

ASPECTOS CLÍNICOS E MORFOLÓGICOS DO TRANSPLANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA SOBRE A CÓRNEA DE COELHOS COM DEFICIÊNCIA INDUZIDA DE CÉLULAS GERMINATIVAS DO LIMBO

Alexandre Lima de Andrade¹
José Álvaro Pereira Gomes²
Maria Cecília Rui Luvizotto¹
Sílvia Helena Venturolli Perri¹
Mauro Campos³

RESUMO

A membrana amniótica humana (MAH) tem sido utilizada clinicamente na reconstrução da superfície ocular nos casos de queimaduras químicas e térmicas, principalmente, nos casos severos onde há deficiência das células germinativas do limbo. O objetivo deste trabalho foi verificar, sob os aspectos clínicos e morfológicos, os efeitos da MAH criopreservada em DMSO₄ sobre as córneas de coelhos com deficiência limbar induzida por trauma mecânico e químico. Para tanto, foram utilizados 20 coelhos albinos saudáveis, com peso médio de 2,6 kg, que foram divididos por sorteio em dois grupos experimentais (G1 e G2). Os grupos foram ainda subdivididos em dois subgrupos para realização dos estudos aos sete e trinta dias (G1: n=10; G2: n=10). Após anestesia, os animais do G1, sofreram trauma à superfície ocular constituído de peritomia e ceratolimbectomia 360°, seguidas de queimadura com NaOH 0,5 M e desepitelização mecânica com bisturi. Os animais do G2, após o mesmo trauma receberam a MAH criopreservada. Ao final de sete e trinta dias, metade dos animais de cada grupo foi submetida à eutanásia e tiveram suas córneas colhidas. A MAH criopreservada é uma alternativa eficiente na reconstrução da superfície ocular, pois as córneas tratadas com membrana apresentaram uma evolução clínica melhor com menor defeito epitelial. Os achados clínicos foram confirmados pelas análises morfológicas.

Palavras-chave: membrana amniótica, transplante, superfície ocular, deficiência límbica, coelho.

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE ON RABBITS CORNEAS WITH INDUCED LIMBAL GERMINATIVE CELLS DEFICIENCY.

ABSTRACT

The human amniotic membrane (HAM) has been used in ocular surface reconstruction of the thermal and alkali burns with limbal stem cells deficiency. The purpose of this study was to evaluate of the DMSO₄ cryo-preserved HAM on rabbit's corneas with limbal deficiency, under clinical and morphological aspects. Twenty healthy rabbits, with 2.6kg weight-body were used. The animals were randomized into two groups (G1- n=10, G2- n=10). The groups were subdivided into two subgroups for study at 7th and 30th days postoperatively. The animals of G1 were submitted to total peritomy and keratolimbectomy, followed by application of 0.5 M NaOH, under anaesthesia, and did not receive the HAM transplantation. The G2 animals, under the same conditions, received the HAM after mechanical and chemical injuries. After 7th and 30th postoperatively observation, half of the animals of each group (G1 and G2) were submitted to humanitarian euthanize and the respective corneas collected for morphological analysis. Cryo-preserved HAM may be an effective alternative in ocular surface reconstructive surgery because the HAM-treated corneas shown a better clinical

¹Professor Assistente Doutor, Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal, Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista – campus de Araçatuba, Araçatuba (SP), Brasil.

²Doutor em Oftalmologia e colaborador do Setor de Córnea e Doenças Externas do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP - São Paulo (SP) - Brasil.

³Professor Doutor do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

evolution and a less epithelial defect. These aspects were confirmed by morphological analysis.

Key words: amniotic membrane, transplantation, ocular surface, limbal deficiency, rabbit.

ASPECTOS CLÍNICOS Y MORFOLÓGICOS DEL TRANSPLANTE DE LOS AMNIOS HUMANOS SOBRE LA CÓRNEA DE CONEJOS CON DISCAPACIDAD INDUZIDA DE LAS CÉLULAS GERMINALES DEL LIMBO

RESUMEN

El amnios humano (MAH) se ha utilizado clínicamente en la reconstrucción de la superficie ocular en los casos de productos químicos y quemaduras térmicas, sobre todo en casos los cuales hay deficiencia severa de las células germinales del limbo. El objetivo de este trabajo fue comprobar en los aspectos clínicos y morfológicos, los efectos de la MAH criopreservada en DMSO₄ en las córneas de conejos con discapacidad limbar inducida por traumas químicos y mecánicos. Para ello, se utilizaron 20 conejos albinos sanos, con un promedio de peso de 2.6 kg, que fueron divididos por sorteo en dos grupos experimentales (G1 y G2). Los grupos fueron también subdivididos en dos subgrupos para los estudios a los siete e treinta días (G1: n = 10; G2: n = 10). Después de la anestesia, los animales de G1, sufrieron traumatismo a la superficie ocular utilizándose de peritomia y ceratolimbectomia 360°, seguido por quema con NaOH 0,5 M y desepitelización mecánica con bisturí. Los animales de G2, después del mismo trauma recibieron la MAH criopreservada. Al final de los siete y treinta días, la mitad de los animales de cada grupo fue sometida a la eutanasia y sus córneas fueron cosechadas. La MAH criopreservada es una alternativa eficiente en la reconstrucción de la superficie del ojo, pues las córneas tratadas con membrana presentaron una mejor evolución clínica con menos defecto epitelial. Los hallados clínicos fueron confirmados por análisis morfológicas.

Palabras-clave: amnio humano, transplante, superficie del ojo, discapacidad de las células germinales, conejos.

INTRODUÇÃO

A córnea, que representa uma das estruturas da túnica fibrosa do bulbo ocular, constitui-se em um tecido predisposto a lesões dada a sua localização externa. Por ser transparente, está diretamente envolvida na visão e a córnea têm sido estudada no homem e nos animais nos últimos tempos, devido ao crescente número de doenças relacionadas a ela, algumas ainda, de etiologias e tratamentos desconhecidos. Essas doenças podem causar dano epitelial, vascularização e inflamação crônica, que resultam na perda de sua transparência e diminuição da acuidade visual (TSENG e TSUBOTA, 1997; GOMES, 2000). Dentre elas, os defeitos epiteliais crônicos constituem complicações frequentes dos “*Distúrbios da superfície ocular e do filme lacrimal*” e podem evoluir para inflamação estromal e infecção (ASSOULINE, 1993; GOMES et al., 1999). Diversos tratamentos convencionais são relatados na literatura, como o uso de medicação tópica (lubrificantes sem preservativos e esteróides tópicos), lente de contato terapêutica, tarsorrafia, transplante de limbo e recobrimento conjuntival (KENYON e TSENG et al., 1989; VAN KLINCK et al., 1993; WAGONER, 1997; GOMES et al., 1999; TSUBOTA et al., 1999). Mais recentemente, o uso de fatores de crescimento, como EGF, NGF e outros, também têm sido relatados com resultados promissores (NISHIDA et al., 1993; WILSON et al., 1993; SOTOZONO et al., 1995; LAMBIASE et al., 1998; CAMPBELL et al., 2000). No entanto, o alto custo dessas substâncias ainda inviabiliza seu uso na prática clínica. A membrana amniótica, por possuir fatores de crescimento estimuladores da epitelização e propriedades antiinflamatórias, tem sido utilizada por alguns autores como opção terapêutica cirúrgica nos casos mais graves de defeitos epiteliais persistentes (KRUSE et al., 1990; KIM e TSENG, 1995; TSENG et al., 1998; GOMES et al., 1999; SIPPEL e FOSTER, 2001). As queimaduras químicas da córnea por álcali resultam em ceratite recalcitrante caracterizada por uma formação bolhosa, ruptura epitelial recorrente, morte das células estromais, infiltração de células inflamatórias e disfunção endotelial (KIM et al., 2000).

Vários modelos experimentais de disfunção das células germinativas límbicas têm sido propostos para simular as alterações encontradas em diversas doenças que afetam a superfície ocular.

Andrade, A.L. et al. Aspectos clínicos e morfológicos do transplante de membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. *Vet. e Zootec.*, p.127-142, v.16, n.1, mar., 2009.

Com uma superfície apresentando conjuntivalização e vascularização, pode-se avaliar a eficácia de um tratamento em restabelecer uma superfície ocular próxima ao normal, por meio da regressão dos vasos corneais, da recuperação do epitélio corneal original e do retorno à transparência (PARENTE et al., 2002). Embora existam modelos em animais, como ratos e camundongos geneticamente modificados para mimetizar doenças da superfície ocular (VAN DER VEEN et al., 1994; YAO et al., 1994; SMITH et al., 1996), o coelho é o animal mais utilizado em modelos de disfunção das células germinativas (CINTRON et al., 1979, THOFT et al., 1979; TSENG et al., 1984; PARENTE et al., 2002). No entanto, a destruição do epitélio corneal e límbico já foi investigada por vários métodos como escarificação mecânica, álcool etílico, n-heptanol entre outros, para mimetizar situações clínicas de deficiência de células germinativas do limbo. Frequentemente ocorre variação dos achados clínicos em condições experimentais, e nem sempre coincidem com os achados clínicos dos distúrbios da superfície ocular no homem. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivos avaliar, clínica e morfológicamente em coelhos, os efeitos da membrana amniótica humana criopreservada, sobre a superfície ocular submetida ou não a traumas mecânico e químico com NaOH 0,5 M.

MATERIAL E MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi realizado de acordo com os princípios internacionais orientados para a pesquisa biomédica envolvendo animais e conforme o Código de Nuremberg (GOLDIM, 1995). Foi utilizado o número mínimo de animais necessários para se observar e analisar os resultados obtidos. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (SP) da UNESP - Campus de Araçatuba.

OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

As membranas foram obtidas a partir de placentas de mulheres submetidas ao parto cesariana. As pacientes tiveram como quesitos de aprovação para colheita: o resultado de sorologia negativa para Hepatite B e C, HIV e Herpes vírus. A colheita da membrana dependeu da aprovação das pacientes e do Comitê de Ética Humana da UNIFESP - EPM. Ao final do parto cesariana, procedeu-se à colheita asséptica das membranas amnióticas em capela de fluxo laminar que, em seguida, foram lavadas sistematicamente com solução fisiológica estéril 0,9% contendo antibióticos e antifúngicos. Em seguida, foram esticadas sobre papel de nitrocelulose com sua face estromal voltada para a membrana e recortada nas dimensões de 3,0 X 3,0 cm. Finalmente, as mesmas foram introduzidas em frascos assépticos de vidro de 20 ml contendo DMSO₄ 12% enriquecido, que foram mantidos em congelador à temperatura de -80°C por, no mínimo, 15 dias.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os coelhos foram divididos de forma aleatória em dois grupos. Constituíram-se os seguintes grupos: **G1 (lesão)** = grupo formado pelo olho direito (OD) de dez coelhos que sofreram trauma cirúrgico e químico de queimadura da córnea e deficiência limbar; **G2 (lesão + membrana)** = grupo formado pelo OD de dez coelhos que, após o trauma cirúrgico e químico de queimadura da córnea e deficiência limbar, receberam transplante de membrana amniótica criopreservada em DMSO₄ 12%. Cada grupo foi, ainda, subdividido em dois subgrupos, para realização das avaliações aos sete e aos trinta dias de pós-operatório. Os olhos contralaterais normais (sem trauma) também foram avaliados para a busca de intercorrências oculares.

PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS

Previamente às condutas operatórias, observaram-se os cuidados relativos a jejum hídrico e alimentar. Foi realizada a contenção do animal para aplicação de acepromazina na dose de 0,1 mg/kg pela via intramuscular. Após 15 minutos, os animais receberam quetamina e xilazina nas doses de 35 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente, misturados na mesma seringa e administrados pela mesma via.

PROCEDIMENTOS DE TRAUMA À SUPERFÍCIE OCULAR E TRANSPLANTE DA MAH

Estando os animais sob efeito da anestesia, realizaram-se as condutas pertinentes ao trans-operatório, monitoradas com microscópio cirúrgico. Com objetivos voltados à execução das lesões à

superfície ocular, após anti-sepsia com PVPI aquoso e preparo rotineiro de campo operatório, efetuou-se blefarostase mecânica. Em seguida, o olho foi posicionado em proptose, para facilitar a realização do trauma proposto. Então, foi realizada peritomia 360° seguida de ceratolimbectomia 360° de 2 mm. Em seguida, com auxílio de um papel filtro, recortado no diâmetro da córnea (1,5 cm) e embebido em NaOH 0.5 M (pH 12), foi colocado sobre a córnea durante 1 minuto. Ato contínuo, a região correspondente ao limbo foi ainda escarificada com auxílio do mesmo papel, por mais 1 minuto. Após este procedimento, as córneas foram lavadas continuamente com solução fisiológica estéril 0,9% durante 1 minuto. Em seguida, com auxílio de uma lâmina número 15 montada em cabo de bisturi n° 3, procedeu-se o desbridamento mecânico da córnea, a fim de se promover a desepitelização. A sua efetividade foi comprovada instilando-se gotas de fluoresceína sódica. Por fim, a superfície ocular foi novamente irrigada com solução salina durante 1 minuto. Ao término de cada procedimento cirúrgico de trauma corneal, os animais foram sorteados com propósito de se constituir os grupos experimentais acima descritos (G1 e G2).

Os animais do G2 receberam, ao final do trauma a membrana amniótica humana descongelada naturalmente, onde a mesma foi esticada sobre a superfície ocular com a face estromal voltada para a superfície ocular e suturada com mononylon 9-0 na região escleral, próxima ao fórnice conjuntival, a uma distância de 1,0 cm do limbo, utilizando-se pontos simples isolados distando 0,6 cm um do outro, em um total de 12 pontos.

CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Como conduta pós-operatória, os animais receberam colírio à base de tobramicina, duas vezes ao dia, durante 7 dias, como medida profilática da infecção. Para um conforto pós-operatório, receberam buprenorfina, na dose de 0,05 mg/kg, pela via subcutânea a cada 12 horas, também por sete dias. E finalmente, para que fatores comportamentais, relativos à automutilação não interferissem com a evolução das lesões concebeu-se aplicar em todos os animais, colares de proteção do tipo “Elisabetano” durante 10 dias. Os pontos da cantorráfia foram retirados aos 10 dias de pós-operatório.

PROTOSCOLOS DE AVALIAÇÃO

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Metade dos animais do G1 e G2 foi avaliada diariamente durante sete dias, e a outra metade de cada grupo foi avaliada diariamente durante trinta dias, por meio de exame oftalmológico com auxílio de lâmpada de fenda. Ao final de cada período de observação clínica, os animais foram anestesiados para que seus olhos fossem colhidos para o estudo morfológico. Em seguida, os mesmos foram submetidos à eutanásia. Para tanto, foi realizada tranquilização com injeção de acepromazina pela via intravenosa, na dose de 0,2 mg/kg. Após 15 minutos, pela mesma via, foi administrado tionembutal em dose excessiva (dose acima de 15 mg/kg) até o momento em que o animal apresentasse sinais de parada respiratória seguida de parada cardíaca, que foi confirmada à auscultação.

Os olhos operados foram avaliados diariamente por sete e trinta dias, na busca dos fenômenos intercorrentes com a evolução clínico-cirúrgica e demais manifestações oculares. O exame foi realizado por dois examinadores “cegos”. Os eventos clínicos observados e os escores adotados estão apresentados no Quadro 1.

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Para estudo à microscopia óptica, conceberam-se os períodos de sete e trinta dias. Os fragmentos foram incluídos em *Tissue Freezing Medium* e estocados em freezer (-20°C). No momento da obtenção dos fragmentos histológicos, as amostras (córneas) foram descongeladas em temperatura ambiente e foram lavadas em PBS em placa de Petri estéril para obtenção do fragmento. Em seguida, os fragmentos foram introduzidos em frascos contendo solução de formaldeído 10% tamponado para fixação durante três dias. Ato contínuo, os fragmentos foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo a uma espessura de 5 µm. De cada amostra, obtiveram-se 6 cortes. Em seguida, os fragmentos foram corados pelos métodos: 1) Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE): para avaliação de todas as córneas especialmente os fenômenos referentes à congestão, edema, hemorragia, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, vascularização corneal e fibrose e 2) Coloração de Tricrômio de Masson, para avaliação do colágeno.

QUADRO 1. Parâmetros oftalmológicos estudados e escores adotados para avaliação dos olhos de coelhos submetidos a trauma mecânico e químico da superfície ocular, tratados ou não com MAH.

Parâmetro Clínico	Escores
Blefarospasmo	(0): ausência (1): leve (2): moderado (3): intenso
Secreção ocular	(0): ausência (+): 1 (++): 2 (+++): 3
Quemose	(a): ausência (p): presença
Hiperemia conjuntival	(0): ausência (1): leve (2): moderada (3): intensa
Vascularização corneal (Segundo THOFT, FRIEND, MURPHY, 1979)	(0): ausência (2): proliferação vascular até 2mm do limbo (4): proliferação vascular até 4mm do limbo (6): proliferação vascular até 6mm do limbo (8): proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual)
Defeito epitelial	(a): ausência – quando não havia defeito epitelial (t): total – quando havia defeito epitelial de toda córnea (p): parcial – quando havia defeito epitelial de parte da córnea (pu): puntiforme
Opacidade corneal	(0): quando não havia dificuldade para observação de detalhes da íris (1): discreta - quando havia borramento dos detalhes da íris (2): moderada - quando havia dificuldade em definir detalhes da íris (3): severa - quando não era possível observar detalhes da íris
Conjuntivalização	(a): ausência (p): presença
Descemetocele	(a): ausência (p): presença
Perfuração corneal	(a): ausência (p): presença

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos em cada análise foram tabulados e submetidos à análise estatística para a comparação das variáveis. Para as variáveis blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival, neovascularização corneal e opacidade corneal utilizou-se a mediana, para caracterizar a tendência central dos grupos, e o teste de Mann-Whitney, para comparar os grupos G1 (controle) e G2 (membrana) em cada dia. Para as variáveis quemose, defeito epitelial e conjuntivalização foram realizados o teste exato de Fisher, para verificar associação entre as variáveis e os grupos (G1 e G2). As estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS¹ (*Statistical Analysis System*).

¹ SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1997. 1167p.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo experimental de trauma à superfície ocular foi idealizado buscando-se obter a remoção completa das células germinativas. Kruse et al. (1990) relataram que a utilização do n-heptanol, durante cinco minutos, seria capaz de remover a totalidade do epitélio límbico. Outros autores utilizaram o mesmo composto durante um minuto (CINTRON et al., 1979; SHAPIRO et al., 1981; TSENG et al., 1984), com o mesmo propósito. A viabilidade de execução da técnica foi testada previamente em estudo piloto. Inicialmente verificou-se que a utilização do n-heptanol friccionado sobre o epitélio da córnea associada à peritomia 360° a 2 mm do limbo e dissecação cirúrgica lamelar do limbo conforme fora descrito por Kim e Tseng (1995) não foram capazes de produzir um quadro de queimadura da córnea com defeito epitelial persistente, pois todas as córneas apresentaram-se reepitelizadas, com teste de fluoresceína negativo e sem quaisquer outras alterações. Frente a esse resultado, optou-se por substituir o n-heptanol por uma solução de NaOH 0,5 M (pH=12) durante um minuto, associada a uma peritomia 360° de 3 mm do limbo, seguida de ceratolimbectomia de 2 mm para córnea e para esclera, na região do limbo. Neste caso, todas as córneas dos seis coelhos apresentaram defeito epitelial persistente com vascularização e opacidade corneal, o que nos fez optar por esse novo modelo.

Parente et al. (2002) estudaram, comparativamente, três modelos de indução de deficiência límbica em coelhos. No estudo, observaram que na maior parte das córneas submetidas às técnicas de lesão límbica, a epitelização se iniciou pela periferia próxima ao limbo, como ocorre no homem (DUA e FORRESTER, 1990). Além disso, conseguiram reproduzir um dos modelos propostos por Kim e Tseng (1995).

Intercorrências sistêmicas ou alterações, como deiscência de sutura ou infecções, não foram observadas em nenhum grupo experimental estudado. No que se refere ao quadro oftálmico, destacou-se o blefarospasmo, considerado importante nos períodos iniciais de pós-operatório. Os animais do G1 (lesão) apresentaram esse sinal clínico de forma mais intensa do que os animais do G2 (lesão+membrana), comprovada por análise estatística entre o 1° e 10° dias de observação. Sugere-se sua correlação com a estimulação das terminações nervosas do epitélio e estroma corneais (WARING, 1984) e fios de sutura junto à córnea ou superfície ocular sensibilizando as incisões palpebrais, bem como uveíte reflexas, a despeito de não poderem ser avaliadas (KERN, 1990). Isto sugere dor ocular, embora medidas para minimizar este sintoma tenham sido tomadas com a utilização sistêmica da buprenorfina durante 7 dias.

A quemose e a hiperemia conjuntival, são comuns em conjuntivites agudas (YANOFF e FINE, 1989). Elas aparecem rapidamente após um trauma ou exposição à alérgenos ou toxinas. Era esperado, portanto, que se observassem as suas ocorrências após o trauma à superfície ocular aqui adotado. Não houve associação significativa entre a presença e a ausência da quemose entre os grupos estudados, e, quanto à hiperemia, embora tenha se verificado diferença estatística entre os grupos em apenas dois dias da observação (12° e 17° dias). Os valores obtidos no teste estiveram próximos do nível de significância adotado ($p=0,05$), não havendo, portanto, diferença significativa entre os grupos.

Em algumas situações, o uso de membranas biológicas utilizadas na reparação de lesões corneais com grande perda tecidual, ocorre o fenômeno de vascularização. A vascularização pode ocorrer por dois tipos de mecanismos: a vasculogênese (PEPPER *et al.*, 1996), e a angiogênese (FOLKMANN, 1985). Vascularização das córneas dos animais do G1 (lesão) e do G2 (lesão+membrana) ocorreu a partir do sétimo dia de pós-operatório, intensificando-se aos 15 dias, com tendência a redução, mas, persistente, nos períodos tardios. Parente et al. (2002) encontraram dados semelhantes ao estudarem, comparativamente, três modelos de deficiência límbica em coelhos. Tais achados, nos respectivos tempos, foram confirmados à avaliação morfológica por microscopia óptica pela coloração de Tricrômio de Masson, corroborando as observações de Maurice et al. (1966) citado por Naumann e Sautter (1988), que informaram que o processo decorre da deflagração de fatores angiogênicos na córnea. STRIETER et al. (1992), demonstraram a participação da interleucina-8 (IL-8) liberada da matriz corneal e seu efeito angiogênico sobre o crescimento de neovasos límbicos. Clinicamente, os animais do G1 (lesão) apresentaram um padrão vascular superficial, ao passo que os animais do G2 (lesão+membrana) apresentaram um padrão de vascularização profunda. Kim e Tseng (1995), ao estudarem experimentalmente os efeitos da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos, observaram que todas as córneas submetidas a trauma químico e cirúrgico apresentavam

vascularização e conjuntivalização. No mesmo estudo, após um mês, metade dos animais recebeu a membrana amniótica. Segundo os autores, a mesma permitiu a reconstrução da superfície ocular com córneas sem vascularização e defeito epitelial. O mesmo não foi observado no presente estudo, pois a membrana amniótica não foi capaz de reduzir a vascularização corneal quando comparada ao grupo que recebeu somente o trauma mecânico e químico (G1), provavelmente por ter sido aplicada logo após o trauma. Tal efeito foi descrito em casos de distúrbios crônicos da superfície ocular, reduzindo a vascularização corneal (GOMES et al., 1999; PIRES et al., 2001).

Outro motivo aventado à persistência da vascularização até o final da observação é o fato da utilização do NaOH 0,5 M, ao invés do n-heptanol, que é costumeiramente utilizado em experimentos com o objetivo de lesar as células germinativas. Os produtos de natureza alcalina, por promoverem uma reação de saponificação tecidual, penetram nos tecidos oculares com maior facilidade, causando lesões mais graves e profundas, caracterizadas por necrose do estroma e/ou endotélio corneal, com perfuração secundária (NÓIA et al., 2000). Entretanto, em nossa experiência, o n-heptanol não foi capaz de reproduzir uma situação clínica de queimadura, como descrito por Kim e Tseng (1995).

Em alguns estudos foi demonstrado que a progressão da vascularização corneal ocorre de forma assimétrica (THOFT et al., 1979; PARENTE et al., 2002); o mesmo não foi observado neste trabalho. A única diferença observada foi quanto ao padrão de vascularização superficial, no G1 (lesão), e *brush like* no G2 (lesão+membrana). Tais dados foram semelhantes aos observados por Swift et al. (1996).

Quanto à avaliação proposta nesse trabalho de estudar a distância dos vasos sobre a córnea a partir do limbo (THOFT et al., 1979), ambos os grupos apresentaram vascularização progressiva ao longo do tempo, até atingirem o eixo visual, com diferença estatística significativa apenas no 17º dia, cujo valor obtido também esteve próximo do nível de significância aqui adotado ($p=0,05$). Com isso, pode-se considerar que não houve diferença entre os grupos (G1 e G2), quanto a este parâmetro avaliado. Ainda, 100% dos animais de cada grupo (G1 e G2) apresentaram vascularização corneal até o final da observação clínica proposta (30 dias). Dados semelhantes foram encontrados (KRUSE et al., 1990; PARENTE et al., 2002), com modelo de deficiência limbar semelhante ao adotado no presente estudo. No entanto, os autores utilizaram n-heptanol como agente de queimadura. Os mesmos achados também foram encontrados por Tsai et al. (1990), que utilizaram um modelo semelhante com posteriores transplantes autólogo de limbo e conjuntival, e concluíram que, apesar da realização dos transplantes, a destruição da região límbica induz a vascularização corneal e conjuntivalização. Os achados deste trabalho não surpreendem, pois Kruse et al. (1990) e Tsai et al. (1990) afirmaram a necessidade da remoção do limbo por meio de dissecação lamelar para se obter um bom modelo de deficiência limbar. Entretanto, Parente et al. (2002) verificaram um elevado percentual de córneas vascularizadas em dois de seus grupos, onde fora realizada a aplicação do n-heptanol, associada ou não à desepitelização mecânica com bisturi.

Outro parâmetro avaliado foi o defeito epitelial. Para isso, utilizou-se o teste da fluoresceína diário, que só foi possível de ser analisado nos animais do G1 (lesão), embora esse teste tenha sido aplicado aos animais do G2 (lesão+membrana). Nesse último grupo, não se poderia avaliar a área de defeito epitelial, pois as córneas receberam a membrana, não sendo possível a avaliação do estroma desnudo. Como a face epitelial da membrana possui afinidade pela fluoresceína, era natural esperar que o corante corasse a membrana, uma vez que esta face foi aplicada sem contato com a córnea. Embora não tenha sido avaliado o defeito epitelial nos animais do G2 (lesão+membrana) o teste serviu para avaliar diariamente a presença da membrana sobre a superfície ocular. A membrana permaneceu em média até o 21º dia da observação, quando então se rompia, ficando apenas uma parte retraída e aderida junto à porção temporal superior da córnea. Por isso, avaliação do defeito epitelial só foi possível de ser realizada entre os G1 (lesão) e G2 (lesão+membrana), onde foi causada desepitelização completa da córnea.

Optou-se por quantificar o defeito epitelial em total, parcial e puntiforme. Não foi observado nenhum caso onde o defeito epitelial fosse puntiforme, que indicasse reepitelização quase total. Todos os animais do G1 (lesão) e G2 (lesão+membrana) apresentaram, ao final da observação, defeito epitelial parcial, cuja análise estatística não demonstrou associação significativa entre a ocorrência de defeito epitelial e os grupos, a partir do 21º dia até o final da observação. Este parâmetro pode ser avaliado mais precisamente pela mensuração da área desepitelizada a partir de fotografias diárias da córnea (MARINHO et al., 1998), ou seqüenciais a cada 12 horas (JORGE, 1995). O mesmo não foi

realizado neste trabalho, pois nos propusemos a avaliar a capacidade da membrana em restaurar o fenótipo da córnea, sob os aspectos descritos. Parente et al. (2002), que também avaliaram a área de reepitelização da córnea, informaram que a avaliação por esse método de fotografias ficou prejudicada por adotarem um espaçamento de dias entre os momentos de avaliação maior do que os adotados pelos autores citados.

Ainda, no terço final da observação clínica deste evento, era nítido verificar a diferença de área corneal com defeito epitelial entre os grupos estudados G1 (lesão) e G2 (lesão+membrana). Quanto ao primeiro grupo, todos os animais apresentaram defeito epitelial parcial envolvendo 2/3 da córnea, ao passo que os animais do G2 (lesão+membrana) apresentavam 1/3 ou menos que isso de área desepitelizada. Com base nesses dados, a membrana amniótica foi capaz de promover a restauração parcial do fenótipo epitelial normal ao final de 30 dias, momento este em que se encerrou as avaliações clínicas neste estudo. O mesmo foi descrito por Prabhasawat e Tseng (1997). Entretanto, estes autores adotaram períodos mais longos de observação. Esse efeito terapêutico benéfico da membrana possivelmente deve-se ao fato dela permitir uma restauração do estroma, produzindo uma membrana basal epitelial saudável para a proliferação e diferenciação epitelial (PIRES et al., 2001). Recentes trabalhos científicos indicam que dentre os inúmeros mecanismos de ação da membrana amniótica, um dos principais se deve ao fato da sua membrana basal servir de substrato ideal para garantir o crescimento e o desenvolvimento de células epiteliais germinativas, prolongando o seu período de vida e mantendo sua capacidade de produzir colônias dessas células, fenômeno denominado de clonogenicidade (MELLER e TSENG, 1998). Este mecanismo explica porque o transplante de membrana amniótica suporta o crescimento de células epiteliais do limbo em cultura de explantes, com posterior transplante da membrana em superfície corneal afetada, obtendo-se excelentes resultados. É possível que o fato dos animais que receberam a membrana apresentarem uma maior área epitelizada também tenha ocorrido porque a mesma permite a diferenciação de células não-caliciformes do epitélio conjuntival (CHO et al., 1999).

O sucesso de causarmos uma lesão severa às células germinativas pôde ser comprovado pelos sinais clínicos observados no G1 (lesão) principalmente, onde o defeito epitelial ao final da observação foi maior do que nos animais do G2 (lesão+membrana). Com a lesão, houve perda do fornecimento contínuo das células germinativas, que se constituem na última fonte de regeneração epitelial (TSENG, 1996). Essas células do epitélio corneal estão localizadas no limbo (SHERMER et al., 1986), e acredita-se que as do epitélio conjuntival estejam localizadas no fórnice conjuntival (WEI et al., 1993). É provável que a membrana amniótica, em nosso estudo, tenha servido de substrato para expandir as poucas células germinativas do limbo e as células amplificadoras de transição da córnea que tenham restado após o trauma (TSENG et al., 1998). Sabe-se que a função destas células germinativas é regulada por fatores hormonais, neuronais, vasculares e inflamatórios em progressão no meio estromal do limbo (PIRES et al., 2001). Sabe-se, ainda, que a membrana basal da membrana amniótica que é espessa, possui propriedades antiinflamatórias, antiapoptóticas e inibitórias da cicatrização, provavelmente relacionadas à presença e/ou à inibição de fatores de crescimento tais como TGF- β 1 e 2, bFGF e HGF. Outros estudos demonstraram que o uso da membrana possibilita a restauração de um meio-ambiente estromal perilimbar sem inflamação (TSENG et al., 1998). Sendo assim, a membrana permitiu a recuperação das poucas células germinativas do limbo e fórnice conjuntival, e conseqüente maior reepitelização. É possível que, se a observação clínica fosse prolongada, tivéssemos encontrado uma maior área sem defeito epitelial do que foi observado aqui, onde adotamos um período curto de observação (trinta dias).

Ao longo dos dias, verificou-se que a reparação do defeito epitelial se deu com movimento celular circunferencial, ao longo do limbo córneo-escleral, e centripetamente, a partir do limbo para o centro da córnea, conforme descreveram Dua e Forrester (1990). A análise morfológica confirmou os achados clínicos de defeito epitelial. Em ambas as colorações observaram-se um estroma corneal desnudo nos animais do G1 (lesão), cuja área foi maior na observação de sete dias. Aos trinta dias, a área de defeito epitelial ainda foi grande, se comparado aos animais do G2 (lesão+membrana). Entretanto, ao analisarmos as áreas periféricas dos cortes, observou-se, aos trinta dias, a presença de epitélio corneal hiperplásico e desorganizado, com intensa exocitose de neutrófilos. Porém, nos animais do G2 (lesão+membrana), aos sete dias verificou-se a presença de células epiteliais constituindo o epitélio corneal em camada única, sob a membrana amniótica. De permeio à membrana e no estroma anterior, observou-se reação inflamatória caracterizada por um exsudato inflamatório

neutrofilico e eosinofilico. Aos trinta dias, observou-se uma área desnuda menor, constituída de um epitélio estratificado, tendendo à organização. Sendo assim, infere-se que a membrana amniótica foi capaz de restabelecer o defeito epitelial, com formação de um epitélio microscopicamente mais organizado do que o encontrado nos animais do G1 (lesão+membrana).

É importante informar que não foram observados sinais clínicos e nem morfológicos de fenômenos que indicassem rejeição da membrana, indicando, assim, insucesso cirúrgico. A membrana não expressa os antígenos de histocompatibilidade HLA-A, B ou DR e quando preservada, é considerada imunologicamente inerte, o que a torna uma excelente opção de enxerto (TRELFOORD e TRELFOORD-SAUDER, 1979; ADINOLFI et al., 1982; TSUBOTA et al., 1996).

A opacidade corneal foi progressiva em ambos os grupos e diminuiu à medida que ocorreu a epitelização de parte da córnea. Alguns estudos foram conduzidos e a relacionaram com os fatores causais, principalmente com os processos avulsivos da córnea e exposição do estroma (SCHOENAU e PIPPI, 1993). Os animais do G2 (lesão+membrana) apresentam aparentemente menor opacidade corneal do que os animais do G1 (lesão), mesmo com a presença da membrana sobre a superfície ocular. A análise estatística revelou diferença estatística significativa entre os dois grupos (G1 e G2) apenas no 8º, 9º e 17º dias de observação, com valores próximos ao nível de significância adotada. Entretanto, apenas um caso de conjuntivalização em um animal do G1 (lesão) foi observado. Este fenômeno é escrito em modelos experimentais de trauma à superfície ocular (KRUSE et al., 1990) e ou em casos graves de doenças crônicas da superfície ocular do homem (GOMES et al., 1999; GOMES, 2000). Não observamos formação de tecido cicatricial durante a reparação da córnea. Isso provavelmente ocorreu porque o lado estromal da membrana foi aplicado sobre a superfície lesada. Esta face estromal contém alguns componentes raros da matriz, os quais suprimem a sinalização de TGF- β , proliferação e diferenciação miofibroblástica de fibroblastos da córnea e do limbo (TSENG et al., 1998). Essa ação explica porque o transplante de membrana amniótica ajuda a reduzir a formação de tecido cicatricial durante a reconstrução da superfície conjuntival (TSENG e TSUBOTA, 1997), a prevenir a recorrência de tecido cicatricial após remoção de pterígeo (PIRES et al., 2001) e a reduzir o *haze* corneal após PTK e PRK (WANG et al., 1998). Embora essa ação seja mais efetiva quando os fibroblastos estão em contato com a matriz estromal da membrana, um efeito menor é também observado quando os fibroblastos estão separados ou distantes da membrana, sugerindo, assim, que fatores difusíveis possam também estar envolvidos, além da presença dos componentes insolúveis da membrana. Juntamente com estes achados, vários fatores de crescimento têm sido identificados na membrana amniótica (SATO et al., 1998). Estudos futuros serão necessários para determinar com exatidão este mecanismo de ação (PIRES et al., 2001).

A transparência corneal requer um estroma avascular, mantido em bom estado de hidratação e com um arranjo interno regular das fibrilas de colágeno (CHIRILA et al., 1998). Esse arranjo regular e equidistante das fibrilas de colágeno necessita também da homogeneidade do diâmetro dessas fibrilas na matriz estromal (MAURICE, 1970). Uma das funções primordiais do epitélio corneal é protegê-la, e alterações em sua integridade repercutem diretamente no estroma. Neste estudo, causamos lesão direta sobre o epitélio e também sobre a porção anterior do estroma corneal. Os conceitos depreendidos poderão ser aplicados na prática oftalmológica, onde a manutenção da transparência corneal é fundamental para a obtenção de boa acuidade visual. Acreditamos que os resultados possam contribuir para oftalmologia humana, embora o modelo animal escolhido apresente uma variação anatômica da córnea, quando comparado ao homem, que é o fato de não apresentar a camada de Bowman, que aparentemente exerce uma função importante de barreira na relação epitélio/estroma (SORIANO, 2000). Os aspectos clínicos e morfológicos estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.

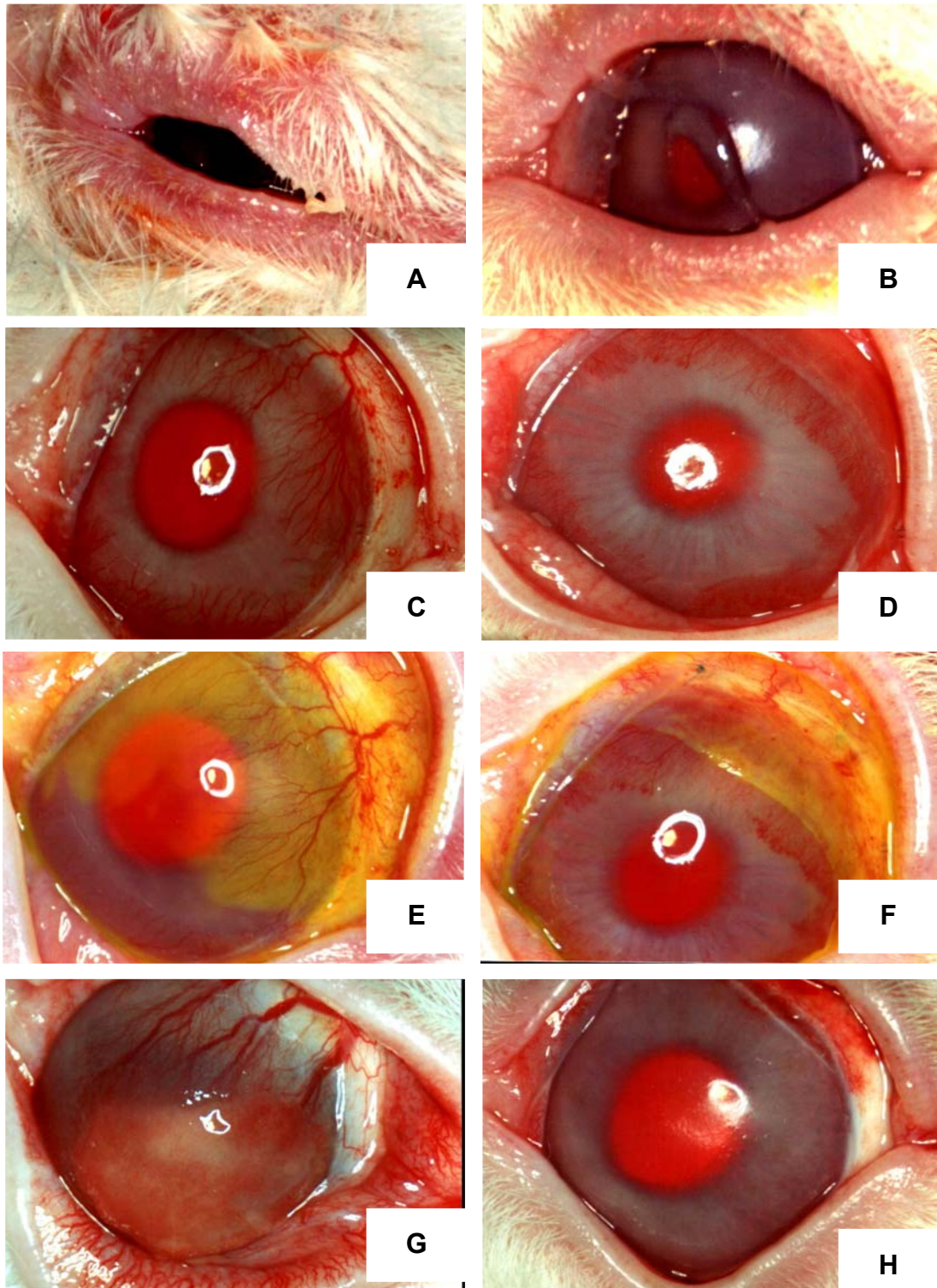


FIGURA 1. Imagem fotográfica do olho no pós-operatório. Em A, observa-se blefarite intensa aos três dias de pós-operatório de um animal do grupo G1 (lesão). Em B, olho de animal do G2 (lesão+membrana) com secreção mucóide aos sete dias de pós-operatório. Em C, vascularização corneal até o eixo visual em olho de animal do G1 (lesão) aos trinta dias de pós-operatório. Em D, olho de animal do G2 (lesão+membrana) aos trinta de pós-operatório, onde se observa vascularização do tipo “brush like”. Em E, observa-se defeito epitelial persistente corado pela fluoresceína em olho de um animal do G1 (lesão) aos trinta dias de pós-operatório. Em F, pequena área de defeito epitelial corado pela fluoresceína em um animal do G2 (lesão+membrana) aos trinta dias de pós-operatório. Observa-se ainda, retração da membrana amniótica junto à porção córneo-escleral temporal (seta). Em G, olho de um animal de G1 (lesão) onde se observa conjuntivalização aos 30 dias de pós-operatório. Em H, olho de um animal do G3 (sem lesão+membrana) aos trinta dias de pós-operatório.

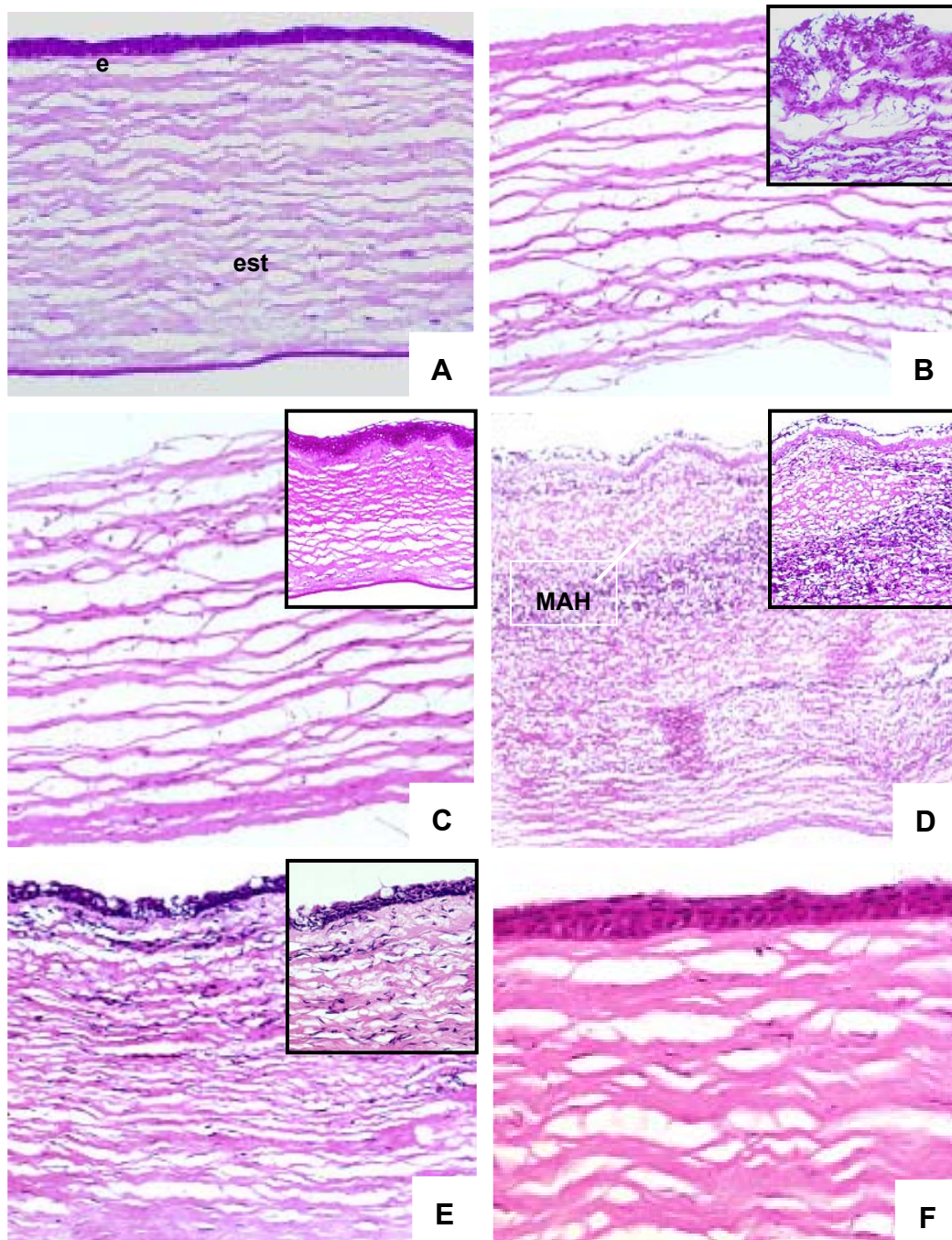


FIGURA 2. Fotomicrografias de córneas de coelhos dos grupos 1, 2 e 3 coradas por H.E. A, córnea normal (e = epitélio; est = estroma). B, córnea de animal do G1 (lesão) aos sete dias; observa-se estroma desnudo e detalhe mostra área de estroma desorganizado com infiltrado polimorfonuclear. C, córnea de animal do G1 (trinta dias). Observa-se estroma desnudo e detalhe mostra região periférica da córnea com epitélio hipertrófico e irregular. D, córnea de animal do G2 (lesão+membrana) aos sete dias; observa-se a membrana amniótica humana revestida superficialmente por infiltrado inflamatório e reação intensa polimorfonuclear no estroma anterior (detalhe). E, córnea de animal do G2 aos trinta dias. Observa-se reação polimorfonuclear e mononuclear com epitélio íntegro, no entanto, ainda sem organização estratificada. F, córnea de animal de G3 aos sete dias. Observa-se organização do epitélio e estroma corneal. (HE 100X e detalhe: 200X).

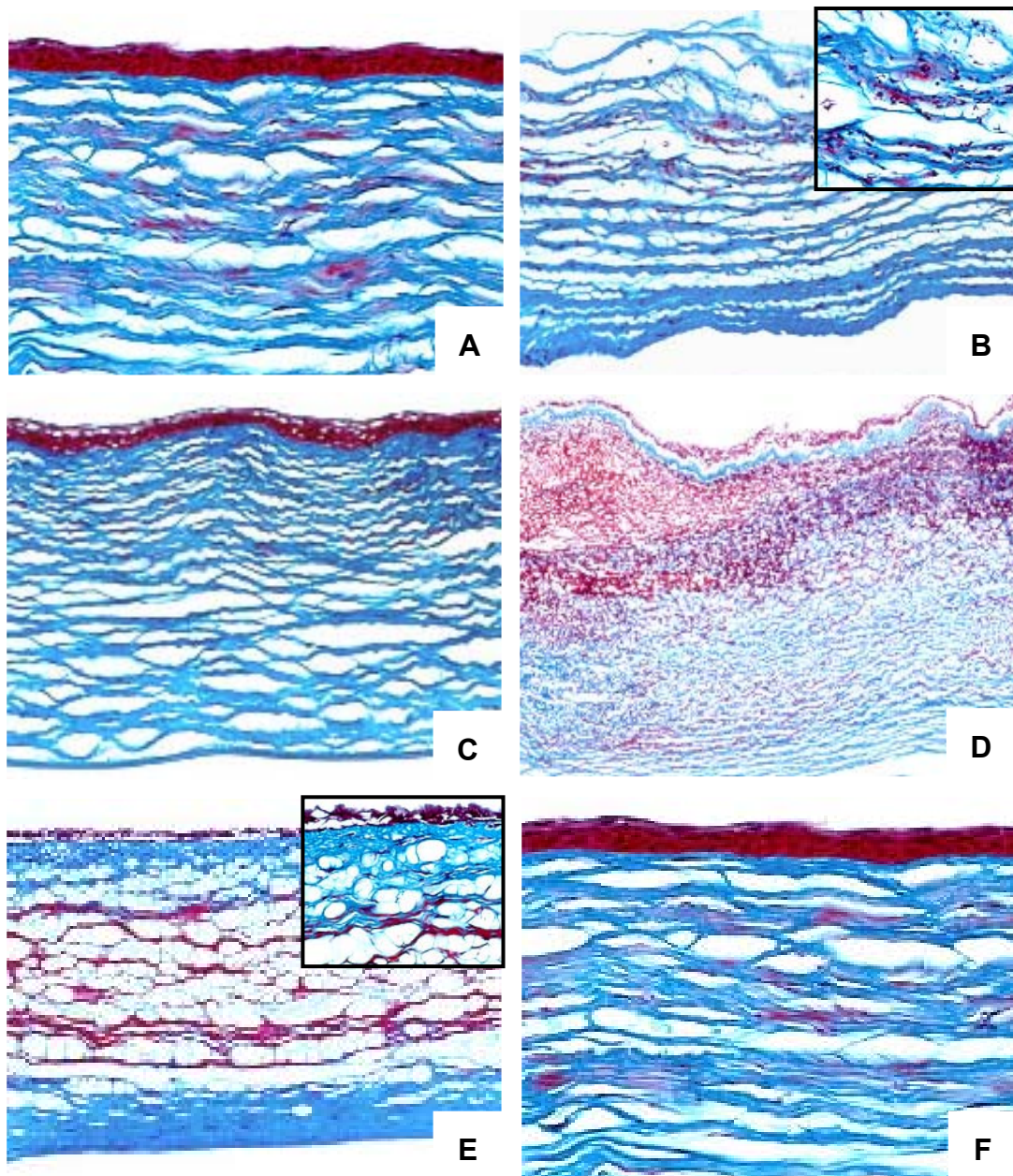


FIGURA 3. Fotomicrografias de córneas de coelhos dos grupos 1, 2 e 3 coradas por Tricrômio de Masson. A, córnea normal. Observam-se células coradas em vermelho e colágeno em azul celeste. B, córnea de animal do G1 (lesão) aos sete dias. Observa-se estroma desnudo e detalhe mostra área do estroma desorganizado com infiltrado polimorfonuclear marcado em vermelho e fibras colágenas em azul. C, córnea de animal do G1 (trinta dias). Observa-se na área periférica da córnea com epitélio hipertrófico e irregular marcado em vermelho. D, córnea de animal do G2 (lesão+membrana) aos sete dias. Observa-se infiltrado inflamatório de permeio às fibras colágenas em azul. Observam-se, ainda, vasos corados em vermelho no estroma anterior da córnea. E, córnea de animal do G2 aos trinta dias. Observa-se epitélio íntegro marcado em vermelho (detalhe) e desorganização estratificada das fibras colágenas. F, córnea de animal de G3 (sem lesão+membrana) aos sete dias. Observa-se organização do epitélio e estroma corneal e, algumas fibras colágenas em vermelho (Tricrômio de Masson, 100X e detalhe: 200X).

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos com a pesquisa, nas condições adotadas, permite-se concluir que:

Os procedimentos de trauma mecânico e químico da superfície ocular de coelhos utilizados foram capazes de produzir um quadro de queimadura da córnea, com defeito epitelial persistente e vascularização corneal em todos os animais.

Clinicamente, a membrana amniótica humana foi capaz de reduzir o defeito epitelial persistente.

Achados histológicos confirmaram os dados clínicos de defeito epitelial, e também mostraram que o epitélio corneal neoformado nos animais que receberam a membrana amniótica era mais organizado do que aquele observado em animais que não receberam a membrana

A aplicação de membrana amniótica humana criopreservada sugere ser um recurso útil para o reparo de queimadura química aguda da córnea.

REFERÊNCIAS

ADINOLFI, M.; AKLE, C.A.; McCOLL, I. Expression of HLA antigens, b2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. **Nature**, v.295; p.325-327, 1982.

ASSOULINE, M. Thérapeutique de la cicatrisation. In: RIGAL, D.. (Ed.). **L'épithélium cornéen**. Paris: Société Française d'Ophthalmologie et Masson, 1993. p.420-439.

CHIRILA, T.V.; HICKS, C.R.; DALTON, P.D.; VIJAYASEKARAN, S.; LOU, X.; HONG, Y.; CLAYTON, A.B.; ZIEGELAAR, B.W.; FITTON, J.H.; PLATTEN, S.; CRAWFORD, G.J.; CONSTABLE, I.J. Artificial córnea. **Prog. Polym. Sci.**, v.23, p.447-473, 1998.

CHO, B.; DJALILIAN, A.R.; OBRITSCH, W.F.; MATTESON, D.M.; CHAN, C.C.; HOLLAND, E.J. Conjunctival epithelial cells cultured on human amniotic membrane to transdifferentiate into corneal epithelial type cells. **Cornea**, v.18, p.216-224, 1999.

CINTRON, C.; HASSINGER, L.; KUBLIN, C.L.; FRIEND, J. Simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizin n-Heptanol. **Ophthalmic. Res.**, v.11, p.90-96, 1979.

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

FOLKMANN, J. Tumor angiogenesis. **Adv. Cancer Res.**, v.43, p.177-203, 1985.

GOLDIM, J.R. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28p.

GOMES, J.A.P. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites cicatríciais. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.63, p.91-96, 2000.

GOMES, J.A.P.; KOMAGOME, C.M.; SANTOS, N.; CHAVES, A.P.; CUNHA, M.C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular nas ceratoconjuntivites cicatríciais. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.62, p.562-576, 1999.

JORGE, E.N. **Avaliação dos efeitos do ketoconazole tópico na regeneração do epitélio corneano: estudo experimental em coelhos**. 1995. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

KENYON, K.R.; TSENG, S.C.G. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v.96, p.709-723, 1989.

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.**, v.20, p.643-666, 1990.

KIM, J.C.; TSENG, S.G.C. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. **Korean J. Ophthalmol.**, v.122, p.38-52, 1995.

KIM, J.S.; KIM, J.C.; NA, B.K.; JEONG, J.M.; SONG, C.Y. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. **Exp. Eye Res.**, v.70, p.329-337, 2000.

KRUSE, F.E.; CHEN, J.J.Y.; TSAI, R.J.F.; TSENG, S.C.G. Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.31, p.1903-1913, 1990.

LAMBIASE, A.; RAMA, P.; BONINI, S.; CAPRIOGLIO, G.; ALOE, L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. **N. Engl. J. Med.**, v.338, p.1174-1180, 1998.

MARINHO, D.R.; LIMA, A.L.H.; KWITKO, S.; KIRST, M.; MÁRSICO, J.; ROEHE, D. Corneal epithelial healing in rabbit eyes with partial corneal-conjunctival limbal deficiency. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.61, p.525-538, 1998.

MAURICE, D.M. The transparency of the corneal stroma. **Vision Res.**, v.10, p.107-108, 1970.

MELLER, D.; TSENG, S.C.G. In vitro conjunctival epithelial differentiation on preserved human amniotic membrane. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.39, S428, 1998.

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

NISHIDA, K.; OHASHI, Y.; NEZU, E.; YAMAMOTO, S.; KINOSHITA, S.; FUJITA, K. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) inhibits epithelial wound healing of organ-cultured rabbit cornea. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**, v.97, p.899-905, 1993.

NOIA, L.C.; ARAÚJO, A.H.G.; MORAES, N.S.B. Queimaduras oculares químicas: epidemiologia e terapêutica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.63, f.5., p.369-373, 2000.

PARENTE, D.R.; SILVA, M.R.B.M.; SILVA JR, R.G.; MARQUES, M.A. Modelos experimentais de deficiência limbar em coelhos – análise clínica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.65, f.2, 2002. Disponível em: <www.abonet.com.br/abo/abo652.htm>.

PEPPER, M.S.; MONTESANO, R.; MANDRIOTA, S.J.; ORCI, L.; VASSALI, J.D. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. **Enzyme Protein**, v.49, p.138-162, 1996.

PIRES, R.T.F.; PIRES, J.L.T.F.; TSENG, S.C.G. Transplante de membrana amniótica para reconstrução da superfície corneana e conjuntival. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 2001. Disponível em: <<http://www.abonet.com.br>>.

PRABHASAWAT, P.; TSENG, S.C.G. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. **Arch. Ophthalmol.**, v.115, p.1360-1367, 1997.

SATO, H.; SHIMAZAKI, K.; TSUBOTA, K. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.39, S428, 1998.

SCHOENAU, L.S.F.; PIPPI, N.L. Aspectos morfológicos e funcionais da córnea: uma breve revisão. **Hora Vet.**, v.12, p.49-53, 1993.

SHAPIRO, M.S.; FRIEND, J.; THOFT, R.A. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.21, p.135-142, 1981.

SHERMER, A.; GALVIN, S.; SUN, T.T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keration in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. **J. Cell Biol.**, v.103, p.49-62, 1986.

SIPPEL, K.C.; MA, J.J.; FOSTER, C.S. Amniotic membrane surgery. **Curr. Opin. Ophthalmol.**, v.12, p.269-281, 2001.

SMITH, R.S.; HAWES, N.L.; KUHLMANN, S.D.; HECKENLIVELY, J.R.; CHANG, B.; RODERICK, T.H.; SUNDBERG, J.P. *Corn1*: a mouse model for corneal surface disease and neovascularization. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.37, p.397-404, 1996.

SORIANO, E.S.; CAMPOS, M.S.Q.; MICHELACCI, Y.M. Effect of epithelial debridement on glycosaminoglycan synthesis by human corneal explants. **Clin. Chim. Acta**, v.295, p.41-62, 2000.

SOTOZONO, C.; INATOMI, T.; NAKAMURA, M.; KINOSHITA, S. Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing *in vivo*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.36, p.1524-1529, 1995.

STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L.; ELNER, V.M.; MARTONYI, C.L.; KOCH, A.E.; POLVERINI, P.J.; ELNER, S.G. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. **Am. J. Pathol.**, v.141, p.1279-12784, 1992.

SWIFT, G.J.S.; AGGARWAL, R.K.; DAVIS, G.J.; COSTER, D.J.; WILLIAMS, K.A. Survival of rabbit limbal stem cell allografts. **Transplantation**, v.62, p.568-574, 1996.

THOFT, R.A.; FRIEND, J.; MURPHY, H.S. Ocular surface epithelium and corneal vascularization in rabbits. The role of wounding. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.18, p.85-92, 1979.

TRELFORD, J.D.; TRELFORD-SAUDER, M. The amnion in surgery, past and present. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.134, p.833-845, 1979.

TSAI, R.J.F.; SUN, T.T.; TSENG, S.C.G. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. **Ophthalmology**, v.97, p.446-455, 1990.

TSENG, S.C.G.; TSUBOTA, K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. **Am. J. Ophthalmol.**, v.124, p.825-835, 1997.

TSENG, S.C.G.; HIRST, L.W.; MAUMENEE, A.K.; KENYON, K.R.; SUN, T.T.; GREEN, W.R. Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin deficient disorders. **Ophthalmology**, v.91, p.545-552, 1984.

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

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

TSUBOTA, K.; SATAKE, Y.; KAIDO, M.; SHINOZAKI, N.; SHIMMURA, S.; BISSEMIYAJIMA, H.; SHIMAZAKI, J. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.1697-1703, 1999.

VAN DER VEEN, G.; BROERSMA, L.; DIJKSTRA, C.D.; VAN ROOIJEN, N.; VAN RIJ, G.; VAN DER GAAG, R. Prevention of corneal allograft rejection in rats treated with subconjunctival injections of liposomes containing dichloromethylene. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.35, p.3505-3515, 1994.

VAN KLINK, F.; ALIZADEH, H.; HE, Y.; MELLON, J.A.; SILVANY, R.E.; MCCULLEY, J.P.; NIEDERKORN, J.Y. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of Acanthamoeba keratitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.34, p.1937-1944, 1993.

WANG, M.X.; GRAY, T.; PRABHASAWAT, P., MA, X.; DING, F.Y.; HERNANDEZ, E.; SANABRIA, O.; CULBERTSON, W.; HANNA, K.; FOSTER, R.K.; TSENG, S.C.G. Corneal haze and apoptosis is reduced by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.39, p.1908, pt1, 1998.

WARING, G.O. Corneal structure and pathophysiology. In: LEIBOWITZ, H. **Corneal disorders: clinical diagnosis and management**. Philadelphia: WB Saunders, 1984. p.3-25.

WEI, Z.G.; WU, R.L.; LAVKER, R.M.; SUN, T.T. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implication on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.34, p.1814-1828, 1993.

WILSON, S.E.; WALKER, J.W.; CHWANG, E.L.; HE, Y.G. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.34, p.2544-2561, 1993.

YANOFF, M.; FINE, B.S. **Ocular pathology: a text and atlas**. 3.ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1989.

YAO, Y.F.; INOUE, Y.; HARA, Y.; KIRITOSHI, A.; OHASHI, Y. Suppression of graft rejection in rat keratoepithelioplasty by anterior chamber inoculation of donor lymphocytes. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v.38, p.345-352, 1994.

Recebido em: 07/07/2008

Aceito em: 08/10/2008