

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MEMBRANAS BIOLÓGICAS NA CÓRNEA DE CÃES E GATOS

Cecilia Capacchi Dall'Agnol

PORTO ALEGRE

2017/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MEMBRANAS BIOLÓGICAS NA CÓRNEA DE CÃES E GATOS

Autor: Cecilia Capacchi Dall’Agnol

Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária

Orientador: João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2017/2

RESUMO

A córnea é a porção mais externa da parte anterior do bulbo ocular. A sua transparência é essencial para uma visão de qualidade. Danos na estrutura corneana, com perda tecidual, como úlceras profundas e perfurações, causadas por trauma ou após alguma intervenção cirúrgica, podem gerar cicatrizes que afetam a transparência e a funcionalidade da córnea, ou até mesmo causar perda do globo ocular. Para essas situações é indicado tratamento cirúrgico. Frente à necessidade de preservar a integridade e a função ocular buscam-se novos materiais para o enxerto corneano que sejam compatíveis com a córnea, substituindo o defeito e trazendo melhores resultados que os métodos comumente utilizados. Estudos com o uso de membranas biológicas têm mostrado resultados satisfatórios. Existem inúmeros estudos a respeito do uso de membranas biológicas na reparação da córnea de animais incluindo, membrana amniótica; submucosa de bexiga, capsula renal; submucosa intestinal; pericárdio; peritônio; mucosa oral; túnica vaginal; e escama de sardinha.

ABSTRACT

The cornea is the outer portion of the anterior part of the eyeball. Its transparency is essential for high quality vision. Damage to the corneal structure, with tissue loss, such as deep ulcers and perforations, caused by trauma or after some surgical intervention, can cause scars that affect the transparency and functionality of the cornea, or even cause loss of the eyeball. For these situations surgical treatment is indicated, the technique normally used is the conjunctival graft. To preserve the integrity and function of the eye, new corneal grafts materials that are compatible with the cornea are searched, replacing the defect and providing better results than the commonly used methods. Studies with the use of biological membranes have shown satisfactory results. In veterinary ophthalmology there are reports of amniotic membrane use; bladder submucosa, renal capsule; small intestine submucosa; pericardium; peritoneum; oral mucosa; vaginal tunic; and sardine scale.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fotomicrografia de córnea felina. (A) Epitélio. (B) Estroma. (C) Membrana de Descemet. (D) Endotélio11
- Figura 2** – Fontes de oxigênio da córnea13
- Figura 3** – Camadas da córnea atingidas de acordo com a extensão da úlcera de córnea. (A) Úlcera superficial atingindo apenas o epitélio. (B) Úlcera intermediária atingindo até 1/3 do estroma. (C) Úlcera profunda atingindo quase toda espessura do estroma. (D) Perfuração ocular13
- Figura 4** – Resultados após a implantação da capsula renal em lesão de córnea em um cão. (A) Primeiro dia de pós-operatório. Discreto edema ao redor do enxerto. (B) Aos 30 dias, vascularização da prótese. (C) Aos 60 dias, moderada transparência no local do enxerto18
- Figura 5** – Fotomicrografias histológicas das áreas de implantação da mucosa oral autógena em córnea canina. (A) Presença de epitélio espesso (▲) com vacuolização de células de camadas intermediárias e inferiores (◆), intensa fibroplasia (●) e intensa atividade angiogênica (■) no 15º dia de pós-operatório (125X - HE); (B) Epitélio compacto com projeções ao estroma (●) e tecido conjuntivo bem organizado com ausência de vasos sanguíneos (▲) no 60º dia de pós-operatório (125X - HE)20
- Figura 6** – Imagem de olho de cão 60 dias do pós-operatório. Neovascularização e opacidade corneanas em grau leve20
- Figura 7** – Córneas que receberam escama de sardinha preservada em glicerina. (A) Primeiro dia de pós-operatório. (B) 60 dias de pós-operatório, padrão reacional pouco significativo com sepultamento do implante e dos fios de sutura. Há neovasos discretos e cicatriz corneana nas áreas da prótese. (C) 30 dias após a enxertia interlamelar. Córnea e prótese translúcidas, ausência de neovasos ou pigmentos23
- Figura 8** – – Córnea de cão 120 dias após certatoplastia lamelar com implantação de túnica vaginal. Discreta opacidade, pigmentação na área do enxerto e cistos de retenção25

Figura 9 – Fotomicrografia de corte histológico da córnea e enxerto aos 70 dias de pós-operatório, mostrando o "sanduíche" de pericárdio (epitélio – estroma – pericárdio – estroma – endotélio) (HE-100x)	27
Figura 10 – Córnea de um cão trinta dias após a implantação da membrana biológica. Evidenciam-se neovasos e tecido de granulação sobre o local da perfuração. Observam-se hiperemia conjuntival e edema de córnea	29
Figura 11 – Membrana comercial de pericárdio bovino previamente à implantação, demonstrando a falta de células e elastina e a presença de colágeno. (A) Coloração HE. Vermelho claro indicativo de colágeno. Não há células visíveis. (B) Coloração para elastina. Nenhuma elastina é visualizada. Vermelho escuro é indicativo de colágeno. (C) Coloração de tricômio. Azul escuro é indicativo de colágeno	30
Figura 12 – Transoperatório de um cão após implantação do pericárdio bovino na córnea ...	31
Figura 13 – Córnea de um cão dois meses após a implantação do pericárdio bovino	32
Figura 14 – OCT de uma córnea de gato 2 meses após a implantação do pericárdio bovino. O epitélio encontra-se normal, mas o estroma está mais fino na região do enxerto. A transição entre o colágeno endógeno e exógeno é visível	33
Figura 15 – Imagem do olho de um felino após ceratectomia lamelar anterior para remoção de sequestro de córnea. Observa-se implantação da membrana SIS na córnea.....	36
Figura 16 – Córnea de um gato sete semanas após a implantação da SIS, com moderada opacidade e neovascularização corneana	37
Figura 17 – Membrana de bexiga suína. O triângulo demarcado deve ficar à direita do cirurgião, garantindo que a túnica própria da membrana esteja voltada para baixo	39
Figura 18 – Córnea de gato 90 dias após o procedimento cirúrgico com moderada cicatriz corneana	42
Figura 19 - Imagem do bulbo ocular de um canino 80 dias após a implantação da membrana amniótica equina em um caso de melting em um cão. Observam-se moderada cicatriz, pigmentação e vascularização corneana.....	46

Figura 20 - (A) Única camada de membrana amniótica sobre a lesão. (B) Imagem do transoperatório, durante a colocação do adesivo sobre a membrana. (C) Membrana fixada com adesivo na córnea. (D) Quatro meses após a cirurgia46

Figura 21 - Fotomicrografia da córnea 60 dias após o procedimento cirúrgico. Nota-se no centro do estroma a presença da membrana amniótica e dos fios de sutura, assim como fibroblastos e fibrose (HE)47

Figura 22 - (A) Pós-operatório imediato após a implantação da membrana amniótica equina na córnea. (B) 3 semanas de pós-operatório, nota-se tecido de granulação e vascularização. (C) 12 semanas de pós-operatório, nota-se transparência e remissão dos vasos48

LISTA DE ABREVIATURAS

HE: hematoxilina e eosina

FGF-2: fator de crescimento de fibroblastos -2

ml: mililitros

mm: milímetros

OCT: tomografia de coerência óptica

SIS: submucosa de intestino delgado de suíno

TGF- β : fator de transformação do crescimento beta

UI: unidade internacional

X: vezes

°C: graus Celcius

μ g: micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	CÓRNEA	11
2.1	Cicatrização da Córnea	13
3	MEMBRANAS BIOLÓGICAS	15
4	CAPSULA RENAL	17
5	MUCOSA ORAL	19
6	PERITÔNIO	21
7	ESCAMA DE SARDINHA	22
8	TÚNICA VAGINAL	24
9	PERICÁRDIO	26
9.1	Pericárdio Equino Conservado em Glicerol	26
9.2	Pericárdio Canino Conservado em Glicerol	28
9.3	Pericárdio Bovino Desidratado em Glutaraldeído	29
10	SUBMUCOSA DE INTESTINO DELGADO SUÍNO	34
11	BEXIGA SUÍNA	39
12	MEMBRANA AMNIÓTICA	43
12.1	Coleta, preparação e armazenamento da membrana amniótica	44
12.2	Procedimento cirúrgico para fixação da membrana amniótica	45
12.3	Membrana Amniótica Canina	45
12.4	Membrana Amniótica Humana	46
12.5	Membrana Amniótica Equina	47
13	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A córnea é a porção mais externa da parte anterior do bulbo ocular (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013) e protege o olho de agentes externos (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000). É a superfície de refração óptica mais importante do olho, e a transparência da mesma é essencial para uma visão de qualidade (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013). Para que a córnea se mantenha transparente existem diversos fatores, entre eles: a organização das fibras de colágeno; a ausência de vasos sanguíneos e de pigmentos; o estado constante de deturgescência e a superfície lisa mantida pelo filme lacrimal (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013). Em cães e gatos a córnea é composta por quatro camadas, sendo elas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002; SAMUELSON, 2013).

Danos na estrutura corneana, com perda tecidual, como úlceras profundas e perfurações, caudadas por trauma ou após alguma intervenção cirúrgica, podem gerar cicatrizes que afetam a transparência (MAGGS, 2008) e a funcionalidade da córnea, ou até mesmo causar perda do globo ocular.

Vários procedimentos são recomendados dependendo da profundidade da lesão. Entre os mais comumente empregados encontra-se o pedículo de conjuntiva (CRISPIN, 2002). Outras técnicas utilizadas incluem as lentes de contato, o recobrimento com a terceira pálpebra, a transposição córneo escleral, o transplante de córnea, a tarsorrafia, os adesivos teciduais e os materiais sintéticos, entre outros (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999). A desvantagem do uso do pedículo conjuntival é que resulta em uma opacidade corneana, e dependendo da sua localização pode afetar a visão do paciente (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001).

Frente à necessidade de preservar a integridade e a função ocular buscaram-se novos materiais para o enxerto corneano que sejam compatíveis com a córnea, substituindo o defeito e trazendo melhores resultados que os métodos comumente utilizados (SOUZA, 2003). O material ideal deve manter a córnea transparente, dar suporte para a migração e adesão das células epiteliais da córnea, ser permeável a solutos, resistente às proteases corneanas (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; MANCUSO; LASSALINE; SCHERRER, 2014), e devem ser degradados completamente e substituídos pelo tecido original corneano (BALLAND *et al.*, 2015). Os materiais desenvolvidos a partir de colágeno

tem sido empregados como ótimas opções no tratamento de lesões córneas (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001).

Estudos com o uso de membranas biológicas têm mostrado resultados satisfatórios. Em animais há relatos de uso de membrana amniótica equina (BARROS *et al.*, 1998), canina (BARROS *et al.*, 2005), e humana (ION *et al.*, 2016); submucosa de bexiga suína (BALLAND *ET AL.*, 2016; CHOW; WESTERMEYER, 2016); capsula renal equina (ANDRADADE *et al.*, 1999; ANDRADADE *et al.*, 2004; LAUS *et al.*, 1999); submucosa intestinal suína (BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007; LEWIN, 1999; GOULLE, 2012); pericárdio canino, equino e bovino (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; HÜNNING *et al.*, 2009; DULAURENT *et al.*, 2014); peritônio canino (GARCIA *et al.*, 1996); mucosa oral canina (DAMASCENO *et al.*, 2004); túnica vaginal canina (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000); e escama de sardinha (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000).

É de extrema importância que sejam realizados estudos permitindo maior acesso à informação. Neste sentido, objetivou-se com esta revisão bibliográfica compilar artigos sobre o uso de membranas biológicas na superfície ocular de animais. Além disso, discutir as propriedades de cada tipo de membrana, as suas utilizações e os resultados esperados com o emprego de cada uma delas.

2 CÓRNEA

A córnea é a porção mais externa da parte anterior do bulbo ocular, compondo juntamente com a esclera, a túnica fibrosa (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013). É uma importante barreira, protegendo o olho de agentes externos (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000). Sua espessura varia entre as espécies e regiões da mesma córnea (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013), ficando entre 0,8 a 1 mm na região central da córnea canina e felina (SAMUELSON, 2013).

A córnea é a superfície de refração óptica mais importante do globo ocular, e a transparência da mesma é essencial para uma visão de qualidade (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013). Essa característica é mantida pela organização paralela das fibras de colágeno tipo I (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001), a ausência de vasos sanguíneos e pigmentos, seu estado constante de deturgescência e sua superfície lisa mantida pelo filme lacrimal (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013)

Em cães e gatos a córnea é composta por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002; SAMUELSON, 2013) (Figura 1).

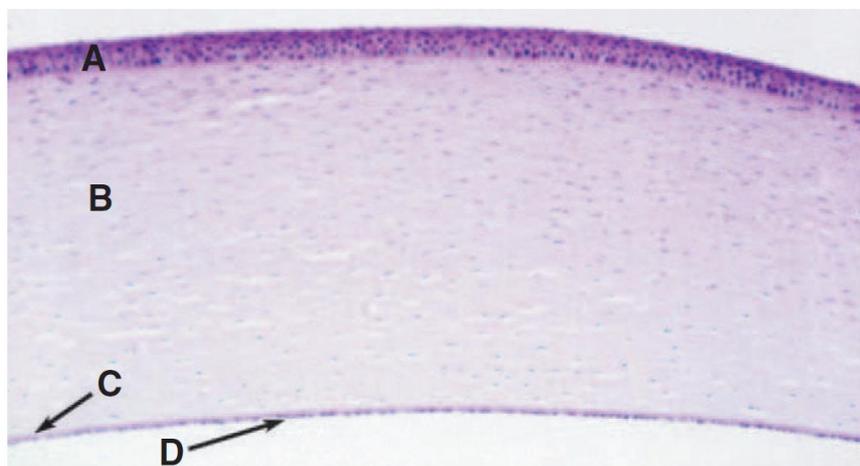


Figura 1 – Fotomicrografia de córnea felina. (A) Epitélio. (B) Estroma. (C) Membrana de Descemet. (D) Endotélio.

Fonte: Maggs, 2008

O epitélio é a camada mais externa da córnea (SAMUELSON, 2013). Suas células se apresentam em um padrão estratificado, escamoso e não queratinizado (MAGGS, 2008). O epitélio está ancorado à sua membrana basal por hemidesmosomos, a qual está firmemente aderida ao estroma por finas fibrilas (CRISPIN, 2002; SAMUELSON, 2013). O epitélio corneano normalmente está em constante descamação na superfície e as células basais estão em mitose continuamente, mandando novas células à superfície (MAGGS, 2008). A

membrana basal possui por diferentes tipos de colágeno, além de hialuronato e fibronectinas que auxiliam na adesão do epitélio (SAMUELSON, 2013).

O estroma corresponde a aproximadamente 90% da espessura corneana e é formado por colágeno, ceratócitos, e substância fundamental (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002), possui ainda raros linfócitos, macrófagos e neutrófilos entremeados nas fibras de colágeno. A transparência da córnea é mantida pelo padrão de espaçamento das fibrilas colágenas, o que também diferencia o estroma corneano normal de uma cicatriz de córnea e do tecido natural da esclera (MAGGS, 2008).

A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio. É elástica, acelular, composta por fibras delgadas de colágeno e é continuamente produzida pelas células do endotélio corneano (MAGGS, 2008; SAMUELSON, 2013).

O endotélio é a camada mais interna da córnea, sendo a barreira em contato com a câmara anterior do globo ocular (MAGGS, 2008). Atua desidratando e eliminando íons do estroma. É composto por uma única camada de células que são predominantemente hexagonais. Esta camada apresenta capacidade limitada de replicação (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002).

A nutrição da córnea ocorre através do contato direto do endotélio corneano com o humor aquoso, do contato com o filme lacrimal, e dos capilares provenientes do limbo e da conjuntiva palpebral, recebendo oxigênio e nutrientes (MAGGS, 2008) (Figura 2).

A inervação corneana tem origem em ramos do nervo trigêmeo. Os receptores nervosos de dor encontram-se nas porções mais superficiais da córnea e os receptores de pressão no estroma, o que justifica o fato de muitas lesões superficiais de córnea trazerem mais desconforto do que lesões profundas (SAMUELSON, 2013).

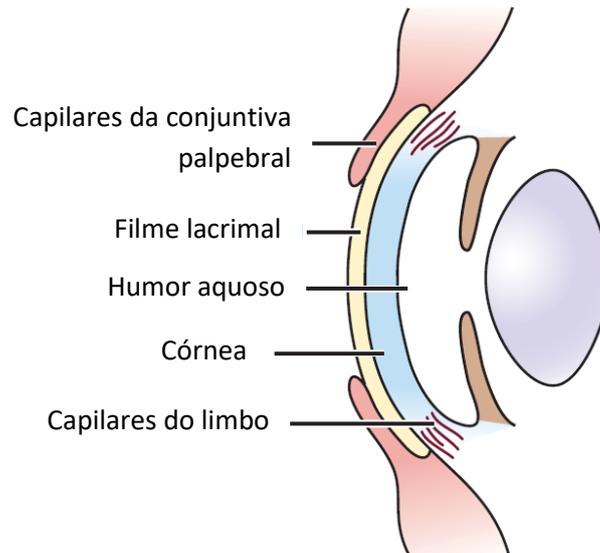


Figura 2 – Fontes de oxigênio da córnea.
Fonte: adaptado de Maggs, 2008

2.1 Cicatrização da Córnea

O mecanismo de reparação da córnea varia de acordo com a profundidade da lesão e as estruturas acometidas (MAGGS, 2008) (Figura 3).

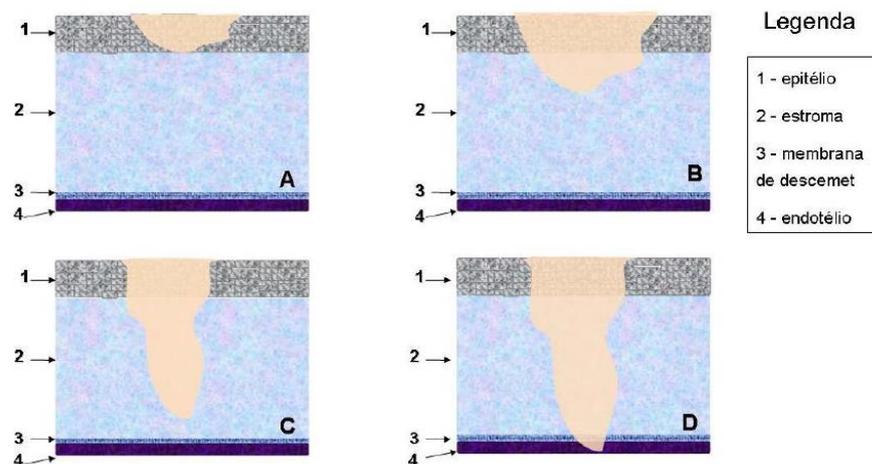


Figura 3 - Camadas da córnea atingidas de acordo com a extensão da úlcera de córnea. (A) Úlcera superficial atingindo apenas o epitélio. (B) Úlcera intermediária atingindo até 1/3 do estroma. (C) Úlcera profunda atingindo quase toda espessura do estroma. (D) Perfuração ocular.

Fonte: Albuquerque, 2011

Nas úlceras superficiais de córnea, a cicatrização inicia alguns minutos após a lesão. O epitélio da córnea possui uma grande capacidade de auto regeneração e as células do epitélio íntegro adjacente migram para a área lesionada primeiramente e posteriormente realizam mitose (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002; SAMUELSON, 2013). Em casos de lesões não tão extensas, a córnea pode reparar-se completamente apenas com a migração celular,

completando este processo em até 24 horas. Se a lesão for maior, novas células epiteliais serão formadas pelas células do limbo para o fechamento completo da lesão (SAMUELSON, 2013). Com esse mecanismo, toda a córnea pode ser recoberta por um novo epitélio em até sete dias (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002).

Se a lesão atingir o estroma, o processo de reparação torna-se mais demorado e complexo, envolvendo migração de células do limbo e síntese de componentes estromais. Em casos de lesões, os ceratócitos são capazes de se tornar fibroblastos ativos, produzindo precursores de colágeno e da substância fundamental. O novo colágeno depositado terá sua organização fibrilar diferente do original com fíbrilas de colágeno tipo III menos organizadas, diferentemente do colágeno tipo I que havia antes da lesão, ocasionando assim uma opacidade no local da lesão (CRISPIN, 2002; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001).

Caso haja danos na membrana de Descemet, esta retrai suas bordas e se enrola, devido sua propriedade elástica (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002), expondo a porção posterior do estroma. As células endoteliais migram para a região para realizar o tamponamento da lesão, e posteriormente produzem uma nova membrana de Descemet (MAGGS, 2008).

Se o endotélio corneano for lesionado, por ser um tecido de baixa capacidade de regeneração, é substituído por células endoteliais adjacentes, que se espalham formando uma monocamada celular mais fina. Quando estas células perdem sua função ou estão em quantidade reduzida o mecanismo para a deturgescência da córnea torna-se ineficaz ou inexistente, comprometendo a transparência corneana (MAGGS, 2008; CRISPIN, 2002).

3 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Frente à necessidade de preservar a integridade anatômica e a função ocular após perdas teciduais, buscaram-se novos materiais para o enxerto corneano que sejam compatíveis com a córnea, substituindo o defeito e trazendo melhores resultados que os métodos comumente utilizados, como a técnica de pedículo conjuntival (CRISPIN, 2002), que traz resultados satisfatórios quanto a manutenção da integridade ocular, mas deixa a desejar no quesito funcionalidade, uma vez que deixa cicatriz maior (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001), podendo alterar a visão do paciente.

A primeira utilização de membranas biológicas na córnea ocorreu no século XVIII, transplantando tecido corneano de cadáveres ou de olhos enucleados (MANCUSO; LASSALINE; SCHERRER, 2014). Posteriormente, buscando materiais alternativos, inúmeros estudos foram realizados com utilização de membranas autólogas, provenientes de doadores e/ou adesivos teciduais, mostrando resultados satisfatórios (BARROS *et al.*, 1995). Em animais estas membranas estão sendo utilizadas como alternativa promissora para cirurgias reconstrutivas de pálpebra, córnea e esclera (SOUZA, 2003; HÜNNING *et al.*, 2009).

O material ideal deve manter a córnea transparente, dar suporte para a migração e adesão das células epiteliais da córnea, ser permeável a solutos, resistente às proteases corneanas (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; MANCUSO; LASSALINE; SCHERRER, 2014), e devem ser degradados completamente e substituídos pelo tecido original corneano (BALLAND *et al.*, 2015). Os materiais desenvolvidos a partir do colágeno tem sido empregados com resultados bastante promissores (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001).

Entre os tecidos utilizados na córnea de cães e gatos destacam-se: membrana amniótica equina (BARROS *et al.*, 1998), canina (BARROS *et al.*, 2005), e humana (ION *et al.*, 2016); submucosa de bexiga suína (BALLAND *ET AL.*, 2016; CHOW; WESTERMEYER, 2016); cápsula renal equina (ANDRADADE *et al.*, 1999; ANDRADADE *et al.*, 2004; LAUS *et al.*, 1999); submucosa intestinal suína (BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007; LEWIN, 1999; GOULLE, 2012); pericárdio canino, equino e bovino (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; HÜNNING *et al.*, 2009; DULAURENT *et al.*, 2014); peritônio canino (GARCIA *et al.*, 1996); mucosa oral

canina (DAMASCENO *et al.*, 2004); túnica vaginal canina (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000); escama de sardinha (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000); entre outros.

Estas membranas possuem variados métodos de utilização e conservação, podendo ser utilizadas frescas logo após sua retirada do leite doador, refrigeradas, congeladas, liofilizadas ou mantidas em glicerol (HÜNNING *et al.*, 2009).

4 CÁPSULA RENAL

O uso da cápsula renal equina é uma alternativa cirúrgica para reparações da superfície ocular. Pode ser utilizada no tratamento de úlceras profundas, descemetoceloses, abscessos e perfurações oculares que não responderam bem a outros tratamentos (ANDRADADE *et al.*,1999; ANDRADADE *et al.*,2004). É um material de fácil coleta e manipulação (ANDRADADE *et al.*,1999). O tecido deve ser obtido de equinos saudáveis e que foram eutanaziados por motivos não relacionados à coleta da membrana, e mantido em glicerina 98% (ANDRADADE *et al.*,1999). A solução de glicerina 98% é de fácil aquisição e permite a preservação de tecidos utilizados para cirurgias reparativas de córnea por um longo período (ANDRADADE *et al.*,1999; ANDRADADE *et al.*,2004).

A utilização experimental de cápsula renal equina na superfície ocular de cães foi relatada por Andrade *et al.* (1999). Experimentalmente foram induzidas lesões na córnea de cães, com um trépano de 5 mm, preparando o leito receptor. A cápsula renal equina foi lavada com solução salina, trepanada no mesmo tamanho da lesão e fixada com fio de nylon 9-0 em sutura simples interrompida. Notou-se fotofobia, blefaroespasmos, secreção ocular e edema intensos nos primeiros sete dias de pós-operatório, reduzindo progressivamente após o 15º dia. A presença de neovasos foi intensa no 15º dia pós-operatório, reduzindo progressivamente. Na revisão após 60 dias do procedimento cirúrgico os cães ainda apresentavam leve edema e neovascularização de córnea, pequenas áreas de leucoma foram notadas próximas aos locais do enxerto (Figura 4). A avaliação histopatológica das córneas revelou uma progressão inflamatória, com leucócitos polimorfonucleares nos primeiros dias, e mononucleares elevados até o 30º dia. Hemorragia estava presente no 3º dia reduzindo progressivamente até o 30º dia, embora apresentasse fibrose entre o 7º e 30º dia, pode ser observada uma moderada transparência do enxerto no dia 60º. As células basais da córnea começaram se multiplicar nas primeiras 24 horas após o procedimento cirúrgico, modificando as células epiteliais corneanas, cobrindo o enxerto (ANDRADADE *et al.*,1999).

O primeiro estudo clínico com o uso da cápsula renal equina preservada em glicerina foi realizado por Laus *et al.* (1999). Neste estudo foi comparado o uso desta com o enxerto conjuntival pediculado em um cão com descemetocelose bilateral devido ao botulismo. Nas avaliações pós-operatórias o paciente apresentou moderadamente blefaroespasmos, secreção ocular mucosa, edema e neovascularização nos primeiros 15 dias em ambos olhos. Tecido de granulação foi observado em maior intensidade no olho que recebeu o enxerto conjuntival.

Após 30 dias do procedimento cirúrgico a cápsula renal equina começou a se incorporar na córnea com redução do edema e da neovascularização, trazendo transparência à superfície, ao contrário da córnea com o pedículo. Quatro meses após a cirurgia, o olho que recebeu a capsula renal equina apresentava-se totalmente cicatrizado e sem a presença da membrana, enquanto o olho que recebeu o pedículo conjuntival apresentava uma pequena sinéquia anterior e o tecido enxertado continuava presente e vitalizado (LAUS *et al.*, 1999).

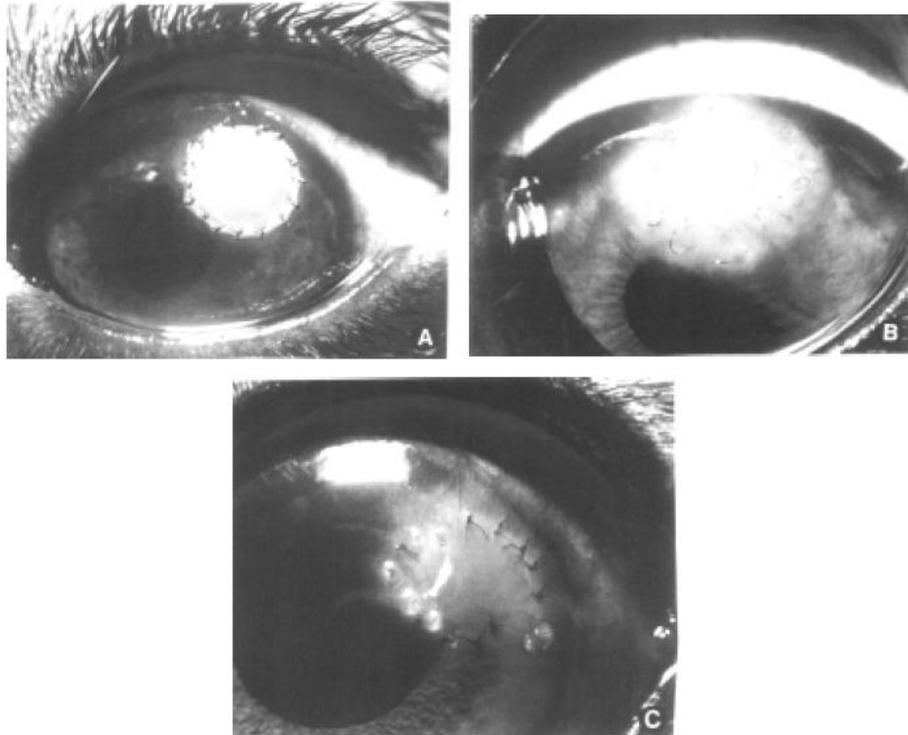


Figura 4 – Resultados após a implantação da capsula renal em lesão de córnea em um cão. (A) Primeiro dia de pós-operatório. Discreto edema ao redor do enxerto. (B) Aos 30 dias, vascularização da prótese. (C) Aos 60 dias, moderada transparência no local do enxerto.

Fonte: Andrade *et al.*, 1999

O uso da cápsula renal equina resultou numa córnea mais transparente quando comparada à utilização de pedículo conjuntival (LAUS *et al.*,1999) e não foram percebidos sinais de rejeição da membrana nos estudos realizados (ANDRADADE *et al.*,1999; ANDRADADE *et al.*,2004; LAUS *et al.*,1999). Laus *et al.* (1999) relataram que o procedimento cirúrgico ao se implantar a cápsula renal também é mais rápido do que a técnica do pedículo, uma vez que a preparação do pedículo leva tempo (LAUS *et al.*,1999).

5 MUCOSA ORAL

A utilização da mucosa oral na superfície ocular é uma alternativa à utilização da conjuntiva (MELO *et al.*, 2009), que é comumente usada em lesões de córnea no procedimento de *flap* conjuntival. Porém a conjuntiva se apresenta em menor quantidade se comparada a mucosa oral. A abundância de sítios doadores desta mucosa facilita a coleta de material, favorecendo procedimentos cirúrgicos em casos emergenciais em que a região lesionada é extensa (MELO *et al.*, 2009).

A utilização da mucosa oral direta ou cultivada como tratamento de doenças da superfície ocular vem sendo pesquisada em humanos (NAKAMURA *et al.*, 2010; NAKAMURA *et al.*, 2004; NISHIDA *et al.*, 2004; SHORE *et al.*, 1992) e em conjuntiva de cães (MELO *et al.*, 2009) com resultados satisfatórios.

Damasceno *et al.* (2004) relataram o emprego desta membrana experimentalmente na córnea de cães, realizando estudo clínico e histopatológico do comportamento da membrana após a implantação.

Para a obtenção da membrana, realizou-se antissepsia da mucosa oral a ser retirada com solução tópica de clorexidina 0,12% por 1 minuto. Após, foi trepanado um fragmento do tecido com 0,5 mm de diâmetro a mais do que a lesão na qual seria implantada. Este fragmento foi então lavado com solução estéril de cloreto de sódio 0,9% antes da aplicação na córnea (DAMASCENO *et al.*, 2004).

Como se tratava de um estudo experimental, foram criadas lesões nas córneas dos cães utilizando um trépano de 4,5 mm de diâmetro. A mucosa oral foi fixada à córnea com sutura simples interrompida com utilização de fio de poliamida monofilamentoso 9-0 (DAMASCENO *et al.*, 2004).

As complicações presentes foram: blefarospasmo, quemose e secreção seromucosa nos primeiros dias após a cirurgia; e opacidade e neovascularização na córnea e na membrana implantada entre 16 e 45 dias pós-operatório, regredindo posteriormente. Macroscopicamente a membrana de mucosa oral se integrou na córnea após o 15º dia (DAMASCENO *et al.*, 2004).

Microscopicamente, houve intensa fibroplasia, infiltrado de células polimorfonucleares, deposição de fibras colágenas em arranjo desorganizado e vascularização

nos primeiros 30 dias do pós-operatório. Entre 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico foi encontrado infiltrado linfoplasmocitário, e após o 60º dia, observou-se epitelização, com presença de fibras de colágeno mais organizadas (DAMASCENO *et al.*, 2004) (Figura 5).

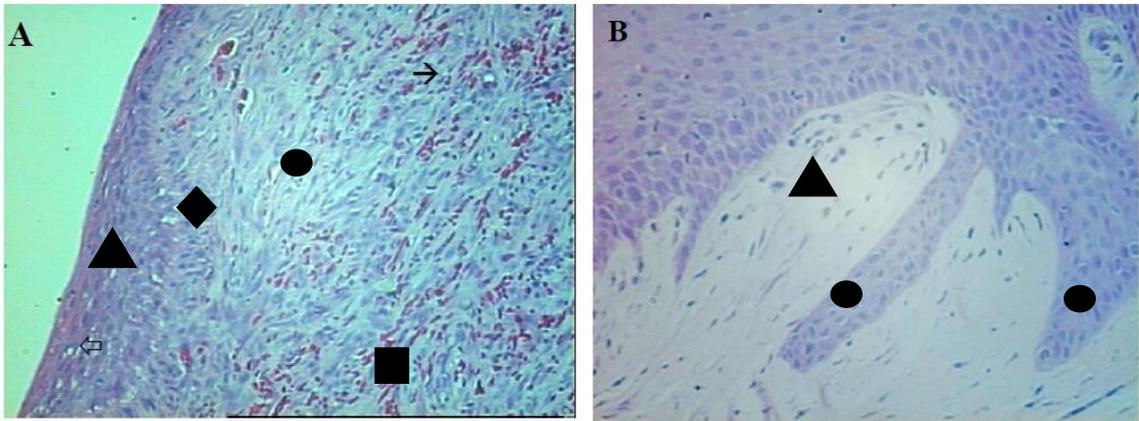


Figura 5 - Fotomicrografias histológicas das áreas de implantação da mucosa oral autógena em córnea canina. (A) Presença de epitélio espesso (▲) com vacuolização de células de camadas intermediárias e inferiores (◆), intensa fibroplasia (●) e intensa atividade angiogênica (■) no 15º dia de pós-operatório (125X - HE); (B) Epitélio compacto com projeções ao estroma (●) e tecido conjuntivo bem organizado com ausência de vasos sanguíneos (▲) no 60º dia de pós-operatório (125X - HE).

Fonte: Damasceno *et al.*, 2004

A mucosa oral autógena é uma boa alternativa para reparação do tecido corneano. Por se comportar de forma similar aos enxertos de conjuntiva ocular (MELO *et al.*, 2009) dá suporte para que a córnea consiga se reconstruir (DAMASCENO *et al.*, 2004). É um método simples, de fácil coleta e sem prejuízos ao animal, desde que este não apresente lesões na mucosa oral (MELO *et al.*, 2009). Porém, o tecido não apresenta tendência à transparência, deixando opacidade cicatricial no sítio de implantação (DAMASCENO *et al.*, 2004; NISHIDA *et al.*, 2004) devido à presença de tecido fibroso subepitelial (NISHIDA *et al.*, 2004) (Figura 6).



Figura 6 – Imagem de olho de cão 60 dias do pós-operatório. Neovascularização e opacidade corneanas em grau leve.

Fonte: Damasceno *et al.*, 2004

6 PERITÔNIO

O uso de peritônio homólogo conservado em glicerina foi descrito pela primeira vez na oftalmologia veterinária por Garcia *et. al.* (1996). O tecido foi utilizado experimentalmente para reparação de lesões superficiais em 14 córneas de sete cães.

Para criar o leito receptor foi realizada ceratectomia lamelar, ultrapassando 1/3 da espessura da córnea, com 0,4 x 0,5 mm de tamanho. O peritônio conservado em glicerina foi hidratado em solução salina e então fixado na lesão criada com a face parietal voltada para o estroma, utilizando fio de nylon 7-0 e 9-0 em sutura simples interrompida (GARCIA *et. al.*, 1996).

Nas avaliações clínicas durante o período pós-operatório notou-se principalmente a presença de blefarospasmo, quemose e edema de córnea, e em menor intensidade foram observados prurido, congestão conjuntival e secreção mucopurulenta, todos sinais regrediram e no 32º dia já não se observavam muitas alterações. Porém, neovascularização da córnea e proliferação de vasos conjuntivais foram notados e mantiveram-se presentes até os 60 dias de observação. Além destes sinais pós-operatórios uma córnea apresentou pigmentação aos 60 dias (GARCIA *et. al.*, 1996).

Para análise histológica das córneas realizou-se enucleação após a eutanásia dos animais. No primeiro dia de avaliação já havia sinais de epitelização da periferia do tecido na córnea e presença discreta de infiltrado de polimorfonucleares. Aos sete dias o infiltrado inflamatório ainda estava presente e nesta fase o enxerto já estava epitelizado por completo. Aos 17 dias o enxerto começou a ser reabsorvido, foi notada a presença de neovasos e o infiltrado inflamatório era composto por células mononucleares. Aos 32 dias não havia mais processo inflamatório e o enxerto já estava completamente coberto pelo epitélio e estroma da córnea. Na córnea que apresentou pigmentação macroscopicamente, pode ser notado microscopicamente presença de pigmento impregnado no estroma corneano aos 60 dias de pós-operatório (GARCIA *et. al.*, 1996).

Embora o enxerto tenha mantido sua opacidade durante o período estudado, não se observou nenhum sinal de rejeição. Além disso, o peritônio homólogo é um material de fácil obtenção, conservação e manipulação, sendo uma técnica alternativa para a reparação de lesões superficiais da córnea de cães (GARCIA *et. al.*, 1996).

7 ESCAMA DE SARDINHA

A escama de sardinha é um material inerte, transparente, de espessura fina, flexível (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000) e composta por colágeno tipo I (HAMADA; KUMAGAI, 1988), o que possibilita seu uso em cirurgias reparativas da córnea. É um material de fácil obtenção e preservação em glicerol 98 %, meio barato e eficiente na preservação de tecidos (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000).

O uso de escama de sardinha conservada em glicerol na superfície ocular foi descrito por Laus, Ferreira e Andrade (2000). O tecido foi utilizado experimentalmente para reparação de lesões criadas na superfície corneana de 14 cães (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000).

Para o procedimento cirúrgico foram criadas lesões superficiais na córnea dos animais com auxílio de um trépano de 6 mm de diâmetro. Para a utilização da escama de sardinha esta foi previamente hidratada para então ser suturada na córnea com fio de *nylon* monofilamentoso 9-0 no padrão simples interrompido, penetrando os pontos primeiramente na córnea e depois na escama, evitando que esta se rompesse. Além deste procedimento realizado em 12 cães, optou-se por realizar enxertia interlamelar em 2 cães, realizando um corte na região temporal superior do limbo e introduzindo a escama no estroma. Assim foi possível avaliar também se as reações ocorridas no pós-operatório não eram provenientes de uma resposta inflamatória aos fios utilizados na sutura dos demais (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000).

Nas avaliações clínicas durante o período pós-operatório, realizadas do primeiro ao 60º dia, notou-se a presença de fotofobia, secreção mucosa e blefarospasmo nos períodos iniciais e intermediários, discreto edema de córnea e neovascularização nas fases intermediárias. As áreas de leucoma restringiram-se às do enxerto, não houve sinais de inflamação intra-ocular e nem qualquer sinal que indicasse rejeição da membrana implantada (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000).

Nas avaliações histológicas foi possível notar proliferação epitelial e estromal nos bordos da membrana na segunda semana do pós-operatório, assim como a presença de neovasos e discreto infiltrado inflamatório mononuclear. Aos 30 dias o enxerto estava recoberto pelo estroma e epitélio corneanos, havia mais neovasos, fibrose e ainda a presença das células mononucleadas. A diminuição do processo inflamatório na córnea se deu aos 60 dias após o procedimento cirúrgico. Nos animais que fizeram o procedimento intralamelar foi

notada pouca reação inflamatória, tendo a presença de pouco edema de córnea e aos 14 dias presença de neovasos fantasmas que regrediram posteriormente (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000).

A escama de sardinha cumpre a função de reparação tectônica de lesões superficiais da córnea de cães. O tecido implantado foi bem aceito pelas córneas do experimento, tendo uma resposta inflamatória mínima, resultando em um leucoma apenas no local da lesão (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000) (Figura 7).

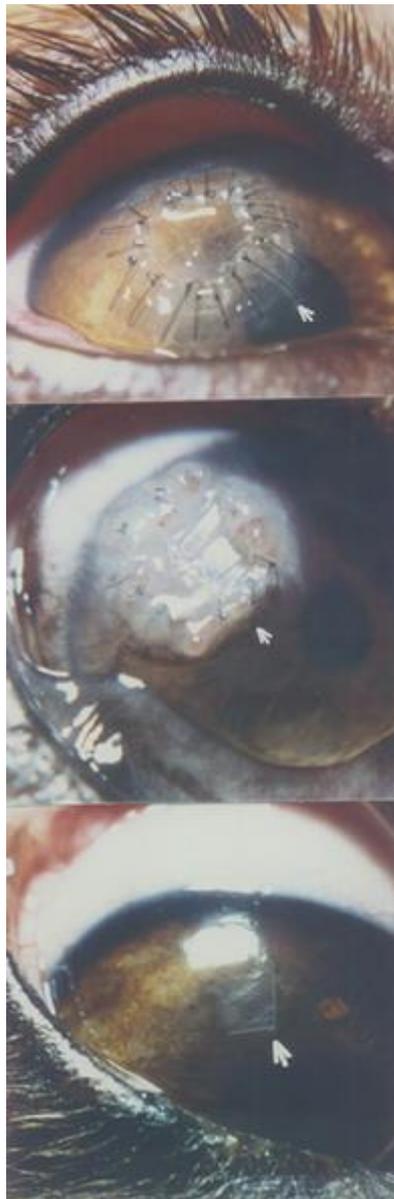


Figura 7 - Córneas que receberam escama de sardinha preservada em glicerina. (A) Primeiro dia de pós-operatório. (B) 60 dias de pós-operatório, padrão reacional pouco significativo com sepultamento do implante e dos fios de sutura. Há neovasos discretos e cicatriz corneana nas áreas da prótese. (C) 30 dias após a enxertia interlamelar. Córnea e prótese translúcidas, ausência de neovasos ou pigmentos.

Fonte: Laus; Ferreira; Andrade, 2000.

8 TÚNICA VAGINAL

O uso da túnica vaginal na ceratoplastia lamelar em cão foi relatado por Galera, Laus e Ferreira (2000). Realizou-se um estudo experimental com 14 cães, clinicamente saudáveis e sem alterações oculares. Para a obtenção da membrana realizou-se uma incisão cranial no escroto para a exteriorização do testículo e então a retirada de um fragmento da túnica vaginal de 6 mm de diâmetro. O fragmento foi mantido em solução salina até sua utilização na córnea.

Com o auxílio de um microscópio cirúrgico a córnea foi trepanada, criando uma lesão de 5 mm de diâmetro, para então receber o disco de túnica vaginal retirado anteriormente. Este foi suturado na córnea com fio de nylon 9-0 com padrão simples interrompido (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000).

Os animais foram avaliados diariamente até o 120° dia pós-operatório. Foram observados desconforto ocular, fotofobia, blefarospasmo, descarga ocular mucosa, hiperemia conjuntival e quemose que foram regredindo progressivamente. Edema foi observado nas regiões próximas ao enxerto, sendo mais intenso na segunda semana pós-operatória. Neovascularização foi observada primeiramente no sétimo dia pós-operatório, tornando-se intensa na segunda semana, regredindo posteriormente, até apresentar-se de forma leve no 120° dia. Pigmentação corneana foi observada nas regiões próximas da região onde o tecido havia sido implantado, aumentando durante os dias de avaliação, estando presente de forma moderada no 120° dia. No último dia de avaliação também foi notado a presença de cistos de retenção (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000) (Figura 8).

O uso da túnica vaginal na córnea de cães tem um baixo custo e resultados satisfatórios. Embora haja a presença de cicatriz, a transparência da córnea em áreas adjacentes foi mantida, possibilitando a visão dos cães após o experimento (GALERA; LAUS; FERREIRA, 2000).

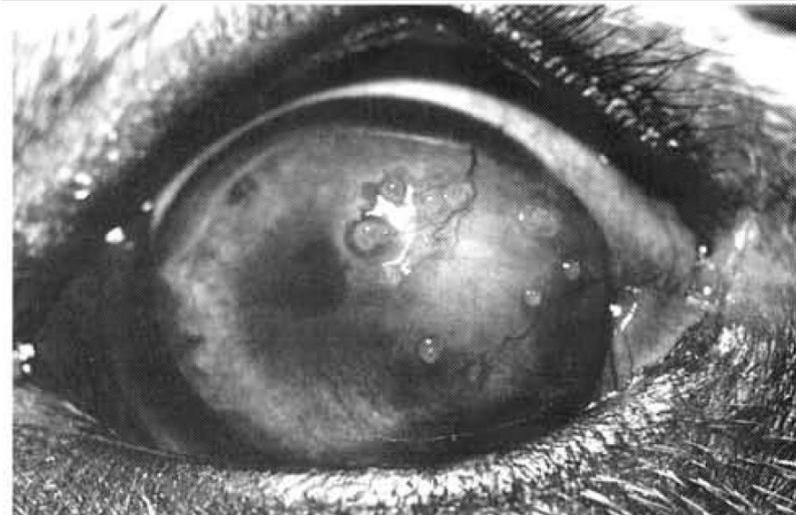


Figura 8 – Córnea de cão 120 dias após ceratoplastia lamelar com implantação de túnica vaginal. Discreta opacidade, pigmentação na área do enxerto e cistos de retenção.

Fonte: Galera; Laus; Ferreira, 2000.

9 PERICÁRDIO

O pericárdio é composto por camadas, sendo uma delas a serosa com a presença de células mesoteliais, e outra a fibrosa de natureza de colágeno e elastina (LI *et al.*, 2011).

O primeiro estudo com a utilização de pericárdio para reparação da córnea em animais foi executado por Barros *et al.* (1995). Tratava-se do uso deste tecido oriundo de um equino e conservado em glicerol (BARROS *et al.*, 1995). Após esta pesquisa inicial, outros estudos foram realizados com a utilização deste material (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999) e também com o uso de pericárdio canino conservado em glicerol (HÜNNING *et al.*, 2009), e pericárdio bovino desidratado com utilização de solvente (DULAURENT *et al.*, 2014).

É um tecido bem tolerado pela córnea (BARROS *et al.*, 1995; HÜNNING *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011) sendo uma opção para cirurgias reconstrutivas desta região ocular. É de fácil obtenção, utilização e armazenagem (BARROS *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2011).

9.1 Pericárdio Equino Conservado em Glicerol:

O pericárdio equino conservado em glicerol foi utilizado para reparação de córnea em casos de excisão de melanoma de limbo com comprometimento de todas as regiões da córnea no sítio da lesão (BARROS *et al.*, 1995), perfuração de córnea com prolapso de íris (BARROS *et al.*, 1995) e em dois estudos experimentais (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999)

Para obtenção do material utilizado como enxerto, o equino deve ter vindo a óbito por motivos não infecciosos e que não tragam danos ao tecido coletado. Após a obtenção do pericárdio o tecido adiposo adjacente é retirado e o restante é armazenado em glicerol 98%. Este material pode ser armazenado por 30 dias em temperatura ambiente após sua preparação. (BARROS *et al.*, 1995)

Para o uso da membrana deve-se reidratar-la em solução salina balanceada (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999). Durante o procedimento cirúrgico é necessário realizar primeiramente ceratectomia para retirada dos tecidos lesionados e posteriormente a implantação da membrana (BARROS *et al.*, 1995) previamente recortada com o tamanho da lesão criada, utilizando fio de propileno

7-0 em sutura simples interrompida (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999).

As complicações pós-cirúrgicas relatadas incluem: pressão intraocular baixa nos primeiros dias possivelmente pela uveíte anterior presente inicialmente; crescimento de tecido de granulação próximo ao enxerto regredindo após utilização de colírio de dexametasona; opacidade do enxerto (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999); miose, blefarospasmo e quemose nos primeiros dias; neovascularização (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999); edema de córnea nos primeiros 15 dias; sinéquia anterior em um caso (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997); e congestão conjuntival (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999).

Durante os estudos experimentais, Barros, Safatle e Rigueiro (1997 e 1999) realizaram análise histológica dos olhos que passaram pelo procedimento relatando a presença de processo inflamatório agudo nos primeiros dias, tornando-se crônico com presença de fibrose posteriormente (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999). No sexto dia já era possível observar epitelização do enxerto e ao 70º dia processo de endotelização (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997) (Figura 9).

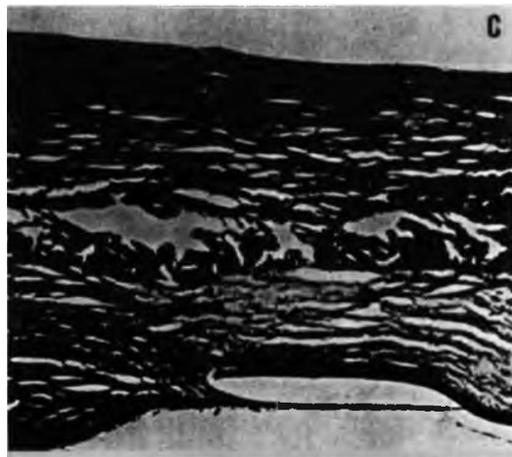


Figura 9 - Fotomicrografia de corte histológico da córnea e enxerto aos 70 dias de pós-operatório, mostrando o "sanduíche" de pericárdio (epitélio - estroma - pericárdio - estroma - endotélio) (HE-100x).

Fonte: Barros; Safatle; Rigueiro, 1997

Com a utilização do pericárdio equino conservado em glicerol não foram observadas reações de expulsão do tecido nem necrose (BARROS *et al.*, 1995), cumprindo o papel de selar a córnea evitando extravasamento do humor aquoso, sendo uma opção indicada para o tratamento de lesões corneanas superficiais (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999) e profundas (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997), mantendo a

funcionalidade da córnea, a visão e estética ocular (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999). A opacidade do enxerto continuou presente (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999) embora Barros, Safatle e Rigueiro (1997) relatarem uma pequena desopacificação em áreas periféricas da membrana implantada aos 70 dias de pós-operatório (BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997). A opacidade do tecido implantado não interferiu na visão dos animais, uma vez que as lesões se situavam em regiões periféricas da córnea (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999).

9.2 Pericárdio Canino Conservado em Glicerol:

Hünning *et al.* (2009) relataram a utilização de pericárdio homólogo conservado em glicerina em um cão com perfuração ocular na região da córnea. Para o procedimento cirúrgico os autores empregaram um trépano para recortar o tecido que será enxertado, este 0,5 mm maior que a lesão, pois este é pouco elástico evitando assim futuros problemas com a retração do mesmo. Após o recorte o pericárdio foi hidratado com solução salina estéril e suturado na córnea em sutura simples interrompida com fio de poliglactina 9-0 (HÜNNING *et al.*, 2009).

No pós-operatório observou-se a câmara interior refeita no primeiro dia; epitelização do enxerto aos 15 dias; intensa vascularização corneana, tecido de granulação e leucoma aos 30 dias (Figura 10), que com exceção do leucoma, regrediram aos 45 dias. Ao avaliar o paciente seis meses após o procedimento cirúrgico notou-se apenas a presença de leucoma no local do enxerto, preservando a integridade e funcionalidade do olho (HÜNNING *et al.*, 2009).

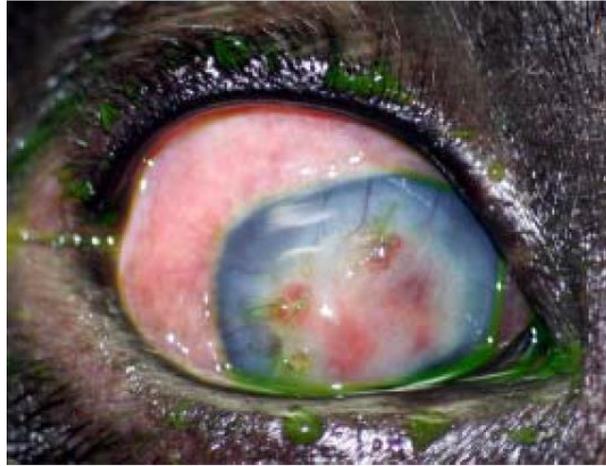


Figura 10 – Córnea de um cão trinta dias após a implantação da membrana biológica. Evidenciam-se neovasos e tecido de granulação sobre o local da perfuração. Observam-se hiperemia conjuntival e edema de córnea.

Fonte: Hünning *et al.*, 2009

9.3 Pericárdio Bovino Desidratado em Glutaraldeído:

O pericárdio bovino é amplamente utilizado no tratamento cirúrgico de diferentes doenças em humanos (DULAURENT *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2011). Há estudos também em oftalmologia humana, utilizando este tecido em lesões de córnea (DULAURENT *et al.*, 2014).

Em animais, Dulaurent *et al.* (2014) utilizaram membrana comercial de pericárdio bovino (Tutopatch®) em três cães com ceratomalácia, e em três gatos com sequestro de córnea (DULAURENT *et al.*, 2014).

As membranas comerciais de pericárdio bovino são compostas de colágeno e elastina. São livres de células, bactérias, vírus, fungo e DNA, uma vez que são esterilizadas (DULAURENT *et al.*, 2014). Para a obtenção destas membranas, o pericárdio, após extraído, é processado com utilização de glutaraldeído e baixa radiação, aumentando a resistência do tecido evitando a degradação e esterilizando o mesmo diminuindo a antigenicidade uma vez que elimina proteínas e DNA do tecido (LI *et al.*, 2011; MEDandCARE, 2017). Li *et al.* (2011) citaram em seu estudo que a membrana comercial de pericárdio bovino é exclusivamente composta de colágeno, assim, auxilia na proliferação e migração celular da córnea, dando suporte para uma regeneração tecidual (LI *et al.*, 2011; MEDandCARE, 2017).

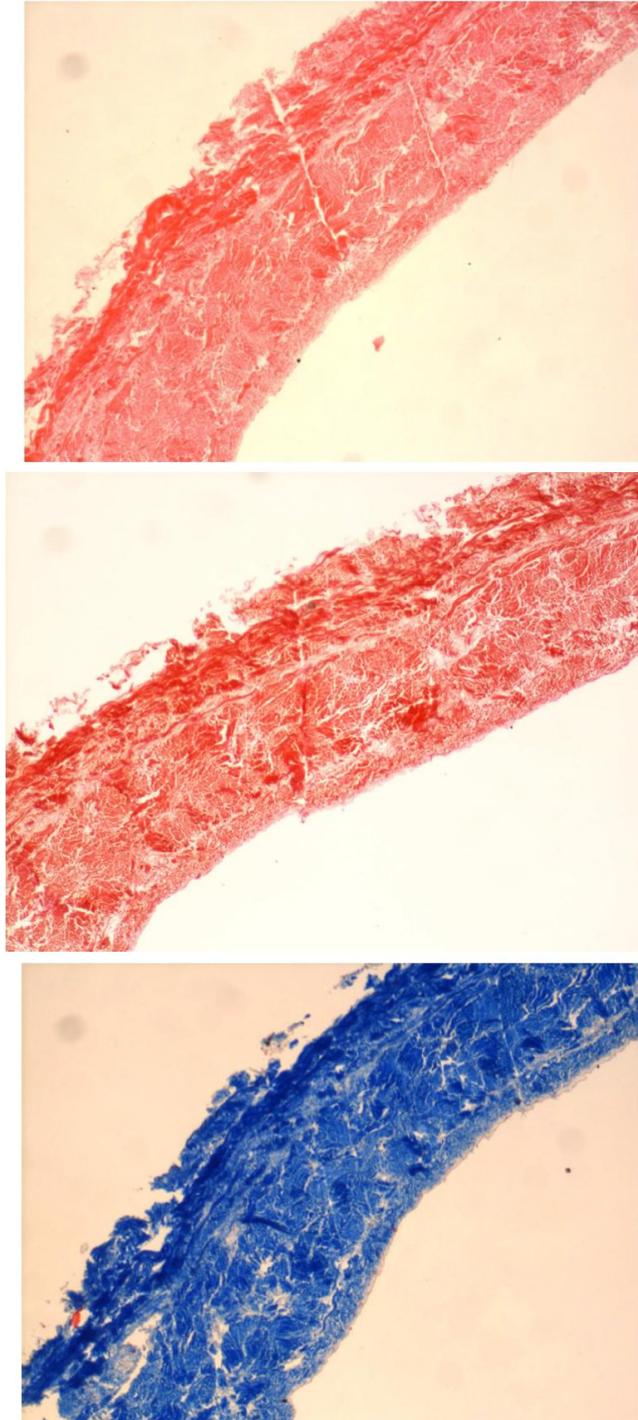


Figura 11- Membrana comercial de pericárdio bovino previamente à implantação, demonstrando a falta de células e elastina e a presença de colágeno. (A) Coloração H&E. Vermelho claro indicativo de colágeno. Não há células visíveis. (B) Coloração para elastina. Nenhuma elastina é visualizada. Vermelho escuro é indicativo de colágeno. (C) Coloração de tricômio. Azul escuro é indicativo de colágeno.

Fonte: Li *et al.*, 2011.

Durante o procedimento cirúrgico, para a preparação do leito receptor, são removidos os tecidos desvitalizados, necróticos e colagenolíticos. Então a membrana é recortada do mesmo tamanho da lesão criada durante a ceratectomia (DULAURENT *et al.*, 2014).

A membrana comercial deve ser marcada com uma caneta de córnea no seu lado liso para que possa ser identificado posteriormente, e então reidratada em uma solução de

gentamicina 4mg/ml por 1 min (DULAURENT *et al.*, 2014). É de extrema importância a eliminação total do glutaraldeído antes da utilização da membrana, evitando calcificações posteriores a implantação (LI *et al.*, 2011). Após à execução destes passos essenciais a membrana deve ser colocada sobre a lesão com o lado rugoso para baixo. Esta face do enxerto deve estar em contato com o estroma da córnea para criar adesão, facilitando a migração celular e a neovascularização da córnea. A membrana pode ser fixada com sutura simples interrompida, simples contínua ou sutura ancorada de Ford contínua com polyglactina 9/0 (DULAURENT *et al.*, 2014) (Figura 12).

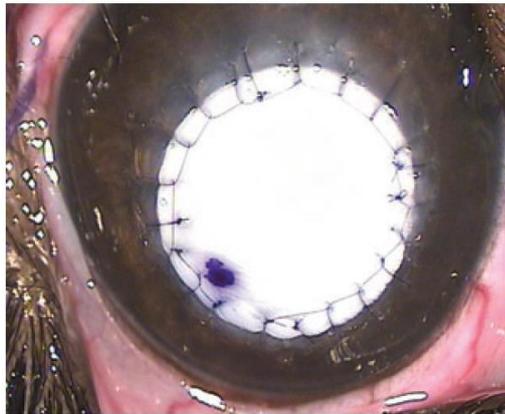


Figura 12 – Transoperatório de um cão após implantação do pericárdio bovino na córnea.
Fonte: Dulaurent *et al.*, 2014.

No estudo de Dulaurent *et al.* (2014), os pacientes foram avaliados nas semanas 1, 2, 4 e 8. E OCT foi realizado em um cão e um gato nas semanas quatro e oito para ver a assimilação do enxerto pela córnea (DULAURENT *et al.*, 2014).

Os autores dividiram o pós-operatório e regeneração da córnea em três fases. A primeira fase ocorre nas duas primeiras semanas, nas quais nota-se intensa vascularização na periferia da córnea. A segunda fase é marcada pela assimilação do enxerto pela córnea e a reepitelização da área afetada. Na terceira fase, entre três e quatro semanas após a cirurgia, há regressão dos vasos e a remodelação estromal, ganhando maior transparência da córnea (DULAURENT *et al.*, 2014).

Na primeira semana de pós-operatório notou-se neovascularização nas regiões adjacentes a implantação da membrana. Em um cão a ceratomalacia agravou-se causando uma perfuração ocular, neste paciente a membrana de pericárdio foi removida fazendo-se um pedículo conjuntival no local. Neste caso a bactéria presente possivelmente infectou a membrana também e a terapia antibiótica utilizada não foi suficiente para controlar a infecção. Um gato apresentou blefarospasmo e secreção ocular. Quatro semanas após o

procedimento, a vascularização estava regredindo, a membrana estava integrada na córnea, conferindo um início de transparência. Dois meses após a cirurgia, com exceção do cão que necessitou o pedículo conjuntival, as córneas estavam curadas e com uma cicatriz no foco da lesão (DULAURENT *et al.*, 2014) (Figura 13).



Figura 13 – Córnea de um cão dois meses após a implantação do pericárdio bovino.
Fonte: Dulaurent *et al.*, 2014.

Não foi observado recorrência do sequestro de córnea nos gatos, todos os pacientes mantiveram a visão no olho previamente afetado, com exceção do cão que teve progressão da ceratomalácia (DULAURENT *et al.*, 2014).

O exame de OCT de segmento anterior utilizado no estudo permite visualizar a interação entre o enxerto e o leito receptor (RAMOS; LI; HUANG, 2009; DULAURENT *et al.*, 2014). Com a OCT realizada em dois pacientes foi possível ver que na 4^o e na 8^o semana o enxerto havia sido assimilado pela córnea, o epitélio estava totalmente restaurado por cima da membrana implantada. Porém, a transição entre o enxerto e a córnea ainda era visível, sendo possível a distinção entre o colágeno endógeno e exógeno. Também observou-se que o estroma corneano se manteve mais fino (DULAURENT *et al.*, 2014) (Figura 14).

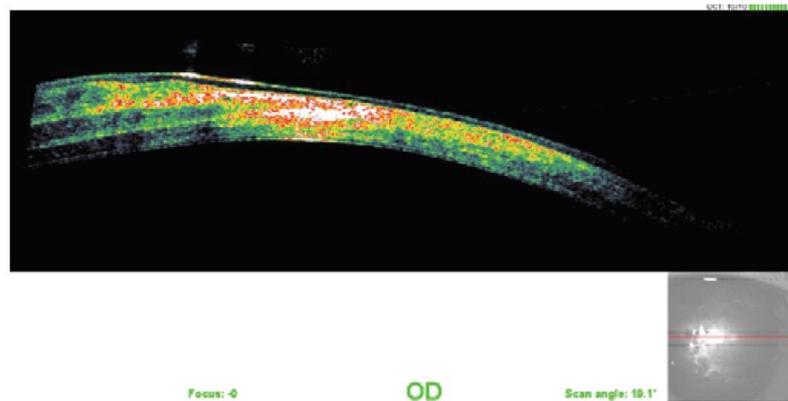


Figura 14 – OCT de uma córnea de gato 2 meses após a implantação do pericárdio bovino. O epitélio encontra-se normal, mas o estroma está mais fino na região do enxerto. A transição entre o colágeno endógeno e exógeno é visível.

Fonte: Dulaurent *et al.*, 2014.

O uso do pericárdio bovino em apresentação comercial, amplamente utilizados em outras áreas da medicina humana (DULAURENT *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2011), mostrou-se uma ótima opção para reconstrução cirúrgica de lesões corneanas nestes estudos (DULAURENT *et al.*, 2014).

10 SUBMUCOSA DE INTESTINO DELGADO SUÍNO (SIS)

A submucosa de intestino delgado suíno é um material a base de colágeno. Possui três camadas: túnica muscular mucosa, túnica mucosa e estrato compacto da túnica mucosa (BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001). Sendo a muscular mucosa o lado áspero da membrana e o estrato compacto da túnica mucosa a superfície mais lisa (BUSSIERES *et al.*, 2004).

É um tecido translúcido, poroso, biodegradável, não imunogênico (possivelmente porque a molécula de colágeno possui uma estrutura semelhante nas diversas espécies) e possui excelente capacidade regenerativa (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001), e embora muitos autores citem que a membrana é acelular (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007; GOULLE, 2012; LEWIN, 1999), Zheng *et al.* (2005) relata que há uma quantidade abundante de células na membrana, possivelmente fibroblásticas e mastócitos entre as fibras de colágeno, as quais, mesmo em pequena quantidade, podem vir a gerar uma resposta inflamatória após a implantação na córnea.

Seu uso tem aumentado, ganhando popularidade nos últimos anos pela utilização em diversos tecidos, entre eles o globo ocular (BUSSIERES *et al.*, 2004). O fato da membrana ser translúcida traz vantagens pra cirurgias de córnea, uma vez que manter a transparência é algo desejável para a manutenção da visão. E por ser porosa permite o uso de medicamentos oftálmicos tópicos no pós-operatório (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001).

A membrana SIS é basicamente proteína, com carboidratos e lipídios. Composta por colágeno (tipo I, III, VI), glicaminoglicanos (ácido hialurônico, sulfato de condroitina A e B, heparina e sulfato de heparano), proteoglicanos e glicoproteínas (BADYLAK, 1993 *apud* BUSSIERES *et al.*, 2004). Além disso, contém fatores de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) e de transformação do crescimento beta (TGF- β) (VOYTIK-HARBIN *et al.*, 1997; MCDEVITT; WILDEY; CUTRONE, 2003), importantes para a reconstrução do tecido que recebe o implante, induzindo mitose nas células epiteliais, endoteliais e estromais (VANORE *et al.*, 2007). O TGF- β também age como inibidor da síntese de colagenases e estimula a deposição da matriz extracelular (VANORE *et al.*, 2007).

Ao se implantar a SIS em outro tecido, ela dá suporte (KROPP *et al.*, 1996; BUSSIERES *et al.*, 2004; SANDUSKY *et al.*, 1992) e estimula uma resposta inflamatória

local fazendo com que o tecido original consiga se regenerar, fazendo com que a membrana antes ali presente tome as características histológicas do tecido original (BADYLAK, 1993 *apud* BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; SANDUSKY *et al.*, 1992). A epitelização da membrana na córnea ocorre possivelmente por ser essencialmente de colágeno, tendo a capacidade de mimetizar a superfície estromal (BUSSIERES *et al.*, 2004).

Para obtenção desta membrana comercial se usa parte do jejuno suíno, e retira-se por abrasão o tecido mesentérico, túnica mucosa, túnica muscular e túnica serosa. Células endoteliais e fibrócitos remanescentes são retirados por lise, com uma solução hipotônica, restando em maior quantidade o colágeno. (VOYTIK-HARBIN *et al.*, 1997). A membrana é então liofilizada, tendo aproximadamente 100 μ m de espessura e posteriormente é esterilizada, eliminando os riscos de transmissão de doenças (BUSSIERES *et al.*, 2004), sendo vendida comercialmente (Vetrix® BioSIS) (VETRIX, 2017).

O primeiro relato de utilização da membrana SIS na córnea e esclera foi um caso de melanoma límbico em um pastor alemão (LEWIN, 1999). Se tratava de uma massa de aproximadamente oito mm de diâmetro e havia presença de degeneração lipídica na córnea e pigmentação da conjuntiva em volta da lesão. Estudos posteriores abordaram o uso da membrana SIS em úlceras de córnea por trauma, infecção ou corpo estranho (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; GOULLE, 2012), *melting* (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007; GOULLE, 2012), descemetocelose (GOULLE, 2012), sequestro de córnea (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; GOULLE, 2012), perfuração ocular (BUSSIERES *et al.*, 2004; GOULLE, 2012) e após excisão de melanocitoma epibulbar (BUSSIERES *et al.*, 2004).

Em todos os casos, anteriormente à aplicação da membrana, foram retirados tecidos desvitalizados, alterações como sinéquias e massas presentes (BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007).

Para a preparação da SIS a ser implantada recomenda-se recortar a membrana assepticamente, fazendo um disco de aproximadamente 1 – 1,5 mm maior que a lesão. A membrana deve ser reidratada em solução salina estéril. Posteriormente, fixada com sutura simples com pontos interrompidos ou contínuos com fio polyglactina 8, 9 ou 10/0 (BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007; LEWIN, 1999) (Figura 15). Pode ser colocada em única ou múltiplas camadas,

dependendo da profundidade da lesão (GOULLE, 2012). A face áspera da membrana deve estar em contato com a córnea, sendo essa a túnica mucosa. (BUSSIERES *et al.*, 2004; GOULLE, 2012; LEWIN, 1999).

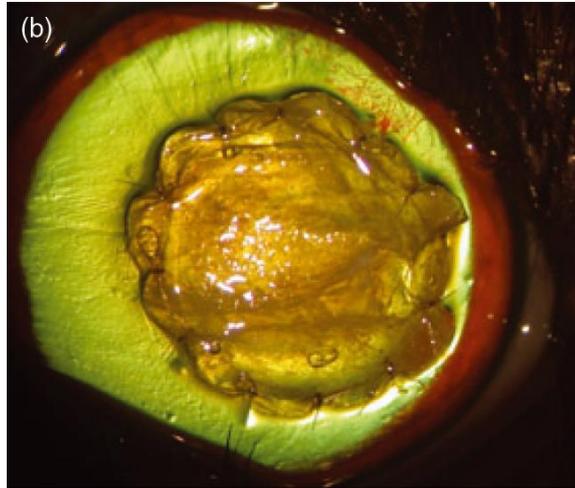


Figura 15 – Imagem do olho de um felino após ceratectomia lamelar anterior para remoção de sequestro de córnea. Observa-se implantação da membrana SIS na córnea.

Fonte: Goulle, 2012.

Após a colocação da membrana SIS, pode-se fazer uso de um pedículo conjuntival (BUSSIERES *et al.*, 2004; LEWIN, 1999), tendo como vantagens suporte estrutural e sanguíneo, porém deixam um leucoma residual (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001). Há relatos também do uso de um *flap* de terceira pálpebra a ser retirado de 2 a 3 semanas após o procedimento (VANORE *et al.*, 2007; GOULLE, 2012), protegendo a membrana e mantendo-a hidratada, porém impedindo a visualização do progresso da lesão (GOULLE, 2012). Featherstone, Sansom e Heinrich (2001) fizeram o uso de lentes de contato em 3 pacientes, para diminuir o desconforto, sendo retiradas de três a cinco dias após a cirurgia.

Todos os estudos relataram em grande maioria dos casos uma gradual assimilação do material implantado, resultado em córneas com pouca vascularização e cicatrizes, com um efeito cosmético e o acesso visual satisfatórios (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007; LEWIN, 1999; BUSSIERES *et al.*, 2004; GOULLE, 2012) (Figura 16). As complicações relatadas incluíram: desconforto pós operatório (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001); edema de córnea (LEWIN, 1999); hiperemia (LEWIN, 1999); neovascularização, (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001; VANORE *et al.*, 2007; LEWIN, 1999); extravasamento ocular, possivelmente devido a emprego de técnica operatória inadequada, resolvido com a colocação de um pedículo conjuntival (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001) e em outro caso com a

colocação de uma nova camada de SIS e então o pedículo (BUSSIERES *et al.*, 2004); continuação da destruição estromal da córnea após a implantação da membrana em um caso de *melting*, com necessidade de enucleação do olho afetado posteriormente (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001); pigmentação transitória do enxerto em casos de sequestro de córnea em gatos (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001); pigmentação na córnea (BUSSIERES *et al.*, 2004; GOULLE, 2012); sinéquia (BUSSIERES *et al.*, 2004; VANORE *et al.*, 2007; LEWIN, 1999); catarata (BUSSIERES *et al.*, 2004); presença de fibrina na câmara anterior (BUSSIERES *et al.*, 2004); deiscência de sutura do pedículo conjuntival (BUSSIERES *et al.*, 2004); integralização parcial transitória da membrana (GOULLE, 2012); formação de um novo sequestro de córnea (GOULLE, 2012).



Figura 16 – Córnea de um gato sete semanas após a implantação da SIS, com moderada opacidade e neovascularização corneana.

Fonte: Featherstone; Sansom; Heinrich, 2001

Embora Featherstone, Sansom e Heinrich (2001) tenham comentado que o uso da SIS deve ser evitado em casos de atividade colagenásicas, Vanore *et al.* (2007) relataram ótimos resultados em casos de *melting*. Porém deve ser realizado um extenso debridamento das partes necróticas, uma vez que é necessário que a córnea circundante seja saudável para que possa suportar o implante (GOULLE, 2012; VANORE *et al.*, 2007; BUSSIERES *et al.*, 2004).

O fato de alguns pacientes desenvolverem mais neovascularização da córnea deve estar associado às diferenças individuais, à doença, ao tamanho da lesão, ao procedimento cirúrgico e/ou à reação ao material utilizado, e não à uma reação imunológica à SIS propriamente dita (BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001). Há também a hipótese de que a vascularização seja induzida pela degradação da membrana na córnea (LEWIN, 1999). Embora um pouco de vascularização seja benéfico para

a regressão da lesão, enxertos grandes, próximos ao limbo e com muita vascularização tem maior chance de serem rejeitados (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001).

Em alguns casos de sequestro de córnea, a membrana assumiu a cor marrom (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001). Possivelmente a membrana absorveu o mesmo pigmento presente no sequestro, já que a SIS tem propriedades que a faz tornar-se o tecido onde é implantada (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001). Por isso, para a utilização da membrana nestes casos, deve-se fazer uma excisão completa do tecido afetado, caso isso não seja possível, o uso deste material deve ser evitado (FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001 GOULLE, 2012).

A pigmentação da córnea foi relatada por Goulle (2012) em cães braquiocefálicos, com lesões de córnea severas, que já apresentavam este sinal antes do procedimento cirúrgico. O autor salientou que a membrana pode ser utilizada nestes pacientes, porém deve ser de conhecimento do veterinário que a pigmentação da córnea pode piorar após a cirurgia.

Vanore *et al.* (2007) citaram que há três fases importantes para integração da membrana SIS e a cicatrização da córnea, sendo elas: 1- A neovascularização da córnea, que é o primeiro passo para integração dos tecidos, possivelmente estimulado pela presença de fatores de crescimento presentes na SIS e na córnea. 2- A proliferação de tecido epitelial e estromal. 3- A remodelagem da matriz extracelular. Inicialmente, após a colocação da membrana SIS, há uma invasão de fibroblastos, que posteriormente são substituídos por células estromais, deixando a córnea transparente e íntegra.

A SIS é um material relativamente barato, de fácil manipulação e conservação, e com bons resultados quando utilizada na córnea de cães e gatos, sendo um produto seguro e uma alternativa às membranas biológicas aplicadas na oftalmologia veterinária (BUSSIERES *et al.*, 2004; FEATHERSTONE; SANSOM; HEINRICH, 2001), podendo ser aplicada em defeitos maiores do que outras técnicas cirúrgicas normalmente aplicadas e sem o risco de rejeição que pode ocorrer com outros transplantes (LEWIN, 1999). Conferindo uma córnea transparente e com sua integridade preservada, mantendo assim a visão (VANORE *et al.*, 2007).

11 BEXIGA SUÍNA

A membrana de bexiga suína é ideal para transplantes, sendo um tecido acelular (BALLAND *et al.*, 2015), com fatores de crescimento e colágeno da matriz extracelular da bexiga (MANCUSO; LASSALINE; SCHERRER, 2014), promovendo resistência tecidual para o leito receptor e pouca resposta imune (BALLAND *et al.*, 2015). A membrana promove proliferação e regeneração celular, e então é degradada fazendo com que não haja grandes cicatrizes (MANCUSO; LASSALINE; SCHERRER, 2014). Pode ser utilizada como uma alternativa à técnica de pedículo conjuntival quando a lesão é muito grande e seria necessária grande quantidade de conjuntiva e quando se busca maior transparência da córnea no pós-operatório (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

Este tecido possui duas faces, a superior é a membrana basal, composta por uma matriz acelular sendo uma barreira entre o epitélio e outros tecidos, e a outra face é a túnica própria e uma matriz colágena acelular, propícia para a integração dos tecidos receptores. Quando vendida comercialmente (AcellVet™) a membrana vem com uma indicação de segurança no lado direito para a identificação de cada face (BALLAND *et al.*, 2015; ACELL, 2017) (Figura 17).



Figura 17 – Membrana de bexiga suína. O triângulo demarcado deve ficar à direita do cirurgião, garantindo que a túnica própria da membrana esteja voltada para baixo.

Fonte: Chow; Westermeyer, 2015

A membrana de bexiga suína da marca *ACell Vet Corneal Discs*™ é disponibilizada em discos de 15 mm de diâmetro. A espessura média da membrana desidratada é de $147.50 \mu\text{m} \pm 12.5 \mu\text{m}$ e após a hidratação necessária previamente à implantação mede $265 \mu\text{m} \pm 22.5 \mu\text{m}$ (BALLAND *et al.*, 2015), essa variação acontece pois o processo de fabricação da membrana é manual (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

Este enxerto já foi utilizado para úlceras severas de córnea (CHOW; WESTERMEYER, 2015; BALLAND *et al.*, 2015), úlceras contaminadas por *Streptococcus* spp, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, úlceras causadas por queimadura química e aranhões de gato (BALLAND *et al.*, 2015) e sequestro de córnea (CHOW; WESTERMEYER, 2015; BALLAND *et al.*, 2015).

Deve-se realizar ceratectomia para retirada dos tecidos necróticos, infectados e/ou pigmentados (CHOW; WESTERMEYER, 2015; BALLAND *et al.*, 2015). O enxerto desidratado é então recortado 0,5 mm maior que a lesão em casos em que esta é menor que 8 mm (BALLAND *et al.*, 2015) e 1 mm maior em casos que a lesão tenha diâmetro superior à 8 mm, para diminuir o risco de rupturas da membrana ao realizar a sutura (CHOW; WESTERMEYER, 2015; BALLAND *et al.*, 2015). É necessário reidratar a membrana com solução salina para então suturá-la no leito receptor com polyglactina 9-0 ou 10-0 em padrão simples interrompido ou contínuo (CHOW; WESTERMEYER, 2015; BALLAND *et al.*, 2015). A túnica própria deverá estar voltada para o estroma corneano, o triângulo presente como marcação de segurança deve estar à direita do cirurgião com a hipotenusa voltada para cima (CHOW; WESTERMEYER, 2015). Balland *et al.* (2015) utilizaram duas camadas de enxerto em lesões mais profundas que 1/3 da córnea. Recomenda-se o uso de *flap* de terceira pálpebra por 18 dias (BALLAND *et al.*, 2015) ou uso de lentes de contato (CHOW; WESTERMEYER, 2015), para a proteção mecânica e para que o enxerto não desidrate. A vantagem da utilização da lente de contato é que permite a visualização da córnea, podendo acompanhar a evolução após a cirurgia (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

Balland *et al.* (2015) dividiram a cicatrização da córnea dos animais estudados em fases, sendo a primeira a neovascularização centrípeta, a segunda marcada pela progressiva neovascularização juntamente com a epitelização da córnea, e a última fase é a regressão dos vasos presentes na córnea e a remodelação do estroma visando a transparência.

Balland *et al.* (2015) relataram uma taxa de sucesso no tratamento de sequestro de córnea em gatos de 100%, e em úlceras de córnea de 96% em cães e 86% em gatos. Um de 28 cães e um de sete gatos apresentaram deiscência de sutura do enxerto, mesmo com a presença do *flap* de terceira pálpebra, estes animais apresentaram extravasamento do humor aquoso necessitando intervenção cirúrgica para a realização de um pedículo conjuntival, recobrando o enxerto anterior (BALLAND *et al.*, 2015). Chow e Westermeyer (2015) relataram que três de 88 olhos operados necessitaram um segundo enxerto pois o primeiro desintegrou-se. Cinco

casos desenvolveram phthisis bulbi, glaucoma ou foram enucleados, todos estes possuíam perfuração ocular anteriormente com encarceramento da íris. Os autores citaram ainda que 93% dos casos resultaram em conforto ocular para o paciente e destes, 87% dos casos tiveram a visão mantida (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

No estudo de Balland *et al.* (2015), a epitelização da córnea foi completa na maioria dos casos aos 18 dias, não foram notados sinais de recidiva de sequestro de córnea aos 90 dias de pós-operatório e ao final do estudo todos animais tiveram a membrana totalmente integrada a córnea, mostrando que é um material seguro e uma boa alternativa para cirurgias reparativas de córnea.

As córneas mantiveram-se íntegras e com diferentes graus de opacidade no local enxertado em ambos estudos (CHOW; WESTERMEYER, 2015; BALLAND *et al.*, 2015), sendo que a cicatriz em cães ficou mais aparente que em gatos (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

Chow e Westermeyer (2015) informam que com a utilização da membrana de bexiga suína foram observados mais casos de deiscência de sutura que outras técnicas que podem ser empregadas em lesões de córnea. Estes casos podem ocorrer pelo extravasamento de humor aquoso, incorreto debridamento dos tecidos necróticos anteriormente à implantação do enxerto, suturas incorretas e com muita tensão, infecção e contração do tecido implantado (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

A membrana de bexiga suína é uma boa alternativa para cirurgias reparativas da córnea, podendo ser utilizada em lesões de qualquer tamanho e profundidade. Em gatos traz resultados mais promissores que em cães, com grande transparência e com complicações semelhantes que as que ocorrem com outras técnicas cirúrgicas (CHOW; WESTERMEYER, 2015) (Figura 18).



Figura 18 – Córnea de gato 90 dias após o procedimento cirúrgico com moderada cicatriz corneana.
Fonte: Balland *et al.*, 2015.

Ao se comparar a membrana de bexiga com a membrana de intestino suíno, a desenvolvida a partir de bexiga é mais resistente e espessa e por isso, de melhor manipulação sendo mais difícil o rompimento e enrolamento da membrana durante sua aplicação. A membrana de bexiga também é disponível comercialmente em discos maiores, o que permite seu uso em lesões corneanas mais extensas (CHOW; WESTERMEYER, 2015). Enquanto a membrana de bexiga possui grande variação em sua espessura o que pode dificultar sua utilização (BALLAND *et al.*, 2015), a membrana SIS é mais estável pela sua forma de padronização no processamento e esterilização, além de possuir fatores de crescimento que auxiliam a regeneração corneana (VOYTIK-HARBIN *et al.*, 1997; MCDEVITT; WILDEY; CUTRONE, 2003; VANORE *et al.*, 2007; CHOW; WESTERMEYER, 2015), presentes também na bexiga (MANCUSO; LASSALINE; SCHERRER, 2014) mas não bem descritos (CHOW; WESTERMEYER, 2015).

12 MEMBRANA AMNIÓTICA

A membrana amniótica é camada mais interna da membrana fetal, e é composta por três camadas, sendo elas a camada epitelial, membrana basal e matriz estromal (DE ROTH, 1940; FERNANDES *et al.*, 2005), sendo o lado epitelial mais liso que o estromal (DUA *et al.*, 2004). É um tecido translúcido, com atividade anti-inflamatória, antiangiogênica (FERNANDES *et al.*, 2005) e antimicrobiana (TALMI *et al.*, 1991). Possui grande quantidade de colágeno e fatores de crescimento epiteliais, reduzindo o processo de cicatrização durante a reconstrução da superfície ocular e favorecendo a epitelização corneana (DE ROTH, 1940; PLUMMER, 2009; DUA *et al.*, 2004) uma vez que substitui propriedades da membrana basal corneana, melhorando sua transparência (KIM; TSENG, 1995).

Ao se implantar a membrana amniótica na córnea, a membrana basal do enxerto atua dando suporte para a epitelização corneana (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; DE ROTH, 1940). Esta camada é basicamente composta por colágenos tipo I, II, III, IV, V e VII, elastina, fibronectina e integrinas. A matriz estromal é rica em ácido hialurônico que regula o TGF- β corneano, suprimindo a proliferação e diferenciação de miofibroblastos, reduzindo a fibrose cicatricial (HOPKINSON *et al.*, 2006). Há também supressão da expressão de citocinas inflamatórias, reduzindo o aparecimento de fibrose e neovascularização (DUA *et al.*, 2004; DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; DE ROTH, 1940). Na camada epitelial da membrana há trombospondina 1, fator antiangiogênico (FERNANDES *et al.*, 2005). A membrana amniótica também contém cistatina E que atua como antimicrobiano, evitando infecções no pós-operatório (TALMI *et al.*, 1991).

As principais indicações do uso de membrana amniótica são para a reconstrução da superfície ocular em casos de: simbléfaro, neoplasia da superfície ocular, úlceras profundas, úlceras de difícil cicatrização, perfuração ocular, descemetocel, ceratites infecciosas, entre outras (PLUMMER, 2009).

Barros *et al.* (1995) foram os pioneiros no estudo desta membrana na oftalmologia veterinária, realizando um estudo experimental em cães.

12.1 Coleta, preparação e armazenamento da membrana amniótica

Para a obtenção de membranas amnióticas humanas, placentas devem ser doadas por pacientes clinicamente saudáveis que realizaram uma cesariana não contaminada. Estas pacientes devem ser negativas para doenças transmissíveis (ADDS *et al.*, 2001). O processamento do material é feito de maneira estéril e então mantido em bancos (DE ROTH, 1940; DUA *et al.*, 2004; DUA; AZUARA-BLANCO, 1999). Quando empregada a membrana amniótica equina, a placenta é obtida principalmente de éguas saudáveis sem histórico de doenças transmissíveis submetidas à cesariana, por ser mais abundante e de manipulação mais fácil se comparada a cães e gatos (PLUMMER, 2009; BARROS *et al.*, 1998).

Após a obtenção da placenta, coágulos de sangue devem ser removidos com solução fisiológica 0,9% (DE ROTH, 1940; DUA *et al.*, 2004). Faz-se a separação da membrana amniótica do córion (KIM; TSENG, 1995) e coloca-se a membrana em papel de nitrocelulose estéril com o epitélio voltado para cima. O papel contendo a membrana é mergulhado três vezes em solução contendo 1.000 UI/ml de penicilina, 20 mg/ml de estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B, e então seccionado em discos para estocagem (DE ROTH, 1940; DUA *et al.*, 2004), podendo ser utilizada fresca (KRUSE *et al.*, 2000; DUA *et al.*, 2004), criopreservada (KIM; TSENG, 1995; DUA *et al.*, 2004), liofilizada (GUILHERME, 2002) ou desidratada (FOURNIER; MCLACHLAN, 2005).

A membrana amniótica fresca é mantida em meio de cultura a 4°C ou em solução de glicerol 50%, podendo ser utilizada de 7 a 12 dias após a coleta (KRUSE *et al.*, 2000). Para a criopreservação da membrana amniótica, esta deve ser colocada em meio de glicerol 50% com antibióticos após o seu processamento. Deve ser mantida a -80°C, tendo validade de dois anos (KIM; TSENG, 1995), se mantida na temperatura de -20°C, esta se mantém viável por sete dias. O descongelamento da membrana amniótica deve ser em temperatura ambiente, e deve ser utilizada em até 24 horas (DUA *et al.*, 2004). Para a liofilização da membrana, deve-se congelá-la a -20°C e a submeter em condições de vácuo, havendo uma desidratação em baixa pressão. A membrana pode ser reconstruída com adição de água, tomando suas características originais (GUILHERME, 2002). Para a obtenção de membrana amniótica desidratada, esta é mantida em temperatura ambiente até a desidratação completa (FOURNIER; MCLACHLAN, 2005).

12.2 Procedimento cirúrgico para fixação da membrana amniótica

Após a preparação do leito receptor, a membrana descongelada ou reconstruída com adição de água (GUILHERME, 2002) deverá ser ajustada em tamanho e forma de acordo com a lesão (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999).

A membrana amniótica pode ser colocada sobre a lesão de dois modos, com o epitélio voltado para cima ou para baixo. Se utilizada com a finalidade de proteção, como uma lente de contato biológica, deve-se colocar o epitélio voltado para o estroma corneano. Para a utilização como suporte para epitelização corneana utiliza-se com o epitélio voltado para cima, ou seja com a matriz estromal voltada para a lesão, assim o epitélio corneano irá crescer sobre a membrana e esta será incorporada ao hospedeiro (DUA *et al.*, 2004; DE ROTH, 1940; PLUMMER, 2009; DUA; AZUARA-BLANCO, 1999). Pode-se utilizar as duas técnicas em conjunto, fazendo uma primeira camada com o epitélio voltado para cima, dando suporte à epitelização corneana e uma segunda camada com um disco maior de membrana amniótica com o epitélio voltado para baixo, servindo como uma lente de proteção (DUA *et al.*, 2004; DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; PLUMMER, 2009). Em lesões profundas ainda pode-se fazer a utilização de diversas camadas de membrana, preenchendo toda profundidade da lesão (DUA *et al.*, 2004).

A membrana deve ser fixada na lesão com fio nylon 9-0 ou vicryl 8-0 com padrão simples interrompido ou contínuo (BARROS *et al.*, 2005; CHOI *et al.* 2010) ou com uso de adesivos (ION *et al.*, 2016)

12.3 Membrana Amniótica Canina

Barros *et al.* (2005), relataram em seu estudo o uso desta membrana em córneas de cães e gatos, sendo utilizadas para casos de ceratomalacia, anquilobléfaro e após excisão de fibrohistiocitoma. No pós-operatório não foi notado desconforto ocular, uma vez que a repitelização da córnea ocorreu de forma rápida, resultando em região de opacidade no sítio da lesão (Figura 19).



Figura 19 – Imagem do bulbo ocular de um canino 80 dias após a implantação da membrana amniótica equina em um caso de *melting* em um cão. Observam-se moderada cicatriz, pigmentação e vascularização corneana.
Fonte: Barros *et al.*, 2005.

12.4 Membrana Amniótica Humana

Ion *et al.* (2016) utilizaram a membrana amniótica equina em casos de sequestro de córnea em seis felinos. A membrana foi colocada em uma única camada e fixada com adesivo corneano (OcuSeal®) e então foi realizado um flap de terceira pálpebra para proteção. Optou-se pela utilização do adesivo para evitar inflamação decorrente de fios de sutura, assim como realizar a cirurgia em um menor tempo. O adesivo forma uma barreira protetora na córnea e segura o enxerto de membrana amniótica no local, porém possui limitações em seu uso, uma vez que deve ser preparado e utilizado imediatamente para que não se torne sólido. As complicações do pós-operatório foram: vascularização corneana superficial em um caso, ulcera de córnea em um caso e cicatriz corneana em um caso. Em todos os casos a visão e a transparência da córnea foram mantidas e não foram observadas recidivas (Figura 20).

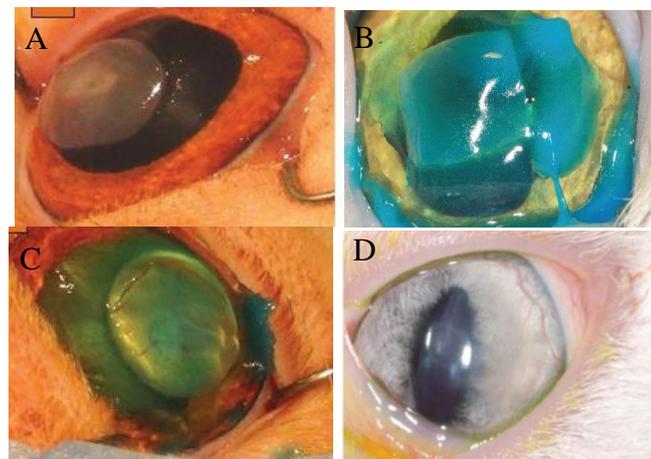


Figura 20 – (A) Única camada de membrana amniótica sobre a lesão. (B) Imagem do transoperatório, durante a colocação do adesivo sobre a membrana. (C) Membrana fixada com adesivo na córnea. (D) Quatro meses após a cirurgia.

Fonte: Ion *et al.*, 2016.

12.5 Membrana Amniótica Equina

O primeiro estudo utilizando membrana amniótica na oftalmologia veterinária foi com a utilização deste tecido proveniente de uma égua, relatado por Barros *et al.* (1995). Neste estudo realizou-se experimentalmente lesões em 18 córneas de cães, obtendo bons resultados na epitelização corneana. Na análise histopatológica pode-se notar integração da membrana na córnea e restabelecimento de todas as camadas corneanas (BARROS *et al.* 1995).

Outros estudos foram realizados em casos de perfuração ocular em cães (BARROS *et al.*, 1998), após remoção de sequestro de córnea em gatos (BARACHETTI *et al.*, 2010) e após ceratectomia lamelar para a remoção de cisto de inclusão epitelial num canino (CHOI *et al.* 2010).

Algumas das complicações observadas no pós-operatório incluíram edema nas primeiras 24 horas, tecido de granulação (BARROS *et al.*, 1998), blefarospasmo, necrose da membrana em um caso e perfuração sob a membrana em outro caso (BARACHETTI *et al.*, 2010), pequena área de pigmentação (CHOI *et al.* 2010), neovascularização (BARROS *et al.*, 1998; CHOI *et al.* 2010) e cicatriz moderada (CHOI *et al.* 2010; BARACHETTI *et al.*, 2010), presença de fibrose e fibroblastos microscopicamente (BARROS *et al.*, 1998) (Figura 21).

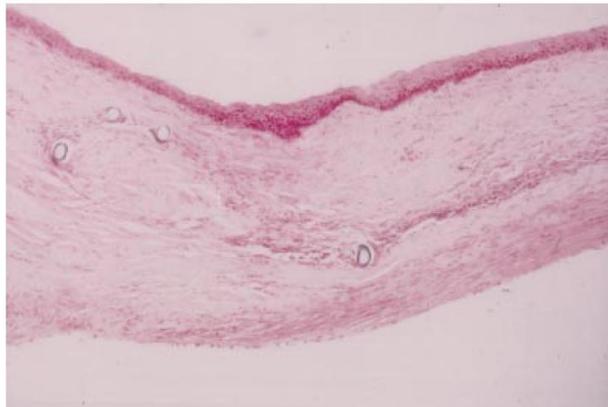


Figura 21 – Fotomicrografia da córnea 60 dias após o procedimento cirúrgico. Nota-se no centro do estroma a presença da membrana amniótica e dos fios de sutura, assim como fibroblastos e fibrose (HE).

Fonte: Barros *et al.*, 1998.

Barachetti *et al.* (2010) relataram que não houve recidiva nos casos de sequestro de córnea em seu estudo, porém, recomendam que sequestros de córnea muito profundos e não vascularizados sejam excluídos para este tipo de cirurgia, devido às complicações presentes em seu estudo.

O enxerto de membrana amniótica equina na córnea de cães e gatos deve ser considerado como uma alternativa para a reparação de grandes defeitos na córnea (CHOI *et al.* 2010), uma vez que restabelece a arquitetura corneana (BARROS *et al.*, 1998), trazendo bons resultados, com um bom nível de transparência no local lesionado (BARACHETTI *et al.*, 2010) (Figura 22).



Figura 22 - (A) Pós-operatório imediato após a implantação da membrana amniótica equina na córnea. (B) 3 semanas de pós-operatório, nota-se tecido de granulação e vascularização. (C) 12 semanas de pós-operatório, nota-se transparência e remissão dos vasos.

Fonte: Barachetti *et al.*, 2010.

13 CONCLUSÃO

As membranas biológicas podem ser utilizadas como alternativa nos procedimentos cirúrgicos para a reconstrução da córnea em cães e gatos, trazendo ótimos resultados. A utilização destas membranas mantém a integridade ocular e em grande maioria dos casos resulta em uma córnea mais transparente se comparado a outros métodos cirúrgicos. Além disso, as membranas biológicas são de fácil obtenção e manipulação, auxiliando em casos emergenciais.

REFERÊNCIAS

- ACELL. **ACell Vet**. Disponível em: <<http://acell.com/vet/>> Acesso em: 24 de dezembro de 2017.
- ADDS, P. J.; HUNT, C. J.; DARK, 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.
- ALBUQUERQUE, L. **Recobrimentos Conjuntivais em Cães e Gatos**. 2011. 43 f. Monografia. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ANDRADE, A. L. et al. Repair of lamellar scleral lesions in dogs with preserved equine renal capsule - Short report. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, p. 169- 171, 2004.
- ANDRADE, A. L. et al. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, n. 2, p. 79-82, 1999.
- BALLAND, O. et al. Use of a porcine urinary bladder acellular matrix for corneal reconstruction in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, n. 6, p. 454-463, 2015.
- BARACHETTI, L.; GIUDICE, C.; MORTELLARO, C. M. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.5, p. 326-330, 2010.
- BARROS, P. S. M. et al. Preserved equine amniotic membrane used in the repair of the cornea of the dog. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.36, n.4, p. 982, 1995.
- _____. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprosthesis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32, n. 4, p. 251-255, 1995.
- _____. The use of xenologus amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, p. 119-123, 1998.
- BARROS, P. S.; SAFATLE, A. M. D. V.; RIGUEIRO, M. Uso do pericárdio de equino conservado em glicerina como enxerto penetrante da córnea de cães. Estudo experimental. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 3, p. 138-141, 1997.
- _____. Experimental lamellar corneal graft in dogs using preserved equine pericardium. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 6, 1999.
- BUSSIERES, M. et al. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 352-359, 2004.
- CHOI, U. S. et al. Successful treatment of an unusually large corneal epithelial inclusion cyst using equine amniotic membrane in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.2, p. 122-125, 2010.

- CHOW, D. W.; WESTERMEYER, H. D. Retrospective evaluation of corneal reconstruction using ACell Vet (™) alone in dogs and cats: 82 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, n. 5, p. 357-366, Sep 2016.
- CRISPIN, S. The cornea. In: PETERSEN-JONES, S. e CRISPIN, S. (Ed.). **BSAVA Manual of Small Animal Ophthalmology**. 2. Barcelona: British Small Animal Veterinary Association, 2002. cap. 8, p.134-154.
- DAMASCENO, A. D. et al. Estudo clínico e histológico da mucosa oral autógena na ceratoplastia lamelar experimental. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 2, p. 117-124, 2004.
- DE ROTH, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. **Archives of Ophthalmology**, v.23, p. 522-550, 1940.
- DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v.83, p.748-752, 1999.
- DUA, H. S. et al. The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey Ophthalmology Journal**, v.49, n.1, p. 51-77, 2004.
- DULAURENT, T. et al. Use of bovine pericardium (Tutopatch) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. 2, p. 91-99, 2014.
- FEATHERSTONE, H. J.; SANSOM, J.; HEINRICH, C. L. The use of porcine small intestinal submucosa in ten cases of feline corneal disease. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 2, p. 147-153, Jun 2001.
- FERNANDES, M.; SANGWAN, V. S.; RAO, G. N. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Cornea**, v.24, n.6, p. 643-653, 2005.
- FOURNIER, J. H.; MCLACHLAN, D. L. Ocular surface reconstruction using amniotic membrane allograft for severe surface disorders in chemical burns: case report and review of the literature. **International Surgery Journal**, v.90, n.1, p. 45-47, 2005.
- GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L. Use of fresh autogenous vaginal tunic in the experimental lamellar keratoplasty in dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 475-479, 2000.
- GARCIA, J. D. A. et al. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, p. 290-294, 1996.
- GOULLE, F. Use of porcine small intestinal submucosa for corneal reconstruction in dogs and cats: 106 cases. BSAVA. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, p. 34-43, 2012.
- GUILHERME, D. A. Liofilização industrial. **Control Contamination**, v.43, p. 22-30, 2002.

HAMADA, M.; KUMAGAI H. Chemical Composition of Sardine Scale (abstract). **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1988.

HOPKINSON, A. et al. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF- β . **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.47, p. 4316-4322, 2006.

HÜNNING, P. S. et al. Reparação de perfuração ocular em um cão usando pericárdio homólogo preservado em glicerina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 195-199, 2009.

ION, L. et al. Human amniotic membrane transplantation in the treatment of feline corneal sequestrum: preliminary results. **AgroLife Scientific Journal**, v. 5, n. 1, p. 91-98, 2016.

KIM, J. C.; 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.

KROPP, B. P. et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. **The Journal of Urology**, v. 155, n. 6, p. 2098-2104, 1996.

KRUSE, F. E. et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 238, n. 1, p. 68-75, 2000.

LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; ANDRADE, A. L. Emprego de escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), conservada em glicerina, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, 2000.

LAUS, J. L.; GALERA, P. D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; CAVASSANI, M. M.; ANDRADE, A. L. Bilateral lamellar keratoplasty in descemetocele 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.

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, n. 7, p. 340-342, Jul 1999.

LI, X. et al. Current usage and future directions for the bovine pericardial patch. **Annals of Vascular Surgery**, v. 24, n. 4, p. 561-568, 2011.

MAGGS, D. J. Cornea and Sclera. In: MAGGS, D. J., et al (Ed.). **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. 4. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2008. cap. 10, p. 175-202.

MANCUSO, L. A.; LASSALINE, M.; SCHERRER, N. M. Porcine urinary bladder extracellular matrix grafts (ACell Vet® Corneal Discs) for keratomalacia in 17 equids (2012-2013). **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, n. 1, p. 3-10, Jan 2016.

MCDEVITT, C. A.; WILDEY, G. M.; CUTRONE, R. M. Transforming growth factor- β 1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 67, n. 2, p. 637-640, 2003.

MEDANDCARE. **Tutopatch - collagen membrane**. Disponível em: <<http://www.medandcare.pl/en/products/orthopedics/tutopatch-collagen-membrane>> Acesso em: 12 de dezembro de 2017.

MELO, J. C. et al. Autoenxerto de Conjuntiva com Mucosa Labial em Canis Familiares. **Medvep**, v. 7, n. 23, p. 494-500, 2009.

NAKAMURA, T. et al. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. **British Journal of Ophthalmology**, v. 95, p. 942-946, 2011.

NAKAMURA, T. et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, n. 1, p. 1280–1284, 2004.

NISHIDA, K. et al. Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 12, p. 1187-1196, 2004.

RAMOS, J. L. B.; LI, Y.; HUANG, D. Clinical and research applications of anterior segment optical coherence tomography – a review. **Clinical Experimental Ophthalmology**, v. 37, n. 1, p. 81-89, 2009.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELLAT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. cap. 2, p.31-150.

SANDUSKY, G. E. et al. Histologic Findings After In Vivo Placement of Small Intestine Submucosal Vascular Grafts and Saphenous Vein Grafts in the Carotid Artery in Dogs. **American Journal of Pathology**, v. 140, n. 2, p. 317- 324, 1992.

SHORE, J. W. et al. Results of Buccal Mucosal Grafting for Patients with Medically Controlled Ocular Cicatricial Pemphigoid. **Ophthalmology**, v. 99, n. 3, p. 383-395, 1992.

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. 162 f. Teses (Doutorado em Cirurgia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

TALMI, Y. P.; SIGLER, L.; INGE, E. Antibacterial properties of human amniotic membranes. **Placenta**, v.12, p. 285-288, 1991

VANORE, M. et al. Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 2, p. 93-99, 2007.

VETRIX. **Vetrix® BioSIS Ocular Discs**. Disponível em:
<<https://shop.rethinkhealing.com/shop/vetrix-corneal-discs/>> Acesso em: 12 de novembro de 2017.

VOYTIK-HARBIN, S. L. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 478-491, 1997.

ZHENG, M. H. et al. Porcine Small Intestine Submucosa (SIS) Is Not an Acellular Collagenous Matrix and Contains Porcine DNA: Possible Implications in Human Implantation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 73, n. 1, p. 61-67, 2005.

