sulfato) sendo que o keratan sulfato está em maiores quantidades no estroma da córnea (MEEK, 2001; MIYAGAWA et al., 2001). Na córnea humana proteoglicanas e colágeno formam uma densa rede de fibras interconectadas. As moléculas de proteoglicanas estão dispostas entre as fibras de forma regular, como os degraus de uma escada, conectando-as. A presença de proteoglicanas torna a córnea menos susceptível à compressão antero-posterior (MÜLLER et al., 2004), sendo que também têm função na fibrilogênese do colágeno (MICHELACCI, 2003), no controle da distância entre as fibras – importante para manutenção da transparência (MIYAGAWA et al., 2001) e participam do controle do teor de água no estroma (MARTIN, 2005).

² BEM-ZVI, A. RODRIGUES, M.M.; KRACHMER, J.H; FUJIKAWA, L.S. Imunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea. *Current eye research*, v.5, p. 105-117, 1986.

2.3 A CICATRIZAÇÃO DA CÓRNEA

A cicatrização das lesões epiteliais segue uma seqüência organizada de eventos. Após uma hora da lesão, as células epiteliais basais começam a se achatar. Polimorfonucleares chegam pelo filme pré-corneal e retiram os debris celulares. As células epiteliais adjacentes à lesão, em três a seis horas, deslizam para cobrir o defeito (KERN, 1990; NASISSE, 1985): as células se achatam e aumentam sua superfície aumentando seu volume de água. Pequenos defeitos são recobertos dessa maneira, e depois ganham espessura com a proliferação celular. A reposição de células epiteliais se dá por proliferação das células basais, que se inicia 24 horas após a lesão (MARTIN, 2005). As células germinativas primariamente responsáveis pela reposição das células basais na renovação celular fisiológica ou na reparação de lesões, estão presentes no limbo, e a reposição celular se dá de forma centrípeta na córnea. As células germinativas são progenitoras presentes em todos os tecidos de renovação constante, têm vida longa e alta capacidade de mitose, sendo esta estimulada na presença de lesões (DUA; GOMES; SINGH, 1994; TSENG, 1989).

Lesões que comprometem as células germinativas do limbo levam à invasão da córnea por células de epitélio conjuntival, com conseqüente vascularização e inflamação crônica e formação de defeitos epiteliais recorrentes (PELLEGRINI et al., 1997; TSENG et al., 1998). Estabelece-se assim, o diagnóstico de deficiência límbica, que pode ser diagnosticado por citologia de impressão (PRABASAWAT; TSENG, 1995; TSENG et al., 1998).

Se a membrana basal não é lesada ela mantém a forte adesão das células epiteliais ao estroma adjacente. No entanto, se há lesão da membrana basal, ela começa a ser reparada em cinco a sete dias, e podem ser necessárias cinco a sete semanas para reconstrução completa e, durante este período, a adesão entre estroma e epitélio está prejudicada (KERN, 1990; MARTIN, 2005).

As lesões estromais são inicialmente cobertas por um coágulo de fibrina, o estroma adjacente começa a ficar edematoso e, em poucas horas, polimorfonucleares e macrófagos começam a remover os debris. Em três dias os ceratócitos adjacentes à lesão, começam a produzir colágeno, fibroblastos invadem a lesão, e o colágeno continua a ser produzido por semanas. O colágeno novo pode se remodelar, mas não adquire a arquitetura anterior à lesão (KERN, 1990), levando assim a formação de áreas de cicatriz com perda de transparência (MARTIN, 2005). Connon e Meek (2004) observaram à microscopia eletrônica de transmissão que as fibras colágenas na cicatriz perdem a organização lamelar e apresentam-se como fibras maiores entrelaçadas entre si. Em casos de lesões profundas ou perfurantes ocorre também uma redução da espessura da córnea no local da cicatriz.

Com relação à composição das fibras durante a cicatrização estromal, Saika et al (1996) realizaram lesões por álcalis em córneas de coelhos para estudar a evolução da proporção das fibras colágenas no estroma. Não houve alteração no colágeno do estroma na periferia da lesão durante a cicatrização. Inicialmente os ceratócitos produziram mais colágeno III e V, e nas fases tardias da cicatrização estromal, predominou o tipo I. Assim, concluíram que os colágenos tipo III e V parecem ter importância primária na cicatrização estromal.

Perfurações da membrana de Descemet resultam em lesão endotelial e em poucas horas as células endoteliais migram para cobrir o defeito. A reparação da membrana de Descemet depende, portanto, do endotélio (HELPER, 1989).

Fatores de crescimento endógenos, presentes na lágrima, no humor aquoso e vasos límbicos são envolvidos com a regulação da cicatrização da córnea. Controlam a quimiotaxia para células inflamatórias, mitose, migração e diferenciação celular, e também regulam a produção de outros fatores. O fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator transformador do crescimento α (TGF- α) estão presentes na lágrima, produzidos pela glândula lacrimal. O EGF é importante para manutenção da integridade da superfície ocular e para renovação celular no epitélio; também é importante na cicatrização estimulando a síntese de fibronectina, a mitose das células epiteliais e dos fibroblastos e atuando na migração e adesão das células epiteliais. O TGF- α estimula a cicatrização, mas na sua ausência não há prejuízo da mesma, já deficiências de EGF prejudicam a cicatrização. Outros fatores envolvidos na cicatrização da córnea são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- β (SWANK & HOSGOOD, 1996)

A neovascularização é a formação de novos vasos em estruturas previamente avasculares (JIN-HONG CHANG et al., 2001); na córnea, ocorre a partir dos vasos do plexo episcleral ou da conjuntiva, que invadem a periferia da córnea durante a cicatrização (FORRESTER et al., 2002). Embora os neovasos possam ocorrer em qualquer parte da córnea, a maior parte se localiza nos terços médio e superior do estroma. Normalmente existe na córnea um equilíbrio entre as citocinas angiogênicas e antiangiogênicas, ocorrendo vascularização quando há aumento dos fatores angiogênicos, provavelmente associado à redução dos antiangiogênicos,

decorrentes de distúrbios inflamatórios, infecciosos, degenerativos ou traumáticos da córnea (JIN-HONG CHANG et al., 2001). São fatores angiogênicos capazes de estimular a neovascularização na córnea: fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator angiogênico tumoral, fator transformador do crescimento β e fator de crescimento derivado das plaquetas. Linfocinas produzidas por linfócitos T ativados, e a prostaglandina E1 são capazes de produzir neovascularização da córnea. Metaloproteinases da matrix extracelular são enzimas proteolíticas presentes na matriz extracelular que participam da remodelação e da angiogênese, sua função ainda parece ambígua pois a mesma molécula ativa fatores pró e anti-angioneogênese (JIN-HONG CHANG et al., 2001). Essas substâncias são liberadas pelas células inflamatórias e pelas próprias células do local na córnea (FORRESTER et al., 2002). Por outro lado, várias substâncias anti angiogênicas tem sido detectadas na córnea: angiostatina, endostatina, trombostatina, fator plaquetário 4, fibronectina, prolactina (MARTN, 2005), e fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) (JIN-HONG CHANG et al., 2001).

2.4 A MEMBRANA AMNIÓTICA

Dentre as membranas biológicas, a membrana amniótica (MA) tem se consolidado como útil no tratamento das afecções da superfície ocular. Seu uso baseia-se na capacidade de beneficiar o processo de epitelização e reduzir os processos inflamatório, angiogênico e cicatricial (GOMES et al., 1999).

2.4.1 Estrutura

A membrana amniótica, o córion e o alantóide compõem a membrana fetal. O córion é a camada mais externa, em contato com as células maternas e consiste em tecido trofoblástico e mesenquimal; a alantóide é a camada intermediária e a amniótica a mais interna do saco embrionário em contato com o feto (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999). Sendo MA a parte mais interna da placenta, é composta por uma membrana basal espessa formada basicamente de colágeno tipo IV ($\alpha 2$) e laminina, e uma matriz estromal avascular (AZUARA-BLANCO et al., 1999; FUKUDA et al., 1999; GOMES et al., 1999; HEINZ et al., 2004; PIRES et al., 1999; SHIMAZAKI et al., 1997). Colágenos tipo I, III, IV, V e VII, laminina e fibronectina são encontrados na membrana basal e no estroma da MA (DUA et al., 2004). O colágeno tipo VI também está presente na sua membrana basal. Algumas das substâncias constituintes da membrana basal, como colágeno tipo IV, laminina e fibronectina estão presentes no estroma da membrana amniótica (FUKUDA et al., 1999). Os colágenos IV e VII, componentes da membrana basal do epitélio da córnea, estão presentes na membrana basal da membrana amniótica (LETKO et al., 2001). Dentre estes componentes o colágeno IV ($\alpha 5$) é importante para a fisiologia do epitélio; Endo et al. (2004) demonstraram sua presença nas membranas basais da córnea e da membrana amniótica, o que torna a MA um excelente substrato para o crescimento destas células epiteliais.

A membrana basal da MA contém grandes quantidades de proteoglicanas, principalmente heparan sulfato, estas moléculas tem função de barreira reduzindo a permeabilidade do amnion. Na MA também são encontradas quantidades

importantes de hialuronan e pequenos proteoglicanas como biglican e decorin, sendo que o decorin predomina e está conectado com as fibrilas colágenas. A distribuição destas moléculas e do colágeno, provavelmente determina as propriedades bioquímicas da membrana (DUA et al., 2004).

2.4.2 História e indicações de uso

Há na literatura indicação para uso de membrana amniótica na reparação de onfalocele e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias de cabeça, abdômen, pélvis, vagina, e laringe (AZUARA-BLANCO et al., 1999; GOMES et al., 1999; LEE et al., 1997; SHIMAZAKI et al., 1997). Em pacientes com queimaduras cutâneas a aplicação de MA como bandagem é recomendada, com ótimos resultados na redução da dor, prevenindo a infecção e promovendo a cicatrização; representa também uma opção barata para tratamento destas afecções (MARAL et al., 1999; RAVISHANKER et al., 2003).

O primeiro relato de uso de membrana amniótica é de Davis³ (1910, apud LETKO et al., 2001), para aplicação em pele.

Experimentalmente a MA, conservada em glicerina a 98%, foi aplicada no tratamento de feridas cutâneas em eqüinos, onde se observou menor tempo de cicatrização, menor formação de tecido de granulação e menor incidência de bactérias patológicas (OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998). Também foi aplicada em

³ DAVIS, J.W. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. Johns Hopkins Medical Journal, v.15, p. 307-396, 1910.

pele, na forma de autoenxertos ou aloenxertos, em carneiros (TRELFOORD et al., 1972). Ramsey et al. (1995) compararam a MA eqüina com outros materiais sintéticos para confecção de bandagens oclusivas para tratamento de feridas em cães e observaram que a aplicação de MA acelera a cicatrização destas lesões. Prakash et al. (2004) utilizaram a MA para reconstituição da uretra em bovinos.

Em oftalmologia foi usada inicialmente por De Rötth em 1940, na reparação do simbléfaro e defeitos conjuntivais e por Sorsby et al. em 1947, para tratamento de queimaduras em superfície ocular. Em 1990, Battle e Perdomo reiniciaram o uso de transplante de MA na oftalmologia e Kim e Tseng (1995) relataram o uso de um modelo experimental da MA na córnea de ratos com queimaduras graves. Em medicina humana sua aplicação é indicada principalmente na reconstrução da superfície ocular, para casos de defeito epitelial persistente, simbléfaro (AZUARA-BLANCO et al., 1999), pterígio (SHIMAZAKI et al., 2003), deficiência de células germinativas do limbo, síndrome de Steven- Johnson, ceratite herpética (PRABHASAWAT et al., 2000), queimaduras químicas e térmicas, penfigóide ocular cicatricial (BARABINO; ROLANDO, 2003), úlceras de córnea não contaminadas, ceratopatia bolhosa sintomática (LETKO et al., 2001), ceratopatia em banda (YOUNG SAM KWON; YOUNG SOO SONG; JAE CHAN KIM, 2004), úlcera de Mooren (KO-HUA CHEN; WEN-MING HSU; CHIH-KAI LIANG, 2004), e após a excisão de neoplasias da superfície ocular (ESPANA et al., 2002). Foi utilizada por Solomon, Espana e Tseng (2003) na reconstrução do fórnix conjuntival em várias doenças de superfície ocular. Outras indicações citadas na literatura são as bolhas filtrantes (BUDENZ; BARTON; TSENG, 2000) e na trabeculectomia para olhos com glaucoma (FUJISHIMA et al., 1998; DEMIR et al., 2002)

2.4.3 Mecanismo de ação

Sua utilização baseia-se na capacidade de beneficiar o processo de epitelização, facilitar a adesão e migração das células epiteliais basais, prevenir a apoptose e restaurar o fenótipo epitelial (GOMES et al., 1999; HEINZ et al., 2004; MEJÍA et al., 2000). Além disso, reduz os processos inflamatório, angiogênico e cicatricial, e possui documentada ação antimicrobiana (GOMES et al., 1999; MEJÍA et al., 2000). Por não expressar os antígenos de histocompatibilidade leucocitários (HLA) -A, B e C ou DR, a MA é considerada como imunologicamente inerte, o que a torna excelente opção para implantes (GOMES et al., 1999; SHIMAZAKI et al., 1997).

Kubo et al. (2001) demonstraram por meio de estudo experimental que a membrana é um tecido imunoprivilegiado e produz fatores imunossupressores. Os autores fizeram implantes de MA humana no limbo, no estroma corneal e na cápsula renal em ratos, além de implantar fragmentos de pele intra-corneanos para comparação. O implante no limbo levou a discreta invasão linfocitária, não havendo na córnea invasão celular. Em contraste, implantes de pele na córnea foram rejeitados em três semanas. Foram identificados, por imunohistoquímica, fatores imunoreguladores, tais com HLA- G e FAs ligante nas células mesenquimais do estroma da membrana amniótica.

A MA, especialmente o epitélio, produz vários fatores de crescimento que podem modular a diferenciação e proliferação das células conjuntivais e corneais (SHIMAZAKI et al., 1997), incluindo fator de crescimento fibroblástico básico

(bFHF), fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), e fator de crescimento transformante β (TGF – β) (GOMES et al., 1999), EGF, TGF - α , receptor do fator de crescimento fibroblástico (FGFR), receptor do fator de crescimento dos hepatócitos HGFR (KOIZUMI et al., 2000). A criopreservação reduz a formação dos fatores de crescimento (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; KOIZUMI et al., 2000). A presença destes fatores na MA, e principalmente em seu epitélio, é uma das possíveis explicações para seus efeitos sobre a epitelização. O EGF é um dos fatores mitogênicos mais importantes para proliferação celular no epitélio, e está presente em grandes concentrações na MA com epitélio (KOIZUMI et al., 2000).

Como a MA possui uma membrana basal espessa ela repõe esta estrutura na superfície ocular (FUKUDA et al., 1999). A presença de substrato normal na córnea é essencial para a proliferação normal e diferenciação das células epiteliais. A membrana basal facilita a migração das células epiteliais e reforça a adesão das células epiteliais basais (PIRES et al., 1999; TSENG et al., 1997), provavelmente porque as mesmas isoformas de laminina estão presentes na membrana basal de córnea e membrana amniótica (DUA et al., 2004).

Na presença da MA a inflamação da superfície ocular é significativamente menor, o que se justifica pela produção de inibidores de proteases, supressão da sinalização TGF- β , proliferação e diferenciação em miofibroblastos dos fibroblastos de córnea e limbo, o que conseqüentemente reduz a formação de cicatriz (TSENG et al., 1998). A presença da MA reduz a invasão por polimorfonucleares, que podem causar a morte dos ceratócitos, e também acelera a apoptose dessas células. Este último efeito é evidente quando se utiliza MA a fresco, comparada à membrana conservada, provavelmente porque a maioria das citocinas que estimulam a

apoptose dos polimorfonucleares está presente no epitélio ativo da membrana amniótica (ZHOU SHIYOU; CHEN JIAQI; FENG JINFA, 2003). Solomon et al. (2001) demonstraram que células epiteliais da córnea quando cultivadas em MA apresentam redução significativa na expressão dos mediadores e do mRNA IL -1 α e interleucina 1 β (IL-1 β), além da maior expressão de IL- 1 RA (receptor antagonista). Outras citocinas tais como IL 2, IL8, interferon gama e fator de necrose tumoral α , também são suprimidas na presença da membrana amniótica e além disso a membrana contém inibidores das proteinases e proteínas antiinflamatórias (HICK et al., 2005)

Além dos fatores antiinflamatórios, fatores antiangiogênicos são produzidos pelas células epiteliais e mesenquimais da membrana amniótica, já tendo sido identificados trombospodina-1, endostatina. Os inibidores das proteinases também têm este efeito, além de sua atividade antiinflamatória inibir a neoangiogênese (DUA et al., 2004; YANXIA HAO, et al., 2000).

Além disso, segundo Meller et al. (2000) a MA é capaz de promover a epitelização, com a manutenção do fenótipo celular, pela expansão das células germinativas do limbo remanescentes após uma lesão. A MA pode promover a proliferação e a diferenciação de células germinativas do limbo e da conjuntiva.

Choi e Tseng (2001) demonstraram, por meio de estudo experimental em coelhos, que as células do epitélio da córnea induzem a diferenciação dos ceratócitos em miofibroblastos, e a presença da MA, como uma barreira entre o epitélio e o estroma da córnea, pode evitar este fenômeno.

Estudos em córneas humanas mostram que o retalho pode permanecer no estroma por meses e o tempo de absorção é influenciado pela vascularização local e pela resposta inflamatória, que aumentam o aporte de células inflamatórias e citocinas, acelerando a dissolução da membrana (GRIS et al., 2002; PRABHASAWAT et al., 2001). Stoiber et al., em 2002, publicaram estudo onde fizeram análise histológica e imunohistoquímica de córneas obtidas de pacientes portadores de deficiências límbicas totais, que foram submetidos ao implante de MA associado a transplante de limbo autólogo ou alógeno, e posteriormente a ceratoplastia penetrante. Foram detectados resquícios da MA em pacientes que tiveram rápida epitelização pós-cirúrgica dos implantes, sendo que em pacientes em que o processo inflamatório pós-operatório foi significativo houve dissolução da membrana, tendo o mesmo fenômeno sido relatado por Gris et al. (2002) e Tosi et al. (2005). Além disso, Stoiber et al. observaram que os resquícios de membrana são remodelados e alterados no tecido receptor, pela invasão por ceratócitos que produzem feixes de fibras colágenas, que se arranjam em feixes ortogonais aos presentes na membrana, facilitando assim a passagem da luz. Essa remodelagem justifica a melhora na transparência do tecido implantado durante o pós-operatório. Tosi et al. (2005) realizaram exame histopatológico de córneas submetidas a transplante de MA anteriormente (2 a 20 meses) e não encontraram resquícios da membrana, nem tecido fibrótico em nenhum dos pacientes, para este fim foram usadas as colorações de PAS, Alcian blue, tricromico de Masson, e imunomarcção para colágenos IV e III. Marcar o tipo IV não foi um método eficaz, embora já descrito anteriormente por Stoiber et al. (2002), pois a membrana basal das córneas e da membrana amniótica foram consistentemente positivas para este colágeno. A imunomarcção do tipo III foi importante para determinar a presença de membrana

amniótica nas córneas, já que este não foi encontrado no estroma corneano normal e está presente na membrana.

Segundo Azuara-Blanco et al. (1999) quando a membrana é suturada à episclera (“overlay” ou “patch”), recobrando toda superfície da córnea, a proliferação das células epiteliais ocorre sob o retalho e, após algumas semanas, a membrana se dissolve, funcionando assim como bandagem biológica. Com esta finalidade a membrana deve ser suturada com a face epitelial voltada para a córnea, pois foi demonstrado que o epitélio produz fatores antiangiogênicos e antiinflamatórios. Porém esta afirmação é aplicada à membrana não conservada, já que a membrana conservada não apresenta epiteliais células viáveis (DUA et al., 2004). A MA também pode ser suturada apenas sobre a lesão da córnea (“inlay”), e nesse caso a epitelização ocorre sobre a membrana, que funciona como substrato, sendo então incorporada ao tecido da córnea. Essa alternativa pode ser melhor quando há perda de estroma, em úlceras profundas ou perfurações (AZUARA-BLANCO et al., 1999). A membrana basal da MA sobrevive à preservação e funciona como excelente substrato para o crescimento epitelial, para que este mecanismo funcione de forma adequada, a membrana deve ser colocada na superfície ocular com a membrana basal voltada para fora (DUA et al., 2004)

Letko et al. (2001) fizeram estudo clínico com o uso da MA no tratamento de defeitos epiteliais persistentes, comparando as técnicas de aplicação “inlay” e “overlay”. Em pacientes com lesões extensas e deficiências de células germinativas limbais, foi aplicada MA pela técnica “overlay”. Em pacientes com lesões localizadas, menores que 20% da superfície da córnea, com ou sem comprometimento estromal, os retalhos de membrana cobriram somente o defeito (técnica “inlay”). As lesões

cicatrizaram após a aplicação da membrana (70%), e não houve diferença nos resultados obtidos nas duas técnicas.

Heiligenhaus et al. (2002) desenvolveram modelo experimental de ceratite herpética em ratos que se mostrou útil para futuros estudos sobre os mecanismos de ação do implante de MA, pois seus resultados comprovaram a supressão da inflamação, a rápida epitelização e a redução da necrose estromal associados à presença da MA.

2.4.4 Métodos de conservação da membrana amniótica

Vários métodos podem ser utilizados para conservação da membrana amniótica incluindo a refrigeração, o congelamento e a liofilização. (ADDS, HUNT, DART, 2001; NAKAMURA et al., 2004c; TSENG et al., 1997; TSUBOTA et al., 1995). A manutenção da membrana basal e do estroma parecem ser vitais para que a membrana implantada exerça sua função na epitelização, e este deve ser o objetivo da preservação (TSUBOTA et al., 1995). Mejía, Acosta e Santamaría descreveram em 2000 a aplicação de MA não conservada, sendo o mesmo método utilizado por Uçakhan, Köklü e Firat (2002). Ainda são descritos na literatura outros métodos, como tratamento com glutaraldeído e politetrafluoroetileno e irradiação (DUA et al., 2004). Von Versen-Höynck et al. (2004) esterilizaram a MA em ácido-etanol peracético, desidrataram em fluxo laminar e preservaram em temperatura ambiente.

A glicerina ou glicerol é o meio básico para preservação de tecidos, utilizado inicialmente por Basile⁴ (1982 apud MARAL et al., 1999) para preservação de pele suína, atua substituindo a água intracelular sem, no entanto, alterar a concentração dos íons intracelulares. Portanto é um agente de preservação dos tecidos que mantém a integridade celular, é um agente antibacteriano de ação lenta, porém eficaz, além de ser um método simples e barato (MARAL et al., 1999). Barros et al. (1995) recomendaram a manutenção do tecido na glicerina por no mínimo 30 dias, com período máximo de conservação indeterminado.

Em Medicina Veterinária a glicerina tem sido amplamente utilizada como meio de conservação de membranas biológicas, e foi anteriormente indicada para preservação da membrana amniótica com bons resultados (BARROS et al., 1998; SAFATLE, 1998; GODOY, GUERRA, BARROS, 2002; SOUZA, 2003; BARROS et al., 2005).

2.4.5 Aplicações clínicas e experimentais para o uso da membrana amniótica

Em 1995, Jae Chan Kim e Tseng, reiniciaram os estudos sobre o assunto, utilizando um modelo experimental de deficiência límbica em coelhos para avaliar a eficácia do implante de MA conservada em glicerol na reconstrução da superfície ocular. Observaram que nos animais que receberam o implante formou-se epitélio com fenótipo semelhante ao da córnea, fator importante para melhora clínica, e

⁴ BASILE, A. R.D. A comparative study of glycerinized and lyophilized porcine skin um dressing for third-degree burns. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.69, p. 969-974, 1982.

também já consideraram a possibilidade da membrana basal da membrana amniótica contribuir para a formação de epitélio corneal normal.

Desde então muitos autores relataram os benefícios obtidos na reconstrução da superfície ocular em diversas situações. Os defeitos epiteliais persistentes são extensamente estudados já que os resultados obtidos com aplicação da MA em pacientes portadores desta afecção são bastante promissores (AZUARA-BLANCO et al., 1999; LEE et al., 1997).

Prabhasawat et al. (2000) relataram uso do implante de MA para reconstrução da superfície ocular em pacientes portadores de diferentes afecções, e obtiveram índice de sucesso de 83,3%, sucesso parcial em 13,1% e falha no tratamento em apenas 3,6% dos olhos, com um período médio de acompanhamento de 10,5 meses. De forma geral a MA reduziu a inflamação, promoveu cicatrização do epitélio e reduziu a irritação nas alterações corneanas de superfície.

As lesões parciais ou totais do limbo levam a invasão das células epiteliais conjuntivais na superfície da córnea, com presença de células globosas, vascularização, inflamação crônica e defeitos epiteliais recorrentes (MELLER; PIRES; TSENG, 2002). Prabhasawat e Tseng (1997) realizaram estudo utilizando exame citológico por impressão e demonstraram que na presença de deficiências límbicas, a MA deve ser associada a transplante de limbo para manter o fenótipo epitelial da córnea. Essa afirmação foi confirmada por Tosi et al. (2005) por meio do histopatológico, onde células globosas da conjuntiva foram encontradas na periferia da córnea de pacientes portadores de deficiência de limbo e submetidos apenas ao transplante de MA. A associação do transplante de MA ao transplante de limbo para tratamento de deficiências límbicas é descrita por Anderson et al. (2001), Meallet et

al. (2003), Pires et al. (1999), Shimazaki, Shimmura e Tsubota (2004) e Tseng et al. (1998). Espana et al. (2003) trataram de uma paciente com deficiência límbica total com transplante de limbo alógeno associado a MA, e posteriormente realizaram a ceratoplastia penetrante. Através do exame histopatológico do botão corneal obtido durante o último procedimento, demonstraram que houve recuperação do fenótipo do epitélio da córnea após o implante de MA associado ao transplante de limbo.

Ainda com foco no tratamento das deficiências límbicas, Meller, Pires e Tseng (2002) usaram a MA como substrato para cultura de células do limbo, considerando sua capacidade de preservar e expandir as células germinativas. As células germinativas mantiveram suas características de indiferenciação, e a expansão celular em culturas permite a retirada de pequena quantidade de tecido do leito doador. Grueterich et al. (2002) aplicaram este método em paciente e depois submeteram um fragmento de tecido da córnea a exame histológico e imunohistoquímico. O epitélio reconstruído apresentou integrinas $\alpha3\beta1$ e $\alpha6\beta4$ da mesma forma que o epitélio do limbo e da córnea, as células mantiveram fenótipo epitelial do limbo. Der-Yaun Wang et al. (2003) obtiveram o mesmo resultado em experimento com coelhos.

Koizumi et al. (2000a) demonstraram por meio de estudo experimental que a MA sem epitélio é um ótimo substrato para cultura de células epiteliais da córnea. No mesmo ano os autores estudaram a viabilidade do transplante dessas células epiteliais cultivadas em membrana amniótica para córneas de coelhos severamente lesadas, a epitelização foi mais precoce quando comparada àquelas que receberam somente a membrana amniótica (KOIZUMI et al., 2000b). A aplicação clínica deste método tem sido relatada com sucesso utilizando células alógenas de limbo

(KOIZUMI et al., 2001; NAKAMURA, 2003b) ou autógenas em casos de deficiências límbicas unilaterais (NAKAMURA et al., 2004c)

Visando ainda as deficiências de limbo, e com objetivo de evitar o uso de células germinativas alógenas, células epiteliais da mucosa oral autóloga cultivadas em membrana amniótica foram utilizadas para reconstrução da superfície ocular, estas células representam um autoenxerto de células epiteliais não queratinizadas (INATOMI et al., 2006; NAKAMURA et al., 2003a; NAKAMURA et al., 2004 b)

Em casos agudos de queimaduras a aplicação da MA pode ser benéfica, pois evita a inflamação, promove a epitelização, reduz a formação de cicatrizes e aderências (MELLER et al., 2000; MELLER et al., 2003). O transplante de limbo autólogo ou alógeno pode ser associado ao implante de MA, na fase mais tardia do tratamento, quando há lesão das células germinativas do limbo, essenciais para reconstituição do epitélio corneal (MELLER et al., 2000; MELLER et al., 2003; SHIMAZAKI et al., 1997a).

Estudos experimentais em coelhos, tem mostrado que o uso da membrana amniótica após ceratectomia fotorefrativa com excimer laser, inibe a resposta inflamatória local, com redução na opacidade e formação de cicatriz no pós-operatório (YONG SUK CHOI et al., 1998; WANG et al., 2001; WOO et al., 2001).

Espana et al. (2002) utilizaram o implante de MA para reconstrução da superfície após a ressecção cirúrgica de neoplasias extensas de superfície ocular.

Em úlceras profundas de córnea, Kruse et al. (1999), aplicaram o transplante de MA em múltiplas camadas, a fim de preencher o defeito estromal, sendo o mesmo procedimento foi utilizado por Hanada et al. (2001), Prabhasawat et al.

(2001) e Rodriguez-Ares et al. (2004). A maior quantidade de matriz disponibilizada na técnica de camadas múltiplas acelera a cicatrização epitelial através do maior aporte de fatores de crescimento, além disso há recuperação significativa da espessura do estroma (PRABHASAWAT et al., 2001). O implante em camadas múltiplas foi usado por Ko-Hua Chen, Wen-Ming Hsu e Chih-Kai Liang (2004) para tratamento de úlcera de Mooren, mostrando que o transplante de membrana pode ser também útil para o tratamento de perfurações de origem autoimune. No entanto, Azuara Blanco et al. (1999) relatou cinco casos de insucesso do implante de membrana para tratamento de perfurações de córnea, usando a aplicação em *patch*.

Chuan-Yi Su e Chan-Ping Lin (1999) usaram a MA associada ao adesivo tissular (cianoacrilato) para tratamento de um caso de perfuração de córnea e obtiveram resultados promissores.

Hick et al. (2005) associaram o transplante de MA à aplicação de cola de fibrina em pacientes com perfurações de até três milímetros, com bons resultados. A cola de fibrina estimula a atividade dos fibroblastos, melhora a migração dos ceratócitos na matriz e não é tóxica, resultando assim em estímulo adicional ao processo de cicatrização.

Pires et al. (1999) estudaram o uso da MA para tratamento da ceratopatia bolhosa sintomática.

Ainda em 1999, Zagorski et al. fizeram o transplante de MA em vários tipos de lesões corneais graves, e associaram às lentes de contato ou implantes de córnea sobre a membrana, não houve sucesso em todos os casos com esta técnica. Já Gabric et al. (1999) também relataram aplicação da MA em lesões corneais de

causas variadas com boa recuperação, mas em casos de perfuração iminente funcionou apenas como suporte temporário durante a preparação do olho para o transplante de córnea.

As úlceras neurotróficas decorrentes da lesão do ramo aferente sensorial corneal do nervo trigêmio, são caracterizadas por anestesia corneal e perda de epitélio, e são de difícil tratamento. Hong- Jeng Chen et al. (2000), Khokhar et al. (2005) avaliaram uso da MA nesta situação, e consideraram-na eficiente. Gris et al. (2002) realizaram exame histopatológico das córneas de dois pacientes portadores de úlceras neurotróficas que foram tratados com implante de MA e posteriormente (3 e 7 meses depois) submetidos à ceratoplastia penetrante. Em ambos os casos, a epitelização sobre a membrana basal implantada ocorreu em poucas semanas, mas a MA reabsorvida foi substituída por tecido fibrótico, o que comprometeu a transparência.

O implante de MA foi indicado por Young Sam Kwon, Young Soo Song e Jae Chan Kim (2004) para o tratamento da ceratopatia em faixa, associado à ceratectomia lamelar superficial e quelação com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Takano et al. (2004), relataram uso da MA em *patch* em paciente portador de úlcera persistente de origem alérgica há seis meses, obtendo epitelização completa em uma semana. Heinz et al. (2004) utilizaram a associação das técnicas “inlay” e “overlay” para o tratamento de caso grave de oftalmopatia de Graves, e segundo eles tal procedimento se justifica pelas diferentes funções exercidas pela MA em cada uma das duas técnicas.

Prabhasawat et al. (1997) e Shimazaki et al. (1997b) relataram uso do implante de MA para reconstrução da superfície ocular em pacientes portadores de pterígio. Tseng et al. (1997) estudaram o implante da MA para reconstrução da conjuntiva e concluíram que pode ser considerado como alternativa para reconstrução após remoção de tumores grandes, cicatrizes extensas e simbléfaro.

Gomes et al. (1999) obtiveram 80% de bons resultados em cirurgias reconstrutivas da superfície ocular na ceratoconjuntivites cicatriciais com aplicação da MA. Honavar et al. (2000) também foram bem sucedidos com uso da membrana amniótica para reconstrução da superfície ocular na Síndrome de Stevens-Johnson, assim como, John et al. (2002) de MA, em dois casos de necrólise epidermal aguda. Posteriormente, Barabino e Rolando (2003) relataram caso de sucesso no tratamento de penfigóide cicatricial severo através do implante de MA.

Rodríguez-Ares et al. (1999) utilizaram a membrana amniótica para recobrir homoenxerto de esclera, em paciente portador de Síndrome de Marfan's, com sucesso. A aplicação da MA em *patch* foi utilizada com bons resultados em pacientes com *melting* escleral, e extensas úlceras esclerais e córneo esclerais infecciosas, por David Hui-Kang Ma et al. (2002), procedimento repetido por Jung Hwan Oh e Chan Kim (2003) em pacientes com escleromalácia.

Gris et al. (2003) relataram uso de MA na reconstrução da superfície ocular em paciente portador de injúria química com calcificação da córnea, esclera e isquemia escleral, ocorrendo epitelização e revascularização do defeito sobre o implante.

São poucos os relatos de insucesso com o uso da MA na reconstrução da superfície ocular. Segundo Marangon et al. (2004) a taxa de complicações pós-

operatórias associadas à contaminação é baixa (3,4%) desde respeitados todos os cuidados recomendados para obtenção e conservação das membranas; e os microrganismos gram positivos são isolados com maior frequência (64%). Schechter et al. (2005) descreveram caso de melting da córnea, 15 dias depois do transplante de MA; Glaber e Lohamnn (2000) descreveram um caso de hipópio após repetidos implantes de MA em paciente com úlcera neurotrófica, e hipópio também foi a complicação observada por Messmer (2001) após implante de MA. Em todos os três relatos as complicações foram associadas à resposta imune do receptor. Outras complicações são associadas ao implante de MA: a membrana pode se dissolver antes da completa epitelização, pode ocorrer necrose da MA por ação das enzimas proteolíticas principalmente quando há inflamação intensa, e a membrana pode não aderir adequadamente à superfície quando a face de contato não é a mesenquimal (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999). Anderson et al. (2003) relataram calcificação de córnea em 12,8% dos pacientes.

Em Medicina Veterinária, a MA para implante em lesões de córnea em cães, foi inicialmente utilizada por Barros et al. (1998), que aplicaram a membrana xenóloga (equina) em ceratectomias penetrantes em cães e verificaram, ao final do experimento, arquitetura da córnea restaurada e a membrana incorporada à sua estrutura. As observações clínicas e histológicas levaram à conclusão de que a MA equina é viável como retalho para ceratectomias penetrantes em cães. Safatle (1998) estudou comparativamente a capacidade angiogênica do pericárdio e da membrana amniótica de equino em córnea de ratos, sendo que ambas induziram a angiogênese, porém a provocada pelo pericárdio xenógeno foi mais intensa e mais duradoura.

Godoy, Guerra e Barros (2002) avaliaram a viabilidade da membrana fetal eqüina como enxerto em ceratectomias lamelares em cães. Histologicamente observaram perfeita integração da membrana ao tecido da córnea, presença de neovasos, quase ausência de infiltrado inflamatório na área do implante e nos pontos de sutura, não se observando formação de granuloma tipo corpo estranho. Assim, concluíram que a membrana fetal eqüina é um bom tecido alternativo no reparo de lesões lamelares de córnea em cães.

Andrade (2003) estudou por meio de experimento em coelhos os aspectos clínicos, morfológicos e bioquímicos, dos efeitos da MA humana criopreservada, em DMSO₄ sobre as córneas de coelhos com deficiência limbar, produzida por meio de periotomia e ceratolimbectomia, seguidas de queimadura com NaOH 0,5 M, e desepitelização mecânica com bisturi. Concluiu que a MA humana criopreservada é uma alternativa eficiente na reconstrução da superfície ocular, pois as córneas tratadas apresentaram melhor evolução clínica e menos defeito epitelial.

Souza (2003) realizou experimento para comparação da ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana amniótica ou alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina 98%. Nas avaliações clínica e histológica os dois grupos mostraram evoluções semelhantes e o desenvolvimento do processo cicatricial foi considerado dentro dos padrões normais para córnea. Concluí-se que ambas as membranas são efetivas como membrana biológica alógena na reparação de defeito corneal.

Ainda em 2003, Freddo utilizou modelo experimental em ratos para estudar efeito da ciclosporina A 0,2% sobre a neovascularização da córnea, pós-implante de membrana amniótica xenógena, em microbolsa, no estroma corneal. A membrana amniótica induziu a neovascularização até o 15º dia de pós-operatório, quando esta

passou a regredir. O uso da Ciclosporina A 0,2% intensificou a neovascularização até o 7º dia de pós-operatório, e depois a regressão dos neovasos foi mais rápida e intensa no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle.

Lassaline et al. (2005) relataram a utilização de implante de MA equina em três eqüinos com diagnóstico clínico de ceratomalacia, acometendo de 50 a 75% da córnea, cujo agente era *Pseudomonas sp.* A membrana obtida durante uma cesariana foi congelada em meio de conservação de Eagle`s modificado (glicerol, penicilina, estreptomicina, neomicina e anfotericina B), e os autores observaram que houve perda do epitélio durante a conservação, permanecendo apenas a membrana basal e o estroma no tecido usado nos transplantes. Os resultados obtidos foram satisfatórios com a manutenção da função dos olhos tratados, apesar da opacidade residual. O implante de membrana amniótica foi considerado uma boa opção de tratamento nestas circunstâncias, pois quando comparada aos retalhos conjuntivais, resultam em área de cicatriz menor e fornecem resistência adequada ao tecido receptor.

Barros et al. (2005) relataram aplicação de membrana amniótica para reconstrução da superfície ocular em três casos clínicos, com os seguintes diagnósticos: ceratomalácia em cão (Yorkshire, 11 anos, fêmea), simbléfaro e anquibléfaro pós rinotraqueíte em felino (Siamês, fêmea, 4 anos), e formação córneo escleral, que após ressecção foi identificada como Histiocitoma fibroso (Terrier, fêmea, 3 anos). Foi utilizada membrana amniótica canina preparada e congelada ou conservada em glicerina 98% em temperatura ambiente. Em todos os casos a evolução foi adequada resultando em formação de cicatriz e de vascularização discretas na córnea. Portanto os autores consideraram o implante de membrana

amniótica adequado para reconstrução da superfície ocular em doenças corneanas e conjuntivais graves.

Godoy (2005) comparou a resposta da córnea do coelho à implantes de membrana amniótica autógena e xenógena (humana). Verificando que clinicamente ambos os grupos apresentaram comportamento semelhante. Nas avaliações microscópicas, as membranas amnióticas de origem alógena e xenógena foram incorporadas e reabsorvidas, contudo no grupo que recebeu membrana humana observou-se maior grau de infiltrado inflamatório e neovascularização, diferença que foi estatisticamente significativa.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade e a eficácia do implante de MA eqüina, preservada em glicerina a 98%, na reparação de ceratectomias lamelares em cães; por meio do estudo da avaliação clínica pós-operatória dos animais, do tempo de cicatrização, da reconstrução da arquitetura da córnea, da resposta inflamatória, e da composição colágena do estroma corneal no local do implante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do experimento foram utilizados doze cães sem raça definida, que foram submetidos a ceratoplastia lamelar unilateral seguida de implante de membrana amniótica eqüina. Realizaram-se avaliações clínicas durante o período de observação e microscópicas pós-mortem.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 12 cães, sem raça definida, machos ou fêmeas, com peso médio de 10 kg, sadios ao exame clínico geral. Os animais foram submetidos ao exame clínico do olho, além de tonometria por aplanção⁵, teste de Schirmer⁶, teste de fluoresceína⁷ e oftalmoscopia direta⁸, para que fossem descartadas quaisquer doenças oftálmicas.

Os animais selecionados foram mantidos em canis individuais e receberam uma dose de vacina anti-rábica e octupla⁹, além de duas doses de ivermectina¹⁰ com intervalos de 15 dias, antes do procedimento cirúrgico. Receberam ração adequada e água “ad libitum”, segundo resolução da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

⁵ Tonopen XL - BIORAD

⁶ Teste Schirmer -Ophthalmos

⁷ Fluoresceína colírio - Allergan

⁸ Oftalmoscópio direto – WelchAllyn 11730

⁹ Canigen CH/A2/PPI/LR - Virbac

¹⁰ Ivomec - Merial

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram formados quatro grupos de três cães, totalizando 12 animais, nos quais foi implantada membrana amniótica na córnea após a ceratectomia lamelar. Os grupos tiveram tempos de observação distintos: 48 horas, 7, 21 e 40 dias, após os quais, os olhos utilizados foram enucleados e fixados para posterior análise. Os grupos foram assim denominados:

G I - 48 horas

G II - 7 dias

G III - 21 dias

G IV - 40 dias

4.3 OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

A membrana amniótica foi coletada de forma asséptica, logo após o parto de égua clinicamente sadia. Em seguida a membrana foi submetida à lavagem com solução fisiológica a 0,9% e para preservação, foi imersa em solução de glicerina 98%, onde permaneceu à temperatura ambiente até o momento da sua utilização.

Antes da cirurgia, os fragmentos foram recortados no tamanho adequado e mantidos em solução fisiológica 0,9% para hidratação, por no mínimo 15 minutos.

4.4 ANESTESIA GERAL INALATÓRIA E ANALGESIA

Após 12 horas de jejum alimentar e quatro horas de jejum hídrico os animais foram submetidos ao procedimento anestésico. Inicialmente, foi aplicada medicação pré-anestésica: acepromazina¹¹ 0,05 mg/kg e meperidina¹² 2 mg/kg, por via intramuscular. Após 15 minutos foi realizada indução anestésica com propofol¹³, na dose de 5mg/kg, por via endovenosa e para manutenção, utilizou-se o isoflurano¹⁴ e o bloqueador neuromuscular, rocurônio¹⁵ na dose de 0,6 mg/kg, por via endovenosa, com objetivo de manter o bulbo ocular centralizado (BECHARA, 2002).

Antes da indução e nos três primeiros dias de pós-operatório os animais receberam 1 mg/kg de flunixin meglumine¹⁶ para controle da uveíte reflexa. No pós-operatório imediato foi aplicado cloridrato de tramadol 2 mg/kg (I.V.)¹⁷

4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Optou-se pela utilização de apenas um dos olhos de cada animal para evitar maiores desconfortos, sendo padronizado o uso do olho esquerdo. Apenas naqueles

¹¹ Acepran 0,2%- Univet

¹² Dolosal - Cristália

¹³ Propovan - Cristália

¹⁴ Isoforine - Cristália

¹⁵ Esmeron – Akzo Nobel Ltda

¹⁶ Banamine - Schering Plough

¹⁷ Tramadon - Cristália

animais em que houve insucesso da cirurgia, um segundo procedimento foi realizado no olho direito, após um período de descanso de 20 a 30 dias.

4.5.1 Ceratectomia lamelar

Com o animal anestesiado foi realizada a anti-sepsia com solução de iodo povidona em solução fisiológica 0,9% (1:50) e foram colocados os campos operatórios como de rotina. Em seguida fez-se a blefaroestase mecânica. Sob microscópio cirúrgico com aumento de dez vezes procedeu-se a ceratectomia lamelar, com profundidade de 0,3 mm e 5 mm de diâmetro, com auxílio de trépano de Castroviejo (5 mm) e uma lâmina de bisturi número 15 para dissecação e retirada do tecido isolado, na região temporal a dois milímetros do limbo (Figura 1).

4.5.2 Sutura da membrana amniótica

Em todos os grupos foram utilizados retalhos de membrana de 6 mm de diâmetro, suturados nos bordos da lesão de córnea, em pontos simples separados, com fio de náilon 8.0 monofilamentado. A MA foi aplicada com sua membrana basal voltada para cima e face mesenquimal voltada para córnea (Figuras 2 e 3).

Após o procedimento os animais foram mantidos com colar elizabetano a fim de evitar o autotraumatismo.

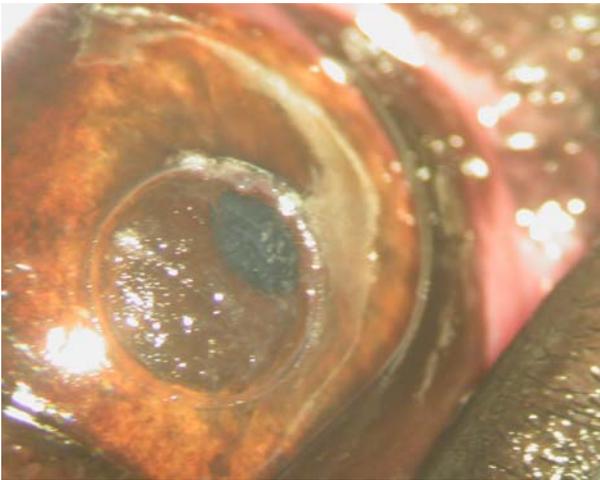


Figura 1 – Imagem fotográfica em trans-operatório, da ceratectomia lamelar de 5 mm realizada 2 mm do limbo na região temporal

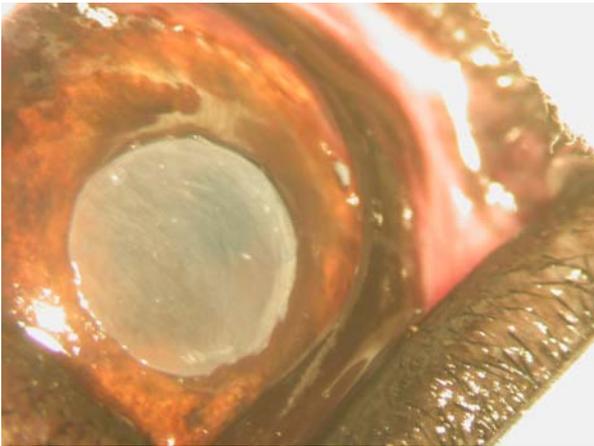


Figura 2 – Imagem fotográfica mostrando posicionamento da membrana amniótica na superfície da área de ceratectomia lamelar

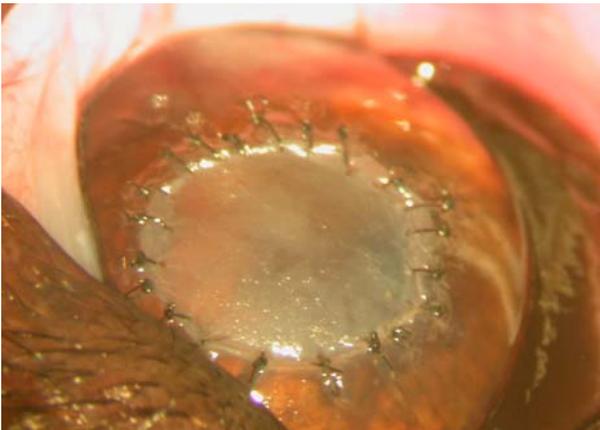


Figura 3 - Imagem fotográfica da córnea imediatamente após o procedimento cirúrgico: ceratectomia lamelar, implante da membrana amniótica eqüina e sutura com pontos simples separados na córnea.

4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA NO PÓS-OPERATÓRIO

Foi utilizado colírio de Tobramicina 0,3%¹⁸, a cada 12 horas, nos primeiros sete dias de pós-operatório. Os cães foram submetidos, em dias alternados, ao exame clínico do olho com auxílio de lupa e fonte luminosa. Foram avaliados quanto à presença de blefaroespasma, fotofobia, secreção ocular, permanência dos implantes, neoformação vascular na córnea, edema de córnea e outros sinais de rejeição do retalho. Também foram realizados os testes lacrimal de Schirmer e de Fluoresceína. Os parâmetros foram classificados de forma subjetiva em: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (acentuado). Os pontos de sutura foram retirados após a completa epitelização do implante, confirmada pelo teste de fluoresceína, entre 9 e 15 dias de pós-operatório, para evitar estímulo adicional à resposta inflamatória. Procedimento realizado sob anestesia endovenosa com propofol. Os 12 cães foram divididos em quatro grupos de três animais, de acordo com a seguinte numeração:

GI – 48 horas – animais A10, A11, A12

G II – 7 dias – animais A7, A8, A9

G III – 21 dias – animais A4, A5, A6

GIV - 40 dias – animais A1, A2, A3

¹⁸ Tobramicina 0,3% - Alcon

4.7 ENUCLEAÇÃO E FIXAÇÃO DOS OLHOS

Ao final do período de observação pré-determinado, os animais foram submetidos à eutanásia, por injeção intravenosa de tiopental sódico¹⁹ para anestesia em plano profundo e em seguida cloreto de potássio 19,1%²⁰. Os olhos em estudo foram então enucleados pela técnica transconjuntival descrita por SLATTER (2001) e mergulhados na solução de formol a 10% tamponado.

Após a fixação os segmentos córneo-esclerais em estudo foram seccionados e incluídos em blocos de parafina, e cortes de 5 µm de espessura foram feitos com micrótomo para a análise morfológica. As lâminas usadas na Imunomarcacão foram preparadas de modo específico, descrito a seguir.

4.8 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA CÓRNEA

4.8.1 Microscopia óptica

Foram utilizados três métodos de coloração para o estudo histológico do tecido implantado: hematoxilina-eosina (HE), para descrição geral dos espécimes estudados; ácido periódico de Schiff (PAS) para evidenciar glicosaminoglicanas na

¹⁹ Tiopental - Cristália

²⁰ Cloreto de potássio – Áster Equiplex

substância intersticial amorfa e presença de membrana basal íntegra na região de implante (YOUNG; HEATH, 2001); Picrossirius, para evidenciar colágeno na região do implante (RAMOS, 1997)

4.8.2 Imunomarcção para os Colágenos Tipos I, III e V

Fragmentos de córnea foram fixados em formol e incluídos em parafina, seccionados em cortes de três micrômetros e montados em lâminas previamente tratadas com aminosilano. Para remoção da parafina os cortes foram imersos em xilol quente por 10 minutos, a seguir submetidos a três banhos de xilol frio e hidratados com sucessivas lavagens com álcool etílico, em concentrações decrescentes (100% a 75%), água destilada e tampão fosfato (PBS) pH 7,2. Posteriormente, foram submetidos à digestão enzimática por 30 minutos a 37°C, com pepsina de estômago de porco (10000 UTD)²¹ 2mg/ml diluída em ácido acético 0,05M/0.5M. Os cortes foram lavados com PBS e incubados com leite desnatado 5% em PBS por 30 minutos. Posteriormente foram incubadas à noite a 4°C, com anticorpos policlonais anti-colágeno dos tipos I e V obtidos em coelhos, na diluição de 1:20 e 1:40 respectivamente, anti-colágeno do tipo III monoclonal obtido em camundongo²² 1:40. Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS com Tween 0,05% e incubadas por 90 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína 1:50. Após esse período as lâminas foram

²¹ Sigma Chemical Co

²² Oncogene

montadas em glicerina tamponada e a reação visibilizada em microscópio de fluorescência²³

¹⁹ Nikon

5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram obtidos a partir das avaliações clínico-oftalmológicas e microscópicas das córneas.

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICO-OFTALMOLÓGICA

Para a avaliação oftalmológica dos 12 olhos com implante de MA eqüina foram considerados os seguintes parâmetros: blefaroespasma, fotofobia, quantidade e tipo de secreção, hiperemia conjuntival, quemose, edema de córnea, teste de fluoresceína e presença de neovasos.

5.1.1 Blefaroespasma

Todos os animais apresentaram blefaroespasma considerado moderado (grau 2) nos quatro primeiros dias, sendo que apenas o cão número oito apresentou blefaroespasma mais acentuado (grau 3), no primeiro dia de pós-operatório. Todos apresentaram redução gradual após este período, até o completo desaparecimento depois da retirada dos pontos de sutura. Considerando que este fenômeno teve comportamento semelhante na maioria dos animais, para observação da sua

evolução na forma de gráfico, foram utilizadas as médias dos dados obtidos em todos os animais, segundo dia de avaliação (Gráfico 1).

5.1.2 Fotofobia

Esta alteração clínica foi observada com graduações entre 1 e 2, apenas nos quatro primeiros dias de pós-operatório na grande maioria dos cães, sendo que apenas no animal A2 do grupo IV permaneceu até o nono dia (Gráfico 2).

5.1.3 Secreção

A secreção foi avaliada quantitativa e qualitativamente, sendo classificada em serosa, seromucosa, serosanguinolenta, mucosa e mucopurulenta. Durante toda a observação predominou a secreção mucosa em todos os animais. A quantidade variou entre os graus 1 e 3, sendo a redução progressiva e mais acentuada após a retirada da sutura. Para análise da evolução deste fenômeno, que teve comportamento semelhante na maioria dos animais, no gráfico foram consideradas a média dos dados de todos os animais por dia de avaliação (Gráfico 3). A forma serosa foi observada na primeira avaliação (48 h) do animal A3; secreção serosanguinolenta foi observada na primeira observação do animal A9, provavelmente associada à autotraumatismo, sem comprometimento do implante.

Secreção mucopurulenta foi observada no cão A5 no sexto dia de observação regredindo para o aspecto mucoso em 24 horas com a manutenção da antibioticoterapia.

5.1.4 Congestão conjuntival e quemose

A congestão conjuntival palpebral e bulbar esteve presente em todos os animais, variando entre acentuada e moderada, apenas desaparecendo após a retirada da sutura. A quemose moderada foi observada apenas nos primeiros dois a quatro dias em todos os animais. Para a análise da evolução do fenômeno congestão conjuntival em forma de gráfico, foram consideradas as médias dos dados de todos os animais, por dia de avaliação (Gráficos 4 e 5).

5.1.5 Edema de córnea

Alteração observada em periferia do implante, em alguns animais, em fases diversas do período de observação: A2 entre 9 e 15 dias; A1, A 3 e A 5 entre 6 e 8 dias; A6 entre 4 e 8 dias; A7 e A8 desde o segundo dia até quarto e sexto dias respectivamente (Gráfico 6).

5.1.6 Teste de Fluoresceína

Em todos os animais observou-se impregnação do implante pelo corante, o que nos permitiu avaliar a epitelização nele ocorrida, e determinar o período necessário para sua finalização. Este período também apresentou grande variação, ficando em torno de 10 (\pm 2) dias para a maioria dos animais, sendo que as exceções foram: o cão A4 com implante totalmente epitelizado no quarto dia e A6 epitelizado somente no dia 16.

5.1.7 Neoformação vascular

Os primeiros neovasos foram observados no sexto dia em cinco animais (A3, A5, A7, A8, A9), no décimo dia em 3 (A2, A4, A6) e no dia 12 para o animal A1. Os vasos atingiram a região do implante entre os dias 8 e 12 (8 dias – A5 e A3; 12 dias – A1, A2, A6). O cão A4 do grupo III apresentou neovascularização mais lenta e que não atingiu o implante até o final do período de observação. Nos animais do G IV houve regressão da vascularização desde o vigésimo dia; aos 40 dias os vasos não foram observados, restando apenas uma nébula no local do implante. Para a análise da evolução deste fenômeno em forma de gráfico, foram consideradas as médias dos dados de todos os animais por dia de avaliação (Gráfico 7).

Blefaroespasma

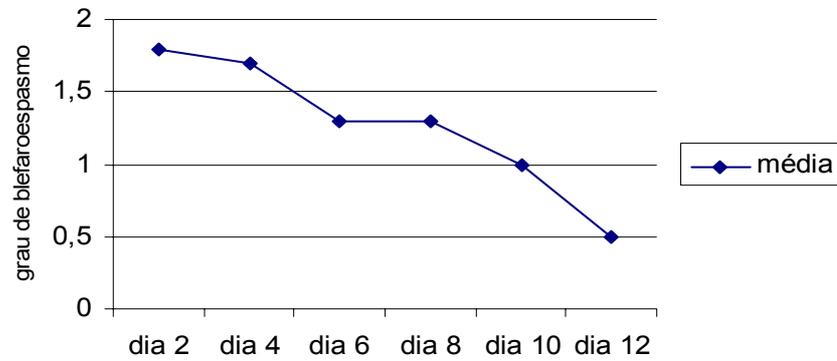


Gráfico 1 – Representação gráfica da evolução do fenômeno blefaroespasma, segundo a média de todos os animais submetidos a ceratoplastia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, durante o período pós operatório.

Fotofobia

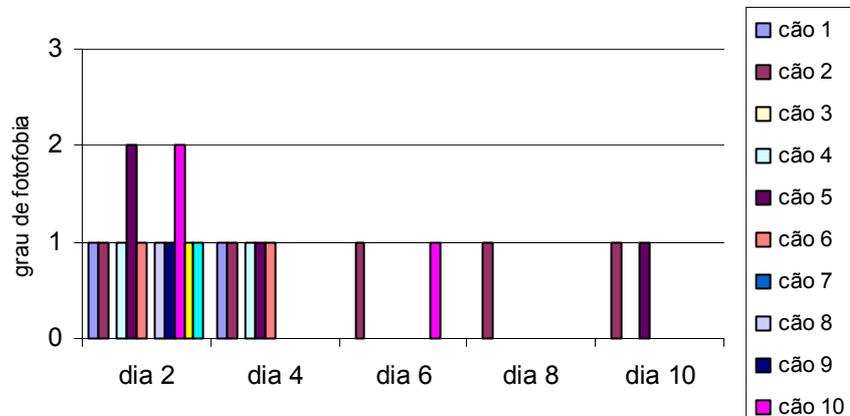


Gráfico 2 – Representação gráfica da evolução do fenômeno fotofobia, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina

Secreção

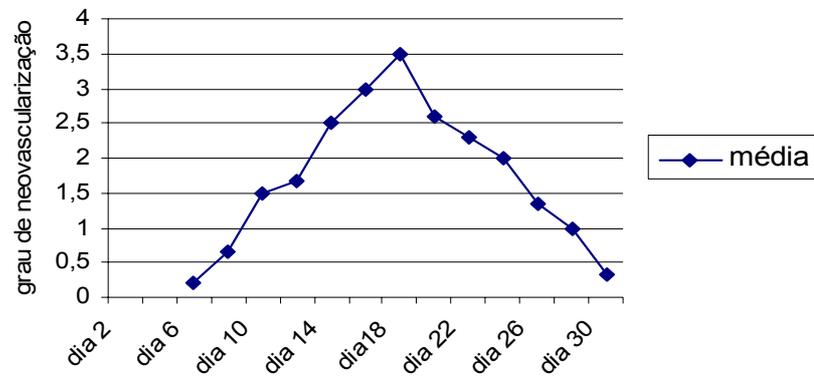


Gráfico 3 – Representação gráfica da evolução do fenômeno secreção, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, segundo a média dos resultados observados em todos animais avaliados

Congestão conjuntival

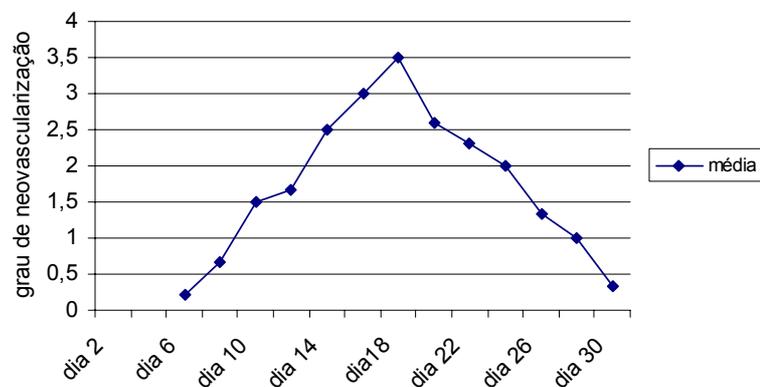


Gráfico 4 – Representação gráfica da evolução do fenômeno congestão conjuntival, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, segundo a média dos resultados observados em todos animais avaliados

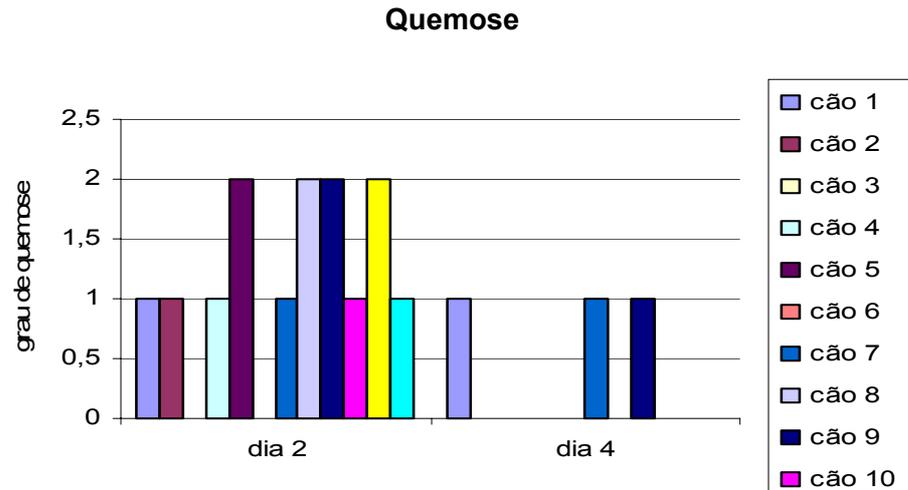


Gráfico 5 – Representação gráfica da evolução do fenômeno congestão quemose, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina.

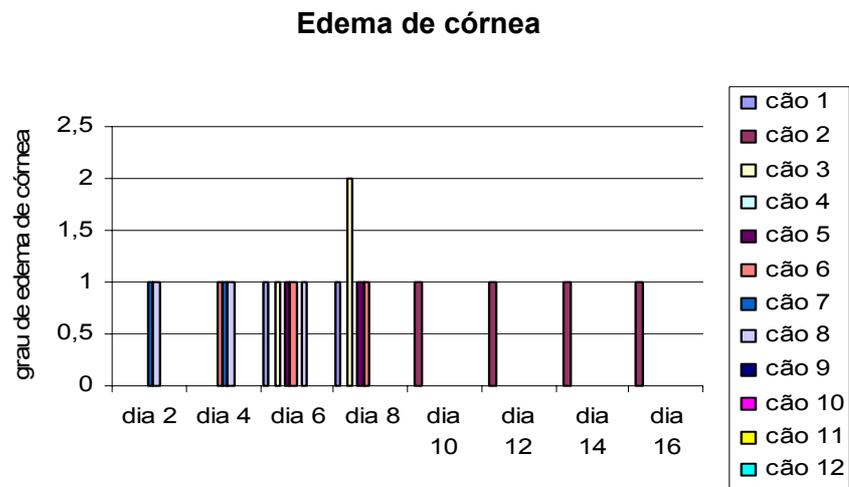


Gráfico 6 – Representação gráfica da evolução do fenômeno edema de córnea, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina

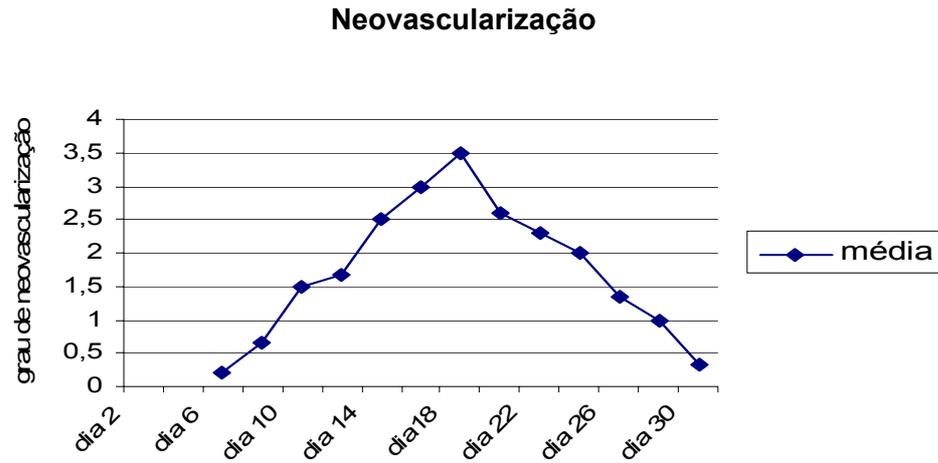


Gráfico 7 – Representação gráfica da evolução do fenômeno neovascularização da córnea, no período pós-operatório dos animais submetidos a ceratectomia lamelar e implante de membrana amniótica eqüina, segundo a média dos valores obtidos em todos os animais avaliados.



Figura 4 – Imagem fotográfica da córnea aos 2 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se presença da MA, presença dos pontos de sutura e congestão conjuntival

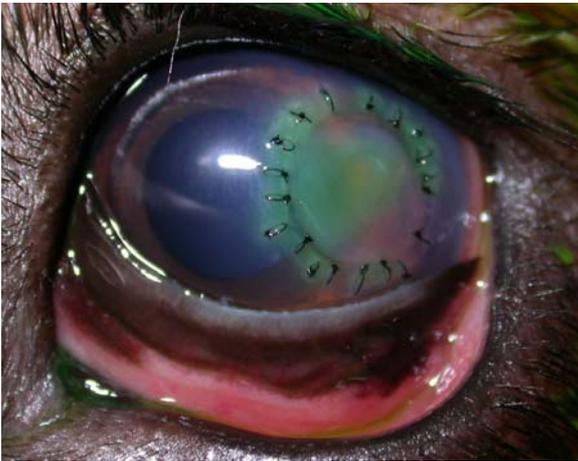


Figura 5 - Imagem fotográfica aos 4 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se presença do implante parcialmente epitelizado, discreto edema de córnea na periferia da lesão, presença dos pontos de sutura conjuntiva congesta.



Figura 6 - Imagem fotográfica de 7 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se presença do implante de MA na córnea, pontos de sutura, formação da neovascularização periférica a partir do limbo, congestão conjuntival.

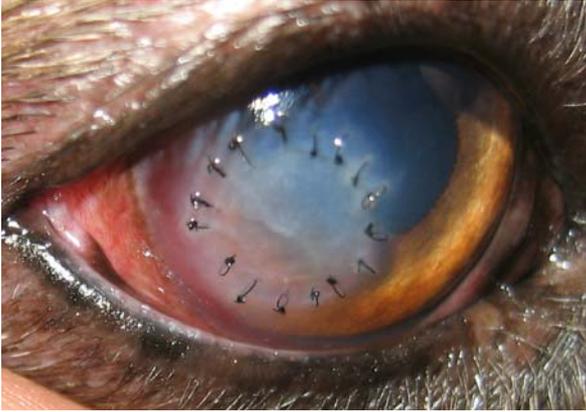


Figura 7 – Imagem fotográfica aos 10 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se implante incorporado ao tecido e completamente epitelizado, neovasos atingindo área do implante, discreto edema na periferia da lesão e congestão conjuntival.

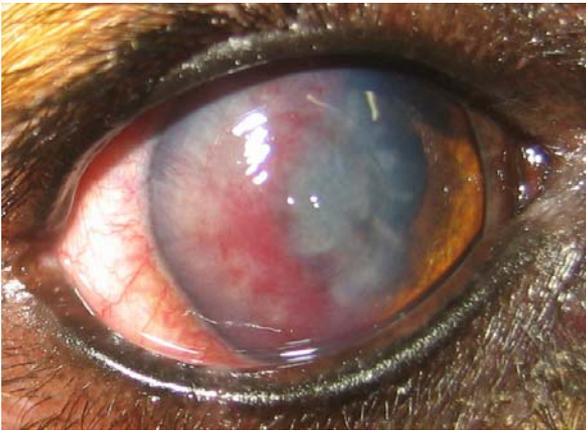


Figura 8 – Imagem fotográfica aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se implante totalmente incorporado ao tecido, neovasos invadindo terço lateral do implante, pontos de sutura já foram retirados.

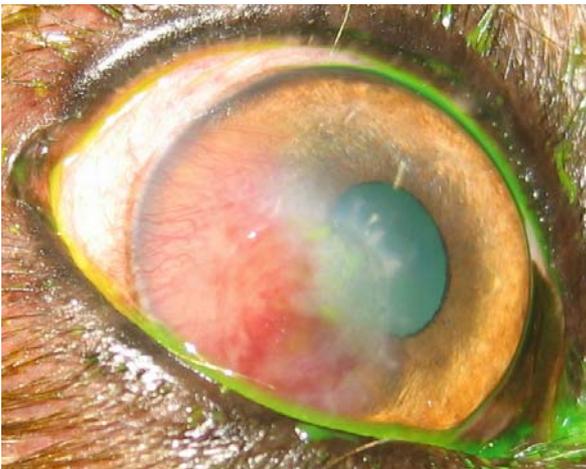


Figura 9 – Imagem fotográfica aos 20 dias de dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se completa incorporação do implante à córnea, início da involução dos neovasos. Ausência de congestão conjuntival.



Figura 10 - Imagem fotográfica aos 20 dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se completa incorporação do implante à córnea, involução dos neovasos mais acentuada neste caso. Ausência de congestão conjuntival.



Figura 11- Imagem fotográfica aos 30 dias de pós-operatório. Observa-se implante totalmente incorporado à córnea, completa involução dos neovasos, nébula na região do implante.



Figura 12 - Imagem fotográfica aos 40 dias de dias após a ceratectomia lamelar e implante de MA eqüina. Observa-se apenas nébula residual na região do implante.

5.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

5.2.1 Hematoxilina eosina, Picrossírius e Periodic acid of Schiff

A avaliação em microscopia óptica da área de implante foi realizada pelas colorações hematoxilina-eosina, picrossírius, e PAS. O resultado é descrito a seguir, respeitada a seqüência experimental.

Aos dois dias após o implante, a membrana é visibilizada na superfície do estroma exposto pela ceratectomia, o tecido implantado apresenta-se amorfo, com baixa celularidade e eosinofílico (Figura 13). Foram encontrados raros fibroblastos e polimorfonucleares invadindo o tecido implantado (Figura 14). Observou-se início de epitelização, com formação de epitélio plano simples e maior proliferação celular nos bordos da lesão, região dos pontos de sutura. As células inflamatórias são representadas principalmente por polimorfonucleares, que estavam em pequena quantidade, principalmente próximos aos pontos de sutura.

Aos sete dias observou-se epitelização do implante com formação de epitélio pavimentoso estratificado, proliferação fibroblástica no interior do tecido implantado e discreto infiltrado inflamatório com polimorfonucleares, sendo que nesta fase ainda foi possível observar a extensão do tecido implantado (Figura 15). A figura 16 mostra que no animal A9 houve crescimento de epitélio entre o estroma e o tecido implantado.

Aos 21 dias a epitelização do implante estava completa, a região de reparação apresentava maior número de camadas celulares, contudo com perda da arquitetura epitelial inicial. Nesta fase não foram observadas células inflamatórias, mas há grande celularidade no estroma, com presença de fibrócitos e fibroblastos. A angiogênese é evidente neste período, sendo que em um dos animais (A 4) foi significativamente menor quando comparada aos demais componentes do grupo. O tecido implantado apresentou-se incorporado à córnea, no entanto observou-se que nesta área as fibras colágenas estromais estavam mais densamente distribuídas. (Figuras 17 e 18). Ao PAS ainda não foi possível identificar a membrana basal do epitélio (Figura 19).

Aos 40 dias de pós-operatório houve completa integração e epitelização do implante, arquitetura celular do epitélio ainda não se apresentou completamente restabelecida (Figura 21). A estrutura colágena apresentou-se mais densa na região da cicatriz, e o infiltrado celular por fibrócitos e fibroblastos mostrou-se de menor intensidade quando comparado ao encontrado no grupo de 21 dias (Figura 20). Nesta fase a coloração PAS evidenciou a presença de lâmina basal epitelial reconstituída (Figura 22).

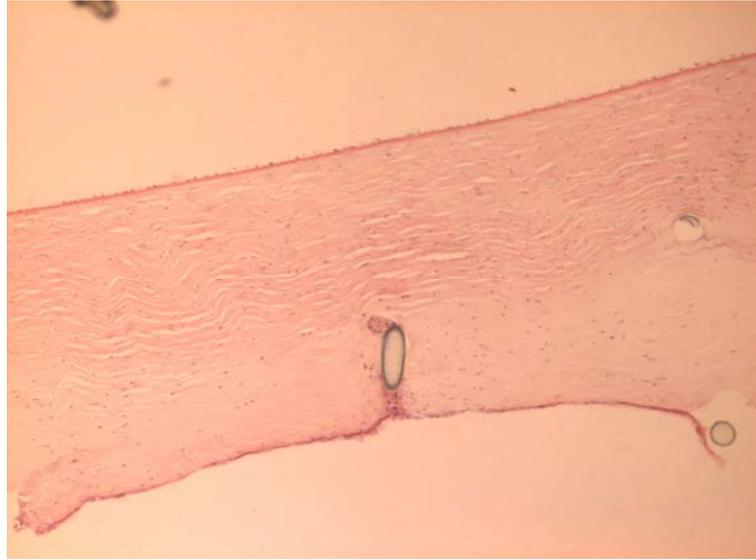


Figura 13 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 2 dias de evolução pós-operatória, mostrando interface do tecido implantado com estroma normal da córnea. O tecido implantado apresenta-se amorfo, com baixa celularidade e eosinófilico. Nota-se ainda formação de epitélio plano simples na superfície do tecido implantado (primórdios da epitelização). Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 40x.

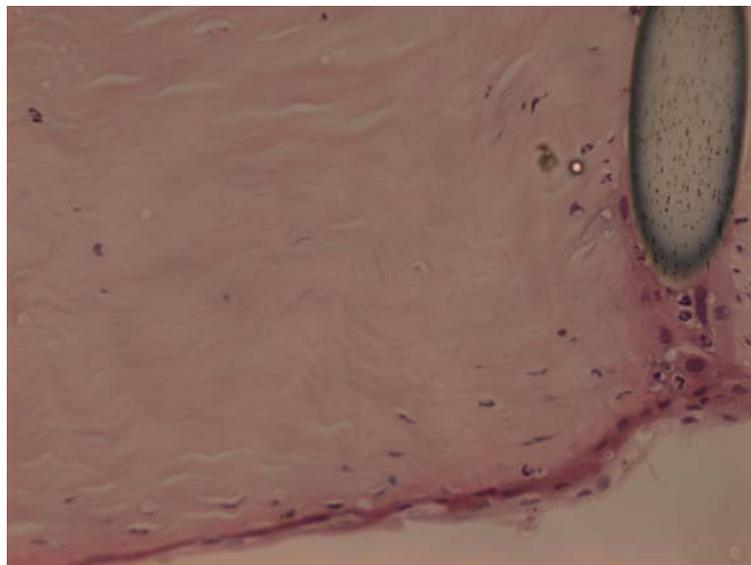


Figura 14 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando o tecido implantado, superfície com início de epitelização e presença de raros fibroblastos e polimorfonucleares. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 200 x.

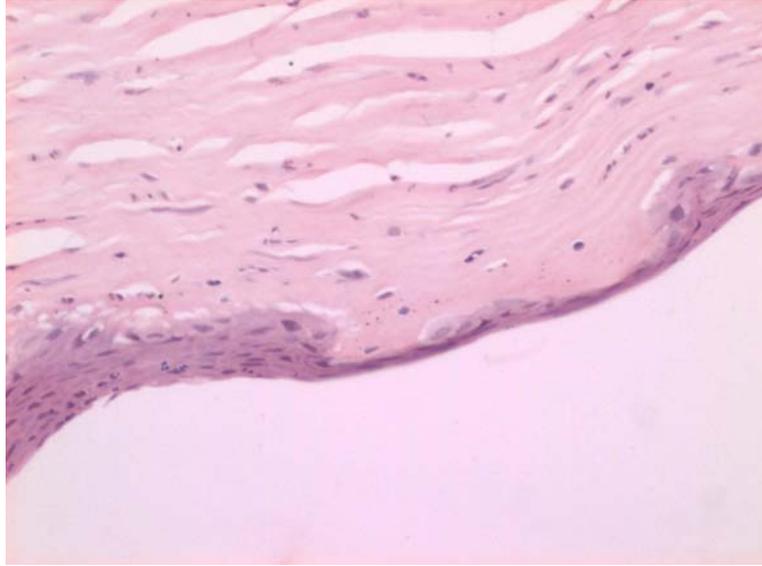


Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 7 dias de evolução pós-operatória, mostrando extensão do tecido implantado com a superfície externa epitelizada, além da proliferação fibroblástica no tecido implantado. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 200 x.

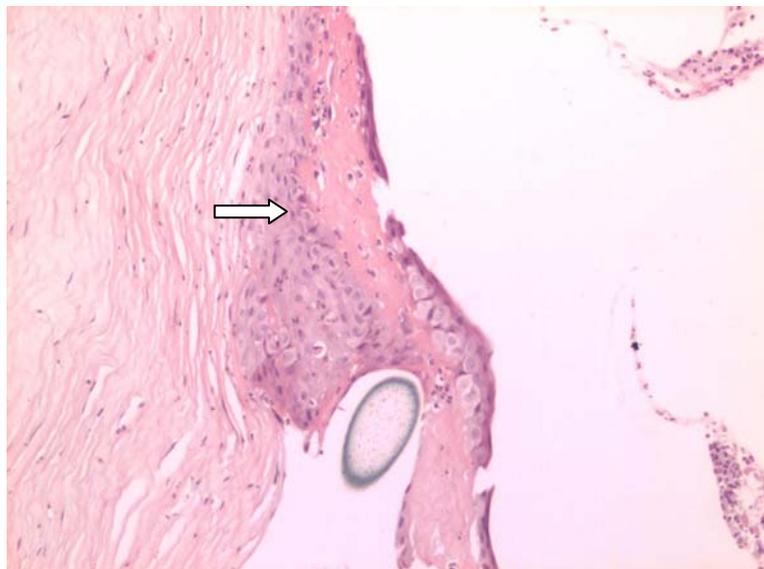


Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 7 dias de evolução pós-operatória, mostrando descolamento do tecido implantado, epitelição da superfície com epitélio pavimentoso pavimentoso estratificado e crescimento de epitélio entre o estroma e o implante (seta). Nota-se infiltrado inflamatório discreto com polimorfonucleares no tecido implantado. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 100 x.

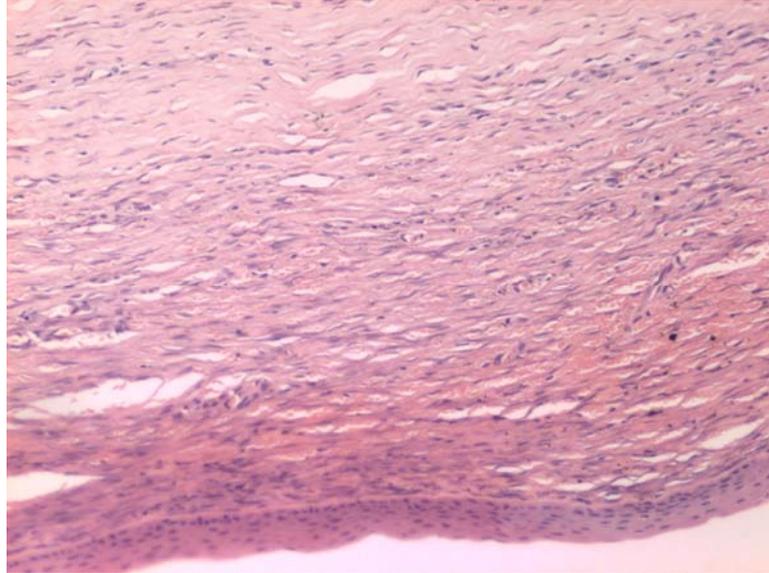


Figura 17 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 21 dias de evolução pós-operatória, mostrando a completa epiteliação do implante, a angiogênese é evidente neste período de observação, implante já incorporado ao estroma da córnea, sendo que os feixes de fibras colágenas apresentam-se mais densamente distribuídos nesta fase. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 100 x.

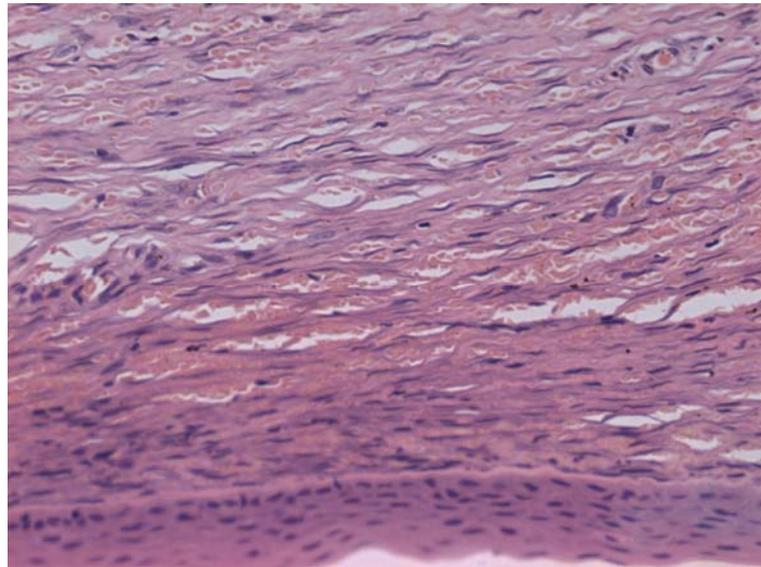


Figura 18 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior evidenciando alto grau de angiogênese e a celularidade aumentada do estroma na região no estroma da córnea, onde são observados fibroblastos e fibrócitos. Coloração hematoxilina eosina. Aumento: 200 x.

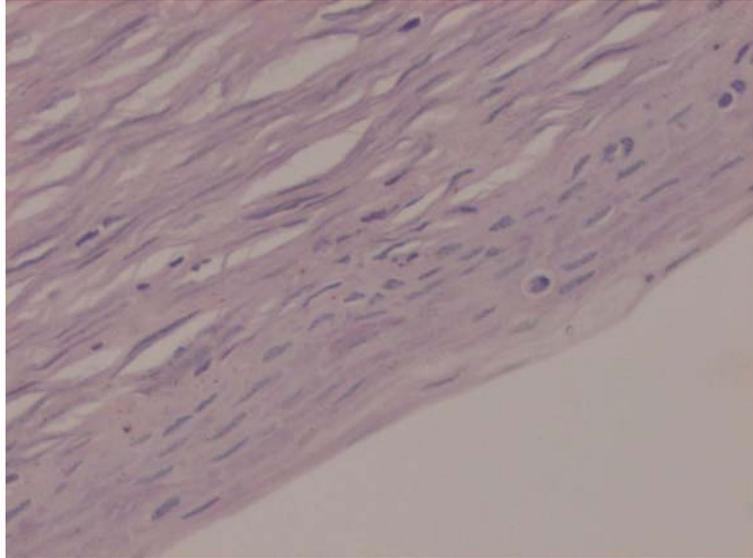


Figura 19 - Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior mostrando que ainda não foi possível evidenciar a membrana basal reconstituída aos 21 dias de pós-operatório. Coloração: PAS. Aumento: 400 x.

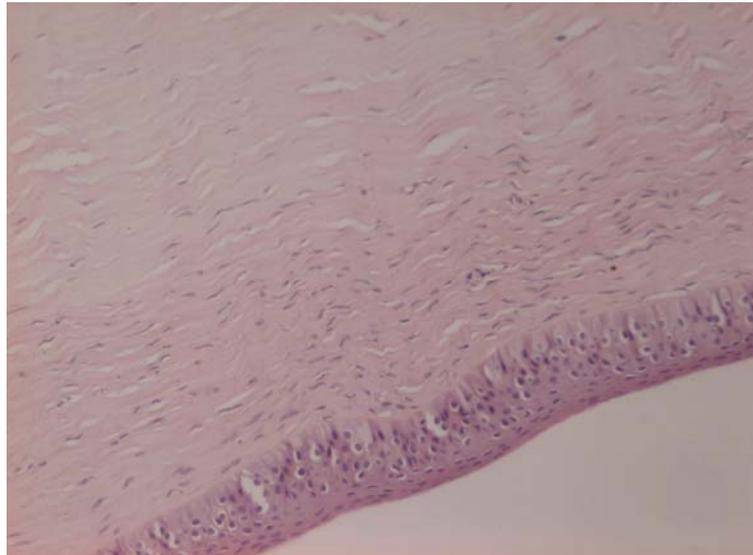


Figura 20 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 40 dias de evolução pós-operatória, mostrando tecido implantado incorporado, colagenizado e epitelizado. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 100 x.

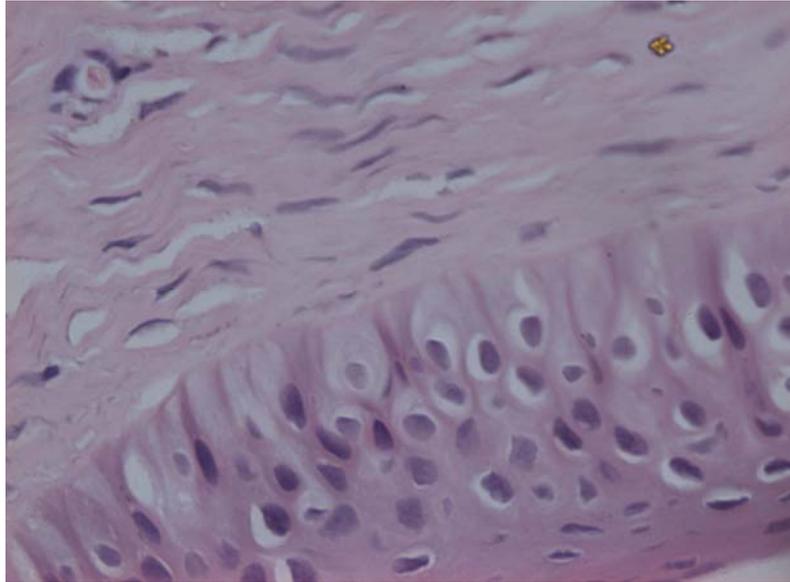


Figura 21 – Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior evidenciando epiteliação do tecido implantado, com arquitetura epitelial ainda não totalmente normalizada. Coloração: hematoxilina eosina. Aumento: 400 x.



Figura 22 – Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, com 40 dias de evolução pós-operatória evidenciando presença de membrana basal completamente reconstituída (seta). Coloração: PAS. Aumento: 400 x.

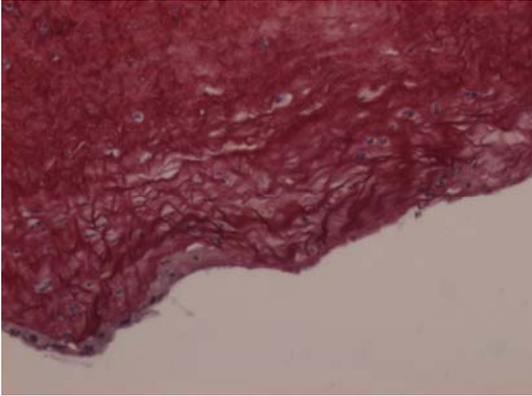


Figura 23 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de evolução pós-operatória, mostrando discreta diferença na distribuição das fibras colágenas na membrana amniótica implantada com relação ao estroma da córnea. Coloração: Picrossirius. Aumento: 200 x.

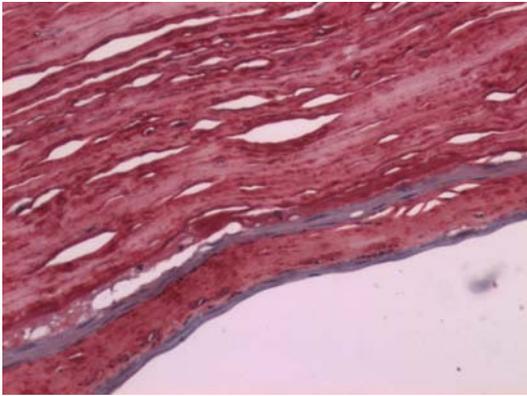


Figura 24 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de evolução pós-operatória, mostrando epitélio formado sob a membrana amniótica e o aspecto estroma da córnea e na membrana implantada. Coloração: Picrossirius. Aumento: 100 x.

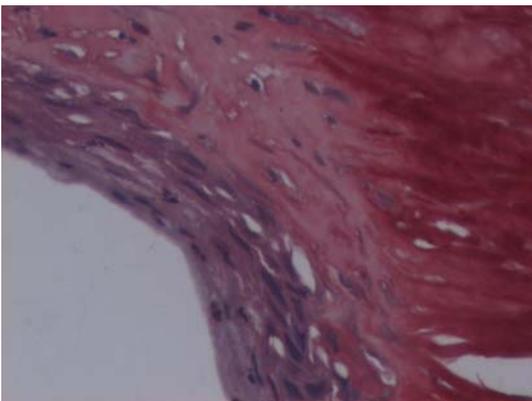


Figura 25 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de evolução pós-operatória, detalhe em maior aumento mostrando membrana amniótica incorporada ao estroma. Coloração: Picrossirius. Aumento: 400 x.

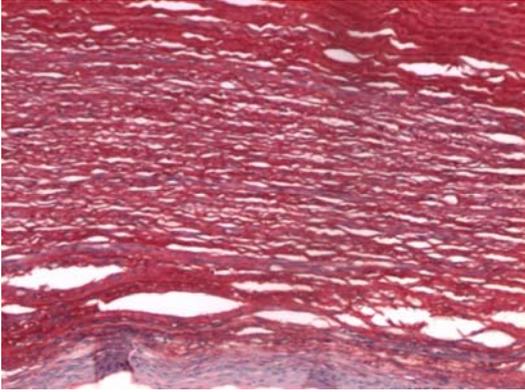


Figura 26 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de evolução pós-operatória, detalhe em maior aumento mostrando membrana amniótica integrada ao estroma, não sendo mais possível delimita-la. Coloração: Picrossirius. Aumento: 100 x.

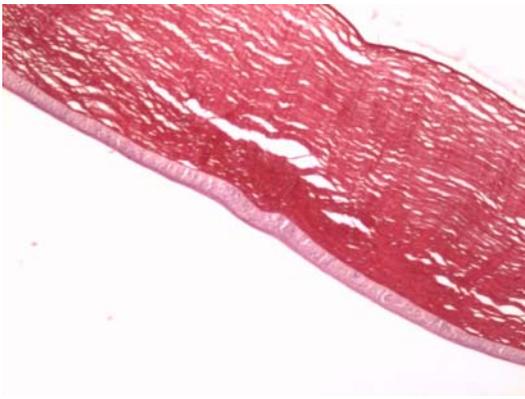


Figura 27 - Fotomicrografia de corte histológico de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de evolução pós-operatória, detalhe em maior aumento completa integração da membrana ao estroma, não sendo mais possível delimitara área de implante. Coloração: Picrossirius. Aumento: 100 x.

5.2.2 Imunomarcacão dos colágenos tipo I, III e V, na córnea.

A imunomarcacão nos permitiu avaliar a evoluçãõ da distribuicão dos tipos de colágeno na córnea durante a cicatrizaçãõ.

Na ausênciã de estudos anteriores similares, em todas as lâminas áreas distantes ao implante foram consideradas normais e usadas como padrãõ de normalidade para análise dos resultados.

Com relaçãõ ao colágeno tipo I, aos dois dias e aos sete dias de pós-operatõrio foi possível identificar na regiãõ mais superficial uma área mais intensamente marcada correspondente a membrana amniõtica implantada, no entanto no estroma padrãõ homogêneo de marcaçãõ, semelhante às amostras normais (Figuras 29 e 30).

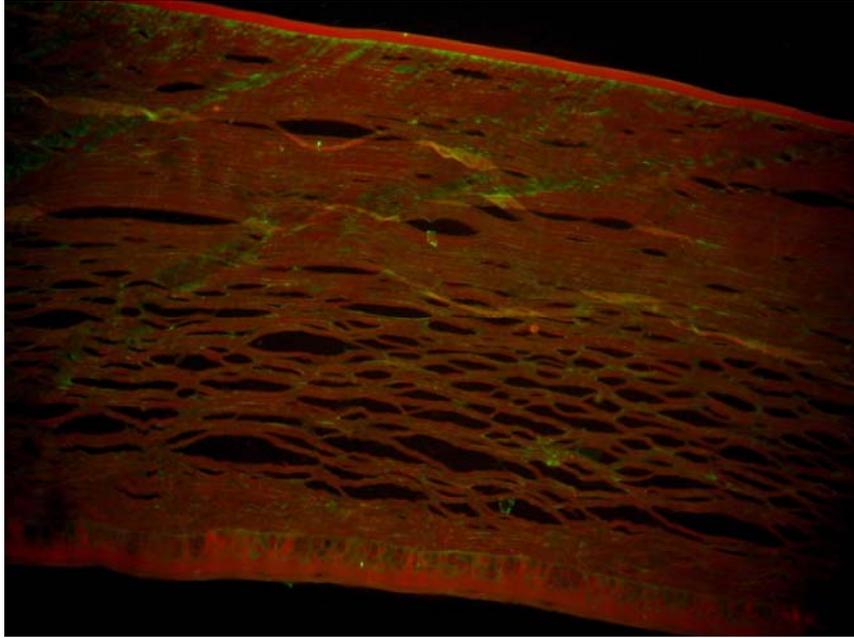
Aos 21 dias, houve um aumento importante da expressãõ das fibras colágenas do tipo I na área de estroma prõxima do epitélio, correspondente à regiãõ do implante (Figuras 31 e 32). Porém aos 40 dias, a distribuicão deste colágeno voltou ao padrãõ homogêneo observado nas amostras normais (Figura 33).

O colágeno tipo I apresentou distribuicão homogênea em todo estroma da córnea (Figuras 28).

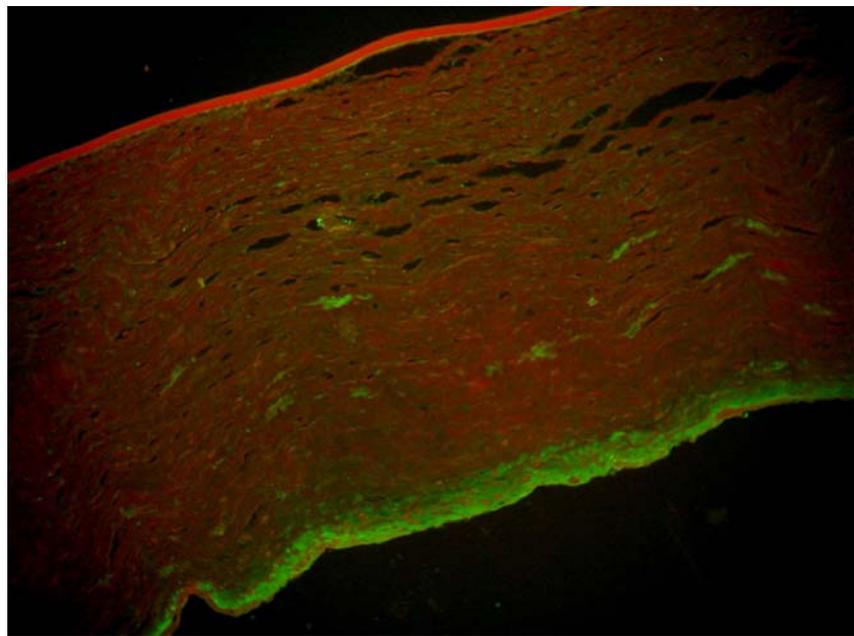
O colágeno tipo III mostrou uma tênue marcaçãõ nas lamelas colágenas do estroma da córnea. Nas amostras obtidas do grupo de dois dias, não foi possível observar a presençã da membrana na superfície da lesãõ. Mas pode-se notar um discreto aumento na marcaçãõ do colágeno tipo III na regiãõ mais superficial do

estroma exposto (Figura 34). No grupo de sete dias persiste este padrão de distribuição, porém foi possível identificar a membrana fortemente marcada (Figuras 35 e 36). Aos 21 dias, a distribuição do colágeno III estava restabelecida na região do implante (Figura 37). Aos 40 dias manteve-se o mesmo padrão descrito anteriormente para áreas não lesadas da córnea, com pouco colágeno tipo III distribuído entre lamelas estromais (Figura 38).

O colágeno tipo V está presente em todo estroma corneano de forma homogênea (Figura 39), estando também presente na membrana amniótica que se apresentou intensamente marcada e sua expressão mostrou-se levemente aumentada no estroma próximo ao implante aos 2 dias de pós-operatório (Figura 40). Nos animais dos grupos de 7 dias e 21 dias, permanece o discreto aumento na expressão destas fibras na área próxima ao implante (Figuras 41, 42 e 43). Aos 40 dias, porém, sua distribuição voltou aos padrões anteriores e observados em segmentos de córnea não lesada, mostrando remodelamento do colágeno na cicatriz (Figuras 44 e 45).



Figuras 28 - Amostras de córnea normal imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando distribuição do colágeno tipo I no estroma. Aumento: 100 x.



Figuras 29 – Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com distribuição homogênea no estroma da córnea e maior concentração na membrana amniótica. Aumento: 100 x.

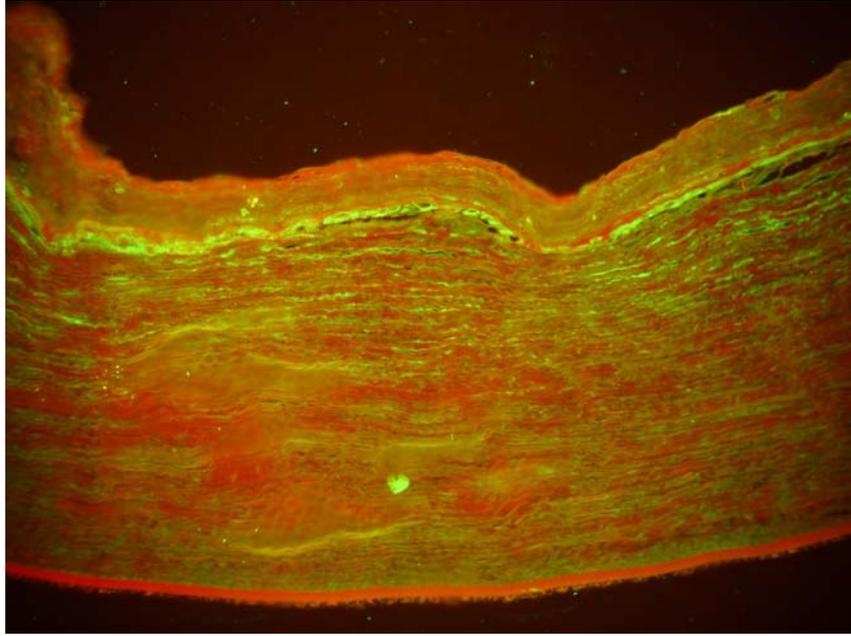
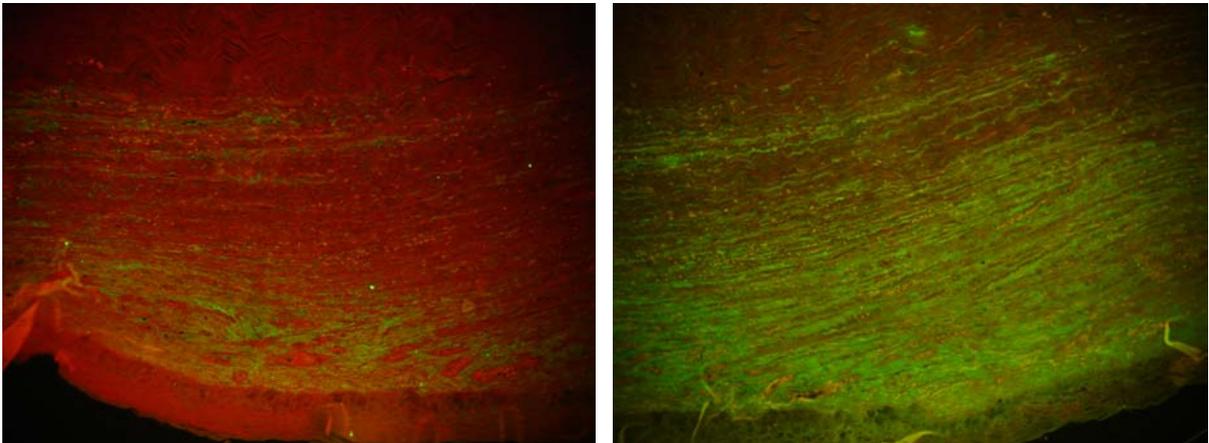


Figura 30 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com distribuição homogênea no estroma da córnea e na membrana amniótica. Aumento: 100 x.



Figuras 31 e 32 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com maior expressão na região do implante. Aumento: 100 x e 200 x.

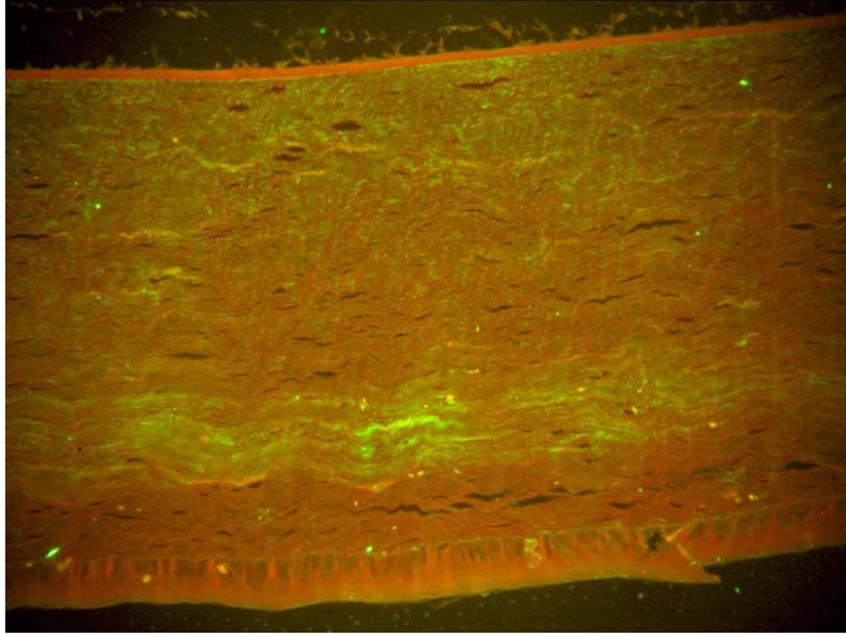


Figura 33 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo I por imunofluorescência (verde), mostrando colágeno tipo I com distribuição homogênea em todo estroma. Aumento: 100 x.

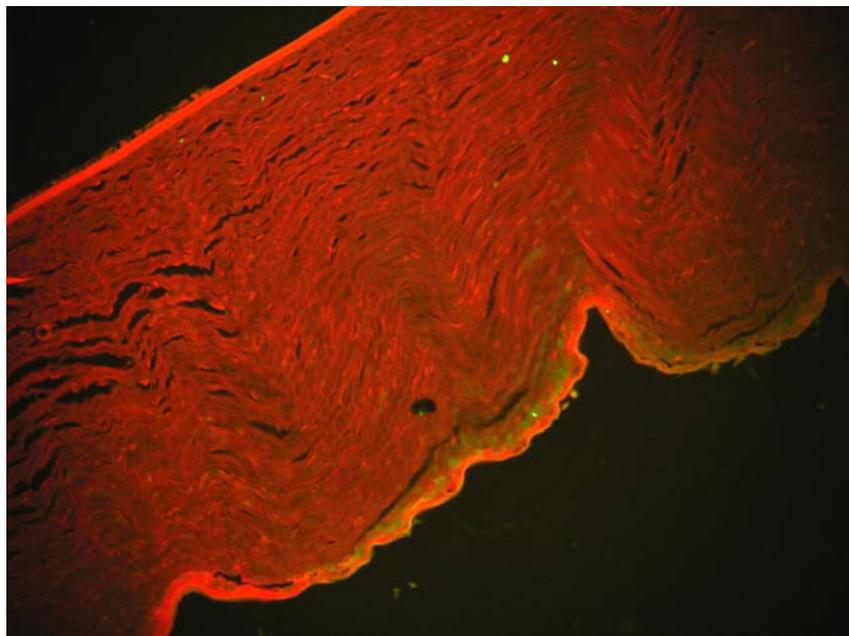
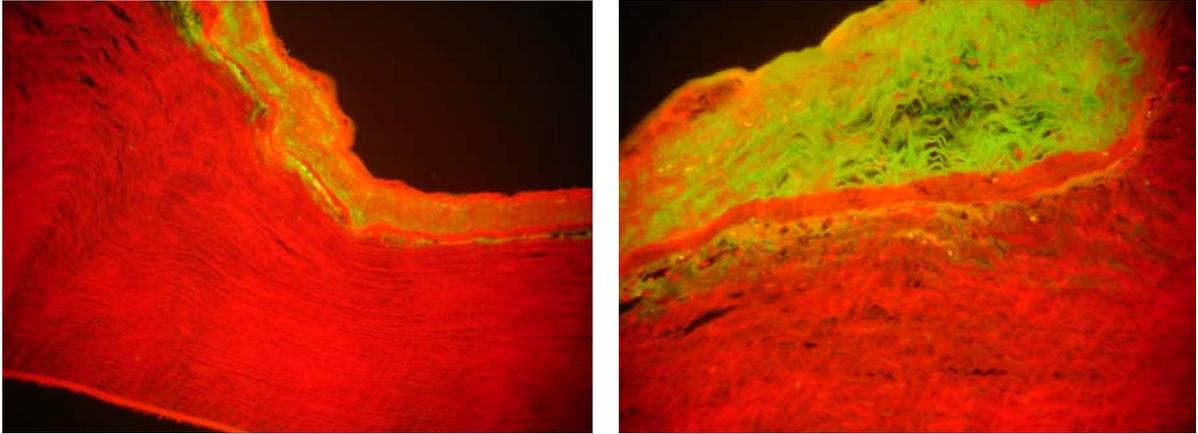
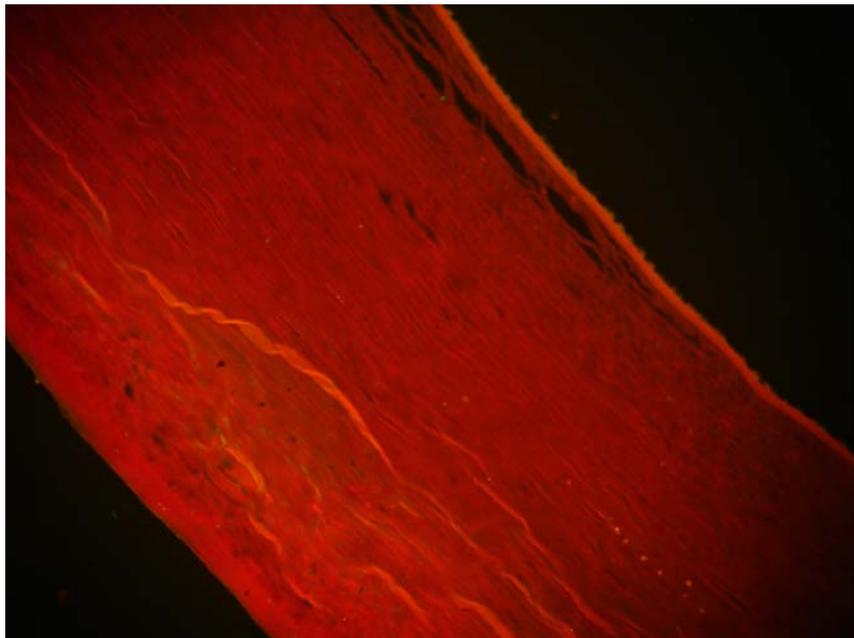


Figura 34 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua baixa concentração no estroma e discreto aumento da sua expressão na área receptora do implante. Aumento: 100x.



Figuras 35 e 36 – Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua baixa concentração no estroma, intensa marcação na membrana amniótica e discreto aumento da sua expressão na área receptora do implante. Aumento: 100x.



Figuras 37 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua tênue expressão no estroma. Aumento: 100x.

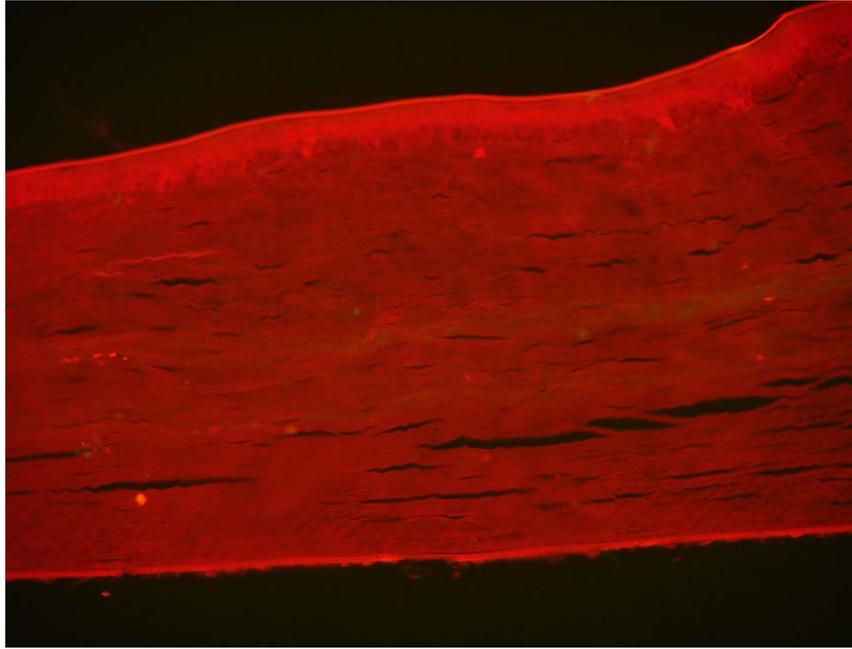


Figura 38 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo III por imunofluorescência (verde), mostrando sua tênue expressão no estroma. Aumento: 200x.

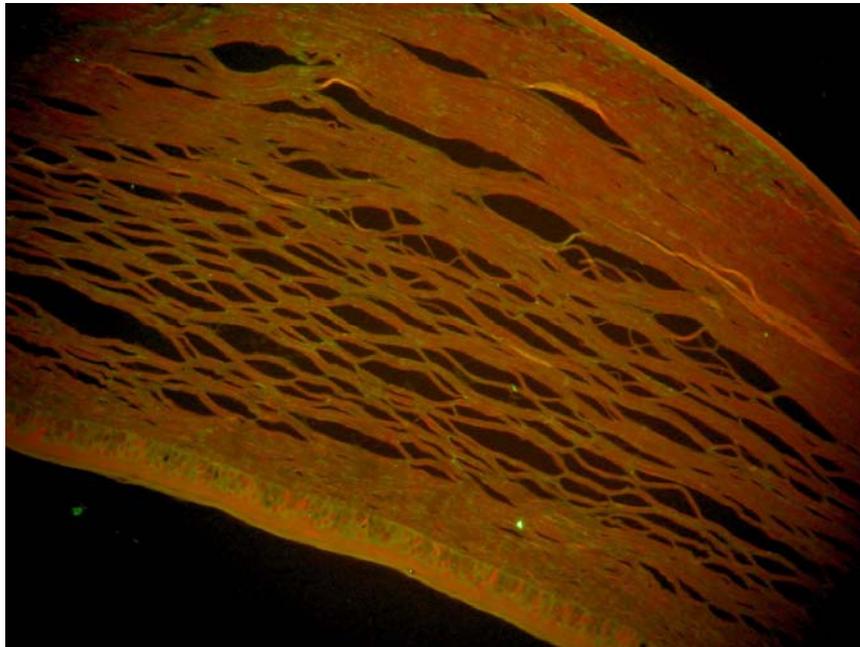


Figura 39 - Amostras de córnea normal imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando padrão de distribuição do colágeno tipo V no estroma. Aumentos: 100 x.

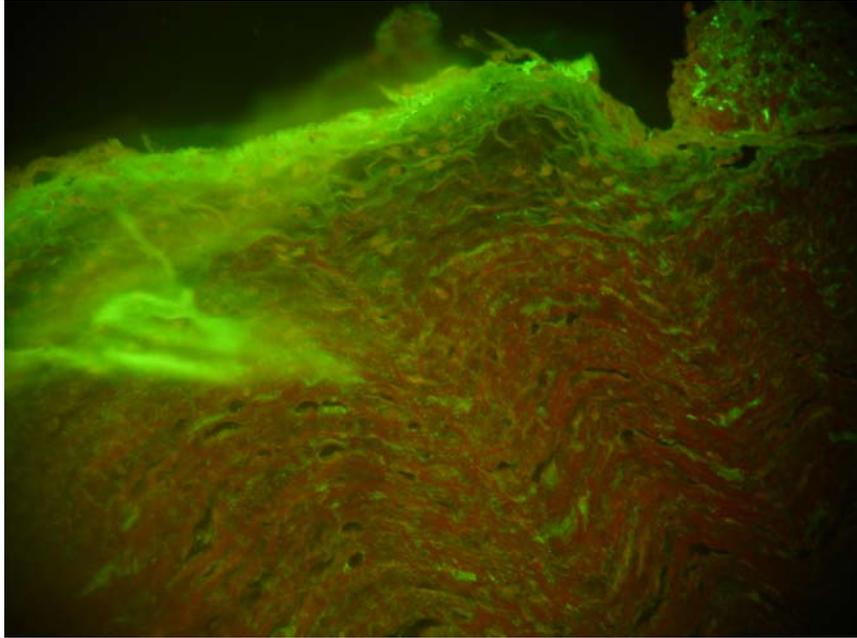
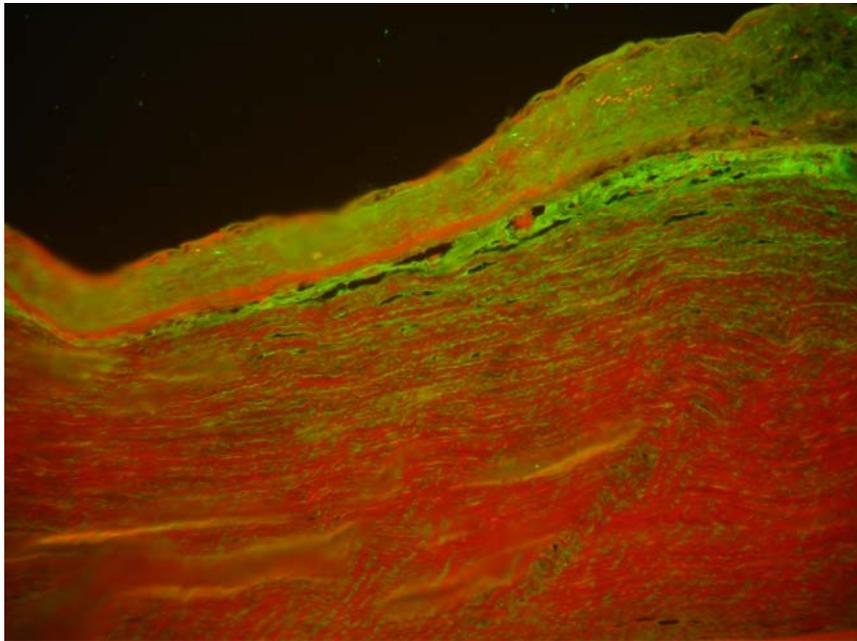
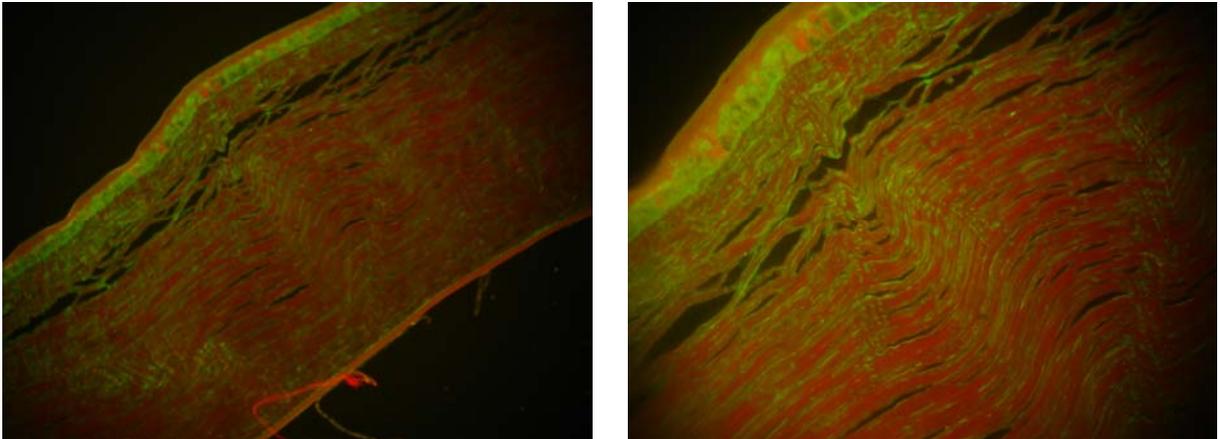


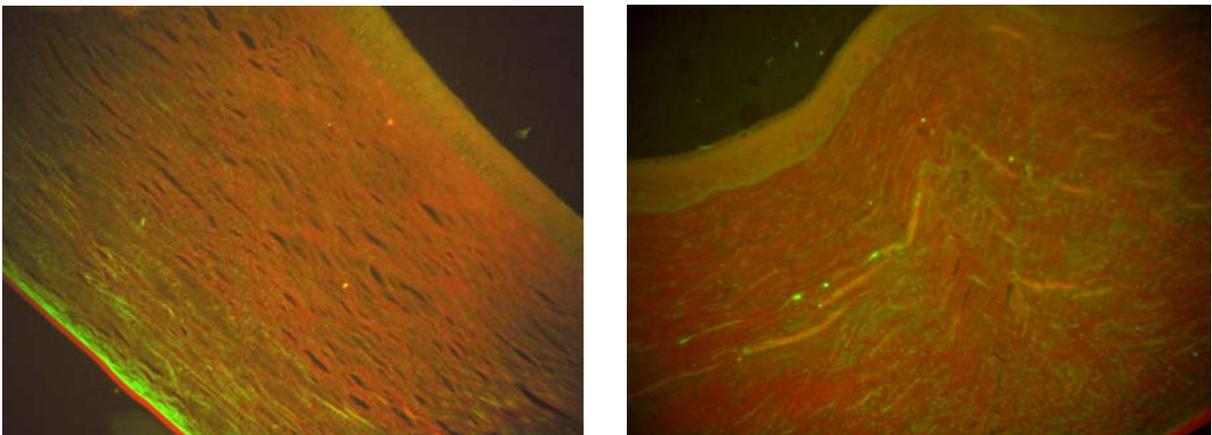
Figura 40 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos dois dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando a membrana fortemente marcada na superfície e a distribuição homogênea deste colágeno no estroma, com discreto aumento de sua expressão no estroma próximo ao implante. Aumento: 100 x.



Figuras 41 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos sete dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando a membrana fortemente marcada na superfície e a distribuição homogênea deste colágeno no estroma, com discreto aumento de sua expressão no estroma próximo ao implante. Aumento: 100 x.



Figuras 42 e 43 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 21 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando a distribuição homogênea deste colágeno no estroma, com discreto aumento de sua expressão no estroma próximo ao implante. Aumentos: 100 x e 200x.



Figuras 44 e 45 - Amostras de córnea com implante de membrana amniótica eqüina, aos 40 dias de pós-operatório, imunomarcadas com anticólageno tipo V por imunofluorescência (verde), mostrando distribuição homogênea deste colágeno no estroma. Aumento: 100 x.

5 DISCUSSÃO

As ceratites ulcerativas são as doenças oculares mais comuns em cães. Úlceras superficiais podem ser reparadas rapidamente, com mínima formação de cicatriz. Úlceras complicadas, no entanto, podem prejudicar a visão devido à formação de cicatrizes, ou por formação de sinéquias. Ceratites ulcerativas graves podem levar a comprometimento do olho por endoftalmite, glaucoma, ou phthisis bulbi (WHITLEY; GILGER, 1999).

Assim úlceras profundas, especialmente quando há descemetocelose, são emergências que necessitam de terapia específica (ANDRADE et al., 1999). Em Medicina Veterinária são várias as técnicas cirúrgicas descritas na literatura para este fim (BLOGG et al., 1989; BRIGHTMAN et al., 1989; GILGER; WHITLEY, 1999; KERN, 1990; MORALES, 1996; NASISSE, 1985; PEIFFER, 1997; SCAGLIOTTI, 1988; SLATTER, 2001; WHITLEY, 1991), e os implantes de membranas biológicas tem sido estudados como meios de reparação (ANDRADE et al., 1999; BARROS et al., 1995; BARROS et al., 1997; GARCIA et al., 1996; LAUS, 1994; LAUS et al., 1999; LEWIN, 1999; TEIXEIRA, 2000). Dentre elas, a membrana amniótica (MA) tem se consolidado como útil no tratamento das afecções da superfície ocular. Os estudos sobre o assunto foram retomados por Kim e Tseng em 1995, com resultados promissores de forma que vários pesquisadores passaram a estudar este tema. Em Medicina Veterinária foi utilizada pela primeira vez, na reconstrução da superfície ocular por Barros et al. (1998), que aplicaram a membrana xenóloga (equina) em ceratectomias penetrantes em cães e consideraram este material como viável para este uso. Diante disto, Godoy, Guerra e Barros (2002) avaliaram a

viabilidade da membrana fetal eqüina para ceratoplastia lamelar em cães, visando à reconstrução da superfície da córnea, e obtiveram bons resultados, com resposta inflamatória menor do que a descrita em implantes de outras membranas biológicas (ANDRADE et al., 1999; GARCIA et al., 1996; TEIXEIRA, 2000), a vascularização regrediu mais precocemente, assim como a invasão por células inflamatórias.

A membrana fetal é formada por córion, alantóide, e amnion. A membrana amniótica é a parte mais interna em contato com o feto (BARROS, et al. 2005), atua no processo de epitelização, por facilitar a adesão e migração das células epiteliais basais, prevenir a apoptose e restaurar o fenótipo epitelial (TSENG PRABHASAWAT, LEE, 1997; DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; FUKUDA et al., 1999; GOMES et al., 1999; PIRES et al., 1999; MEJÍA et al., 2000; MELLER et al., 2000; KOIZUMI et al., 2000c; HEINZ et al., 2004), tem ação antiinflamatória e antiangiogênica, além de ação antimicrobiana (DUA et al., 2004; GOMES et al., 1999; MEJÍA et al., 2000; HICK et al., 2005; SOLOMON et al. 2001; YANXIA HAO, et al., 2000; ZHOU SHIYOU, CHEN JIAQI, FENG JINFA, 2003). A MA humana também é considerada imunologicamente privilegiada, (GOMES et al., 1999 KUBO et al., 2001; SHIMAZAKI et al., 1997) e reduz a formação de cicatriz (TSENG et al., 1998). A MA pode promover a proliferação e a diferenciação de células germinativas do limbo e da conjuntiva (MELLER et al., 2000a).

Os bons resultados encontrados por Godoy, Guerra e Barros (2002) com a aplicação da membrana fetal eqüina em ceratectomia lamelares, e por Barros et al. (1998) com membrana amniótica eqüina em ceratectomias penetrantes, nos levaram a estudar a viabilidade da aplicação da membrana amniótica eqüina em ceratoplastias lamelares em cães, visando a reconstrução da córnea em ceratites

ulcerativas complicadas nesta espécie, já que não foram observados nos estudos anteriores sinais de rejeição ao implante xenógeno, e a membrana amniótica eqüina é um material de fácil obtenção, fácil manipulação e não requer métodos especiais de preservação (BARROS et al., 1998). Para este fim, avaliamos a evolução clínica oftalmológica e a morfologia da córnea, durante a cicatrização, com o implante xenógeno.

Doze cães foram utilizados no experimento, divididos em quatro grupos de três com diferentes tempos de observação (2, 7, 21, e 40 dias). A formação dos grupos foi baseada nas publicações anteriores de estudos com implantes de membranas biológicas na córnea (ANDRADE et al., 1999; BARROS et al., 1997; BARROS et al., 1998; GARCIA et al., 1996; GODOY et al., 2002; TEIXERA, 2000; SOUZA, 2003). A grande maioria dos autores manteve os animais em observação por até 60 dias, neste estudo o maior tempo de observação usado foi de 40 dias, já que em seu experimento com aplicação de membrana fetal eqüina, Godoy, Guerra e Barros (2002) observaram regressão mais rápida dos neovasos, além da epitelização completa e ausência de células inflamatórias aos 60 dias. Assim, o tempo de 40 dias foi considerado suficiente para observação de todo processo de cicatrização da córnea na presença do implante de membrana amniótica xenógena.

Os animais selecionados receberam os cuidados básicos de saúde e higiene, e depois de 15 a 20 dias foram submetidos ao procedimento cirúrgico, em somente um dos olhos, seguindo as normas para experimentação oftalmológica da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

A membrana foi obtida em parto de égua clinicamente sadia, foi lavada em solução fisiológica (GODOY; GUERRA; BARROS, 2002), e então imersa em

glicerina 98%, para conservação em temperatura ambiente (BARROS et al., 1998; BARROS et al., 2005; GODOY; GUERRA; BARROS, 2002; SAFATLE, 1998; SOUZA, 2003). A sua face epitelial identificada pela colocação de um ponto de fio de nylon antes de separá-la do feto recém nascido. A glicerina tem ação antimicrobiana lenta (MARAL et al., 1999) e, portanto, a membrana só foi utilizada após um período mínimo de 30 dias de conservação (BARROS et al., 1995).

Na literatura são descritos vários outros métodos de conservação da membrana, tais como a refrigeração, o congelamento e liofilização (ADDS; HUNT; DART, 2001), a glicerina 98% foi o método de escolha por ser simples e barato (MARAL et al., 1999), permitindo preservação da membrana amniótica por tempo ilimitado (BARROS et al., 1995).

Como protocolo anestésico padronizou-se o uso de acepromazina e meperidina como pré-anestésicos, na indução foi aplicado propofol e para manutenção foi usado isoflurano associado ao bloqueador neuromuscular rocurônio, protocolo descrito por Bechara (2002).

A técnica de ceratectomia lamelar com trépano de cinco milímetros é descrita por Andrade et al. (1999), Barros et al. (1998), Godoy (2005); Godoy, Guerra e Barros (2002), Morales et al. (1996), Souza (2003) e Teixeira (2000). O trépano de Castroviejo foi utilizado para padronizar a profundidade das lesões produzidas, em aproximadamente 0,3 mm. Após a aplicação do trépano, o tecido foi dissecado e retirado com lâmina de bisturi número 15 (GODOY, 2005).

O segmento de MA foi recortado com trépano de seis mm (GODOY, 2005; GODOY, GUERRA, BARROS, 2002), hidratado em solução fisiológica e em seguida

posicionado sobre o defeito da córnea, com a face mesenquimal em contato com o estroma (AZUARA-BLANCO et al., 1999; GODOY, 2005; SOUZA, 2003), em forma de retalho. Quando aplicada desta maneira, a membrana amniótica é incorporada ao tecido receptor, funcionando como substrato para a proliferação das células epiteliais (AZUARA-BLANCO et al., 1999; DUA et al., 2004; STOIBER et al., 2002). A sutura do implante foi realizada em pontos simples separados não penetrantes, conforme descrito por Andrade et al. (1999); Barros et al. (1997), Garcia et al. (1996), Godoy, Guerra e Barros (2002), Souza (2003) e Teixeira (2000). O fio mononáilon 8.0 foi escolhido para fixação dos implantes à córnea, por seu baixo custo e fácil manipulação, e por ter sido usado anteriormente com sucesso para este fim, por Godoy, Guerra e Barros (2002), Souza (2003) e Teixeira (2000). Foram colocados inicialmente quatro pontos cardeias para garantir o perfeito posicionamento do implante, e depois os pontos foram distribuídos com distanciamento de aproximadamente dois milímetros (TEIXEIRA, 2000). Souza (2003) observou formação de granulomas de fio nos pontos que não caíram durante o tempo de observação, Godoy, Guerra e Barros (2002) também relataram presença de neovasos ainda aos 60 dias de pós-operatório relacionados à presença dos pontos. Diante disto para evitar a ocorrência de resposta inflamatória pela presença dos fios, prejudicando a interpretação dos resultados, optou-se por retirar as suturas após a completa epitelização e integração do implante, confirmadas pelo teste de fluoresceína. Os pontos foram retirados entre os dias 09 e 15 de pós-operatório.

Durante o período pós-operatório a higienização do olho, para retirada de secreções foi realizada duas vezes ao dia, com solução fisiológica, e em seguida foi aplicado colírio antibiótico de amplo espectro, com objetivo de evitar a contaminação secundária, que pode ter origem na própria flora do saco conjuntival (ANDRADE,

2003; BARROS, 1997; GARCIA, 1996; GODOY, 2005; NASISSE, 1985; SOUZA, 2003). Tratamento mantido nos primeiros sete dias de pós-operatório.

Para avaliação pós-operatória, os cães foram submetidos, em dias alternados (SOUZA, 2003; TEIXEIRA, 2000), ao exame clínico do olho, quando foram considerados: a presença de blefaroespasma, fotofobia, secreção ocular, congestão conjuntival e quemose, vascularização e edema de córnea. Parâmetros utilizados por Andrade (2003), Andrade et al. (1999), Godoy (2005), Souza (2003) e Teixeira et al. (2000), para avaliação da evolução da cicatrização da córnea. Assim como Andrade (2003), optou-se pela realização do teste de fluoresceína em todas as avaliações clínicas a fim de evidenciar a progressão da epitelização do implante.

Os parâmetros foram classificados de forma subjetiva em: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (acentuado), método também usado anteriormente em modelos experimentais de ceratoplastia em cães e coelhos (ANDRADE, 2003; ANDRADE et al., 1999; GODOY, 2005; SOUZA, 2003; TEIXEIRA et al., 2000).

O fenômeno blefaroespasma esteve presente em grau moderado, na maioria dos cães, nos quatro primeiros dias de pós-operatório, e sofreu redução gradativa após este período, desaparecendo de forma completa com a retirada dos pontos. O mesmo fenômeno foi observado por Souza (2003) com evolução semelhante e desaparecimento por volta dos 15 dias, Andrade et al. (1999) e Teixeira (2000) observaram presença de blefaroespasma moderado por 7 dias e Galera (2000) por 15 dias, tempos mais prolongados do que o ocorrido neste experimento, provavelmente devido características inerentes aos tecidos implantados (cápsula renal e pericárdio eqüinos, e túnica vaginal autógena, respectivamente). A fotofobia foi observada somente nos primeiros quatro dias de pós-operatório, na grande

maioria dos animais. Ambos os fenômenos foram observados em graus variados e com diferentes evoluções em ceratoplastias lamelares ou penetrantes com diversos implantes avaliados em trabalhos anteriores (ANDRADE, 2003; ANDRADE et al., 1999; BARROS et al., 1998; GARCIA et al., 1996; GODOY, GUERRA, BARROS, 2002; MORALES et al., 1996; SOUZA, 2003; TEIXEIRA, 2000).

O blefaroespasmto inicial provavelmente caracterizou manifestação de dor pela própria intervenção cirúrgica, exposição de terminações nervosas da córnea (MARTIN, 2005), pelo estímulo do n. palpebral ocasionado pela presença dos pontos de sutura (SLATTER, 2001) e uveíte reflexa (KERN, 1990).

A secreção mucosa predominou em todos os períodos de avaliação, houve redução progressiva na quantidade produzida durante o pós-operatório, que se acentuou até desaparecer por completo, após a retirada dos pontos. Esta secreção se deve ao estímulo às células caliciformes da conjuntiva (GODOY; GUERRA; BARROS, 2002). O componente purulento apareceu em apenas um dos animais e resolveu-se rapidamente provavelmente por ação do antibiótico ou ainda pela atividade antimicrobiana e antiinflamatória da membrana amniótica (GOMES et al., 1999; MEJÍA et al., 2000; SOUZA, 2003). Outros experimentos anteriores, que utilizaram modelo de ceratoplastia lamelar ou penetrante, relataram predomínio da secreção mucosa (ANDRADE et al., 1999; GALERA et al., 2000; GARCIA et al., 1996; GODOY, 2005; SOUZA, 2003; SOUZA et al., 1997; TEIXEIRA, 2000).

A secreção serosanguinolenta ocorreu em um dos animais, na primeira avaliação, e acredita-se que relacionada ao autotraumatismo. Esta alteração não é relatada por outros autores que usaram cão como modelo experimental, em ceratoplastias lamelares (ANDRADE et al., 1999; BARROS et al., 1998; GALERA et

al., 2000; GARCIA et al., 1996; GODOY; GUERRA; BARROS, 2002; MORALES et al., 1996; SOUZA, 2003; TEIXEIRA, 2000)

A hiperemia conjuntival e a quemose estiveram presentes em todos os animais. A quemose foi observada apenas nos primeiros dois a quatro dias, indicando a resposta inflamatória aguda após a intervenção cirúrgica (SLATTER, 2001). A hiperemia conjuntival, mais intensa nos primeiros dias, manteve-se presente por tempo mais prolongado, desaparecendo somente após a retirada dos pontos, cuja presença estimula constantemente a resposta inflamatória local.

Hiperemia e quemose foram também observadas por Andrade (2003), Barros et al. (1997), Barros et al. (1998), Garcia et al. (1996), Godoy, Guerra e Barros (2002), Souza (2003) e Teixeira (2000). Godoy (2005) que utilizou modelo experimental de ceratoplastia em coelhos, para avaliar a resposta desta espécie à membrana xenógena, não relatou ocorrência de quemose, mas apenas de hiperemia conjuntival.

O edema de córnea não foi uma observação constante, manifestou-se em sete animais em diferentes fases da cicatrização, e esteve restrito à periferia do implante. Barros et al. (1997), Barros et al. (1998), Godoy, Guerra e Barros (2002) e Souza (2003), usaram modelo de ceratoplastia lamelar ou penetrante para diferentes implantes biológicos e descreveram ocorrência de edema de córnea na região periférica ao implante com evolução semelhante à observada neste experimento. O edema de córnea resulta do excesso de fluido no estroma, o que ocorre quando as funções do epitélio ou endotélio são alteradas, e o deve regredir quando estas funções são restabelecidas e a causa removida (SLATTER, 2001; WHITLEY & GILGER, 1999). Nas ceratectomias lamelares a lesão epitelial permite a penetração

de água no estroma, levando ao edema periférico, que tende a resolução com a epitelização do defeito. (GODOY; GUERRA; BARROS, 2002).

A evolução da epitelização foi avaliada por meio do teste de fluoresceína, realizado a cada exame clínico. Em todos os animais observou-se impregnação do implante por fluoresceína, já que esta tem afinidade pelo corante (ANDRADE, 2003). A membrana amniótica foi suturada sobre o defeito com a face mesenquimal voltada para estroma, esta forma de aplicação leva a epitelização sobre a membrana e incorporação do implante ao tecido receptor (AZUARA-BLANCO et al., 1999; DUA et al., 2004). Assim, a impregnação por fluoresceína permitiu a avaliação da epitelização sobre o implante, e a determinação do tempo necessário para sua finalização, que foi variável entre os animais, mas na maioria dos casos a impregnação por fluoresceína não mais ocorreu por volta do décimo dia de pós-operatório.

Com a aplicação da membrana amniótica equina conservada em glicerina para reparação de lesões penetrantes em córnea de cão, Barros et al. (1998) observaram teste de fluoresceína negativo somente aos 30 dias de pós-operatório. Já Garcia et al. (1996) refere teste de fluoresceína negativo na região do implante aos sete dias de pós-operatório, em ceratoplastias lamelares com implante de peritônio homólogo.

À análise histológica observou-se epitelização do implante aos sete dias de pós-operatório, levando a aparente divergência entre os dados clínicos e microscópicos. Isso provavelmente ocorreu porque no sétimo dia apenas áreas restritas do implante apresentavam impregnação por fluoresceína, assim provavelmente os cortes histológicos analisados não envolveram essas pequenas

áreas ainda não epitelizadas. Godoy, Guerra e Barros (2002) avaliaram a epitelização dos implantes somente pela microscopia e observaram-na completa aos sete dias de pós-operatório. Para Souza 2003, o tempo necessário para completa repitelização esteve entre sete e 15 dias, enquanto Godoy (2005) observou este fenômeno aos 15 dias de pós-operatório. Portanto os resultados encontrados no presente estudo são compatíveis com aqueles encontrados em experimentos anteriores, com relação ao tempo de repitelização do implante.

A neovascularização é a formação de vasos em estruturas inicialmente avasculares, e na córnea pode ocorrer por distúrbios inflamatórios, infecciosos, degenerativos ou traumáticos da córnea (JIN-HONG CHANG et al., 2001). Fatores angiogênicos são liberados pelas células inflamatórias e pelas próprias células do local na córnea (FORRESTER et al., 2002). A neovascularização foi observada em todos os estudos que utilizaram membranas biológicas na córnea (ANDRADE et al., 1999; BARROS et al., 1998; GALERA et al., 2000; GARCIA et al., 1996; GODOY; GUERRA; BARROS, 2002; MORALES et al., 1996; SOUZA, 2003; TEXEIRA, 2000). No presente estudo os primeiros vasos foram observados entre os dias seis e dez de pós-operatório. O processo de involução dos neovasos iniciou-se aos 20 dias de pós-operatório, e aos 40 dias estes já não foram observados. Evolução similar foi observada por Godoy, Guerra e Barros (2002), com início da neovascularização aos 7 dias, maior intensidade entre 17 e 18 dias quando se iniciou a regressão. Souza (2003) observou início mais precoce deste fenômeno, mas a curva de progressão foi semelhante à do estudo anterior, e àquela encontrada neste experimento. Na presença de uma lesão corneana neutrófilos, carregados para o local pelo filme lacrimal, e as células epiteliais produzem fatores de crescimento que estimulam a neovascularização, como parte da resposta inflamatória da córnea. Esses vasos

formam-se a partir do limbo e surgem entre o terceiro e quarto dias após a lesão (FORRESTER et al., 2002; PEIFFER et al., 1999). Safatle (1998) utilizou implantes de pericárdio e membrana amniótica eqüinos para análise da neovascularização da córnea em ratos, e os primeiros vasos corneanos apareceram aos 3 dias de pós-operatório, progredindo até os 15 dias quando a vascularização atingiu sua maior intensidade. Observação semelhante à descrita por Freddo em 2003, com implante de membrana amniótica xenógena em ratos.

A análise morfológica à microscopia óptica aos dois dias de pós-operatório mostrou formação de epitélio em plano simples, principalmente nas regiões de bordos das lesões. Aos 7 dias o epitélio já se apresentava estratificado e pavimentoso, assemelhando-se a estrutura normal (WILKIE; WHITTAKER, 1997).

Lesões epiteliais da córnea cicatrizam por reepitelização, processo que envolve migração celular, mitose e diferenciação (SWANK; HOSGOOD, 1996). Nas primeiras 4 a 6 horas após a lesão ocorre uma fase de latência em que as células reduzem as suas interconexões e começam a se separar. Em seguida as células epiteliais da periferia da lesão se achatam e se espalham em direção à área lesada, essas células aumentam seu conteúdo de água para ganhar volume (DUA; GOMES; SINGH, 1994). Esta é a fase de cicatrização linear, na qual encontramos as ceratoplastias do grupo de 2 dias.

A proliferação celular inicia-se durante a cicatrização linear e se intensifica na fase proliferativa, na qual uma onda de mitoses ocorre na periferia da lesão, as células migram de forma centrípeta, para cobrir o defeito e restabelecer a espessura epitelial. As células basais são as principais responsáveis por este mecanismo de reposição celular, e por sua vez são repostas pelas células germinativas do limbo

(DUA; GOMES; SINGH, 1994). Aos sete dias de pós-operatório houve maior proliferação celular, levando a formação do epitélio pavimentoso estratificado. Godoy (2005), Godoy, Guerra e Barros (2002), Souza (2003) encontraram evolução semelhante com relação à epitelização do implante, embora Souza (2003) tenha obtido cicatrização mais precoce no grupo que recebeu membrana amniótica em comparação com o grupo que recebeu implante de membrana alantoamniótica.

Aos 21 dias a epitelização do implante estava completa, a região de reparação apresentou maior número de camadas celulares sem, contudo restabelecer sua arquitetura normal. Godoy (2005) e Gris et al. (2002) também encontraram hiperplasia epitelial pós-implante de MA, sendo que no segundo estudo, com tempo de pós-operatório mais longo (sete meses).

A formação de células epiteliais entre o estroma da córnea e a membrana amniótica que ocorreu em um dos animais neste experimento, foi relatada anteriormente por Godoy (2005), Souza (2003) e Teixeira (2000), este fenômeno parece estar associado ao infiltrado de células epiteliais, sob a membrana no momento da sutura.

Aos dois dias a celularidade no tecido implantado ainda é baixa, mas já são identificados fibroblastos e polimorfonucleares. Aos sete dias ainda foi possível identificar o tecido implantado, mas há proliferação fibroblástica no seu interior e discreto infiltrado inflamatório, ainda representado pelos polimorfonucleares. Aos 21 dias o tecido implantado encontrava-se incorporado ao tecido da córnea, com alta celularidade, presença de fibrócitos e fibroblastos. No entanto as fibras colágenas apresentaram-se mais densamente dispostas no estroma na área do implante. Nesta fase já não foram identificadas células inflamatórias. Com 40 dias de evolução a

integração do implante ao estroma foi total, com maior densidade das fibras colágenas nesta região, mas o infiltrado celular por fibrócitos e fibroblastos estava reduzido. Ao PAS nesta fase a lamina basal estava completamente reconstituída. Segundo Swank e Hosgood (1996) a regeneração da membrana basal pode levar semanas ou meses, e até então a adesão do epitélio ao estroma está prejudicada.

Brown et al. (1995) demonstraram com a inserção de um disco poroso no estroma da córnea, que os ceratócitos estromais invadem o implante e passam a produzir colágeno e glicosaminoglicanas, levando a incorporação do implante, como observado no presente estudo. No experimento de Souza (2003) a proliferação de fibroblastos iniciou-se aos 15 dias e perdurou até o final da avaliação. Godoy, Guerra e Barros (2002), avaliando implante de membrana fetal equina já observaram intensa proliferação celular aos sete dias e 60 dias a celularidade no implante já foi considerada baixa. Barros et al. (1998) utilizando membrana amniótica equina em lesões penetrantes relataram presença de fibroblastos persistente até os 60 dias de pós-operatório, diferindo dos resultados encontrados por nós aos 40 dias. Invasão do implante por fibroblastos também foi descrita por Gris et al. (2002), em córneas com três e sete meses pós-implante de MA. A presença dos fibroblastos, formando novas fibras colágenas em permeio às fibras do implante (BROWN et al., 1995) resultou em maior densidade de fibras colágenas na região da cicatriz observada aos 21 e aos 40 dias de pós-operatório.

Na presença de uma lesão epitelial na córnea, inicialmente os polimorfonucleares atingem a região por meio do filme lacrimal, e tem origem na conjuntiva e vasos límbicos. Estas células produzem citocinas que estimulam a migração de fibroblastos e a angiogênese (PEIFFER et al., 1999). Aos dois dias de

pós-operatório os polimorfonucleares presentes apenas nos bordos das lesões, na região dos pontos de sutura e em pequena quantidade. Aos sete dias o infiltrado inflamatório foi maior, mas ainda considerado discreto. E nos tempos de observação seguintes, 21 e 40 dias, estas células já não foram encontradas na região receptora do implante.

A ausência de infiltrado inflamatório foi descrita por Godoy, Guerra e Barros (2002) e por Barros et al. (1995) aos 15 dias. As observações de Souza (2003) foram ligeiramente diversas com relação a este aspecto, pois relata maior infiltrado inflamatório aos dois, com redução da quantidade de células já aos sete dias, além do achado de células mononucleares a partir desta fase. Godoy (2005) comparou a resposta da córnea de coelhos a membrana amniótica alógena e xenógena, e no segundo grupo a resposta foi mais intensa e prolongada.

Teixeira (2000) aplicou pericárdio xenógeno em ceratoplastias lamelares e a resposta inflamatória foi mais intensa em todos os tempos quando comparada aos estudos que utilizaram membrana amniótica, sendo representada por polimorfonucleares e mononucleares e nas fases mais tardias houve predomínio dos mononucleares. A justificativa para estas diferenças está nas características inerentes à membrana amniótica, na sua presença a inflamação da superfície ocular é significativamente menor, e a MA reduz a invasão por polimorfonucleares e também acelera a apoptose dessas células (ZHOU SHIYOU, CHEN JIAQI, FENG JINFA, 2003). A membrana amniótica reduz a expressão de citocinas pró-inflamação, contém inibidores das proteinases, proteínas antiinflamatórias (HICK et al., 2005), e é um tecido imunoprivilegiado (GOMES et al., 1999; KUBO et al., 2001; SHIMAZAKI et al., 1997).

A imunomarcação da córnea foi realizada com objetivo de avaliar a evolução da cicatrização com relação   constituic o do estroma e se possível determinar o tempo aproximado de permanência do implante antes de ser substituído por colágeno cicatricial. Não foram encontrados na literatura estudos anteriores sobre a composic o colagena da córnea do cão normal, ou sobre seu comportamento durante a cicatrização. Portanto a discussão dos resultados s  poderá se basear em informações provenientes de estudos realizados em outras espécies, sendo que as córneas de aves e humanas são as mais frequentemente estudadas.

É preciso considerar que algumas dificuldades foram encontradas para realização desta fase do experimento. No preparo das lâminas para Imunomarcação são necessários banhos com substâncias como xilol, álcool e PBS, além da digestão em pepsina para exposição dos epítopos de superfície do colágeno. Por ser a córnea um material extremamente delicado, por diversas vezes os cortes se soltavam das lâminas durante este preparo, levando a perda significativa de material. Assim não foi possível a realização adequada desta técnica nas amostras de todos os animais. Mas tivemos amostras adequadas em animais de todos os tempos de avaliação, que nos permitiu análise adequada dos resultados.

A metodologia empregada no preparo das lâminas foi adaptada a partir da descrição de Teodoro et al. (2004). As imunofluoresc ncias para córnea, descritas anteriormente na literatura foram realizadas de diferentes formas, mas principalmente usando a enzima colagenase para digestão do material (LINSENMAYER et al, 1989; WHITE et al., 1997) e exposição dos epítopos do colágeno, optamos por testar pepsina para este fim, por ser o método mais

empregado na rotina do laboratório, como conseguimos a marcação adequada, este foi o método de escolha para realização do estudo.

A transparência da córnea é uma propriedade física única, necessária para manutenção de sua função, assim o estroma da córnea é formado por fibras pequenas e uniformes em diâmetro, que são regularmente distribuídas ou organizadas em lamelas paralelas e ortogonais (BIRK, 2001; MICHELACCI, 2003; WHITE et al., 1997).

A matriz extracelular no estroma é composta principalmente por colágeno tipo I, V, VI e XII, e glicosaminoglicanas (keratan sulfato e dermatan sulfato) (CONNON; MEEK, 2004). O tipo I é o principal, sendo um colágeno fibrilar (GELSE et al., 2003; MICHELACCI, 2003) componente de tecidos como a córnea, tendão, derme, osso e cartilagem (MICHELACCI, 2003), na córnea está associado ao tipo V em fibras heterotípicas, cuja presença nas fibrilas é um fator que limita o seu crescimento (BIRK, 2001; LINSENMAYER et al., 1985; MEEK & BOOTE, 2003).

Pudemos observar por meio da imunomarcação que o colágeno tipo I faz parte das fibras lamelares e está distribuído de forma homogênea ao longo de todo estroma na córnea, achados compatíveis com as descrições realizadas por Birk, 2001, Linsenmayer et al., 1985 e Meek e Boote, 2003. O implante mostrou-se intensamente marcado para este tipo de colágeno, também conforme descrito na literatura (DUA et al., 2004), sua identificação foi possível nas córneas de GII e GII (2 e 7 dias). Em GIII (21 dias), na área da lesão, o colágeno tipo I mostrou-se mais fortemente marcado do que em outras áreas da córnea, indicando aumento da expressão deste tipo, nas fibras durante esta fase da cicatrização, principalmente no terço anterior do estroma, região receptora do implante.

O colágeno tipo III é descrito como presente no estroma corneano em pequenas proporções, podendo aumentar em processos de cicatrização e inflamação (CINTRON et al., 1988; FEATHERSTONE et al., 2001; MICHELACCI, 2003). No presente estudo este colágeno mostrou expressão muito pequena por entre as fibras colágenas de todo o estroma da córnea. Aos dois dias de pós-operatório não foi possível observar a presença da membrana na superfície da lesão nas lâminas utilizadas para marcar o tipo III, provavelmente porque esta se perdeu durante o preparo do material. Mesmo assim pode-se notar um discreto aumento na marcação do colágeno tipo III na região mais superficial do estroma exposto, como esperado a partir das informações encontradas na literatura. No grupo de 7 dias persiste este padrão de distribuição, porém foi possível identificar a membrana densamente marcada. A membrana amniótica é rica em colágeno III (DUA et al., 2004). Assim, o aumento da concentração do colágeno III foi um fenômeno observado nos grupos GI e GII. Nos animais de GIII (21 dias) e GIV (40 dias) o padrão do colágeno III estava restabelecido na região do implante, indicando remodelamento do tecido implantado, já que o colágeno III foi identificado na membrana amniótica. Essa informação importante indica que estroma da membrana foi substituído pelo colágeno cicatricial já nesta fase.

Gris et al. (2002) relacionaram o tempo necessário para reabsorção da MA à resposta inflamatória e vascularização que ocorrem no pós-operatório, quanto maiores estas respostas maior será o aporte celular no local, levando a reabsorção mais precoce do tecido implantado. O menor tempo de avaliação usado por estes autores foi de três meses, significativamente maior que aqueles avaliados neste experimento, dificultando a comparação dos resultados. O mesmo pode ser dito com relação aos resultados publicados por Tosi et al. (2005), que analisou as córneas

com dois a 20 meses após o implante, e não encontrou resquícios de membrana em nenhuma delas. O assunto ainda é controverso inclusive porque cada autor que o estudou usou um método de avaliação diferente (GRIS et al., 2002; STOIBER et al. 2002; TOSI et al., 2005). Dentre os relatos anteriores apenas Tosi et al. (2005) usou a imunomarcagem do colágeno III para verificar a presença ou não de resquícios de membrana nas córneas receptoras. Foram examinadas quatro córneas de pacientes que receberam a MA com intervalo de 2 a 20 meses entre a cirurgia e o exame morfológico. Em todos a imunomarcagem para colágeno III no estroma foi negativa, indicando ausência de resquícios da membrana implantada.

Mesmo após a dissolução da MA, a superfície ocular permanece estável e o estroma mantém sua espessura (KRUSE et al., 1999; LEE & TSENG, 1997). Segundo Stoiber et al. (2002) após o implante, a membrana amniótica é transformada em tecido semelhante ao estroma, pois é invadida pelos ceratócitos, que reorganizam e transformam a matriz extracelular, produzindo fibras colágenas que são dispostas em arranjo ortogonal às vizinhas permitindo a passagem da luz através da córnea. Esse processo de reorganização pode explicar o aumento da transparência do implante com o tempo, apesar da maior densidade das fibras colágenas no local, pois aos 40 dias, clinicamente, havia apenas uma nébula no local do implante.

O colágeno tipo V está presente na membrana amniótica, que se apresentou intensamente marcada em GI e GII (DUA et al., 2004). No estroma da córnea o colágeno tipo V está associado ao tipo I em fibras heterotípicas, esta associação determina a formação de fibras pequenas (IMAMURA et al., 2000; CHANUT-DELANDE et al., 2001; WHITE et al., 1997), em nosso estudo tipo V foi

marcado de forma homogênea em todo estroma da córnea, como descrito na literatura. Os epítomos do colágeno V estão fechados nas fibras heterotípicas e somente são expostos após a digestão parcial do tipo I, Lisenmayer et al. (1990) recomendaram o uso de enzima colagenase específica para tipo I para este fim. No entanto, a pepsina foi eficaz na digestão das fibras heterotípicas e exposição dos epítomos do tipo V, permitindo assim sua observação no estroma da córnea e na MA.

Aos dois, sete e 21 dias, houve um discreto aumento na concentração destas fibras no estroma próximo ao implante. Porém sua distribuição voltou aos padrões anteriores e observados em segmentos de córnea não lesada, aos 40 dias, mostrando remodelamento do colágeno na cicatriz.

Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos por Saika et al. (1996), que também observaram aumento na expressão dos colágenos III e V no estroma da córnea em fases iniciais da cicatrização e predominância do tipo I em fases mais tardias da cicatrização estromal.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pudemos concluir que:

- A membrana amniótica eqüina mostrou-se viável como implante em córnea de cão, sendo incorporada ao estroma, resultando em restabelecimento aceitável da transparência no local da lesão.
- A membrana amniótica eqüina não ocasionou resposta de rejeição no tecido receptor.
- O colágeno tipo I tem sua deposição no colágeno da córnea aumentada tardiamente na cicatrização estromal. Já o tipo III, aumenta de forma discreta nas fases iniciais da cicatrização e o tipo V tem sua concentração intensificada durante toda cicatrização. Aos 40 dias todos os tipos de colágeno estudados voltaram a apresentar a sua distribuição padrão no estroma da córnea.
- Os colágenos tipo I, III, e V estão presentes na membrana amniótica eqüina.
- O colágeno da membrana amniótica foi remodelado e substituído aos 21 dias de pós-operatório.
- A pepsina foi eficiente na digestão das fibras e exposição dos epítomos dos colágenos I e V, das fibras heterotípicas.

REFERÊNCIAS

- ADDS, P. J.; HUNT, C.J.; DART, J. K. G. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *British Journal of Ophthalmology*, v. 85, p. 905-907, 2001.
- ANDRADE, A. L.; LAUS, J. L.; FIGUEIREDO, F.; BATISTA, C. M. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.2, p. 79-82, 1999.
- ANDERSON, D. F.; ELLIES, P.; PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation for partial limbal deficiency. *The British Journal of Ophthalmology*, v. 85, p. 567-575, 2001
- ANDRADE, A. L. **Efeitos da membrana amniótica humana sobre a cicatrização de córnea de coelhos submetidas a traumas mecânicos e químicos**: aspectos clínicos, morfológicos e bioquímicos. 2003. 253f.Tese (Doutorado em cirurgia)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- AZEVEDO, A. B.; RANZANI, J. J. T.; CROCCI, A. J. Paquimetria ultra-sonográfica da córnea em cães. *A Hora Veterinária*, v. 25, n.147, p. 65-67, 2005.
- AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Brazilian Journal of Ophthalmology*, v. 83, p. 933-402, 1999.
- BARABINO, S.; ROLANDO, M. Amniotic membrane transplantation elicits goblet cell repopulation after conjunctival reconstruction in a case of severe ocular cicatricial pemphigoid. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, v. 81, p. 68-71, 2003.
- BARROS, P. S. M.; SATAFLE, A. M. V.; MALERBA, T. A.; BURNIER J., M. The surgical repair of the córnea of the dog using pericardium as a keratoprothesis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.32, n. 4, p. 251-55, 1995.
- BARROS, P. S. M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; GOMES, T. L. S. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. *Veterinary Ophthalmology*, v. 1, p. 1119-1123, 1998.
- BARROS, P.S.M.; SAFATLE, A.M.V.; GODOY, C.A.; SOUZA, M.S.B.; BARROS, L.F.M.; BROOKS, D.E. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of ocular surface in three cases. *Veterinary Ophthalmology*, v.8, n. 3, p.189-192, 2005.

BECHARA, J. N. Anestesia em oftalmologia. In: FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002, p. 271- 279.

BIRK, D. E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. **Micron**, v. 32, p. 223-237, 2001.

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

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

BROOKS, D. E.; OLLIVIER, F. J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, v.34, p.611-621, 2004.

BROWN, C. T.; APPLEBAUM, E.; BANWATT, R.; TRINKAUS-RANDALL, V. Synthesis of stromal glycosaminoglycans in response to injury. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 59, p. 57-68, 1995.

BUDENZ, D. L.; BARTON, K.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. **American Journal of Ophthalmology**. v. 130, p. 580-588, 2000.

CHANUT-DELALANDE, H.; FICHARD, A.; BERNOCCO, S.; GARRONE, R.; HULMES, D.J.S.; RUGGIERO, F. Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. **Journal of Biology and chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24352-24359, 2001.

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

CHUAN-YI SU; CHANG-PING LIN. Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation: a case report. **Ophthalmic Surgery and lasers**, v. 31, n. 2, p.151–154, 2000.

CINTRON, C.; HONG, B. S.; COVINGTON, H. I., MASCARAK, E. J. Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 29, p. 767-775, 1988

CONNON, C. J.; MEEK, K. M. The structure and swelling of corneal scar tissue in penetrating full thickness wounds. **Cornea**, v. 23, p. 165-171, 2004.

DAVID HUI-KANG MA; SU-FANG WANG; WAN-YA SU; RAY JUI-FANG TSAI. Amniotic membrane graft for the management of scleral melting and corneal perforation in recalcitrant infectious scleral and corneoscleral ulcers. **Cornea**, v. 21, n. 3, p. 275-283, 2002

DEMIR, T.; TURGUT, B.; AKYOL, N.; OZERCAN, I.; ULAS, F.; CELIKER, U. Effects of amniotic membrane transplantation and mitomycin C on wound healing in experimental glaucoma surgery. **Ophthalmologica**, v. 216, p. 438-442, 2002.

DE RÖTTH, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. **Archives of Ophthalmology**, v. 23, p. 522-5, 1940.

DER-YUAN WANG.; YI-JEN HSUEB; VIVIAN C. YANG; JAN-KAN CHEN. Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 11, p. 4698-4704, 2003

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

DUA, H.S.; FORRESTER, J. V. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. **American Journal of Ophthalmology**, v. 110, p. 646-656, 1990.

DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; KING, A. J.; MAHARAJAN, V.S. The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey Ophthalmology**, v.49, p. 51-77, 2004.

DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v.78, p. 401-408, 1994.

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

EICHENBAUM, J. D.; LAVCH, J.D.; SEVERIN, G. A.; PAULSEN, M. E. Immunology of ocular surface. **Compendium on Continuing Education of Veterinary Practice**, v. 9, n. 11, p. 1101-1109, 1987.

ENDO, K.; NAKAMURA, T.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the $\alpha 5$ chain of type IV collagen. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, p. 1771-1774, 2004)

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

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

FORRESTER, J. V.; DICK, A. D.; MCMENAMIN, P. G.; LEE, W. R. Biochemistry and cell biology. In: _____ **The eye: basic sciences in practice**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002. p.155-222.

FREDDO, J. **Avaliação do efeito da Ciclosporina A a 0,2% tópica sobre a neovascularização em córnea de ratos após implante de membrana amniótica xenóloga em microbolsa no estroma corneal**. 2003. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In: _____ **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 260- 313.

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

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

GABRIC, N.; DEKARIS, I.; MRAVICIC, I.; KARAMAN, Z.; MITROVIC, S. Amniotic membrane transplantation in surgical reconstruction of the ocular surface. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 40, n. 4 , p. 1733- B641, 1999

GARCIA, J. A.; BARROS, P. S. M.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; SATAFLE, A. M. V. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, p. 291-294, 1996. Supplement

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens – structure, function and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531-1546, 2003.

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

GLABER, B.; LOHMAN, C. P. Hypopion after repeated transplantation of human amniotic membrane onto corneal surface. **Ophthalmology**, v. 107, p. 1344-1346, 2000.

GODOY, C. A. L. **Estudo comparativo da utilização de membranas amnióticas de coelha e humana como enxerto em ceratoplastia lamelar em coelhos**. 2005. 94 f. Tese (Doutorado em cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GODOY, C. A. L.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal eqüina como enxerto. Estudo experimental. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 65, n. 545-549, 2002.

GOMES, J. A. P.; KOMAGONE, C. M.; SANTOS, N.; CHAVES, A. P.; CUNHA, M. C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície

ocular nas ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 62, n. 5, 1999.

GRIS, O.; DEL CAMPO, Z.; WOLLEY-DOD, C.; GÜLL J. L.; VELASCO, F.; ADAN, A. Conjunctival healing after amniotic membrana grafo over ischemic sclera. **Cornea**, v. 22, n. 7, p. 675-678, 2003.

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

GRUETERICH, M.; ESPANA, E. M.; TOUHAMI, A.; TI, S.E.; TSEN, S. C. G. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v. 109, n. 8, p. 1547-1551, 2002

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

HEINZ, C.; ECKSTEIN, A.; STEUHL, K. P.; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of corneal ulcer in Graves ophthalmopathy. **Cornea**, v. 23, n. 5, p. 524-526, 2004.

HELIGENHAUS, A.; BAUER, D.; MELLER, D.; STEUHL, K. P.; TSENG, S. C. G. Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, n. 42, p. 1969-1974, 2001.

HELPER, L. C. Diseases and surgery of the cornea and sclera, In: MAGRANE, **Canine Ophthalmology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p. 102-149.

HICK, S.; DEMER, P. E.; BRUNETTE, I.; LA, C.; MABON, M.; DUCHESNE, B. Amniotic membrane transplantation and fibrin glue in the management of corneal ulcers and perforations – a review of 33 cases. **Cornea**, v. 24, p. 369-377, 2005.

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

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

IAMAMURA, Y.; SACOTT, I. C.; GREENSPAN, D. S. The Pro α -3 (V) collagen chain. **Journal of biology and chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8749-8759, 2000.

INATOMI, T.; NAKAMURA, T.; KOIZUMI, N.; SOTOZONO, C.; YOKOI, N.; KINOSHITA, S.. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 141, p. 267-275, 2006.

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

JIN-HONG CHANG; GABISON, E. E.; KATO, T.; AZAR, D. T. Corneal Vascularization. **Current Opinions in Ophthalmology**, v. 12, p. 242- 249, 2001.

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

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

KERN, T. J. Ulcerative Keratitis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 643-666, 1990.

KHOKHAR, S.; NATUNG, T.; SONY, P.; SHARMA, N.; AGARWAL, N.; VAJPAYEE, R. B. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers. **Cornea**, v. 24, p. 654-660, 2005

KO-HUA CHEN, WEN-MING HSU, CHIH-KAI LIANG. Relapsing Mooren's ulcer after amniotic membrane transplantation combined with conjunctival autografting. **Ophthalmology**, v. 111, p. 792-795, 2004.

KOIZUMI, N.; FULLWOOD, N. J.; BAIRAKTARIS, G.; INATOMI, T.; KINOSHITA, S.; QUANTOCK, A. J. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 41, p. 2506-13, 2000a.

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

KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; SOTOZONO, C.; FULLWOOD, N.J.; QUANTOCK, A.J.; KINOSHITA, S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. **Current Eye Research**, v. 20, n. 3, p. 173-177, 2000c.

KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; SUZUKI, T.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v. 108, p. 1569-1574, 2001.

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

KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R.; USUI, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, p. 1539-1546, 2001.

LASSALINE, M. E.; KOMAROMY, A. M.; OLLIVIER, M. E.; KALLBERG, D. E.; BROOKS, D. E.; GELATT, K. N. Equine amniotic membrane transplantation for corneal ulceration and keratomalacia in three horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 5, p. 311-317, 2005.

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

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

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

LETKO, E.; STECHSCHULTE, S.U.; KENYON, K. R.; SADEQ, N.; ROMERO, T.R.; SAMSON, C. M.; NGUYEN, Q. D.; HARPER, S. L.; PRIMACK, J. D.; AZAR, D. T.; GRUTERICH, M. D.; BALTATZIS, S.; FOSTER, S. Amniotic membrane Inlay and Overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. **Archives of Ophthalmology**, v. 119, p. 959-963, 2001.

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

LINSENMYER, T. F.; FITCH, J. M.; GROSS, J.; MAYNE, R. Are collagen fibrils in the developing avian cornea composed of two different collagen types- evidence from monoclonal antibody studies. In: FLUSCHMAYER, R.; OLSE, B. R.; KUHN, K. **Biochemistry, chemistry and pathology of collagen**. New York: N.Y. Academy of Science, 1985. p. 232-245.

LINSENMYER, T. F.; BRUNS, R. R.; MENTZER, A.; MAYNE, R. Type VI collagen: immunohistochemical identification as a filamentous component of the extracellular matrix of the developing avian corneal stroma. **Developmental Biology**, v. 118, p. 425-431, 1986

LISENMYER, T. F.; FITCH, J. M. SCHMID, T. M.; BIRK, D. E.; BRUNS, R. R.; MAYNE, R. Applications of anti-collagen monoclonal antibodies to studies of connective tissue structure and development. In: OLSEN, B.R. **Collagen**. Boca: Katon, 1989. p. 141-170.

LINSENMYER, T. F.; FITCH, J. M., BIRK, D. E. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens – controlling elements in corneal morphogenesis? **Annual of New York Academy Science**, v. 580, p. 143-160, 1990.

MARAL, T.; BORMAN, H.; ARSLAN, H.; DEMIRHAN, B.; AKINBINGOL, G.; HABERAL, M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. **Burns**, v. 25, p. 625-635, 1999.

MARANGON, F. B.; ALFONSO, E. C.; MILLER, D.; REMONDA, N. M.; MUALLEN, M. S.; TSENG, S. C. G. Incidence of microbial infection after amniotic membrane transplantation. **Cornea**, v. 23, n. 3, p. 264-269, 2004

MARTIN, C.L. Cornea and Sclera. In: _____ **Ophthalmic disease in veterinary medicine**. London: Manson publishing, 2005. p. 241-288.

MEALLET, M. A.; ESPANA, E. M.; GRUETERICH, M. D.; SENG-EI TI; GOTO, E.; TSENG, S. C. G. Amniotic Membrane Transplantation with limbal autograft for total limbal cell deficiency. **Ophthalmology**, v. 110, n. 1585-1592, 2003.

MEEK, K. M.; FULLWOOD, N. J. Corneal and scleral collagens- a microscopist's perspective. **Micron**, v. 32, p. 261-272, 2001.

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

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

MEEK, K.M.; BOOTE, C. The organization of collagen in corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 503-512, 2004.

MELLER, D.; PIRES, R. T. F.; MACK, R. J. S.; FIGUEIRREDO, F.; HEILIGENHAUS, A.; PARK, W. C.; PRABHASAWAT, P.; JOHN, T.; McLEOD, S. D.; STEUHL, K.P.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. **Ophthalmology**, v. 107, p. 980-990, 2000.

MELLER, D.; PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 86, p. 463-471, 2002.

MESSMER, E. M. Hypopyon after amniotic membrane transplantation. **Ophthalmology**, v. 108, n. 10, p. 1714-1715, 2001.

MICHELACCI, Y. M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1037-1046, 2003.

MIYAGAWA, A.; KOBAYASHI, M.; FUJITA, Y.; HAMDY, O.; HIRANO, K.; NAKAMURA, M. MIYAKE, Y. Surface ultrastructure of collagen fibrils and their association with proteoglycans in human cornea and sclera by atomic force microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 651-656, 2001.

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

MÜLLER, L. J.; PELS, E.; SCHURMANS, L. R. H. M.; VRENSSEN, G. F. J. M. A new three-dimensional model of organization of proteoglycans and collagen fibrils in human corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 493-501, 2004

MURATA, Y.; YOSHIOKA, H.; IYAMA, K.C.; USUKU, G. Distribution of type VI collagen in the bovine cornea. **Ophthalmic Research**, v. 21, p. 67-72, 1989

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

NAGAGHI, L. S. O.; BOLELI, I. C. Princípios básicos da microscopia de transmissão. Jaboticabal: Departamento de morfologia e Fisiologia Animal, FCAV- UNESP, 1999. 62 p.

NAKAMURA, T.; ENDO, K. I.; COOPER, L.J.; FULLWOOD, N.J.; TANIFUJI, N.; TSUZUKI, M.; KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; SANO, Y.; KINOSHITA, S. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 1, p. 106-116, 2003a

NAKAMURA, T.; INATOMIA, T.; SOTOZONO, C.; AMEMIYA, T.; KANAMURA, N.; KINOSHITA, S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. **British journal of Ophthalmology**, v.88, p. 1280-1284, 2004b

NAKAMURA, T.; INATOMIA, T.; SOTOZONO, C.; KOIZUMI, N.; KINOSHITA, S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 82, p. 468-471, 2004a.

NAKAMURA, T.; KOIZUMI, N.; TSUZUKI, M.; INOKI, K.; SANO, Y.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using membrane as a carrier in severe ocular surface disease. **Cornea**, v.22, n. 1, p. 70-71, 2003b.

NAKAMURA, T.; YOSHITANI, M.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N.J.; ITO, W.; INATOMI, T.; SOTOZONO, C.; NAKAMURA, T.; SHIMIZU, Y.; KINOSHITA, S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, p. 93-99, 2004c.

NASISSE, M. P. Canine Ulcerative Keratitis. **Compendium on Continuing Education of Veterinary Practice**, v. 7, n. 9, p. 686 –701, 1985.

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

PEIFFER JÚNIOR, R. L.; PETERSEN-JONES, S. M. Ocular surface lesions as cause of pain. In: _____ **Small Animal Ophthalmology**. A problem oriented approach. 2. ed. London: W. B. Saunders, 1997. p. 175-181.

PEIFFER JR, R. L.; WILCOCK, B. P.; DUBIELZIG, R. R.; RENDER, J. A.; WHITELEY, H. E. Fundamentals of Veterinary Ophthalmic Pathology. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 635-673.

PELLEGRINI, G.; TRAVERSO, C. E.; FRANZI, A. T.; ZINGIRIAN, M.; CANCEDDA, R.; DE LUCA, M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. **The Lancet**, v. 349, n. 5, p. 990-993, 1997.

PIRES , R.T.F.; PIRES, J.L.T.F.; TSENG, S.C.G. Transplante de membrana amniótica para reconstrução da superfície corneal e conjuntival. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 62, n. 3, p. 340-346, 1999.

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

PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; BURKETT, G.; TSENG, S. C. G. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. **Ophthalmology**, v. 104, p. 974-85, 1997.

PRABHASAWAT, P.; TSENG, S. C. G. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. **Archives of Ophthalmology**, v. 115, p. 1360-67, 1997.

PRABHASAWAT, P.; KOSRIRUKVONGS, P.; BOORANAPONG, W.; VAJARADUL, Y. Application of preserved human amniotic membrane for corneal surface reconstruction. **Cell and Tissue Banking**, v. 1, p. 213-222, 2000.

PRABHASAWAT, P.; TESAVIBUL, N.; KOMOLSURADEJ. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. **British journal of ophthalmology**, v. 85, p. 1455-1463, 2001.

PRAKASH, T. J.; SREENU, M.; KUMAR, R. V. S.; KRISHNA, S. V.; GOPAL, V. H. Efficacy of amniotic membrane for wound healing in comparison to sutured vs. non sutured urethra in bovine calves. **Indian Veterinary Journal**, v. 81, p. 41-43, 2004.

RAMOS, M. C. C. **Avaliação de aspectos morfológicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e ultras-estruturais do processo inflamatório crônico induzido pela inoculação de *Mycobacterium marinum* vivo e morto pelo calor,**

em tartarugas tracajá (*Podocnemis unifelis* – TROSCHER, 1848). 1997. 129 f. Tese (Doutorado em Patologia experimental e comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

RAMSEY, D. T.; POPE, E. R.; WAGNER-MANN, C.; BERG, J. N.; SWAIN, S. F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

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

RAVISHANKER, R.; BATH, A. S.; ROY, R. "Amnion bank"- the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. **Burns**, v. 29, p. 369-374, 2003.

RODRIGUEZ-ARES, M. T.; TOURINÕ, R.; CAPEANS, C.; SALORIO-SÁNCHEZ, M. Repair of sclera perforation with preserved sclera and amniotic membrane in Marfa's Syndrome. **Ophthalmic Surgery and Lasers**, n. 30, p. 485-487, 1999

RODRIGUEZ-ARES, M. T.; TOURINÕ, R.; LÓPEZ-VALLADARES, J.; GUDE, F. Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations. **Cornea**, v. 23, n. 6, p. 577-583, 2004.

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

SAIKA, S.; KAWASHIMA, Y.; OKADA, Y.; OHKAWA, K.; YAMANAKA, O.; KATOH, T.; OHNISHI, Y.; OOSHIMA, A.; KAO, W. W. Y. Immunohistochemical and ultrastructural analysis of dysplastic epithelium of human ocular surface: basement membrane and intermediate filament. **Cornea**, v. 18, n. 3, p. 343 – 352, 1999.

SAIKA, S.; OKADA, Y.; MIYAMOTO, T.; YAMANAKA, O.; OHNISHI, Y.; YAMANAKA, A.; OOSHIMA, A. Protein expression pattern of collagen type XV in mouse cornea. Graefe's **Archives of Clinic and Experimental Ophthalmology**, v. 242, p. 432-436, 2004.

SAIKA S. ; OOSHIMA, A. ; SHIMA, K.; TANAKA, S.; OHNISHI, Y. Collagen types in healing alkali-burned corneal stroma in rabbits. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 40, n. 3, p. 303-309, 1996.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 31-151.

SCAGLIOTTI, R. H. Tarsconjunctival island graft for the treatment of deep corneal ulcers, desmetoceles, and perforations in 35 dogs and 6 cats. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 3 n. 1, p. 69-76, 1988.

SCHECHTER, B. A.; RAND, W. J.; NAGLER, R. S.; ESTRIN, I.; ARNOLD, S. S.; VILLATE, N.; VELASQUEZ, G. E. Corneal melt after amniotic membrane transplant. **Cornea**, v.24, p. 106-107, 2005.

SCHOENAU, L.S.F.; PIPPI, N.L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **A Hora Veterinária**, v. 12, n. 17, p.49-54, 1993.

SHIMAZAKI, J.; KOSAKA, K.; SHIMMURA, S.; TSUBOTA, K. Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. **Ophthalmology**, v. 110, n. 110-119, 2003.

SHIMAZAKI, J.; SHIMMURA, S.; TSUBOTA, K. Donor source affects the outcome of ocular surface reconstruction in chemical or thermal burns of the cornea. **Ophthalmology**, v.111, p. 38 – 44, 2004.

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

SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblefaron. **Brazilian journal of Ophthalmology**, v. 82, p. 235–240, 1998.

SHIVELY, J. N.; EPLING, G. P. Fine structure of the canine eye: cornea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 4, p. 713-722, 1970.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In: _____ **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 260- 313.

SOLOMON, A.; ESPANA, E. M.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrana transplantation for reconstruction of conjunctival fornices. **Ophthalmology**, v. 110, p. 93-100, 2003.

SOLOMON, A.; ROSENBLATT, M.; MONROY, D. Supression of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in human limbal epithelial cells cultured on amniotic membrane stroma. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 444–449, 2001.

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

SOUZA, M.S.B. **Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica**. 2003. 161 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

SWANK, A.; HOSGOOD, G. Corneal wound healing and the role of growth factors. **Compendium on Continuing Education of Veterinary Practice**, v. 18, n. 9, 1007 – 1014, 1996.

TAKANO, Y.; FUKAGAWA, K.; MIYAKE-KASHIMA, M.; TANAKA, M.; ASNO-KATO, N.; DOGRU, M.; TSUBOTA, K.; FUJISHIMA, H. Dramatic healing of an allergic corneal ulcer persistent for 6 months by amniotic membrane patching in a patient with atopic keratoconjunctivitis. **Cornea**, v. 23, p. 723-725, 2004.

TEIXEIRA, R.B. Efeitos da aplicação tópica de ciclosporina "A" a 2% sobre a córnea de cães submetidos a ceratoplastia lamelar com implante de pericárdio de equino ocnervado em glicerina: avaliação clínica e morfológica. 2000. 158 f. Tese (mestrado em cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TEODORO, W.R.; VELOSO, A.P.; WITZEL, S.S.; GARIPPO, A.L.; FARHAT, C.; PARRA, E.R.; SONOHARA, S.; CAPELOZZI, V.L.; YOSHINARI, N.H. Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. **Pathology – Research and Practice**, v. 200, p. 681-691, 2004.

TOSI, G.M.; TRAVERSI, C.; SCHUERFELD, K.; MITTICA, V.; MASSARO-GIORDANO, M.; TILANUS, M.A.D.; CAPOROSSI, A.; TOTI, P. Amniotic membrane graft: histopathological findings in five cases. **Journal of cellular physiology**, v. 202, p. 852-857, 2005.

TRELFORD, J.D.; ANDERSON, D.G.; HANSON, F.W.; MENDEL, V.; SAWYER, R.H. Amnion autografts and allografts as a cover for skin defects in sheep. **Journal of Medicine**, v. 3, p. 81-87, 1972.

TSENG, S. C. G. Concept and application of limbal stem cells. **Eye**, v.3, p. 141-57, 1989.

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

TSENG, S. C. G.; PRABHASAWAT, P.; LEE, S. H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. **American journal of ophthalmology**, v.124, p. 765-74, 1997.

TSUBOTA, K.; TODA, I.; SAITO, H.; SHINOZAKI, N.; SHIMAZAKI, J. Reconstruction of corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v. 102, p. 1586-1496, 1995

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

VERSEN-HÖYNCK, F.; HESSELBARTH, U.; MÖLLER, D. E. Application of sterilized human amnion for reconstruction of ocular surface. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, p. 57-65, 2004.

YANXIA HAO; HUI-KANG, D.; HWANG, D. G.; KIM, W. S.; ZHANG, F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. **Cornea**, v. 19, n. 3, p. 348-352, 2000.

YONG SUK CHOI; JI YOUNG KIM; WON RYANG WEE; JIN HAK LEE. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. **Cornea**, v. 17, n. 4, p. 389-395, 1998.

YOUNG, B. HEATH, J. W. Notas sobre técnicas de coloração. In: _____ Wheater – Histologia funcional. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p. 406-407.

YOUNG SAM KWON, YOUNG SOO SONG, JAE CHAN KIM. New treatment for band keratopathy: superficial lamella keratectomy, edta chelation and amniotic membrane transplantation. **Journal of Korean Medicine Science**, v. 19, p. 611-615, 2004.

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

WATTÉ, C.M.; ELKS, R.; MOORE, D. L.; MCLELLAN, G. J. Clinical experience with butyl-2-cyanoacrylate adhesive in management of canine and feline corneal disease. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 319-326, 2004.

WHITE, J.; WERKMEISTER, J. A.; RAMSHAW, J. A. M.; BIRK, D. E. Organization of fibrillar collagen in the human and bovine cornea: collagen types V and III. **Connective Tissue Research**, v. 36, n. 3, p. 165-174, 1997.

WHITLEY, R. D.; GILGER, B. C. Diseases of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 635-673.

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

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

ZAGORSKI, Z. F.; RAKOWSKA, E.; KARDASZEWSKA, A. Amniotic membrane transplantation in the treatment of severe corneal disorders. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 40, n. 4 (15), 1999 (Apresentado no Annual meeting of the Association for research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1999)

ZHAN, Q.; BURROWS, R.; CINTRON, C. Localization of type XII collagen in normal and healing rabbit cornea by in situ hybridization. **Experimental eye research**, v. 60, p. 551-561, 1995.

ZHOU SHIYOU; CHEN JIAQI; FENG JINFA. The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. **Chinese Medicine Journal**, v. 116, n. 5, p. 788-790.