

Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica

Experimental corneal ulcer treated with amniotic membrane

Eliana Cristina Louza Monteiro ⁽¹⁾

Silvana Artioli Schellini ⁽²⁾

Mariângela E. Alencar Marques ⁽³⁾

Amélia Kamegasawa ⁽⁴⁾

Carlos Roberto Padovani ⁽⁵⁾

RESUMO

Objetivo: Avaliar a evolução da úlcera de córnea experimental tratada com enxerto de membrana amniótica (MA) homóloga.

Métodos: Foram utilizados 18 coelhos, divididos em dois grupos experimentais: úlcera corneana (G1) e úlcera corneana tratada com enxerto de MA (G2). A ulceração corneana foi induzida na córnea toda, com álcool absoluto e lâmina de bisturi. Os animais foram sacrificados em três momentos experimentais: 7 dias (M1), 15 dias (M2) e 30 dias (M3) após a indução da ulceração. Os defeitos corneanos foram avaliados com fotodocumentação por analisador de imagem Luzex-F e exames histopatológicos, comparando-se os resultados por meio da análise de variância.

Resultados: O resultado do exame morfométrico mostrou desepitelização maior em G2 no M1; a opacidade corneana foi mais intensa na área central da córnea, sendo significativamente maior em G1 no M3. Os neovasos corneanos também foram mais intensos em G1. A avaliação histopatológica revelou ulceração epitelial em dois animais de G1 no M2 e em dois de G2 no M1; o edema estromal foi mais intenso em G1, assim como a presença de neovasos.

Conclusão: O uso de MA homóloga no tratamento da úlcera corneana experimental não acelerou a cicatrização, porém preveniu o edema estromal e a formação de neovascularização corneana. A cicatrização se mostrou mais deficiente na área central da córnea.

Palavras-chave: Úlcera corneana; Membrana amniótica; Cicatrização corneana.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu

Apresentado como tema livre no XXX Congresso Brasileiro de Oftalmologia-1999

⁽¹⁾ Ex-Residente da Disciplina de Oftalmologia do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

⁽²⁾ Professor Assistente Doutor do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP.

⁽³⁾ Professor Assistente Doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

⁽⁴⁾ Professor Assistente do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

⁽⁵⁾ Professor Titular do Departamento de Bioestatística-IB - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Endereço para correspondência: Silvana Artioli Schellini. Dep. OFT/ORL/CCP.Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Botucatu - São Paulo Brasil. Cep 18618-000. e-mail: btrcs@zaz.com.br

INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização corneana se dá diferentemente, de acordo com a extensão e a causa da injúria. Sendo a desepitelização superficial, de pequena extensão e não havendo quadro infeccioso, o processo de cicatrização deve ocorrer em até 24 horas. A cicatrização ocorre através da restituição direta das camadas epiteliais corneanas ou através do crescimento epitelial conjuntival (conjuntivalização) com neovascularização e defeitos epiteliais corneanos persistentes ou recorrentes.

Vários são os tratamentos sugeridos para auxiliar o processo de cicatrização, abreviando o tempo de desepitelização. Recentemente foi sugerido o uso da membrana amniótica (MA) como tratamento da úlcera corneana química experimental em coelhos ¹. Outras utilizações para MA seriam nos portadores de ceratoconjuntivites cicatriciais ², no penfigóide cicatricial ³ e nas queimaduras oculares térmicas e químicas ⁴.

O efeito da MA sobre os defeitos da superfície ocular ainda são

especulativos. Este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da utilização da MA no tratamento da úlcera corneana experimental em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 coelhos albinos, machos, pesando de 1000 a 1500 g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram divididos por sorteio em dois grupos experimentais: grupo controle (G1), no qual foi removido o epitélio corneano e o grupo tratado (G2), no qual a desepitelização corneana foi tratada com transplante de MA homóloga.

A MA utilizada foi de coelhas, obtida de parto cesariana, tendo sido lavada em soro fisiológico 0,9% e cefalotina (1 g) e conservada em glicerina a 5°C por período máximo de 5 dias.

Os procedimentos foram realizados com os animais anestesiados, utilizando-se Pentobarbital Sódico 2% (Abbot Laboratórios do Brasil), na dose de 30mg/kg de peso, por via endovenosa.

Foi instilado colírio de Vitelinato de Prata 10% (Frumtost-Allergan), procedendo-se a desepitelização química e mecânica da córnea, usando álcool absoluto por 20 segundos e removendo-se, em seguida, o epitélio em toda a extensão da córnea com bisturi lâmina 15 (Becton-Dickinson). No G1 foi realizada tarsorrafia com Seda preta 6-0 (Cirumédica). No G2 foi colocada, sobre a área desepitelizada, a MA previamente retirada da glicerina e reidratada em soro fisiológico 0,9% e suturada à conjuntiva límbica com pontos contínuos de Vicryl 8-0 (Ethicon). Em seguida, foi realizada tarsorrafia com Seda 6-0.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração “ad libitum” e o sacrifício, foi realizado de acordo com os momentos experimentais: 7 dias (M1), 15 dias (M2) e 30 dias (M3), após o procedimento cirúrgico, sacrificando-se 3 animais de cada grupo, a cada momento experimental.

A avaliação clínica foi feita no dia do sacrifício, realizandose o exame externo e a fotodocumentação com máquina fotográfica Asahi Pentax K1000 (Asahi Optical CO), com objetiva para macro-fotografia de 100 mm, com distância de foco padronizada com e sem a instilação de fluoresceína líquida 2% (Frumtost-Allergan). Em seguida procedeu-se à retirada da córnea, conservando-a em formol 10%. As córneas foram recortadas em fragmentos de 0,2 por 0,5 cm e processadas para exame histopatológico segundo rotina do Departamento de Patologia-UNESP, que consiste de desidratação automatizada em álcool absoluto (Nuclear) a 70%, 80% e 95%. A emblocagem foi feita em parafina e os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (Merck).

Estudou-se a cicatrização corneana por meio de: 1) análise das fotografias, em analisador de imagens Luzex-F (Nireco), avaliando-se a área (mm²) dos defeitos corneanos existentes (úlceras, opacidade e neovasos). Os resultados obtidos foram submetidos à técnica da análise de Variância para o esquema fatorial 2x3, para experimentos inteiramente casualizados⁵;

2) avaliação dos cortes histopatológicos, interessando o epitélio (morfologia celular e presença de ulceração) e o estroma (presença de edema e processo inflamatório) corneano.

RESULTADOS

Todos os animais (G1e G2) submetidos a ulceração aguda da córnea, apresentaram secreção esbranquiçada, sem sinais de infecção.

O estudo morfométrico da área da úlcera, opacidade e neovasos corneanos, assim como o resultado do teste estatístico, realizado nos dois grupos e nos três momentos experimentais está apresentado nas tabelas 1, 2 e 3. Quanto à ulceração corneana, observou-se diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2 em M1, onde os animais de G2 tiveram desepitelização maior que os de G1. Esta foi a única alteração significativa, apesar de animais de G1 ainda terem

Tabela 1. Média e desvio padrão da área de desepitelização corneana em coelhos segundo grupo, nos diferentes momentos experimentais – UNESP, 1999.

Grupo	Momento		
	1	2	3
G1	0,00 ± 0,00 aA	2,80 ± 2,58 aA	2 0,00 ± 0,00 aA
G2	4,13 ± 3,60 bB	0,00 ± 0,00 aA	0,00 ± 0,00 aA

DMS (5%) = 3,20; comparação de grupos fixado o momento (significâncias apontadas por letras minúsculas diferentes)

DMS (5%) = 3,93; comparação de momentos dentro de grupo (significâncias apontadas por letras maiúsculas diferentes)

Tabela 2. Média e desvio padrão da área de capacidade corneana em coelhos segundo grupo, nos diferentes momentos experimentais – UNESP, 1999.

Grupo	Momento		
	1	2	3
G1	8,63 ± 0,55 aA	8,20 ± 4,24 aA	14,37 ± 14,01 bA
G2	9,97 ± 1,97 aA	12,46 ± 2,76 aA	0,00 ± 0,00 aA

DMS (5%) = 10,87; comparação de grupos fixado o momento (significâncias apontadas por letras minúsculas diferentes).

DMS (5%) = 3,53; comparação de momentos dentro de grupo (significâncias apontadas por letras maiúsculas diferentes).

Tabela 3. Média e desvio padrão da área de neovasos corneanos em coelhos segundo grupo, nos diferentes momentos experimentais – UNESP, 1999.

Grupo	Momento		
	1	2	3
G1	1,47 ± 2,54 aA	3,97 ± 3,46 aA	47,00 ± 40,95 bB
G2	0,00 ± 0,00 aA	1,97 ± 3,41 aA	0,00 ± 0,00 aA

DMS (5%) = 29,85; comparação de grupos fixado o momento (significâncias apontadas por letras minúsculas diferentes).

DMS (5%) = 36,60; comparação de momentos dentro de grupo (significâncias apontadas por letras maiúsculas diferentes).

apresentado ulceração em M2. A comparação da presença de ulceração nos diferentes momentos experimentais mostrou em G2, significância do M1 sobre os outros dois, os quais foram semelhantes entre si. No G1, não houve diferença significativa nos diversos momentos experimentais (Tabela 1).

A opacidade corneana (Tabela 2) ocorreu em G1 e em G2, em intensidades semelhantes em todos os momentos experimentais, com exceção em M3, quando os animais de G1 apresentaram opacidade média superior aos animais de G2. A opacidade corneana foi mais intensa na região central da córnea em todos os animais que a apresentaram.

Com relação aos neovasos (Tabela 3), a comparação entre os grupos e entre os momentos foi diferente apenas em M3, quando animais de G1 apresentaram neovasos em quantidade muito superior aos animais de G2, sendo que esta observação não ocorreu nos demais momentos.

A avaliação histopatológica (Tabela 4) mostrou presença de úlcera em dois animais de G1 em M2 e dois de G2 em M1. Foi possível observar espaçamento entre os ceratócitos, traduzido como edema corneano, mais intenso e presente em todos os animais do G1; no G2, apenas em M1 foi observado edema mais intenso, restringindo-se depois a um animal em M2 e um em M3. Com relação a neovasos na córnea, a observação foi mais freqüente em animais de G1. Com o uso da MA (G2), o processo inflamatório foi mais acentuado inicialmente (M1), porém diminuindo em M2 e M3, ao contrário do observado em G1. Ressalte-se que a MA não foi observada em nenhum dos cortes histopatológicos analisados. Na figura 1 apresentamos fotomicrografias de G1 (Figura 1 - a, b, c) e de G2 (Figura 1 - d, e, f).

DISCUSSÃO

O uso da MA teve origem no começo deste século, quando Davis ⁶ propôs a sua utilização como transplante sobre a pele. Muitos outros usos foram sugeridos, como para correção de queimaduras da pele, fistula entero-cutânea, prevenção de adesões meningo-cerebrais, cirurgias pélvicas, reparo de nervos e de tendões ⁷.

É sugerido o uso da MA “in vitro” como substrato para cultura de células (pneumócitos e células endometriais) ⁶.

O uso da MA em Oftalmologia foi relatado por De Roth ⁸

na década de 40, no reparo de defeitos conjuntivais, como o simbléfaro.

Para este estudo foi utilizada MA homóloga para a realização do transplante. Kim & Tseng ¹ fizeram o uso de MA humana para correção de defeitos epiteliais oculares de coelhos, não se preocupando com possíveis alterações imunológicas. A antigenicidade existe no córion; no âmion, a inexistência de leucócitos facilita a realização dos halo-transplantes, não havendo chances de rejeição ^{7,9}.

O método de conservação com manutenção da MA em glicerina e à temperatura de 5°C, foi utilizado por nós e também por Kim & Tseng ¹. Atualmente, é o meio de Eagle modificado por Dulbecco e glicerol (1:1), estocado a -80°C, o mais utilizado ^{10,11}. Outros apenas colocam a MA a -80°C, para uso em período de 2 semanas ².

A observação do modo adequado de conservação da MA é muito importante. O uso de MA degenerada, sem dúvida, prejudica o resultado.

É prática freqüente e necessária adicionar antibióticos para esterilização da MA. Utilizamos cefalotina, mas vários são os esquemas propostos.

O âmion e o córion são entidades biologicamente distintas. O âmion é uma membrana muito fina, transparente, sendo difícil identificar-se qual é a face epitelial e a face coriônica a olho nu. Pode-se tornar mais fácil a identificação, colocando-se a MA sobre folha de papel de nitrocelulose, com a face epitelial voltada para cima.

A indução de úlcera de córnea experimental pode ser feita por vários métodos. Neste estudo utilizou-se desepitelização química associada à mecânica, realizada em toda a superfície corneana.

Tanto animais do G1 (úlceras de córnea), como do G2 (úlceras de córnea e MA), tiveram as pálpebras cerradas por tarsorrafia. Esta medida foi tomada visando diminuir o desconforto da úlcera em G1 e impedir que os animais de G2 removessem mecanicamente os transplantes.

Procurou-se avaliar o processo cicatricial por dois métodos: clínico (com fotodocumentação) e histopatológico, assim como quantificar as alterações morfometricamente. Clinicamente observou-se que nenhum animal apresentou sinais de infecção que pudessem interferir nos resultados.

A ulceração corneana regrediu, tanto nos coelhos nos quais se realizou o transplante de MA (G2), como nos que não a receberam (G1), estando os animais de G2 em desvantagem

Tabela 4. Análise histopatológica dos grupos G1 e G2, nos diferentes momentos experimentais – UNESP, 1999.

Grupo	G1									G2								
	M1			M2			M3			M1			M2			M3		
Momento	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Coelhos	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Úlcera	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Edema	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Neovasos	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Inflamação	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
[-] ausente		[+] presente																

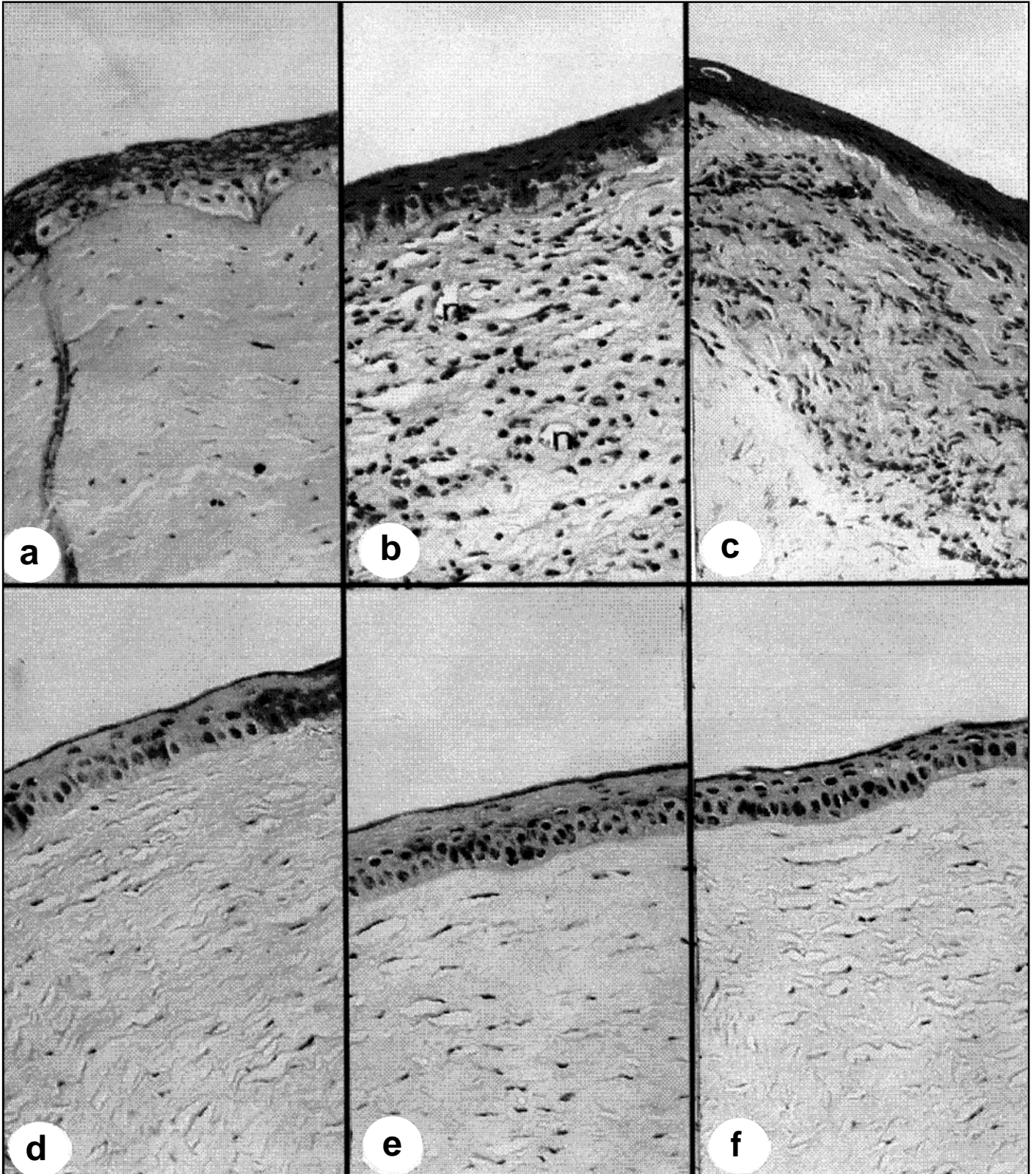


Fig. 1 - Fotomicrografias de córnea de coelho:
a, b, c: Grupo 1 (G1) - úlcera de córnea. a: G1 - M1; b: G1 - M2 - observar inúmeros neovasos (n), hemácias e células inflamatórias; c: G1 - M3 - área representativa de leucoma clinicamente, observando-se a presença de cicatriz estromal com distribuição desordenada dos ceratócitos.
d, e, f: Grupo 2 (2) - úlcera de córnea tratada com membrana amniótica. d: G2 - M1; e: G2 - M2; f: G2 - M3 (HE - 40x).

aos de G1 após 7 dias da cirurgia (M1). Apesar de se pensar ser a MA capaz de acelerar a cicatrização, já se constatou que o uso de MA não influi na velocidade de reparação⁷.

As opacidades corneanas coincidiram com as observações histopatológicas sugestivas de edema estromal. Por ter a MA ação semelhante a uma membrana semi-permeável, controlando o movimento iônico e atuando na reabsorção ativa do sódio do espaço inter-celular, mantendo o balanço entre forças hidrostáticas e osmóticas⁷, é possível que o edema estromal tenha sido prevenido nos animais do G2.

Os neovasos foram mais freqüentes nos animais em que não se usou a MA. Sabe-se que a presença dos neovasos na córnea se associa ao edema, principalmente crônico e que foi mais freqüente em G1. Além disso, já se constatou que, com o uso do transplantado de MA, existe inibição da neovascularização¹⁴.

Também a presença de células inflamatórias pode ter contribuído para a manutenção do edema e neovascularização em G1.

A MA age como uma membrana basal, facilitando a migração de células epiteliais, reforçando a adesão de células basais, promovendo a diferenciação epitelial e prevenindo a apoptose¹⁶. O emprego da MA em úlceras experimentais de coelhos não influiu na velocidade de cicatrização. O seu uso em superfícies ulceradas é útil por promover diminuição da dor, do risco de infecção e da perda de fluidos⁷.

O uso da MA em úlcera corneana experimental de coelhos mostrou-nos resultados positivos. Por ser a MA de fácil obtenção e conservação, a sua utilização em Oftalmologia deve se ampliar.

Agradecimentos: À Srta. Eliete Correa Soares da Nobrega de Jesus pelo serviço de fotodocumentação.

SUMMARY

Purpose: To evaluate healing of experimental corneal ulcer of rabbit eyes treated with homologous amniotic membrane (AM) graft.

Methods: 18 rabbits were used and divided into two experimental groups: corneal ulcer (G1) and corneal ulcer treated with AM graft (G2). Corneal ulcer was induced by a total epithelial removal using a scalpel and absolute alcohol. The animals were sacrificed at three experimental moments: 7 days (M1), 15 days (M2) and 30 days (M3) after the induction of the ulceration. Corneal defects were evaluated with image analyzer Luzex-F and histopathologic examinations and the results were compared through variance analysis.

Results: Morphometric results showed corneal ulcer in G2 at M1; corneal opacity was identified in the central area and was significantly larger in G1 at M3. New corneal vessels were more active in the G1 animals. Histopathologic evaluation revealed epithelial defects in two animals of G1 at M2, and in two of G2 at M1; stromal edema was more intense in G1, as well as the presence of new vessels. Conclusion: The use of homologous MA in the treatment of experimental corneal ulcer did not accelerate epithelial healing but it prevented stromal edema and new vessel formation. Epithelial healing was poorer in the central region of the cornea.

Keywords: Corneal ulcer; Amniotic membrane; Corneal cicatrization.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14:473-84.
2. Gomes JAP, Komagome CM, Santos N, Chaves AP, Cunha MC, Freitas D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular nas ceratoconjuntivites cicatríciais. *Arq Bras Oftalmol* 1999;62:562-74.
3. Tsubota K, Satake Y, Shimazaki J. Treatment of severe dry eye [letter]. *Lancet* 1996;348:123.
4. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997;104:2068-76.
5. Montgomery DC. Design of experiments. 3 ed. John Wiley, New York. 641 p.
6. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at The Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 1910;15:307.
7. Trelford JD, Trelford Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:833-45.
8. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 1940;23:522.
9. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM. et al. The human amnion is a site of MHC class Ib expression. *J Immunol* 1995;154:5665-74.
10. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic Membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765-74.
11. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SCG. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997;104:974-85.
12. Tsai J, Tseng SGC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994;13:389-400.
13. Tseng SCG. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep* 1996;23:47-58.
14. Trelford JM, Hanson FW, Anderson DG. Wound healing and the amniotic membrane. *J Med* 1975;6:383.
15. Tseng SCG, Hirst LW, Farazdaghi M, Green WR. Globet cell density and vascularization during conjunctival transdifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1168-76.
16. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic Membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-12.

Novidades na Internet!!!

Agora no site CBO você tem disponível todas as informações na íntegra dos Arquivos Brasileiros de Oftalmologia
<http://www.cbo.com.br/abo>