

PREPARO DA MATRIZ ACELULAR DE CÓRNEA SUÍNA E APLICABILIDADE EM CERATITES ULCERATIVAS – ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Paulo César Gonçalves Perpétua¹; Marcela Nunes Liberati¹; Nilson Didoni²; Juliany Gomez Quitzan³

RESUMO: As lesões ulcerativas de córnea representam um desafio ao clínico veterinário, já que podem evoluir para descemetocelose e perfuração do globo ocular. Uma agressão grave promove a destruição das células germinativas do limbo, obrigando que o reparo da córnea ocorra pelas células conjuntivais o que resulta em neovascularização corneana e opacidade que podem torna-se irreversíveis, causando cegueira no paciente. Atualmente, a membrana amniótica é o material mais utilizado para coberturas de defeitos corneanos em humanos. Porém, o alto custo do material preservado e sua curta durabilidade limitam o uso na medicina veterinária. A facilidade de obtenção e preparação da córnea suína para uso oftálmico, pode torná-lo uma ferramenta importante à medicina referida a lesões corneanas, uma vez que espera-se garantir a descelularização completa do material com dodecil sulfato de sódio (SDS). Foram utilizados 20 coelhos machos provenientes do biotério da UEM (Universidade estadual de Maringá), estes foram aleatoriamente divididos em dois grupos (A e B). O grupo A foi o grupo controle, onde foram realizadas queimaduras com hidróxido de sódio sobre o olho direito e enxágue do mesmo com solução cloreto de sódio a 0,9%. O grupo B, além da queimadura e lavagem, recebeu o implante de membrana suína. Os animais tiveram os olhos fotografados e corados com fluoresceína a cada sete dias por um período de 30 dias. Contudo análises macroscópicas não revelaram diferenças significativas entre os animais do grupo A e B decorridos 30 dias do procedimento de fixação da membrana.

PALAVRAS-CHAVE: úlcera, córnea, implante.

1 INTRODUÇÃO

A córnea é um tecido avascular localizado na superfície anterior do globo ocular e é responsável por aproximadamente 75% do poder refrativo necessário para focar a imagem na retina (ZHANG, 2007).

Ulcerações corneanas podem ocorrer devido contato dos olhos com substâncias químicas, traumas e secundárias a doenças locais ou sistêmicas. Descemetocelose e perfuração da cornea são as principais complicações relacionadas às ceratites ulcerativas (KHANNA, 2008).

Sabe-se que as queimaduras químicas causadas por agentes alcalinos, como amônia e soda cáustica, tem pior prognóstico que as queimaduras causadas por

¹ Discentes do Curso de Medicina Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). pcgp_veterinario@hotmail.com; marcela_liberati@hotmail.com.

² Co-orientador e Docente do curso de Medicina. Departamento de Medicina da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. didoni@teracom.com.br

³ Orientadora e Docente do Curso de Medicina Veterinária. Departamento de Medicina veterinária do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá – Paraná. juliany@cesumar.br

substâncias ácidas, devido à grande capacidade de penetração nas estruturas oculares.

Uma agressão química grave (WAGONER, 1977). Uma agressão química grave, com conseqüente destruição das células germinativas do limbo, faz com que o reparo da córnea ocorra pelas células epiteliais conjuntivais, resultando em neovascularização, inflamação crônica, defeito epitelial persistente e opacificação estromal, causando perda visual e desconforto crônico (KENYON, 1989).

Atualmente, a engenharia de tecidos tem oferecido novas oportunidades terapêuticas, por meio de bioengenharia, coordenando o desenvolvimento de substitutos biológicos. A tecnologia in vivo viabiliza materiais biodegradáveis, conhecidos como matrizes. Independente do procedimento cirúrgico, quando matrizes biológicas heterólogas são utilizadas, é necessário instituir rigoroso preparo que garanta a descelularização. A reação imunológica ocasionada pela implantação de um material celular em outro organismo indubitavelmente compromete a viabilidade do procedimento. Dentre os importantes benefícios inerentes ao uso de matrizes acelulares, destaca-se a pronta disponibilidade do material.

A dissecação e liofilização são métodos físicos utilizados para preparo e conservação de membranas biológicas. Métodos químicos também podem ser empregados na descelularização de matrizes. A utilização de córnea preservada de suínos foi experimentalmente descrita como forma de tratamento em úlceras químicas de coelhos, com bons resultados. Os autores relatam que o preparo da matriz foi feito com o detergente enzimático Triton X-100 (ZHANG, 2007). Outro detergente comumente usado em descelularizações é o dodecil sulfato de sódio (SDS). Esta substância faz parte da composição química de muitos cosméticos, produtos para higiene e limpeza. A investigação das suas propriedades aplicadas à bioengenharia é observada principalmente nas pesquisas cardiovasculares, envolvendo descelularização de próteses valvares (Da COSTA, 2004). Schaner et al. (2004) referem que o detergente é capaz de lisar células uniformemente, em todas as camadas do tecido. O uso da matriz de córnea suína, preparada com SDS, ainda não foi utilizada como cobertura corneana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 coelhos machos proveniente do biotério da UEM (Universidade Estadual de Maringá), divididos em 2 grupos, Grupo A (queimadura química) e Grupo B (queimadura química e posterior cobertura com camada estromal de córnea suína).

Os animais receberam acepromazina (1 mg/kg) e fentanil (3µg/ kg) intramuscular (IM). Posteriormente receberam quetamina (30 mg/ kg) e diazepam (2 mg/ kg) IM.

Foram provocadas queimaduras corneanas químicas unilateral direita em todos os coelhos (Grupo A e B), com a instilação de 0,2 mL de solução de NaOH 0,5N, utilizando um recipiente plástico de 15 mm de diâmetro, para delimitar a área que permaneceu 20 segundos em contato com a substância química. A seguir, foi feita a lavagem do olho com 500 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%).

Nos animais selecionados aleatoriamente para o grupo B, após a queimadura química, foi realizada a fixação da membrana estromal suína sobre o olho direito. Com o auxílio de magnificação óptica, iniciou-se o procedimento com uma dissecação perilimbar de conjuntiva a 360 graus e sutura da membrana estromal na conjuntiva bulbar, com fio absorvível de poliglactina 8.0 em pontos simples isolados distribuídos em 8 pontos de fixação dispostos as 12, 2, 3, 5, 6, 8, 9 e 11 horas.

Após o procedimento cirúrgico todos os animais receberam a administração de cetoprofeno na dose de 3 mg/kg a cada 24 horas e Meperidina na dose de 12 mg/kg a

cada 12 horas por via subcutânea (SC) até o 5º dia de pós operatório. Além disso, foi instilado no olho direito uma gota de colírio a base de tobramicina e dexametasona, quatro vezes ao dia, durante 15 dias. Após 7-15-21 e 30 dias, os olhos dos animais foram fotografados afim de mostrar a evolução clínica macroscópica do quadro.

Seguidos 30 dias os animais pertencentes aos dois grupos, foram submetidos a eutanásia. O protocolo estipulado foi o mesmo descrito para o procedimento cirúrgico, seguido pelo uso intravenoso de tiopental sódico na dose de 50 mg/kg, posteriormente foi administrado cloreto de potássio (KCl) até que os batimentos cardíacos.

Após a eutanásia foi realizada a ceratectomia da córnea direita dos animais pertencentes aos dois grupos, as córneas foram acondicionadas em formalina tamponada 10% e posteriormente enviadas ao serviço de patologia ocular da UNIFESP-EPM.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Passados 7 dias do procedimento cirúrgico os 10 animais do grupo B (100%) apresentavam opacidade corneal, secreção purulenta intensa e blefaroespasma, 4 animais (40%) apresentavam colabamento de pálpebras, nesse período 3 animais (30%) vieram a óbito por complicações pulmonares hiperagudas relacionadas à brusca queda de temperatura no período, levando a uma redução de 30% na amostra B. Nenhum dos animais apresentou formação de microvasos corneais visíveis a olho nu sob a membrana inserida. Não houveram animais com perda parcial ou total da membrana nesse período. No grupo A foram observados opacidade corneal, secreção purulenta intensa e blefaroespasma nos 10 animais (100%), 2 animais apresentavam colabamento de pálpebras, 6 animais (60%) apresentavam microvasos corneais visíveis a olho nu.

Ao completar 15 dias do procedimento de inserção da membrana estromal suína os animais foram reavaliados. No grupo B observou-se secreção ocular discreta em 2 (25%) dos animais e ausência de secreção em 5 animais (75%); 7 animais (100%) não apresentavam microvasos corneais visíveis, a opacidade corneal era menos acentuada embora permanecesse em 100% dos animais. No período, 1 (13%) dos animais tiveram perda total da membrana.

Entre os animais pertencentes ao grupo A, contatou-se aos 15 dias: 10 animais (100%) com opacidade corneana moderada, 1 animal (10%) com secreção purulenta, 8 animais (80%) com presença de microvasos corneais que se prolongavam em direção ao centro da córnea, sendo mais longos que aos 7 dias, .

Ao seguimento de 21 dias do implante biológico constatou-se no grupo B ausência de secreção ocular purulenta em 100% dos animais, ausência de microvasos corneais visíveis em 100% dos animais e presença de opacidade, embora menos acentuada que aos 15 dias, em 100% dos animais. Nesse período 2 (25%) dos animais tiveram perda total da membrana.

No grupo A observou-se ausência de secreção purulenta, presença de microvasos corneais em 9 animais (90%) e opacidade corneana leve em 100% dos animais.

Completando 30 dias após a rafia da córnea suína sob a conjuntiva dos coelhos (grupo B) observou-se ausência de secreção purulenta em 7 (100%) dos animais, ausência de microvasos em 100% animais, opacidade corneana presente em 100% dos animais, embora menos acentuada que nos períodos anteriores. Nesse período foi realizada a eutanásia e enucleação de todos os animais e constatou-se que 3 (38%) dos animais tiveram queda parcial da membrana, totalizando portanto: 3 (38%) quedas parciais, 1 (13%) permanência total e 3 (38%) quedas totais da membrana estromal suína aos 30 dias.

No grupo A foram encontrados ausência de secreção purulenta, presença de microvasos corneais em 9 animais (90%) e opacidade corneana leve em 100% dos animais.

Após a eutanásia foram feitas a remoção das córneas dos animais de ambos os grupos, fixadas em formol e encaminhadas ao serviço de patologia ocular da UNIFESP-EPM para o estudo histopatológico e anatomopatológico destas. Até o presente momento aguarda-se o laudo histopatológico para realização das comparações microscópicas entre os grupos A e B.

As alterações macroscópicas relacionadas ao descolamento das membranas estromais suínas, constatadas no decorrer dos dias, nos animais do grupo B podem estar relacionadas a vários fatores, entre eles podemos destacar a não permanência de colar elisabetano nos animais, a início tentou-se instituir o uso do colar, entretanto notou-se que os animais apresentavam sinais evidentes de estresse e mutilação tais como: trauma induzido por prurido, anorexia, prostração e redução de ingestão hídrica, sinais estes incompatíveis ao quesitos de bem estar animal recomendados pelo comitê de bioética animal do CESUMAR, portanto julgou-se necessário a remoção dos colares, embora não tenha sido observado trauma ocular em nenhum dos animais, é possível que a não permanência do colar permitisse que os animais tivessem livre acesso ao olho lesionado. Outro fator predisponente ao descolamento foi a reação inflamatória ocular intensa gerada nas primeiras semanas podendo ter enfraquecido a resistência dos fios de poliglactina que são comumente degradados por hidrólise, como citado por Andrade et al (2000).

As reações de neovascularização presentes em 9 animais (90%) do grupo A eram esperadas já que como descrito por Thoft (1977) Queimaduras químicas causadas por substâncias alcalinas, podem levar a graves complicações como: defeitos epiteliais persistentes, úlceras tróficas, neovascularização, necrose corneana ou até perfurações oculares, interferindo diretamente na perda da transparência corneana e redução da acuidade visual. Embora a opacidade corneana notada em ambos os grupos ao final do experimento tenha sido de 100% os animais do grupo B não apresentaram presença de microvasos corneais visíveis a olho nu, mesmo sendo a queimadura corneana padronizada igualmente para os dois grupos. Acredita-se que mesmo com o comprometimento das células germinativas do limbo causado pela queimadura alcalina como descrito por Kenyon (1989), a membrana estromal suína possa ter fornecido subsídios necessários para que a reparação precoce da córnea queimada, impedindo assim que a reparação ocorresse através das células epiteliais conjuntivais, resultando em sequelas neovasculares descritas pelo mesmo autor.

A opacidade corneana constatada nos animais do grupo B após os 30 dias pós cirúrgicos pode estar relacionada a espessura da camada estromal suína e o pouco tempo para que toda a membrana fosse absorvida ou então ao baixo índice de permanência total da membrana ao final dos 30 dias (13% de permanência total).

4 CONCLUSÃO

Macroscopicamente não houveram diferenças significativas entre os animais do grupo A e os animais do grupo B. Portanto a inserção de camada estromal de córnea suína, descelularizada com SDS, sobre a lesão corneal química, causada pelo hidróxido de sódio, fixada com pontos simples de fio absorvível de poliglactina 8.0 sob a conjuntiva dissecada e observada macroscopicamente após 30 dias do procedimento cirúrgico parece não ser uma boa alternativa para impedir defeitos de opacidade corneana, embora tenha demonstrado baixos resultados de rejeição e não surgimento macroscópico de

vasos corneais. Todavia faz-se necessário o resultado do estudo anatomopatológico e histopatológico das córneas para que o resultado possa ser considerado fidedigno.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. L. LUVIZOTTO, M. C. R. NEGRELLI, G. GABAS, D. T. EUGÊNIO F. R. Efeitos da terapia com ciclosporina A a 0,2% (Optimmune®) sobre a córnea de ratos submetida a enxerto interlamelar de cápsula renal de eqüino, preservada em glicerina. Revista Vet News. São Paulo. ano VII, n. 45, p. 4-8, maio/jun, 2000.

DA COSTA, F.D.A., DOHMEN, P., LOPES, S.V., POHL, F., VILANI, R., VIEIRA, E. et al. Experimental study with decellularized porcine heterografts: the prosthesis of the future. Rev Bras Cir Cardiovasc. 19: 74-82, 2004.

KENYON, K.R., Tseng, S.C.G. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. Ophthalmology. 96: 709-23, 1989.

KHANNA, R.K., MOKHTAR, E. Bovine pericardium in treating large corneal perforation secondary to alkali injury: a case report. Indian Journal of Ophthalmology. 56(5): 429-30, 2008.

SCHANER, P.J., MARTIN, N.D., TULENKO, T.N., SHAPIRO, I.M., TAROLA, N.A., LEICHTER, R.F. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. J Vasc Surg. 40: 146-53, 2004.

Thoft RA. Conjunctival transplantation. Arch Ophthalmol 1977;95:1425-7.

WAGONER, M.D. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. Surv Ophthalmol. 41: 275-313, 1997.

ZHANG, C., NIE, X., HU, D., LIU, Y., DENG, Z., DONG, R., ZHANG, Y., JIN, Y. Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer. Cell Tissue Res 329:249–257, 2007.