

GRAZIELA MÜLLER

**COMPARAÇÃO DE DOIS TRATAMENTOS TÓPICOS NA  
CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CORNEANAS PRODUZIDAS  
E INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE POR  
*Pseudomonas aeruginosa* EM COELHOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Felipe P. F. Wouk

CURITIBA

2004



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária GRAZIELA MÜLLER após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Dissertação, intitulada “**COMPARAÇÃO DE DOIS TRATAMENTOS TÓPICOS NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CORNEANAS PRODUZIDAS E INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE POR *Pseudomonas aeruginosa* EM COELHOS**” foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou a candidata APROVADA concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 28 de maio de 2004.

Prof. Dr. ANTONIO FELIPE PAULINO DE FIGUEIREDO WOUK  
Presidente/Orientador.

Prof. Dr. HAMILTON MOREIRA  
Membro

Profa. Dra. ROSANA NOGUEIRA DE MORAIS  
Membro

Dedico aos animais, que me impulsionaram na realização desta pesquisa, despertando em mim a necessidade de buscar novas alternativas no tratamento de doenças, melhorando a qualidade de vida desses queridos amigos.

## AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-graduação pelo auxílio financeiro e pelo apoio durante o curso e, também ao Francisco por sua atenção e auxílio sempre.

A CAPES, ao Laboratório Labyes Argentino, à empresa Nuvital e a minha Mãe pelo auxílio financeiro, permitindo a realização desta pesquisa.

Ao diretor do HV, Prof. Ferrari que permitiu a utilização dos serviços laboratoriais e aos funcionários do hospital: Rosa, Maristela, Paulo, Sebastião, Ari, Fernando, Áurea, Luisa, Olair, pela sua atenção e por terem sido solidários para com a realização desta pesquisa.

Ao meu querido amigo e orientador, Dr. Felipe Wouk, o qual proporcionou-me a vida, a realização de um sonho, pois com seu apoio e com sua proficiência soube conduzir-me na resolução dos percalços ocorridos durante este trabalho. Agradeço-lhe todas as oportunidades, mas acima de tudo, e o mais importante: a confiança em mim depositada, a qual deu-me força e coragem para enfrentar as adversidades e jamais desistir....

À Dr<sup>a</sup> Belquiz Nassaralla, médica oftalmologista, que forneceu importantes informações e esclarecimentos sobre a metodologia nesta pesquisa.

Aos colegas veterinários, colaboradores, que tiveram papel fundamental na execução da parte prática, Prof. Rogério Ribas Lange, Prof. Felipe Caron, Prof<sup>a</sup>. Silvana Maris Sório, Prof<sup>a</sup>. Marina I. de Almeida e Prof<sup>a</sup>. Dominguita L. Graça, da UFSM, os quais contribuíram com seu trabalho com muita competência.

Ao Prof. Ivan Deconto e colega Juliano que auxiliaram na realização das ultra-sonografias e à Prof<sup>a</sup> Agueda de Vargas, UFSM, que permitiu-me realizar treinamento técnico no laboratório de microbiologia.

Às bibliotecárias do setor de ciências agrárias, Simone e Dona Vera que foram tão prestativas e que muito auxiliaram na correção desta dissertação e na obtenção de artigos. Também, à bibliotecária do Hospital de Clínicas, Rocio, pela atenção na busca por artigos utilizados.

Ao meu colega de faculdade e amigo, Mateus Matiuzzi, que me auxiliou no planejamento do projeto, especialmente na parte de microbiologia, e carinhosamente forneceu bactérias para a utilização neste projeto e deu-me muita força e estímulos positivos.

A minha querida amiga Verena e à colega Juliana que realizaram as ultra-sonografias gestacionais nas coelhas. Ve, obrigada por me ouvir e me apoiar durante todo o meu trabalho e sempre.

Ao amigo e colega Rogério Robes que auxiliou na anestesia dos animais e contribuiu com medicações anestésicas utilizadas na execução dos procedimentos cirúrgicos. Ao colega Marcos pelo auxílio.

Às queridas estagiárias, Mildred e Franceli, as quais auxiliaram no tratamento dos animais e em todos os procedimentos, com carinho e dedicação.

A minha querida estagiária e, sobretudo, amiga Ale, por sua dedicação, lealdade, confiança, fundamental auxílio e pelo imenso carinho dedicado aos animais desta pesquisa. Obrigada por tudo, minha querida amiga.

A minha família: Mãe, Henry, Tati e Pola, que apoiou-me incondicionalmente, o que foi fundamental para o meu equilíbrio emocional, especialmente por estar longe. Obrigada pelo amor de vocês. Eu os amo muito.

Ao Baxo, a quem jamais poderia deixar de agradecer o apoio, o companheirismo, a ajuda e, sobretudo o amor. Obrigada, você foi fundamental.

Às coelhas que participaram desta pesquisa e que surpreenderam nos com demonstrações de carinho e amor incondicionais. A vocês, meu amor e minha eterna gratidão....

A todos que tenham contribuído para a realização e divulgação desta pesquisa.

A Deus.

Em todos os passos da vida, a calma é convidada a estar presente.

Aqui, é uma pessoa tresvariada, que te agride...

Ali, é uma circunstância infeliz, que gera dificuldade...

Acolá, é uma ameaça de insucesso na atividade programada...

Adiante, é uma incompreensão urdindo males contra teus esforços...

É necessário ter calma sempre.

A calma é filha dileta da confiança em Deus e na Sua justiça, a expressar-se numa conduta reta

que responde por uma atitude mental harmonizada.

Quando não se age com incorreção, não há porque temer-se acontecimento infeliz.

A irritação, alma gêmea da instabilidade emocional, é responsável por danos, ainda não avaliados

na conduta moral e emocional da criatura.

A calma inspira a melhor maneira de agir, e sabe aguardar o momento próprio para atuar,

propiciando os meios para a ação correta.

Não antecipa, nem retarda.

Soluciona os desafios, beneficiando aqueles que se desequilibram e sofrem.

Preserva-te em calma, aconteça o que acontecer.

Aprendendo a agir com amor e misericórdia em favor do outro, o teu próximo, ou da

circunstância aziaga, possuirás a calma inspiradora da paz e do êxito.

Divaldo Pereira Franco pelo espírito Joanna de Ângelis

## SUMÁRIO

	<b>LISTAS DE TABELA E FIGURAS.....</b>	viii
	<b>RESUMO .....</b>	xiii
	<b>ABSTRACT.....</b>	xiv
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	1
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	5
2.1	COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA CÓRNEA .....	5
2.2	RESPOSTA CORNEANA À LESÃO....	8
2.3	CICATRIZAÇÃO CORNEANA .....	10
2.3.1	Metaloproteases (MMPs) e serinoproteases na cicatrização .....	13
2.3.2	Citoquinas e fator ativador de plaquetas na cicatrização corneana.....	16
2.4	<b>CERATITE ULCERATIVA BACTERIANA POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	20
2.4.1	Patogênese da Ceratite Bacteriana .....	21
2.4.2	Sinais Clínicos .....	27
2.4.3	Diagnóstico .....	28
2.4.4	Tratamento .....	28
2.4.4.1	Glicosaminoglicanos monossulfatados (GAGMS) .....	31
3	<b>METODOLOGIA.....</b>	33
3.1	LOCAL E PERÍODO .....	33
3.2	OBTENÇÃO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PARA INOCULAÇÃO.....	33
3.3	<b>INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NA CÓRNEA DE COELHOS.....</b>	33
3.3.1	Suspensão Bacteriana.....	33
3.3.2	Animais.....	34
3.4	<b>PROTOCOLO CIRÚRGICO.....</b>	34
3.4.1	Pré-experimental.....	34
3.4.2	Experimental.....	35
3.5	<b>PROTOCOLO TERAPÊUTICO.....</b>	36
3.6	<b>PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO.....</b>	39
3.6.1	Avaliação Oftálmica.....	39
3.6.2	Histopatologia.....	40
3.6.3	Avaliação Estatística .....	41
4	<b>RESULTADOS.....</b>	42
4.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	42
4.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	54
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	58
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	70
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	71
	<b>ANEXO .....</b>	84

## LISTA DE TABELA E FIGURAS

TABELA 1	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS (T1 E T2) NO TEMPO DE CICATRIZAÇÃO DE CÓRNEAS DE DEZOITO COELHAS INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> . VALORES DAS MEDIANAS. VARIAÇÃO INTERQUARTIL E AMPLITUDE DE VARIAÇÃO PARA A VARIÁVEL NOS DOIS TRATAMENTOS. TESTE DE WILCOXON PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS.....	52
FIGURA 1	IMAGEM FOTOGRÁFICA DE TREFINAÇÃO DA CÓRNEA DE COELHA ADULTA, REALIZADA PREVIAMENTE À INJEÇÃO INTRAESTROMAL DE SUSPENSÃO BACTERIANA DE <i>P. aeruginosa</i> , CONTENDO $1 \times 10^4$ UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS.....	37
FIGURA 2	IMAGEM FOTOGRÁFICA DE PEQUENA BOLHA (SETA) NA CÓRNEA DO OLHO ESQUERDO DE UMA COELHA, APÓS INJEÇÃO INTRAESTROMAL DE DEZ MICROLITROS DE UMA SUSPENSÃO BACTERIANA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NA CONCENTRAÇÃO DE $1 \times 10^4$ UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS.....	37
FIGURA 3	IMAGEM FOTOGRÁFICA DA CERATITE POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . OLHO ESQUERDO, GRUPO TRATAMENTO 1, DE COELHA ADULTA, NO SEGUNDO DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	38
FIGURA 4	IMAGEM FOTOGRÁFICA DA CERATITE ULCERATIVA POR <i>P. aeruginosa</i> EM OLHO DIREITO, GRUPO TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, NO SEGUNDO DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	38
FIGURA 5	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA QUEMOSE DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	44
FIGURA 6	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA SECREÇÃO CONJUNTIVAL DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	44
FIGURA 7	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA HIPEREMIA CONJUNTIVAL DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	45
FIGURA 8	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA OPACIDADE CORNEANA DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	45

FIGURA 9	IMAGEM FOTOGRÁFICA DE CERATITE ULCETATIVA POR <i>P. aeruginosa</i> EM COELHA ADULTA. NO QUARTO DIA PÓS-OPERATÓRIO. NOTAR O PADRÃO PERILIMBAL DE NEOVASCULARIZAÇÃO PROFUNDA (SETA) E A OPACIDADE CORNEANA SEVERA.....	47
FIGURA 10	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS. UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	47
FIGURA 11	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS. UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA RETENÇÃO DE FLUORESCÉINA DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	49
FIGURA 12	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS. UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NO EDEMA PALPEBRAL DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	49
FIGURA 13	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA FOTOFobia DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	51
FIGURA 14	EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NO BLEFAROSPASMO DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM <i>P. aeruginosa</i> .....	51
FIGURA 15	IMAGEM DE CERATITE ULCERATIVA POR <i>P. aeruginosa</i> NO OLHO ESQUERDO, GRUPO TRATAMENTO 1, DE COELHA ADULTA, NO 25º DIA PÓS-TRATAMENTO. LEUCOMA DENSO APÓS A CICATRIZAÇÃO (SETA).....	52
FIGURA 16	IMAGEM DA CERATITE ULCERATIVA POR <i>P. aeruginosa</i> NO OLHO DIREITO, GRUPO TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, NO 22º DIA PÓS-OPERATÓRIO. LEUCOMA MENOS DENSO APÓS CICATRIZAÇÃO (SETA)....	53
FIGURA 17	CORTE SAGITAL DE CórNEA NORMAL DE COELHA DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA ADULTA. COLORAÇÃO DE SHORR. 10X.....	53
FIGURA 18	CORTE SAGITAL DE OLHO DIREITO, TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, AOS 14 DIAS. NA IMAGEM, EPITÉLIO COMPOSTO POR UMA CAMADA DE CÉLULAS EPITELIAIS BASAIS E, DUAS A TRÊS DE CÉLULAS	

	SUPERFICIAIS ESCAMOSAS. ÁREA COM FIBROPLASIA (SETA) E FIBRAS COLÁGENAS ADJACENTES NORMAIS. SHORR. 40X.....	55
FIGURA 19	CORTE SAGITAL DE OLHO ESQUERDO, TRATAMENTO 1, DE COELHA ADULTA, AOS 14 DIAS. EPITÉLIO COMPOSTO POR UMA CAMADA DE CÉLULAS EPITELIAIS BASAIS E, DUAS A TRÊS CAMADAS DE CÉLULAS SUPERFICIAIS ESCAMOSAS. ÁREA COM FIBROPLASIA (SETA) E FIBRAS COLÁGENAS ADJACENTES NORMAIS. SHORR. 40X. ....	55
FIGURA 20	CORTE SAGITAL DE OLHO ESQUERDO, TRATAMENTO 1, COELHA ADULTA, AOS 21 DIAS DE TRATAMENTO..EPITÉLIO E FIBRAS COLÁGENAS DO ESTROMA NORMAIS e PRESENÇA DE INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA ESCASSA NO ESTROMA DA CÓRNEA. SHORR. 10X.....	56
FIGURA 21	CORTE SAGITAL DE OLHO DIREITO, TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, AOS 21 DIAS DE TRATAMENTO. IMAGEM DO EPITÉLIO CORNEANO NORMAL E, NO ESTROMA, ÁREA DE FIBROPLASIA (SETA) E FIBRAS COLÁGENAS ADJACENTES NORMAIS COM INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA. SHORR. 10X. ....	56
FIGURA 22	FIGURA 22 - CORTE SAGITAL DE OLHO ESQUERDO, TRATAMENTO 1, COELHA ADULTA, AOS 45 DIAS DE TRATAMENTO. IMAGEM DO EPITÉLIO E ESTROMA CORNEANOS NORMAIS. HEMATOXILINA/EOSINA. 40X.....	57
FIGURA 23	CORTE SAGITAL DE OLHO DIREITO, TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, AOS 45 DIAS DE TRATAMENTO. IMAGEM DO EPITÉLIO CORNEANO COM UMA CAMADA DE CÉLULAS EPITELIAIS BASAIS E, UMA A DUAS CAMADAS DE CÉLULAS SUPERFICIAIS ESCAMOSAS. ÁREA DE FIBROPLASIA (SETA) E ESTROMA ADJACENTE NORMAL. HE. 40X.....	57

## RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo comparar a eficácia de um tratamento tópico convencional, com tobramicina e um novo, com sulfato de condroitina A 10% associado à tobramicina na cicatrização de úlceras corneanas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* em coelhos. Utilizaram-se 30 coelhas, das quais 18 sofreram avaliação clínica a cada dois dias e 12 foram destinadas à análise histopatológica aos 14, 21 e 45 dias. Sob anestesia geral, realizou-se ceratectomia superficial nos olhos direitos e esquerdos, os quais foram subsequentemente inoculados com injeção intraestromal de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853). Os olhos esquerdos constituíram o grupo tratamento 1 (T1) e receberam três instilações diárias de colírio a base de sulfato de condroitina A 10% e tobramicina; os olhos direitos formaram o grupo tratamento 2 (T2), tratados com colírio de tobramicina. Na avaliação clínica, verificou-se diferença significativa para secreção ( $p= 0,002$ ) e hiperemia conjuntival ( $p= 0,002$ ), opacidade ( $p= 0,0004$ ) e neovascularização corneana ( $p= 0,001$ ), os quais reduziram-se primeiramente nos olhos do grupo tratamento 2, além da retenção de fluoresceína ( $p= 0,0005$ ) que apresentou escores menos intensos. Na histopatologia, verificaram-se indícios de melhor organização da fibrilas de colágeno estromais aos 21 e 45 dias nos olhos tratados com associação de sulfato de condroitina A 10% e tobramicina (T1). Comparando-se os dois grupos, concluiu-se que o colírio de tobramicina (T2) foi mais efetivo que o colírio de sulfato de condroitina A 10% associado à tobramicina (T1) no tratamento das úlceras corneanas, produzidas e infectadas, experimentalmente, em coelhos, entretanto, na histopatologia, melhores resultados foram observados nos olhos do grupo tratamento 1.

**PALAVRAS-CHAVE:** úlcera de córnea, *P. aeruginosa*, coelhos, sulfato de condroitina, tobramicina

## ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the effects of an eye drops association of a new treatment with chondroitin sulfate 10%-tobramycin to conventional with tobramycin alone in an animal model of *Pseudomonas* corneal ulcer. Thirty does were intracorneally infected with *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) after superficial keratectomy. Eighteen animals underwent clinical evaluations even two days and 12 were killed at 14, 21 and 45 days after infection and these corneas were prepared for histopathological examination. The left eyes rest as the treatment-1 group and received three times association of chondroitin sulfate 10%-tobramycin eye drops and the right eyes were the treatment-2 group and received five times tobramycin eye drops alone. Clinical evaluations showed significant difference for conjunctival discharge ( $p=0,002$ ) and congestion ( $p=0,002$ ), corneal cloudiness ( $p=0,0004$ ) and pannus ( $p=0,001$ ) for the treatment-2 group. Fluorescein staining had the lowest scores in treatment-2 eyes and treatment-1 group had the highest scores with significant difference ( $p=0,0005$ ). Histopathological findings revealed evidence of better stromal arrangement of collagen fibrils in treatment-1 group than treatment-2 group at 21 and 45 days. Clinically, the topical use of tobramycin alone (T2) was more effective than topical use of association of chondroitin sulfate A 10%-tobramycin (T1), and the histopathological examination revealed better terminal healing in the treatment-1 group.

KEY-WORDS: corneal ulcers, *Pseudomonas aeruginosa*, rabbits, chondroitin sulfate, tobramycin

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção bacteriana da córnea pela *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram negativa, resulta em rápida e severa degradação dos proteoglicanos estromais, podendo ocasionar um importante decréscimo da acuidade visual e até mesmo cegueira (GUPTA et al., 1996; BERK et al., 2001). Por essa razão, esta ceratite tem sido extensivamente estudada em modelos de infecção experimental em ratos, coelhos e cães (WYMAN et al., 1983; GUPTA et al., 1996; O'CALLAGHAN et al., 1996; TWINING et al., 1996; NASSARALLA et al., 1997; ENGEL et al., 1998; MATSUMOTO, 2000; BERK et al., 2001; MIYAJIMA et al., 2001; NAGANO et al., 2001; ESCO et al., 2002; PILLAR & HOB DEN, 2002), sendo os primeiros estudos iniciados na década de 1950. A partir de então, muitos pesquisadores têm se dedicado ao tema, no sentido de elucidar os fatores teciduais e bacterianos envolvidos na patogênese da infecção, visando a novas opções de tratamento que possibilitem a manutenção de uma melhor acuidade visual para seres humanos e animais.

No Brasil, não existem dados sobre a frequência da ceratite por *P. aeruginosa* em cavalos e, mesmo na ausência de informações precisas acerca da frequência desta infecção em animais no Brasil, a rotina em clínica de oftalmologia veterinária permite afirmar que ela seja em torno de 5%, considerando-se a casuística global de cavalos, cães e gatos (comunicação pessoal - A.F.P.F. WOUK, Universidade Federal do Paraná – Paraná). Entretanto, em estudo de 63 casos de ceratite infecciosa equina, realizado nos Estados Unidos, 14 olhos estavam infectados com *P. aeruginosa*, representando 46% das bactérias gram negativas isoladas (MOORE, 1995). Em outro estudo, de 38 olhos com ceratite ulcerativa em 37 cavalos, foram comumente encontradas bactérias do tipo bacilo gram negativo, com predominância de *P. aeruginosa* e coliformes fecais (MOORE, 1983). Em registros recuperados de 65 casos de ceratite ulcerativa bacteriana em cavalos, entre 1991-2000, na Universidade da Flórida, 22% dos microrganismos isolados eram *Pseudomonas aeruginosa* (SAUER et al., 2003).

Nos cavalos, em especial, aqueles que vivem em haras, esta infecção corneana é frequentemente encontrada como secundária a traumas oculares, devido às características de patógeno oportunista da *P. aeruginosa* e sua ampla distribuição no ambiente em que vivem estes animais (BARNETT et al., 1995; SWEENEY & IRBY, 1996).

A perda de transparência da córnea, o desconforto e a dor ocular provocados pela infecção corneana pela *Pseudomonas aeruginosa* atingem indiretamente o desempenho dos cavalos afetados. Esta afecção ocular gera grandes perdas econômicas em função do custo e do tempo de tratamento, porquanto, muitas vezes, os animais necessitam hospitalização. Além disso, a necessidade de intensos cuidados de enfermagem na limpeza de secreções oculares e instilações bastante freqüentes de colírios, nem sempre é respeitada, levando ao insucesso do tratamento (HAMOR & WHELAN, 1999).

Em seres humanos, a freqüência da *P. aeruginosa* foi da ordem de 3,9%, considerando-se 71,7% das amostras negativas, segundo estudo retrospectivo do banco de dados do Laboratório de Microbiologia da Santa Casa de São Paulo (UESUGUI et al., 2002). Apesar da sua baixa freqüência, a *Pseudomonas aeruginosa* é um dos microrganismos mais prevalentes na córnea acometida por doença bacteriana, sendo ainda a ceratite infecciosa mais comum na espécie humana.

A infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em seres humanos está relacionada principalmente aos usuários de lente de contato e à utilização das soluções de uso oftálmico, como fluoresceína e soluções para higiene das lentes, por funcionarem como meio de cultura para o crescimento da bactéria (LIMA & BELFORT JR., 1996; KANSKI, 2000).

A ceratopatogenicidade da *P. aeruginosa* tem sido associada a uma porta de entrada pré-existente, criando condições propícias à colonização do tecido pela bactéria oportunista, e também à manifestação dos seus fatores de virulência, como a exotoxina A, elastase, protease alcalina e protease IV, documentadas na patogênese da ceratite infecciosa (GUPTA et al., 1996; O'CALLAGHAN et al., 1996; MATSUMOTO, 2000; PILLAR & HOB DEN, 2002). Atualmente, em seres humanos, a *P. aeruginosa* também tem sido freqüentemente associada com uma afecção denominada olho vermelho agudo do usuário de lente de contato (CLARE), uma ceratite não infecciosa, de pouca gravidade, mas igualmente importante (COLE et al., 1998).

Assim como nos cavalos, os seres humanos, que apresentam sinais clínicos decorrentes desta ceratite infecciosa, necessitam de intensos cuidados de enfermagem, prejudicando o rendimento de suas funções no trabalho, particularmente, quando o paciente não é afastado do mesmo por ordem médica, resultando, desta forma, custos importantes com o tratamento. Segundo estudo realizado nos Estados Unidos, o custo do tratamento da ceratite bacteriana foi

estimado entre 15 e 30 milhões de dólares por ano, gerando grande impacto médico e econômico (Khari *apud* HAZLETT, 2004).

Outro fator extremamente importante relacionado à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, é a crescente resistência antibiótica dos isolados clínicos, a qual limita, cada vez mais, as opções entre os poucos antimicrobianos ainda capazes de produzir sua morte (FLEISZIG & EVANS, 2002). Em função disso, estudos têm sido conduzidos objetivando o desenvolvimento de terapias capazes de prevenir os danos à córnea, por meio da inibição de produtos bacterianos que diretamente danificam os tecidos oculares ou incitam reações inflamatórias exacerbadas prejudiciais (O'CALLAGHAN et al., 1996) e do bloqueio das interações de adesão bacteriana aos tecidos do hospedeiro, prevenindo as infecções (FLEISZIG & EVANS, 2002).

Resultados animadores foram obtidos, quanto à minimização de cicatrizes corneanas, com o uso de colírio a base de sulfato de condroitina A 20%, na cicatrização de úlceras experimentais em cavalos (ZULIAN, 2002) e coelhos (RANZANI et al., 2004). Portanto, a possibilidade da instilação tópica do sulfato de condroitina A 10% promover inibição da elastase neutrofílica e da plasmina e de favorecer uma melhor organização das fibras de colágeno, com mínima formação cicatricial, teria um grande valor potencial, no tratamento de úlceras corneanas infectadas por *P. aeruginosa* em cavalos e seres humanos, ganhando desta forma importante papel social.

Cabe salientar que a infecção bacteriana da córnea dos cavalos por *Pseudomonas aeruginosa* parece progredir de modo mais agressivo, pois tem sido verificado que o tecido corneano destes animais parece ter maior sensibilidade à ação das enzimas líticas liberadas por células do tecido do hospedeiro e pela bactéria, resultando em lesões extensas e destrutivas com liquefação corneana (BARNETT et al., 1995). Este último fato, de forma mais marcante e, juntamente com os citados acima, instigaram a realização deste trabalho experimental, tendo como principal alvo a possibilidade de transposição dos resultados para cavalos.

Sendo assim, esta pesquisa teve como objetivo geral: comparar, por meio de estudos clínico oftalmológico e histopatológico, a eficácia de dois tratamentos tópicos, um convencional com tobramicina e um novo com sulfato de condroitina A 10% associado à tobramicina, na cicatrização de úlceras corneanas, infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* em coelhos. Como objetivos específicos, pretendeu-se, por meio de estudo clínico, comparar o tempo e a qualidade da cicatrização (mácula, nébula e leucoma), a evolução dos sinais clínicos e possíveis

complicações e seqüelas; e, mediante estudo histopatológico, comparar o grau de organização do estroma, homogeneidade dos extratos epiteliais e eventuais distrofias.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA CÓRNEA

A córnea dos animais é formada por três leitos distintos, o epitélio, o estroma ou substância própria e o endotélio, os quais estão unidos entre si por duas importantes membranas basais, a membrana basal do epitélio, localizada entre este último e o estroma, e a membrana de descemet, encontrada entre a substância própria e o endotélio (HASSEL et al., 1983; SAMUELSON, 1991; BANKS, 1992; BARNETT, 1995; CRISPIN, 1999; SPENCER, 1996; SLATTER, 2001; BAZAN & OTTINO, 2002).

O primeiro leito, o epitélio do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, é composto por células superficiais escamosas, células aladas e epiteliais basais. Estas últimas sofrem mitose ativa e estão aderidas, por meio de hemidesmossomos à membrana basal, uma camada de matriz extracelular na interface entre o epitélio e o estroma, que serve para ancorar estes dois últimos leitos (FUJIKAWA et al., 1984; ALBERTS et al., 1997; ANDRADE & LAUS, 1998; ABELSON & SLUGG, 1999; CRISPIN, 1999; ANDREW & GELATT, 2001; SLATTER, 2001; BAZAN & OTTINO, 2002). A membrana ou lâmina basal é composta principalmente por colágeno tipo IV, proteoglicano sulfato de heparana, laminina, entactina (ALBERTS et al., 1997; BAZAN & OTTINO, 2002) e, por fibronectina (SPENCER, 1996). Entretanto, esta última não foi detectada na lâmina basal epitelial de córneas normais de coelhos e tampouco após reparação; detectou-se fibronectina somente na superfície da córnea após escarificação ou ceratectomia (FUJIKAWA et al., 1981; FUJIKAWA et al., 1984; PHAN et al., 1989a; PHAN et al., 1989b). Segundo ALBERTS et al. (1997), a lâmina basal separa o tecido conjuntivo subjacente ou em volta das células epiteliais, determina a polaridade das células, influencia no seu metabolismo, organiza as proteínas nas membranas plasmáticas adjacentes, induz diferenciação celular e fornece uma base para a migração das células em regeneração. Além disso, na córnea, a lâmina basal altera-se quimicamente após ser danificada, por exemplo, pela adição de fibronectina, conforme verificado nos estudos de FUJIKAWA e colaboradores (1981; 1984).

O segundo leito, o estroma ou substância própria, constitui cerca de 90% da espessura da córnea em humanos e animais. É um tecido conjuntivo avascular, com fibras nervosas

amielínicas, constituído de uma densa matriz extracelular e uma população de poucos ceratócitos dispersos entre as suas fibras (Jakus *apud* HASSELL et al., 1983; BARNETT et al., 1995; SPENCER, 1996; ANDRADE & LAUS, 1998; CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001; BAZAN & OTTINO, 2002; BIROS et al., 2002). Os ceratócitos possuem a capacidade de sintetizar componentes do estroma e transformarem-se em fibroblastos quando da resposta à lesão corneana profunda, formando tecido cicatricial não transparente (SAMUELSON, 1991; SLATTER, 2001; BAZAN & OTTINO, 2002).

A matriz extracelular, por sua vez, consiste de fibrilas de colágeno de diâmetro uniforme, regularmente espaçadas, e de substância fundamental amorfa, a qual é formada por glicosaminoglicanos e glicoproteínas (SAMUELSON, 1991; BANKS, 1992; CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001). Dos 19 tipos de colágenos conhecidos, pelo menos dez são expressos na córnea dos mamíferos, incluindo os tipos I, III, IV, V, VI, VII, VIII, XII, XIII e XVII. Os glicosaminoglicanos são encontrados formando complexos com proteínas, os chamados proteoglicanos, cujas duas maiores classes possuem sulfato de queratana e sulfato de dermatana/condroitina (ZIESKE, 2001). Acredita-se que os proteoglicanos desempenhem importante papel na manutenção da hidratação, rigidez e transparência da córnea; que os glicosaminoglicanos que formam os proteoglicanos sejam responsáveis pela manutenção do espaçamento regular entre as fibrilas de colágeno estromais (HASSELL et al., 1983; CINTRON & COVINGTON, 1990; GUM, 1991; BANKS, 1992; NAKAZAWA et al., 1997), e que influenciam na regulação do crescimento e desenvolvimento celular, na concentração dos componentes da matriz extracelular e na modulação das interações entre células (DAVIES et al., 1999; Nakamura *apud* BIROS et al., 2002). Além disso, os proteoglicanos possuem alta capacidade de absorção de água; contribuem para a estabilidade e suporte proporcionado pelo tecido conjuntivo, colaborando com a manutenção do volume de água no tecido (BANKS, 1992). Desta forma, também desempenham importante papel na manutenção do estado de deturgescência da córnea, permitindo o eficiente funcionamento das barreiras epitelial e endotelial (SAMUELSON, 1991). Os proteoglicanos, juntamente com o colágeno tipo I aparecem como os maiores componentes do estroma da córnea (NAKAZAWA et al., 1997; HAO et al., 1999).

Uma importante glicoproteína adesiva, que se encontra como constituinte da matriz extracelular, é a fibronectina, a qual contribui para uma adequada ligação celular à matriz, por exemplo, permitindo a ligação dos fibroblastos e várias outras células à matriz dos tecidos conjuntivos (FUJIKAWA et al., 1981; Colvin *apud* PHAN et al., 1989b; ALBERTS et al., 1997; FOSTER, 2001; VYGANTAS & WHITLEY, 2003). Estudos realizados mostram que a fibronectina deposita-se rapidamente na superfície desepitelizada de lesões epiteliais corneanas (FUJIKAWA et al., 1981, BERMAN et al., 1983; FUJIKAWA et al., 1984), especificamente, na margem anterior do estroma desnudo (TERVO et al., 1986). Além disso, ela possui a capacidade de estimular a migração epitelial corneana em cultura celular (NISHIDA et al., 1983) e *in vivo* (Nishida *apud* NISHIDA et al., 1992). É um proeminente componente do tecido de granulação e pode formar uma matriz provisória por meio de sua ligação com fibrinogênio, facilitando deste modo, a invasão de fibroblastos e adesão dos mesmos ao substrato de fibrina e ao tecido colágeno (FUJIKAWA et al., 1981; PHAN et al., 1989b). Entretanto, parece que esta matriz provisória não é essencial para a migração de células epiteliais em modelos de feridas superficiais por escarificação da córnea. De qualquer forma, sua maior importância quanto à migração celular tem sido sugerida em modelos de feridas com dano tecidual extenso e infiltração celular inflamatória como: queimaduras química e térmica, infecções viral e bacteriana da córnea (PHAN et al., 1989b). Além disso, tem sido sugerida também a produção endógena de fibronectina pelas células corneanas das bordas da lesão (PHAN et al., 1989a). Outras glicoproteínas, como a laminina e a tenascina também constituem a matriz extracelular, são encontradas em córneas normais e lesadas, respectivamente (BANKS, 1992; ZIESKE, 2001).

O terceiro e último leito, o endotélio, é formado por uma única camada de células escamosas poligonais, as quais contribuem para manutenção da transparência corneana, por meio de um contínuo bombeamento de água para fora do tecido. Suas células possuem reduzida capacidade de regeneração, a qual pode variar conforme espécie e idade e, ainda, são responsáveis pela secreção da sua membrana basal, a membrana de descemet. Esta última é constituída por fibrilas de colágeno tipo IV e confere resistência e elasticidade à hidrólise química e enzimática (SAMUELSON, 1991; BARNETT et al., 1995; CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001; BAZAN & OTTINO, 2002). Segundo estudo de FUJIKAWA et al. (1981), a fibronectina foi detectada nas superfícies anterior e posterior da membrana descemet em olhos normais de coelho.

DAVIS et al. (1999) revelaram, em cultura de células endoteliais humanas normais, um padrão do proteoglicano de sulfato de queratana e um padrão similar a este para os proteoglicanos de sulfato de heparana e de sulfato de condroitina, embora, os níveis encontrados para estes dois últimos proteoglicanos tenham sido muito menores.

## 2.2 RESPOSTA CORNEANA À LESÃO

A transparência da córnea é seu maior atributo e a presença de opacidade é o indicador mais óbvio de afecção corneana. Esta opacidade resulta da interrupção no arranjo regular das fibrilas de colágeno em decorrência da absorção de líquido do filme lacrimal e/ou humor aquoso pelo estroma adjacente, quando da formação de edema corneano. Este último ocorre rapidamente, após a lesão do epitélio e/ou endotélio, e pode manifestar-se de modo difuso ou localizado, estando na dependência da extensão da lesão corneana. Além da opacidade, a hidratação da córnea decorrente do edema, promove alteração no seu estado de deturgescência e aumento na sua espessura, com comprometimento das suas propriedades ópticas (WILCOCK, 1993; BARNETT et al., 1995; CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001; WILCOCK, 2001). Nos cortes histológicos, a coloração de um estroma edematoso é menos intensa que o normal, observando-se, ainda, a separação das fibrilas de colágeno por meio da formação de uma fina rede de fibrilas pálidas, decorrentes da excessiva hidratação dos proteoglicanos da substância fundamental amorfa (WILCOCK, 1993).

Um outro importante atributo da córnea é sua natureza avascular. Entretanto, neovasos podem invadir o estroma corneano em resposta a vários processos patológicos e na reparação do processo inflamatório. Além disso, a neovascularização, superficial ou profunda, pode tornar-se um guia útil para determinação da cronicidade mais do que da profundidade da lesão corneana. Os neovasos superficiais ocorrem no terço anterior do estroma e originam-se a partir da vascularização conjuntival, podendo ser perfeitamente observados em uma coloração vermelho brilhante. Os neovasos profundos continuam-se com a circulação ciliar e terminam no limbo, podendo formar uma borda em toda a circunferência da córnea. Estes vasos são geralmente curtos, retos, menos ramificados e de coloração vermelho escura (NASISSE & NELMS, 1992; BARNETT et al., 1995; CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001). Normalmente sua formação não é

observada durante o processo inflamatório inicial (CARLTON & RENDER, 1990; SPENCER, 1996), mas pode ocorrer durante os três a seis primeiros dias após a lesão (BANKS, 1992). Em lesões estromais mais graves, particularmente, quando há persistência da agressão à córnea, pode não ocorrer o colapso dos neovasos e, sim a maior formação desses, juntamente com tecido de granulação (SLATTER, 2001).

A formação de tecido cicatricial é uma outra importante reação corneana à lesão. Uma vez que a destruição estromal ocorre, na subsequente reparação tecidual, a deposição das fibrilas de colágeno é feita de modo irregular e desordenado, resultando em formação de tecido cicatricial e, conseqüentemente, em dispersão da luz (SLATTER, 2001; VYGANTAS & WHITLEY, 2003). Um achado interessante obtido em determinado estudo, foi o desaparecimento do proteoglicano de sulfato de queratana do estroma corneano lesionado nas primeiras semanas do processo de reparação e a percepção de uma quantidade relativamente mais abundante do proteoglicano de sulfato de condroitina. Com o tempo, há uma restauração da síntese normal de proteoglicanos, embora os níveis do proteoglicano sulfato de queratana não sejam completamente restaurados, mesmo após um ano (HASSELL et al., 1983). Quanto mais profunda a lesão inicial, mais densa e duradoura a cicatriz, com menor possibilidade de retorno da transparência corneana (SLATTER, 2001). As cicatrizes da córnea têm sido classificadas histologicamente conforme seu tamanho e densidade, podendo variar entre uma cicatriz pequena e tênue (nébula), uma levemente maior e mais densa (mácula) a uma maior, densa e opaca (leucoma). Na coloração de hematoxilina/eosina são observados fibrócitos grandes, com núcleo intensamente corado e um citoplasma mais eosinofílico quando comparado a fibras corneanas mais velhas (SPENCER, 1996).

A infiltração celular ocorre especialmente nos casos de ceratite ulcerativa infecciosa. Durante o processo inflamatório, polimorfonucleares neutrófilos migram para o local da lesão, podendo resultar em uma infiltração superficial ou profunda. Surgem no mesmo local macrófagos e ceratócitos modificados que fagocitam bactérias, neutrófilos mortos e tecido corneano lesado (CARLTON & RENDER, 1990). Nas ceratites bacterianas, a presença dos neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos é observada clinicamente como uma infiltração estromal de coloração branco-amarelada, podendo estar associada à ulceração da córnea ou edema (LIMA & BELFORT JR., 1996). Ao exame, na lâmpada de fenda, as infiltrações celulares aparecem como opacidades focais granulosas (KANSKI, 2000). A infiltração de polimorfonucleares leucócitos,

como neutrófilos e linfócitos em localização interlamelar, e macrófagos ou fagócitos podem ocorrer associados à presença de edema (WILCOCK, 1993; BARNETT et al., 1995; SPENCER, 1996; LIMA & BELFORT JR., 1996).

A pigmentação é uma resposta inespecífica decorrente da inflamação crônica da córnea, resultante do depósito de pigmentos como células melanocíticas, advindos do limbo e região perilimbal, a partir de neovasos (BROOKS, 1991; WILCOCK, 1993; ANDRADE & LAUS, 1998; SLATTER, 2001). A melanina pode ser depositada tanto no leito de células epiteliais basais do epitélio quanto no estroma superficial durante uma reação inflamatória deste tecido (BROOKS, 1991; WILCOCK, 1993; SLATTER, 2001). A pigmentação freqüentemente acompanha outros sinais clínicos de ceratite ulcerativa como neovascularização, infiltração celular inflamatória do estroma e formação de tecido de granulação (BROOKS, 1991). É observada menos freqüentemente em cavalos e, no entanto, especialmente nesta espécie, pode-se verificar, associada à neovascularização e à inflamação severa da córnea, uma pigmentação estromal mais intensa (SLATTER, 2001), a qual pode permanecer como uma marca de afecção corneana prévia (BARNETT et al., 1995).

O depósito de substâncias anormais ou aparecimento de alterações degenerativas, como calcificação e deposição lipídica, são respostas passíveis de serem observadas subseqüentemente ao desenvolvimento de reação inflamatória da córnea (CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001). A deposição mineral ocorre primariamente na membrana basal do epitélio e estroma anterior, enquanto que a deposição lipídica ocorre no estroma somente. Esta última é verificada também em coelhos com dietas ricas em colesterol e a neovascularização está freqüentemente presente (WILCOCK, 1993).

### 2.3 CICATRIZAÇÃO CORNEANA

A cicatrização de feridas corneanas é um processo dinâmico, no qual há envolvimento de uma resposta inflamatória rápida, seguida de uma fase de reparação e remodelação (ABELSON & SLUGG, 1999; BAZAN & OTTINO, 2002). Entretanto, este processo pode sofrer variações de acordo com o local e profundidade da lesão, envolvimento da lâmina basal, presença de infecção corneana ou corpos estranhos (WILCOCK, 1993; BARNETT et al., 1995). Nas úlceras corneanas

superficiais, com envolvimento somente do epitélio ou estroma superficial, a cicatrização ocorre por meio de migração e mitose das células epiteliais. A migração é realizada pelo epitélio adjacente à lesão, o qual inicialmente promove o fechamento do defeito e após, entra em mitose para restabelecer o número de células e a espessura corneana original (LAFORGE, 1993; WILCOCK, 1993; ABELSON & SLUGG, 1999; CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001; WILCOCK, 2001; VYGANTAS & WHITLEY, 2003). Esta migração é grandemente aumentada pela deposição de fibronectina, pelo epitélio adjacente, conforme demonstrado em vários estudos (FUJIKAWA et al., 1981; BERMAN et al., 1983; NISHIDA et al., 1983; TERVO et al., 1986; FUJIKAWA et al., 1992; Nishida *apud* NISHIDA et al., 1992).

Entretanto, nas lesões profundas da córnea, que estendem-se até o estroma, afetando a membrana basal e, especialmente naquelas que se tornam infectadas, o processo cicatricial torna-se mais complicado e prolongado (NASISSE & NELMS, 1992; NISHIDA et al., 1992; WILCOCK, 2001; VYGANTAS & WHITLEY, 2003). Envolve migração e mitose, combinadas com fibroplasia estromal (WILCOCK, 1993) e, geralmente depende de neovascularização adequada (ANDRADE & LAUS, 1998). A apoptose dos ceratócitos adjacentes à área de debridamento epitelial, deixa uma região desprovida de células, e desencadeia a resposta cicatricial, conforme sugerido por MOHAN et al. (2000). Esta exposição do estroma promove quimiotaxia de polimorfonucleares leucócitos, oriundos dos vasos conjuntivais ou do filme lacrimal. Esta atração celular é seguida da transformação de ceratócitos quiescentes em fibroblastos, os quais sofrem mitose rápida e migram até o local da lesão (ANDRADE & LAUS, 1998; VYGANTAS & WHITLEY, 2003). Histiócitos que se acumulam neste local podem eventualmente assumir características de fibroblastos (WILCOCK, 1993). Estes fibroblastos sintetizam e depositam grandes quantidades de colágeno e glicosaminoglicanos sulfatados, particularmente sulfato de condroitina, sobre uma matriz provisória (WILCOCK, 1993; ZIESKE, 2001), provavelmente formada por uma variedade de componentes da matriz extracelular, como fibronectina, fibrina e tenascina, pois estes mesmos já foram encontrados no estroma corneano após lesão (ZIESKE, 2001). A formação de uma matriz de fibronectina é essencial para a subsequente deposição de fibrina (FUJIKAWA et al., 1981; PHAN et al., 1989b). A composição da matriz extracelular durante a cicatrização influencia a motilidade dos fibroblastos da córnea em humanos, evidenciando que a matriz provisória, formada por fibronectina e proteoglicano de

sulfato de condroitina, facilita a entrada de fibroblastos em migração na área ferida, quando comparada com outros componentes (ANDRESEN et al., 2000). A deposição de colágeno e proteoglicanos no estroma ocorre de modo aleatório; resultando em perda de transparência e formação de tecido cicatricial (BARNETT et al., 1995; ANDRADE & LAUS, 1998; VYGANTAS & WHITLEY, 2003). Durante o processo, também pode ocorrer a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, os quais estão envolvidos na contração da área da ferida. Entretanto, a extensão desta transformação parece estar na dependência do tipo de lesão e ocorre particularmente naquelas em que há envolvimento da membrana basal (WILCOCK, 1993; KNOTTENBELT & PASCOE, 1997; Moller-Pedersen *apud* ZIESKE, 2001; AHMADI & JAKOBIEC, 2002; BAZAN & OTTINO, 2002). Segundo NAKAMURA (2003), a diferenciação dos miofibroblastos, a partir de ceratócitos, não é induzida somente por lesão estromal, mas requer lesão de ambos, estroma e epitélio da córnea. A fase final da reparação de lesões estromais envolve o remodelamento com orientação das fibrilas de colágeno, próximas da organização normal, e gradual substituição do proteoglicano de sulfato de condroitina pelo proteoglicano de sulfato de queratana. No entanto, a restituição completa normal do estroma nunca ocorre (HESSELL et al., 1983; WILCOCK, 1993; ZIESKE, 2001).

Nas lesões corneanas com envolvimento da membrana de descemet, esta última se retrai e enrola-se em direção à câmara anterior, com subsequente exposição de uma pequena área de estroma. A partir de então, as células endoteliais vizinhas deslizam para cobrir a área afetada e uma nova membrana é produzida e depositada, podendo formar uma dupla camada de membrana descemet ou incorporar-se a esta última. As lesões endoteliais corneanas cicatrizam primariamente mediante alongamento e migração das suas células (WILCOCK, 1993; CRISPIN, 1999; SLATTER, 2001), com uma contribuição relativamente pequena de atividade mitótica celular, o que limita, em muito, sua capacidade de regeneração e resulta em opacidade persistente da córnea (SCHILLING-SCHÖN et al., 2000). Embora, resultados de estudos com cultura celular humana tenham demonstrado que as células endoteliais da periferia da córnea sofreram mitose, a uma baixa taxa, a capacidade mitótica das células endoteliais humanas é muito mais limitada *in vivo* (Bednarz *apud* AHMADI & JAKOBIEC, 2002). Recentemente investigou-se a distribuição e função dos proteoglicanos de sulfato de heparana, sulfato de queratana e sulfato de condroitina, durante a cicatrização de lesões endoteliais em córneas humanas. DAVIES et al. (1999)

verificaram níveis reduzidos do proteoglicano de sulfato de queratana e, em contraste, níveis aumentados para os proteoglicanos de sulfato de heparana e de sulfato de condroitina em células endoteliais migrando para o local da lesão. Parece provável que esta migração celular esteja ligada à troca da expressão de sulfato de queratana por sulfato de heparana e sulfato de condroitina, o que sugere que estes glicosaminoglicanos tenham diferentes funções neste processo. Mesmo que o papel destes proteoglicanos ainda não tenha sido estabelecido, evidências sugerem que esses complexos estejam envolvidos tanto na manutenção normal do endotélio quanto no seu processo de migração celular (DAVIES et al., 1999).

### 2.3.1 Metaloproteases (MMPs) e serinoproteases na cicatrização

O processo normal de cicatrização das feridas corneanas conta com o auxílio de duas importantes classes de enzimas proteolíticas, as metaloproteases (MMPs) e as serinoproteases, as quais têm sido atribuídas importantes funções no remodelamento tecidual (ZIESKE, 2001), e também, estão envolvidas na cascata proteolítica durante a degradação, ulceração e cicatrização da córnea (BERMAN et al., 1983; YE et al., 2000; SIVAK & FINI, 2002).

As MMPs são endoproteínases secretadas na sua forma inativa como pró-MMPs, cuja atividade depende de uma ligação com cálcio ou zinco (ALBERTS et al., 1997) e da sua ativação no meio extracelular (SIVAK & FINI, 2002; TERSARIOL et al., 2002). Das 17 diferentes MMPs expressas em humanos, três grupos principais podem ser categorizados: gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que degradam componentes da membrana basal e colágeno tipo IV; colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) que reconhecem colágeno tipos I, II e III, e estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) que reconhecem uma variedade de colágeno e proteoglicanos. Além disso, esses grupos ativam outras MMPs (KIESEIER et al., 1999; SIVAK & FINI, 2002; TERSARIOL et al., 2002). Acredita-se que, durante a cicatrização, as MMPs tenham atividade no remodelamento da membrana basal, na contração da ferida, na limpeza de restos celulares, na neovascularização e na deposição de tecido fibrótico de reparação, sendo muitas as fontes celulares destas enzimas (WILCOCK, 1993; BARNETT et al., 1995; SIVAK & FINI, 2002), como por exemplo: neutrófilos polimorfonucleares e células corneanas (NASISSE & NELMS, 1992; LI et al., 2001; WILCOCK, 2001; TERSARIOL et al., 2002; VYGANTAS & WHITLEY,

2003). Recente descoberta mostra que as células epiteliais da córnea secretam as enzimas MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) (Matsubara *apud* MATSUMOTO, 2000), as quais estão diretamente envolvidas na neovascularização e no remodelamento da membrana basal, respectivamente (KVANTA et al., 2000). Os ceratócitos produzem tipos variados de metaloproteases, como MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9, na sua forma latente (Berman *apud* HAO et al., 1999).

Na classe das serinoproteases, têm-se duas importantes enzimas, quais sejam: elastase neutrofílica (NE) e a plasmina. A NE é liberada por polimorfonucleares neutrófilos e possui a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, incluindo a elastina, colágeno intersticial, fibronectina, proteoglicanos e laminina (TERSARIOL et al., 2002). O ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) atua como um ativador específico de uma cascata proteolítica, por meio da transformação de plasminogênio em uma protease ativa, a plasmina, uma enzima capaz de degradar várias proteínas como a fibrina, fibronectina e laminina, componentes da lâmina basal e matriz extracelular do estroma, (ALBERTS et al., 1997; ROBERTS, 1999; BAZAN & OTTINO, 2002) e de ativar outras MMPs, como colagenases latentes (Werb *apud* BERMAN et al., 1980; BAZAN & OTTINO, 2002). Um estudo prévio demonstrou a presença de quantidades elevadas de plasmina tanto no fluido lacrimal de pacientes humanos com úlceras corneanas causadas por bactérias, vírus, fungos e queimaduras (SALONEN et al., 1987), quanto no de coelhos utilizados como modelos experimentais de úlceras por queimaduras alcalinas, sendo que neste estudo ainda sugeriu-se que ceratócitos, células epiteliais e polimorfonucleares neutrófilos também sejam fontes de liberação de ativador de plasminogênio (BERMAN et al., 1980). A fibrina depositada sobre o estroma lesado é capaz de ativar o u-PA. Assim sendo, foi sugerido que, em condições normais, o sistema plasmina/ativador de plasminogênio pode prevenir a deposição excessiva e permanente de fibrina após exsudação da ferida, uma vez que foi observado que a fibrina e fibronectina subepiteliais são reabsorvidas em regiões da córnea onde o PA está localizado (BERMAN et al., 1983).

Vários mecanismos operam para assegurar que a degradação dos componentes da matriz extracelular seja rigorosamente controlada, como a secreção das proteases como precursores inativos, os quais somente são ativados localmente; o confinamento da ação das proteases a áreas específicas por seus inibidores específicos, como os inibidores das metaloproteases teciduais

(TIMPs), os inibidores das serinoproteases, denominados serpinas, e os inibidores do ativador de plasminogênio (PAI) e a restrição das enzimas a somente locais onde sua presença é necessária, por meio de receptores na superfície das células (ALBERTS et al., 1997; TERSARIOL et al., 2002). O delicado equilíbrio existente entre as proteases ativas e seus inibidores é um pré-requisito importante na modulação normal da cicatrização das feridas (BAZAN & OTTINO, 2002). Nestas condições, as proteinases, acima citadas, exercem um importante papel na cicatrização normal da córnea e, mesmo desta forma, a córnea do cavalo parece ter maior sensibilidade à ação destas enzimas, podendo sua liberação resultar em lesões extensas e destrutivas com liquificação corneana (BARNETT et al., 1995).

Por outro lado, um desequilíbrio entre a síntese de MMPs e u-PA e a quantidade funcional dos seus inibidores presentes no tecido corneano, no sentido de maior síntese das enzimas, somado à persistência do estímulo danoso, como por exemplo, a colonização do tecido corneano por *Pseudomonas aeruginosa*, permite o desencadeamento de uma excessiva destruição da matriz extracelular e da membrana basal, resultando em ulceração do estroma (BERMAN et al., 1980; MATSUMOTO, 2000; HAFFNER et al., 2003) e no impedimento do processo cicatricial, apresentando, desta forma, um maior significado na patofisiologia das afecções corneanas (BERMAN et al., 1980; BAZAN & OTTINO, 2002). Em estudo realizado em ratos imunes e não imunes, a expressão do gen para u-PA foi detectada em córneas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* nestes últimos, sugerindo um importante papel do sistema plasmina/ativador de plasminogênio na persistência da ulceração, resultado de uma maior degradação dos componentes da matriz extracelular do estroma da córnea (BERK et al., 2001). Verificou-se também que em modelos de queimaduras corneanas por alcali, a degradação da membrana basal precede a ulceração da córnea (MATSUBARA et al., 1991).

Acredita-se que a eventual persistência da ulceração possa ser resultado da neovascularização do estroma em resposta ao ativador do plasminogênio, o qual possui ação angiogênica (BERMAN et al., 1982). A angiogênese envolve a degradação e o remodelamento da lâmina basal e da matriz extracelular, com subsequente proliferação e migração de células endoteliais vasculares aos tecidos a serem vascularizados. Durante este evento, que é regulado por MMPs (KVANTA, et al., 2000), especialmente MMP-2 (SIVAK & FINI, 2002), as células endoteliais quiescentes migram e degradam a membrana basal subjacente, formando um lúmen

para os neovasos (Patan *apud* GABISON et al., 2004). Em geral, a neovascularização é benéfica, entretanto, resulta na redução da transparência, no influxo de pigmento, e no transporte de anticorpos e de células inflamatórias que contribuem ainda mais para a opacidade da córnea (SLATTER, 2001), sendo, por isso, considerada uma ameaça à acuidade visual. Usualmente está associada com infecções corneanas, lesões químicas e após ceratoplastias (KVANTA et al., 2000; CHANG et al., 2001). Resultados obtidos em estudo com modelo experimental de neovascularização corneana em ratos, sugerem que a MMP-2 e o fator de crescimento endotelial vascular podem estar envolvidos no estímulo pelo qual ela é desencadeada (KVANTA et al., 2000). Esta MMP-2 é secretada por células endoteliais vasculares e fibroblastos do estroma no local da lesão (KARELINA et al., 1995). Pesquisas na área da angiogênese do câncer têm mostrado a existência de um equilíbrio entre os fatores angiogênicos e moléculas anti-angiogênicas e, portanto, várias desordens traumáticas, degenerativas, infecciosas e inflamatórias estão associadas com a sua neovascularização, na qual o equilíbrio pende para a angiogênese. Estes mesmos fatores angiogênicos e anti-angiogênicos podem inibir ou estimular o crescimento das células endoteliais, as quais estão sob estreita regulação (CHANG, 2001).

### 2.3.2 Citocinas e fator ativador de plaquetas na cicatrização corneana

Sabe-se, hoje, que todo este processo cicatricial recebe interferência de várias citocinas e do fator ativador de plaquetas, oriundos do fluido lacrimal e produzidos por células epiteliais e/ou fibroblastos do estroma (NAKAZAWA et al., 1997; Affonso *apud* BEVANS-NELSON et al., 2001; NAKAMURA et al., 2001; BAZAN & OTTINO, 2002).

Em estudo *in vitro*, NAKAMURA et al. (2001) demonstraram que os receptores para fator de crescimento epidermal (EFG) foram ativados minutos após o debridamento epitelial e que a inibição dos mesmos reduziu a cicatrização em quase 50%. Além disso, também verificou-se que a adição tópica do EFG conjugado com fluoresceína não penetrou o epitélio intacto, sugerindo que este fator de crescimento não desempenhe nenhum papel na homeostasia da córnea, a menos que a barreira epitelial esteja comprometida (ZIESKE et al., 2000). A avaliação *in vivo* mostrou que o EFG, ligado ao receptor do fator de crescimento epidermal, tem importante papel na proliferação celular (NAKAMURA et al., 2001). Em cultura de células corneanas de coelho, foi

demonstrado que o EGF aumentou o número de células aderidas à matriz de fibronectina, sugerindo que o EGF estimula a migração epitelial, não somente por meio do aumento da mitose celular, mas também pelo aumento da expressão de receptores para fibronectina (NISHIDA et al., 1992).

Outros estudos demonstraram que o fator ativador de plaquetas (PAF) acumula-se rapidamente na córnea após lesão (BAZAN et al., 1991), estimula colagenase MMP-1, gelatinase MMP-9 (TAO et al., 1995) e uPA (TAO et al., 1996). Descobriu-se também que o PAF induz a expressão de inibidores de metaloproteases teciduais, TIMP-1 e TIMP-2 em cultura de células corneanas de coelho e, mais uma vez, comprovou-se que ele induz a expressão de MMP-1 (OTTINO et al., 2002). Também em cultura de células, as córneas incubadas com PAF mostraram um atraso significativo na taxa de cicatrização epitelial, quando comparada às córneas controle, e um aumento na apoptose dos ceratócitos (CHANDRASEKHER et al., 2002). O PAF é capaz de inibir a ação dos fatores de crescimento epidermal, fator de crescimento de hepatócito e fator de crescimento de ceratócito durante a cicatrização epitelial (BAZAN & OTTINO, 2002) e a adesão de células epiteliais da córnea em presença de colágeno tipo I e IV, laminina e fibronectina (ZIESKE et al., 1987). Além do mais, o desequilíbrio entre a expressão de MMP-9 e TIMP-1, induzido pelo PAF, pode aumentar a degradação de vários componentes da membrana basal, necessária para adesão das células epiteliais (OTTINO et al., 2002). Durante a resposta inflamatória há um aumento na síntese do PAF nas células estromais (Sheng *apud* BAZAN & OTTINO, 2002) e a inibição parcial da expressão dos receptores de PAF no estroma pode ser um mecanismo para evitar-se excessiva degradação da matriz extracelular. Conforme a gravidade da lesão, há infiltração de células inflamatórias na córnea, as quais liberam PAF que, por sua vez, por meio da ligação com seu receptor, pode desencadear respostas celulares específicas. A regulação da expressão desses receptores nas células epiteliais pode ser determinante chave na inflamação e na cicatrização da córnea, mediadas pelo PAF (BAZAN & OTTINO, 2002).

As interleucinas também têm sido envolvidas no processo cicatricial da córnea. O que se sabe até o momento é que, após uma lesão corneana, as células epiteliais danificadas liberam interleucinas, IL-1a e IL-1b, as quais difundem-se até o estroma, onde sua elevada concentração desencadeia uma seqüência de eventos celulares (WILSON et al., 1996; ABELSON & SLUGG, 1999). Recentes publicações demonstraram que a produção de MMP-9 nas afecções corneanas em

humanos está associada com a presença de IL-1 $\alpha$  no fluído lacrimal. Este achado permitiu pensar-se que este mediador pró-inflamatório é um importante indutor da síntese de MMP-9 (Barton *apud* BEVANS-NELSON et al., 2001; Affonso *apud* BEVANS-NELSON et al., 2001), MMP-1, MMP-2 e MMP-3 na superfície ocular (Fini *apud* HAO et al., 1999). A interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) foi identificada, após teste com vários inibidores, como a maior molécula capaz de bloquear a indução de colagenase (MMP-1) por fibroblastos em cultura (Fini *apud* SIVAK & FINI, 2002) e como um mediador na regulação do processo de apoptose dos ceratócitos estromais. Além disso, resultados de pesquisa demonstram que a morte celular *in vitro* dos fibroblastos do estroma da córnea e da derme em resposta à exposição à interleucina-1 $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  foi associada com fragmentação do DNA, consistente com apoptose celular. Isto sugere que, na homeostasia normal, a liberação controlada de interleucina-1, durante a maturação e a morte epitelial, pode manter a organização tecidual por meio de apoptose e, possivelmente, de efeito quimiotático negativo nos ceratócitos adjacentes à lesão (WILSON et al., 1996; ABELSON & SLUGG, 1999).

O fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ 1), em modelo de reconstrução corneana com interação ceratócito-epitélio de células epiteliais bovina, organizou a estrutura lamelar do epitélio e induziu a diferenciação deste último, o qual encontrava-se em um estado pré-diferenciado, devido ao estímulo de proliferação. Somado a isto, também promoveu a proliferação de ceratócitos e induziu hipertrofia celular, fazendo-se acreditar que o mesmo ativa os ceratócitos e facilita a secreção de fatores de crescimento conhecidos e desconhecidos, promovendo a diferenciação e proliferação das células epiteliais (NISHIMURA et al., 1998). Outra função atribuída ao TGF- $\beta$ 1 é a sua capacidade de inibir a síntese de MMP-1 e MMP-3 (Fini *apud* HAO et al., 1999).

Outros importantes resultados do mesmo trabalho realizado por NISHIMURA e colaboradores (1998), mostraram que o fator de crescimento de hepatócito (HGF) promoveu aumento da espessura da estrutura lamelar epitelial e induziu levemente a diferenciação lamelar epitelial, entretanto, foi incapaz de produzir proliferação epitelial significativa.

Atuando como um estimulante da proliferação e migração das células endoteliais vasculares, está o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), cuja expressão do RNAm foi correlacionada com o desenvolvimento de novos vasos, em modelo de neovascularização em

ratos, sugerindo seu papel no processo inflamatório associado com a angiogênese corneana (KVANTA et al., 2000).

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) também apresenta importante função neste processo, atuando como um potente indutor da síntese de MMP-9 pelas células corneanas de coelhos, estimulando significativamente o aumento da síntese de MMP-9, de modo dose-dependente. A partir disso, e juntamente com outras descobertas, acredita-se que a expressão do gen de MMP-9 nas células epiteliais seja responsiva ao TNF- $\alpha$ , produzido por células mononucleares acumuladas no local da lesão, e que esta enzima seja produzida após infiltração leucocitária dentro do tecido corneano inflamado, podendo participar da reparação da membrana basal e contribuir para a restauração da integridade corneana (BEVANS-NELSON et al., 2001).

O fator de crescimento de fibroblasto (FGF) é uma substância moduladora e, dentre os seus vários subtipos existentes, sabe-se que o FGF-2 ou também chamado fator de crescimento de fibroblasto básico (*bFGF*) é capaz de estimular mitose, quimiotaxia e migração das células epiteliais em humanos e outros mamíferos. Além disso, ele pode ser expresso por células epiteliais, ceratócitos e pela glândula lacrimal, podendo exercer tanto efeito autócrino como parácrino sobre as células epiteliais (Hoppenteya *apud* AHMADI & JAKOBIEC, 2002).

O fator de crescimento de ceratócito (KGF) é uma citocina de efeito parácrino clássico, expressa por ceratócitos estromais e pela glândula lacrimal, exercendo seu efeito sobre as células epiteliais da córnea. Em estudos de cultura de células humanas, o KGF estimula a proliferação celular (Wilson *apud* AHMADI & JAKOBIEC, 2002) e sua aplicação tópica sobre feridas epiteliais corneanas de coelhos acelera a cicatrização (Imanishi *apud* AHMADI & JAKOBIEC, 2002).

Quanto à cicatrização endotelial, demonstrou-se que a adição exógena do fator de crescimento de fibroblasto básico (*bFGF*) (CHOLLET et al., 1993; SCHILLING-SCHÖN et al., 2000) e EGF (SCHILLING-SCHÖN et al., 2000), diretamente sobre a ferida, estimulou a migração de células endoteliais bovina e o aumento do número de células no local da lesão em teste de cultura celular *in vitro*. Neste mesmo estudo, revelaram-se evidências de que os fatores de crescimento intracelulares, presentes nos restos celulares e células lisadas, modulam a cicatrização de lesões iniciadas por dano celular.

CHOLLET et al. (1993) apresentaram a primeira evidência da presença de receptores funcionais, envolvidos na migração e mitose celular, para endotelina-1 (ET1) em células endoteliais de bovino. Neste mesmo estudo, verificou-se que a adição exógena de endotelina-1 (ET1) estimulou a migração e mitose de células endoteliais de bovino em cultura celular *in vitro*; entretanto, a adição exógena de ambos, bFGF e ET1, resultou em um efeito aditivo sobre a migração de células endoteliais, sendo esta significativamente maior do que aquela promovida por um ou outro fator isoladamente, o que sugere diferentes caminhos de atuação sobre estas células.

#### 2.4 CERATITE ULCERATIVA BACTERIANA POR *Pseudomonas aeruginosa*

A ceratite ulcerativa bacteriana é considerada comum nos cavalos (SAUER et al., 2003) e relativamente rara em seres humanos (MATSUMOTO, 2000; FLEISZIG & EVANS, 2002), porquanto, é uma das afecções oculares mais graves em oftalmologia veterinária e humana, requerendo terapia médica efetiva rápida, devido à potencial ameaça à visão (WYMAN et al., 1983; MATSUMOTO, 2000; EVANS et al., 2002; FLEISZIG & EVANS, 2002). Em animais, as bactérias comumente isoladas diferem daquelas da flora conjuntival normal, sendo que os microrganismos mais freqüentemente encontrados são bactérias gram-negativas, principalmente da família das Enterobacteriaceae (*Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.), *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus* spp. (MOORE, 1983; DAVIDSON, 1991; NASISSE & NELMS, 1992; BARNETT et al., 1995; SAUER et al., 2003). Entretanto, bactérias gram-positivas como *Streptococcus* spp e *Staphylococcus* spp também já foram isoladas (McLAUGHLIN et al., 1983; MOORE et al., 1983; MOORE et al., 1988; SAUER et al., 2003). Em seres humanos, os microrganismos encontrados com maior freqüência, na córnea acometida por afecção bacteriana, são bactérias gram-positivas e negativas como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (FLEISZIG & EVANS, 2002; UESUGUI et al., 2002). Dentre as três bactérias mais freqüentemente isoladas destas afecções, está a *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa, amplamente distribuída no ambiente e encontrada na água, no solo, nas plantas, nas membranas mucosas e na pele (Sabath *apud* GYLES, 1993; TODAR, 2001) e, também, nas fezes de animais sadios (CARTER &

CHENGAPPA, 1991; QUINN et al., 1994; GILLIGAN, 1995; HIRSH, 1999). É encontrada, ainda, em uma variedade de soluções aquosas, como os colírios ou soluções para uso oftálmico e cosméticos (GILLIGAN, 1995; LIMA & BELFORT JR., 1996).

#### 2.4.1 Patogênese da Ceratite Bacteriana

Como um patógeno oportunista, a *P. aeruginosa* tipicamente requer uma porta de entrada, ou por uma lesão prévia ou por uma “quebra” nos mecanismos normais de defesa, para que a subsequente invasão corneana possa ocorrer (TODAR, 2001). Um leito epitelial intacto, firmemente aderido a sua lâmina basal subjacente, cria uma barreira essencial para a manutenção da homeostasia corneana. Esta barreira epitelial, juntamente com elementos advindos do filme lacrimal, apresenta grande importância na prevenção da adesão, colonização e infectividade bacteriana na superfície da córnea e na dispersão da bactéria no estroma (TODAR, 2001; ESCO et al., 2002). Para que a infecção ocular se instale, é necessário que haja aderência, penetração, invasão, persistência e replicação do microrganismo, independente dos mecanismos locais de defesa (UESUGUI et al., 2002). Portanto, o rompimento desta barreira epitelial, frequentemente causado por trauma, permite a entrada da *P. aeruginosa* e de outras bactérias, comensais ou patogênicas, e sua multiplicação no estroma (MOORE, 1987; DAVIDSON, 1991; SWEENEY & IRBY, 1996; STADES et al., 1999; HAMOR & WHELAN, 1999; HAO et al., 1999; KANSKI, 2000), resultando em uma ceratite ulcerativa como consequência da evolução do processo bacteriano na córnea (HAO et al., 1999). Em modelos experimentais de ceratite bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa* em coelhos, a inoculação intraestromal permite abortar as três etapas iniciais do processo de instalação da bactéria, uma vez que a mesma é introduzida diretamente no estroma, facilitando a infecção (O’CALLAGHAN et al., 1996), entretanto, observam-se variações na frequência e severidade da infecção produzida com relação à ceratopatogenicidade da cepa utilizada (HYNDIUK et al., 1983; ARISTOTELI & WILLCOX, 2001). Várias concentrações bacterianas têm sido utilizadas nestes modelos e, geralmente o inóculo é preparado em unidades formadoras de colônias/ml em fase logarítmica da *Pseudomonas* (HOB DEN et al., 1993; O’CALLAGHAN et al., 1996; NASSARALLA et al., 1997; MATSUMOTO, 2000). Estes modelos de inoculação, através de injeção intraestromal, diferem das condições em que a

infecção naturalmente ocorre em cavalos e seres humanos (PRIMBS et al., 1961; FLEISZIG & EVANS, 2002), entretanto, continuam extremamente válidos para seu estudo.

A habilidade da *Pseudomonas aeruginosa* aderir às células dos mamíferos, aos tecidos e aos biomateriais, como as lentes de contato, parece ser modulada por várias moléculas próprias, incluindo pili, flagelo, proteínas externas da membrana e lipopolissacarídeo (LPS) (Fletcher *apud* FLEISZIG & EVANS, 2002), o qual também influencia na adesão bacteriana às células epiteliais (Fletcher *apud* EVANS et al., 2002). Acredita-se que a bactéria seja capaz de modular sua própria adesão, por meio de adesinas de superfície, as quais interagem com receptores na superfície das células epiteliais do hospedeiro (GUPTA et al., 1996). Segundo TODAR (2001), no trato respiratório, as fímbrias da *Pseudomonas aeruginosa* aderem às células epiteliais por meio de adesinas, que parecem ligar-se a receptores específicos para o ácido siálico nas células epiteliais. Além disso, a colonização do trato respiratório requer aderência das fímbrias, a qual pode ser auxiliada pela produção de proteases que degradam a fibronectina, expondo, desta forma, os receptores subjacentes das fímbrias nas células epiteliais. Segundo estudo realizado por ARISTOTELI & WILLCOX (2001), diferentes cepas de *P. aeruginosa* são capazes de aderirem-se à mucina em um modelo experimental com mucina gástrica de suíno. Foi sugerido que a mucina ocular pode funcionar como uma barreira de proteção do epitélio subjacente da córnea contra a colonização pela bactéria e, por isso, o uso de agentes mucolíticos, como N-acetilcisteína, para a remoção da mucina ocular pode aumentar a aderência da *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, a mesma já foi sugerida como um receptor específico para este microrganismo nas superfícies epiteliais (GYLES, 1993). Para ESCO et al. (2002), um outro fator que pode contribuir para a ligação da *P. aeruginosa* às células epiteliais é a composição da matriz extracelular, de forma que, em condições de hipoxia, menos laminina é incorporada à matriz, resultando em aumento da ligação da bactéria. Além disso, a *P. aeruginosa* pode aderir-se prontamente aos componentes da lâmina basal, incluindo laminina, fibronectina e colágeno tipo IV (PLOTKOWSKI et al., 1996). Essa adesão às células do hospedeiro pode ser facilitada por dois dos seus exoprodutos, a protease alcalina e a elastase (GUPTA et al., 1996).

A capacidade da *Pseudomonas aeruginosa* invadir os tecidos está diretamente relacionada a sua resistência à fagocitose e às defesas imunológicas do hospedeiro e, também, à produção dos seus fatores de virulência, que contribuem para invasão e persistência nos tecidos (TODAR,

2001; FLEISZIG & EVANS, 2002). Sua cápsula bacteriana e um biofilme (alginate viscoso) protegem-na efetivamente da opsonização pelos anticorpos, da deposição de complemento e da fagocitose (TODAR, 2001). O LPS, considerado um dos fatores de virulência essenciais no desenvolvimento da afecção corneana, contribui para a ocultação da bactéria das defesas do hospedeiro, como atividade do complemento, anticorpos e fagocitose (GYLES, 1993; TODAR, 2001) e, ainda, contra medicações antimicrobianas como aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos. Além disso, atua influenciando na aderência, invasão e sobrevivência da *P. aeruginosa* nas células epiteliais (EVANS et al., 2002). As células corneanas permanecem como as únicas células nas quais a invasão pela *Pseudomonas aeruginosa* foi demonstrada *in vivo* (FLEISZIG et al., 1994). Duas proteases extracelulares têm sido associadas com a capacidade de virulência, exercida no estágio de invasão bacteriana, a elastase e a protease alcalina (TODAR, 2001). Em estudo *in vitro*, sobre a invasão e multiplicação da *P. aeruginosa* nas células epiteliais da córnea, verificou-se influências do tempo de interação da bactéria com as células corneanas, da presença de lesão e da temperatura de incubação. Além disso, neste mesmo, ficou demonstrado com uso de testes de sobrevivência à gentamicina, que a *P. aeruginosa* pode invadir e sobreviver dentro dessas células em vários modelos *in vitro* em ratos, coelhos e camundongos, após lesão da córnea (FLEISZIG et al., 1995). Uma importante descoberta feita por NI et al. (2004), em recente pesquisa, foi a detecção de uma proteína-D surfactante no fluido lacrimal de humanos e de ratos. Verificou-se que esta proteína é capaz de proteger as células epiteliais corneanas da invasão pela *P. aeruginosa*, entretanto, não se detectou atividade bacteriostática.

Segundo estudo *in vitro*, utilizando-se células epiteliais corneanas de coelho, a *P. aeruginosa* foi capaz de multiplicar-se dentro dessas células, sendo que a taxa de replicação em quatro horas foi de 10 campos e, em 24 horas, o número de bactérias foi reduzido aos níveis iniciais, provavelmente devido à fração de células epiteliais mortas contendo bactéria (FLEISZIG et al., 1995). A *Pseudomonas aeruginosa* produz e libera vários fatores de virulência, capazes de danificar direta e indiretamente os tecidos corneanos, por meio de suas próprias enzimas proteolíticas ou por degradação do colágeno mediada pelos ceratócitos (HAO et al., 1999; MIYAJIMA et al., 2001; NAGANO et al., 2001). Algumas das suas proteases são capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular, incluindo proteoglicanos, colágeno tipo III e

IV, e laminina. Destas, conforme afirmou MATSUMOTO (2000), a elastase e a protease alcalina são responsáveis pela necrose estromal liquefativa na córnea de coelhos. À elastase também foi atribuída a capacidade de ativação de metaloproteases (HAO et al., 1999), como MMP-1, MMP-3 (NAGANO et al., 2001), MMP-2 e MMP-9 (MIYAJIMA et al., 2001) e degradação de colágeno, fibronectina, IgA, IgG e complemento (TODAR, 2001). A exotoxina A tem sido associada à virulência ocular, conforme PILLAR & HOB DEN (2002) mostraram em estudo, no qual verificou-se que a ausência de exotoxina A nas cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetou sua capacidade de persistir e causar doença em modelos de ceratite bacteriana em ratos murine. A protease IV, uma exoproteína, também demonstrou atividade na virulência corneana em modelos experimentais de infecção com escarificação da córnea de camundongos, entretanto, não se percebeu diferenças entre os escores em modelos de inoculação intraestromal em coelhos com cepas mutantes, deficientes em protease IV e não mutantes (O'CALLAGHAN et al., 1996). Em outro estudo, esta mesma exoproteína degradou fibrinogênio, fibrina, plasminogênio e C3 e, degradou parcialmente plasmina e IgG, mas permanece desconhecida sua habilidade de degradar proteínas estruturais e ativar proteases corneanas do hospedeiro (ENGEL et al., 1998). Tanto a protease alcalina como a elastase e o lipopolissacarídeo, conforme demonstrado em pesquisa *in vitro*, foram capazes de aumentar a liberação de MMP-2 e promover síntese e liberação de MMP-9 (MIYAJIMA et al., 2001). A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista único por seus fatores de virulência e, além dos citados acima, muito outros são produzidos pela bactéria, entretanto, o conhecimento acerca do envolvimento dos demais na patogênese da ceratite bacteriana ainda permanece limitado (TODAR, 2001).

Antigos e recentes relatos indicam que a combinação dos fatores patogênicos derivados dos tecidos do hospedeiro com os fatores da virulência da *P. aeruginosa* são responsáveis pela destruição corneana, durante esta infecção (VAN HORN et al., 1981; DONG et al., 2000; MIYAJIMA et al., 2001; VYGANTAS & WHITLEY, 2003; HAZLETT, 2004). Acredita-se que as proteases que contribuem para a ulceração da córnea no estágio inicial da infecção sejam provenientes da própria bactéria. Entretanto, num estágio mais avançado do processo, as proteases que predominam como fatores patogênicos da destruição tecidual são oriundas dos polimorfonucleares leucócitos, os quais se acumulam no tecido do hospedeiro e substituem as proteases bacterianas 24-48 horas após a infecção (WILCOCK, 1993; MATSUMOTO, 2000;

Steuhl *apud* MIYAJIMA et al., 2001). Como prova disso, verificou-se uma clara associação entre infiltração prolongada de polimorfonucleares na córnea e a destruição da córnea (FLEISZIG & EVANS, 2002). Estas células, que se infiltram no estroma, podem contribuir para a ulceração, por meio da secreção de elastases, collagenases, gelatinases (WILCOCK, 1993; MATSUMOTO, 2000; TERSARIOL et al., 2002) e citocinas, as quais, por sua vez, estimulam a produção de metaloproteases pelos ceratócitos (HAO et al., 1999), que num primeiro momento são importantes na limpeza do tecido afetado. Os ceratócitos produzem metaloprotease-1 (MMP-1, collagenase), MMP-2 (gelatinase A), MMP-3 (estromelina 1) e MMP-9 (gelatinase B) (FINI et al., 1990). A MMP-1 degrada colágeno intersticial tipo I, II e III e as formas ativadas de MMP-2 e MMP-9 podem degradar colágeno tipo IV, V e VII, laminina e fibronectina, assim como colágeno denaturado e sua liberação aumentada pode contribuir para a destruição da membrana basal e ulceração corneana (MIYAJIMA et al., 2001). Em recente estudo, verificou-se a indução de altos níveis da expressão do RNAm de metaloprotease de membrana tipo-1 nas córneas de ratos infectadas com *P. aeruginosa*, os quais permaneceram altos do segundo ao 11º dia. Isto pode significar que estas metaloproteases também sejam responsáveis pelo dano à córnea causado por outras MMPs, devido a sua dupla função no remodelamento da matriz extracelular, por meio da ativação de pró-MMP-2 e degradação direta de suas proteínas (DONG et al., 2000). As metaloproteases são liberadas como zimogênios inativos e ativadas extracelularmente por uma serinoprotease, a plasmina, a qual é capaz de desencadear uma cascata proteolítica por meio da degradação de proteínas da matriz extracelular e pela ativação de outras metaloproteases (BERMAN et al., 1983; RICHIERT & IRELAND, 1999), levando à destruição estromal (BERMAN et al., 1983). O fator responsável pela ativação da plasmina, o ativador de plasminogênio, é liberado por polimorfonucleares leucócitos (BERMAN et al., 1980) e macrófagos, principais células a infiltrar a córnea infectada. Em estudo realizado por BERK et al. (2001), verificou-se um forte aumento na expressão do ativador do plasminogênio em ratos com ceratite ulcerativa por *Pseudomonas aeruginosa*, o qual assim permaneceu até o 11º dia pós-infecção. Além disso, ocorreu também liberação de fator ativador de plaquetas, citocinas e metabólitos do ácido aracdônico (KERNAKI & BERK, 1994). O fator de crescimento de hepatócito (HGF) aumentou a susceptibilidade de células epiteliais à aderência, invasão e citotoxicidade pela *Pseudomonas aeruginosa* (FLEISZIG et al., 1998). Sabe-se que a

interleucina-6 (IL-6) atua como um importante fator de proteção da córnea durante a infecção por esta bactéria gram-negativa (WILLCOX et al., 1998) e, segundo COLE et al. (2001), a administração tópica de IL-6 na córnea infectada por *P. aeruginosa* de dois tipos de ratos resultou em efetivo recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares para a córnea; verificando-se, ainda, que o aumento precoce dos níveis de IL-6 podem ser protetores na infecção corneana. A interleucina-12 (IL-12), produzida pelos macrófagos, induz a secreção de IL-2 e de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e potencializa a proliferação e citotoxicidade das células T (TIZARD, 1998). HAZLETT et al. (2002) detectaram, mediante reação em cadeia da polimerase, IL-12 na córnea infectada por *P. aeruginosa* de ratos susceptíveis, desde 12 horas após a infecção até o sétimo dia. Neste mesmo estudo, níveis de produção de RNAm do INF- $\gamma$  foram maiores em ratos susceptíveis. A partir disso, foi sugerido que um desequilíbrio na regulação positiva do INF- $\gamma$  pela IL-12 leva a uma excessiva produção da citocina e toxicidade. Mesmo com o importante papel da IL-12 na indução de INF- $\gamma$ , segundo pesquisa realizada por LIGHVANI et al. (2004), a maior fonte desta última citocina são as células *natural killer* (NK), as quais são necessárias durante a infecção experimental por *P. aeruginosa* para regularem efetivamente a morte bacteriana e o número de polimorfonucleares na córnea de ratos susceptíveis. Além disso, KERNAKI & BERK (1994) observaram, em homogeneizados oculares, a indução do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) acima dos níveis basais entre um e três dias pós-infecção com *P. aeruginosa*. Seu papel na infecção corneana ainda não está definido, entretanto, sabe-se que o TNF- $\alpha$  é liberado em resposta à endotoxina bacteriana no choque séptico (TIZARD, 1998) e, deste modo, pode apresentar importante papel nesta infecção corneana.

O resultado, em cavalos e seres humanos, da associação dos fatores patogênicos da *P. aeruginosa* com os do hospedeiro no tecido corneano, é uma típica ceratite bacteriana, caracterizada por uma opacidade gelatinosa acinzentada adjacente à úlcera chamada “melting” (KANSKI, 2000; SAUER et al., 2003) e caracterizada por necrose estromal liquefativa (BARNETT et al., 1995), ambas decorrente da rápida liquefação dos proteoglicanos da substância fundamental da córnea (SWEENEY & IRBY, 1996). Na histopatologia, esta lesão é visualizada como um coágulo eosinofílico característico, com neutrófilos adjacentes, formando uma parede espessa de células vivas e fragmentadas, podendo resultar em um abscesso na forma de anel

(WILCOCK, 1993). Em coelhos, observa-se extensa infiltração de polimorfonucleares leucócitos (KESSLER et al., 1977), os quais aparecem principalmente degranulados (VAN HORN et al., 1981). Nas lesões experimentais de infecção corneana por *Pseudomonas aeruginosa*, após 24 horas da inoculação, observa-se infiltração maciça de polimorfonucleares, dispostos ao redor da lesão da córnea (MIYAJIMA et al., 2001).

#### 2.4.2 Sinais Clínicos

Em cavalos, os sinais clínicos da infecção bacteriana da córnea incluem dor ocular pronunciada, secreção ocular mucopurulenta, opacidade corneana extensa, ceratite intersticial com influxo de células inflamatórias para o tecido, neovascularização extensa, perda estromal progressiva, necrose do estroma e liquificação (DAVIDSON, 1991). Blefarospasmo, fotofobia, hiperemia conjuntival marcada e quemose também são observadas (BARNETT et al., 1995). Uveíte anterior freqüentemente acompanha a ceratite ulcerativa e é mediada por caminhos reflexos, originados nos nervos sensoriais da córnea. O estímulo reflexo axonal resulta em vasodilatação dos capilares da íris, alteração da permeabilidade e quimiotaxia por leucócitos polimorfonucleares (NASISSE & NELMS, 1992; HAMOR & WHELAN, 1999; SLATTER, 2001). Nas 24 horas seguintes às infecções experimentais em coelhos, observa-se hiperemia conjuntival e secreção ocular mais severas, uma área oval de edema e infiltração celular, as quais evoluem em 48 horas para um infiltrado celular centralmente mais denso, incluindo quase todo o diâmetro da córnea. Infiltrados periféricos, na forma de anel e hipópio, hiperemia conjuntival e bulbar severa com grande quantidade de secreção purulenta também podem ser constatados. (KESSLER et al., 1977; VAN HORN et al., 1981; HYNDIUK et al., 1983; NASSARALLA et al., 1997). Edema palpebral também é um dos sinais clínicos visualizados em seres humanos e coelhos (LIMA & BELFORT JR., 1997; NASSARALLA et al., 1997). A descemetocelose é uma complicação decorrente da progressão da úlcera corneana, pois uma vez atingida a membrana de descemet, poderá ocorrer sua protrusão, devido à influência da pressão intra-ocular (WILCOCK, 1993; BARNETT et al., 1995; SLATTER, 2001). No estudo realizado por SWEENEY & IRBY (1996), as descemetoceloses foram observadas em oito olhos dos 70 casos observados. Segundo KESSLER et al. (1977), a descemetocelose ocorreu somente na segunda semana da inoculação,

enquanto, NASSARALLA et al. (1997) verificaram descemetoceltes no terceiro dia do experimento, mesmo em olhos de coelhos tratados com colírio de gentamicina e, no estudo de WYMAN et al. (1983), esta última foi observada já no período de 48 horas pós-infecção em cães.

Conforme ocorre a progressão da destruição da córnea e das terminações nervosas subepiteliais, há redução da dor ocular e, em num período de 12-18 horas, pode ser evidenciada uma borda perilimbal de neovascularização profunda (BARNETT et al., 1995).

#### 2.4.3 Diagnóstico

A ceratite ulcerativa bacteriana, na grande maioria dos casos, pode ser diagnosticada com exames clínicos, incluindo iluminação difusa, oftalmoscopias direta e indireta, biomicroscopia e teste de retenção de fluoresceína (NASISSE & NELMS, 1992; BARNETT et al., 1995; HAMOR & WHELAN, 1999), o qual também é útil na diferenciação entre abscesso estromal e úlcera de córnea (HAMOR & WHELAN, 1999). Córneas extremamente edemaciadas podem resultar em testes falso-negativos, uma vez que o estroma torna-se incapaz de maior absorção de fluido (NASISSE & NELMS, 1992). Para um diagnóstico mais preciso pode-se realizar exame citológico com coloração de Gram e Giemsa e, testes de cultura e antibiograma de amostras de origem corneana (MOORE, 1987; BARNETT et al., 1995; BISTNER, 1995; HAMOR & WHELAN, 1999; WHITLEY, 2000; SAUER et al., 2003).

#### 2.4.4 Tratamento

A terapia inicial requer antibioticoterapia agressiva nas concentrações normais ou com soluções fortificadas, sendo a eleição do antibiótico conforme os resultados da cultura e do antibiograma (BARNETT et al., 1995; HAMOR & WHELAN, 1999; SLATTER, 2001). Em geral, as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam sensibilidade aos aminoglicosídeos, como tobramicina, gentamicina ou amicacina (MOORE, 1987; NASISSE & NELMS, 1992; GYLES, 1993; BARNETT et al., 1995), no entanto, eles devem ser utilizados com cautela devido a sua ação tóxica sobre o epitélio corneano (LIMA & BELFORT JR., 1996; KANSKI, 2000). Demonstrou-se que a terapia tópica com tobramicina na ceratite experimental por *P. aeruginosa* foi significativamente melhorada pela remoção do epitélio corneano, sendo eficaz a

concentração antibiótica mais baixa (3mg/ml) (DAVIS et al., 1978). Segundo estudo realizado por SWEENEY & IRBY (1996), os testes de sensibilidade para *P. aeruginosa* isolada de úlceras corneanas em cavalos, revelaram maior sensibilidade à amicacina (93%) comparada à tobramicina (87%) e, em contraste, uma resistência bacteriana a estes antibióticos já foi verificada em estudo retrospectivo (SAUER et al., 2003). A frequência de instilações normalmente é maior durante o primeiro e/ou segundo dias e, após a mesma é reduzida para cinco ou quatro vezes, diariamente (MOORE, 1987; NASISSE & NELMS, 1992; HAMOR & WHELAN, 1999).

Na presença concomitante de miose e espasmo ciliar, a atropina tópica é indicada para alívio do desconforto ocular, estabilização da barreira hematouveal e prevenção de sinéquias (NASISSE & NELMS, 1992; VYGANTAS & WHITLEY, 2003). Em alguns casos, pode ser utilizada juntamente com fenilefrina tópica (BARNETT et al., 1995).

O uso de agentes anticolagenolíticos também são indicados em todos os casos de necrose estromal liquefativa e, especialmente na infecção da córnea por *P. aeruginosa*. Diversos autores recomendam o uso de inúmeros agentes: acetilcisteína, EDTA, plasma, solução de heparina, toxóide tetânico (MOORE, 1983; LAFORGE, 1993; BARNETT et al., 1995; SWEENEY & IRBY, 1996; HAMOR & WHELAN, 1999; SLATTER, 2001). Conforme mencionado anteriormente, a acetilcisteína pode facilitar a adesão da *P. aeruginosa* por afetar a integridade do filme lacrimal (HAMOR & WHELAN, 1999; ARISTOTELI & WILLCOX, 2001). Atividade anticolagenolítica foi verificada em estudos *in vitro* para o soro, acetilcisteína, toxóide tetânico (HAFFNER et al., 2003), ao contrário do que foi observado para a heparina (SALONEN et al., 1987). A eficácia destes agentes é controversa (LAUS & ANDRADE, 1998) e, em geral, eles falham durante o tratamento clínico (HAO et al., 1999a). A apronitina não inibiu a degradação de colágeno *in vitro* (HAO et al., 1999b) nem quando utilizada na terapia da ceratite experimental por *P. aeruginosa* em coelhos (STUART et al., 1991), diferentemente do obtido por SALONEN et al. (1987) no tratamento de afecções corneanas em seres humanos. Além desta, verificou-se que a galardina é capaz de diminuir, de modo significativo, a ação direta e indireta da *P. aeruginosa* sobre a degradação de colágeno em cultura celular (HAO et al., 1999). Em outro estudo, a inibição da elastase, oriunda de leucócitos humanos, foi alcançada com o uso de glicosaminoglicano polissulfatado, cuja máxima capacidade foi cerca de 60-70% (BAICI et al., 1980).

Antiinflamatórios não esteroidais também têm sido indicados no tratamento destas ceratites bacterianas para alívio da dor ocular, estabilização da barreira hemato-aquosa (BARNETT et al., 1995) e inibição dos metabólitos do ácido aracdônico, de forma a reduzir a reação inflamatória e minimizar os danos provenientes de uma resposta exacerbada. Entretanto, estes agentes podem retardar o processo de cicatrização (LIMA et al., 1995), assim como os analgésicos opióides (ZIESKE, 2001).

KRISHNAN et al. (2004) testaram um ácido graxo identificado no pepino do mar, o 12-metiltetradecanóico, como inibidor da angiogênese em córneas de rato infectadas com *P. aeruginosa* e verificaram que a neovascularização foi significativamente menor no grupo tratado (cerca de 72% dos animais) quando comparado ao grupo controle, aos 7 e 14 dias, após o desafio.

O tratamento cirúrgico das úlceras bacterianas por *P. aeruginosa* é indicado para a redução da área necrótica ou na reparação de lesões profundas. Várias técnicas estão disponíveis, entretanto, no cavalo, normalmente utilizam-se transposição lamelar córneo-escleral, *flaps* de membrana nictitante, ceratoplastia conjuntival livre ou pediculada, ceratoplastia lamelar (HACKER et al., 1990; HAMOR & WHELAN, 1999) ou tarsorrafia temporária (BARNETT et al., 1995). Ótimos resultados foram obtidos com transplante de membrana amniótica no tratamento cirúrgico, nas úlceras infectadas por *P. aeruginosa* em coelhos e foram indicadas especialmente, naqueles casos de liquefação estromal e perda estromal extensa, sendo necessário, nesse caso, controle prévio da infecção (CHEN et al., 2002). Estes efeitos benéficos têm sido atribuídos à presença de fatores de crescimento encontrados em várias amostras de membranas amnióticas frescas e congeladas (CHARTERS, 2001). A cauterização da úlcera corneana com tintura de iodo 5-7% é uma outra opção disponível e pode ser associada ao tratamento cirúrgico (BARNETT et al., 1995), conforme realizado em um estudo de dois casos de ceratite ulcerativa colagenolítica (HACKER et al., 1990).

A despeito da terapia antimicrobiana apropriada, a ceratite infecciosa persiste como resultado das proteases já liberadas, da ativação de pró-MMPs e da degradação da matriz extracelular (NASISSE & NELMS, 1992; ENGEL et al., 1998; NAGANO et al., 2001). Esta ceratite é freqüentemente difícil de ser tratada, podendo progredir rapidamente para perfuração ou resultar em cicatrização exuberante, com danos à acuidade visual (BARNETT et al., 1995; Laibson *apud* GUPTA et al., 1996; SAUER et al., 2003). A *phthisis bulbi* pode seguir-se à

ulceração da córnea, especialmente quando esta leva à perfuração com aumento da reação inflamatória, produzindo oftalmite (CARLTON & RENDER, 1990). Em estudo retrospectivo realizado por SWEENEY & IRBY (1996), os resultados clínicos obtidos em 70 olhos de cavalos com esta afecção incluíram: visão excelente com leucoma mínimo (73%), enucleação (19%), olho *phthisico* (4%) e cegueira frontal (3%).

#### 2.4.4.1 Glicosaminoglicanos monossulfatados (GAGMS)

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos de alto peso molecular, predominantes na substância fundamental da córnea, que podem se apresentar como polímeros monossulfatados tal como o sulfato de condroitina, polímeros polissulfatados e polímeros não sulfatados (BANKS, 1991; ALBERTS et al., 1997). Os glicosaminoglicanos formam complexos com proteínas, chamados proteoglicanos, os quais contribuem para a estabilidade e suporte do tecido conjuntivo, além da transparência da córnea (SAMUELSON, 1991; ALBERTS et al., 1997; SLATTER, 2001). Estudos clínicos têm mostrado que o sulfato de condroitina reduz a dor em pacientes com osteoartrite (MORREALE et al., 1996), devido a sua possível ação antiinflamatória (PIPITONE, 1991; CASALS & DAMBIELLE, 1995; DAVIDSON, 2000). Esta última ação, atribuída aos glicosaminoglicanos sulfatados, pode ser resultado da inibição competitiva de enzimas líticas, do influxo leucocitário, síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> e interleucina-1, e formação de complemento (RASHMIR-RAVEN, 1994; GAUGHAN, 1994; ALVES, 1998). O sulfato de condroitina é capaz de levar ao aumento nas sínteses de RNAm pelos condrócitos, o que pode estar relacionado ao aumento na síntese de proteoglicanos, colágeno tipo II (CASALS & DAMBIELLE, 1995; Knämfelt *apud* MORREALE et al., 1996) e ácido hialurônico (Hutadilok *apud* CONTE et al., 1995). Além disso, CONTE et al. (1995) observaram que cinco dias de administração oral de sulfato de condroitina levou a um aumento significativo da concentração e massa molecular do ácido hialurônico e diminuição de uma enzima lisossomal. O uso do sulfato de condroitina em pacientes com osteoartrite, também reduziu significativamente a dor ocasionada por esta doença ósseo-articular (MORREALE et al., 1996), na qual, assim como nas afecções corneanas, as metaloproteases e serinoproteases como colagenase e elastase, respectivamente, exercem funções líticas sobre a cartilagem (CASALS & DAMBIELLE, 1995; Ali *apud* MORREALE et al., 1996).

A inibição das serinoproteases pode ser alcançada com o uso dos glicosaminoglicanos sulfatados (Verbruggen *apud* RASHMIR-RAVEN, 1994), que além desta, também possuem ação antioxidante, exercendo, desta forma, uma ação reparadora da cartilagem (CASALS & DAMBIELLE, 1995). Aos glicosaminoglicanos polissulfatados também são atribuídas todas essas funções (BAICI et al., 1980; ROBERTS, 1999), além da inibição da agregação plaquetária (McNAMARA et al., 1996). Importantes resultados foram obtidos na cicatrização de úlceras corneanas refratárias em cães e cavalos com o uso tópico de uma solução de glicosaminoglicano polissulfatado a 5% (MILLER, 1996; WOUK et al., 1998) e, mais recentemente, o uso de uma solução de sulfato de condroitina 20%, associada com ciprofloxacina, resultou em cicatrização mais rápida, sem formação de tecido cicatricial, de úlceras de córneas, experimentalmente, produzidas em cavalos (ZULIAN, 2002). Resultados clínicos similares a estes últimos também foram obtidos no tratamento de úlceras corneanas experimentais em coelhos, com estudo histopatológico adicional, que revelou um arranjo mais regular das fibras de colágeno, resultando em menor formação de tecido cicatricial (RANZANI et al., 2004). Boas respostas também foram alcançadas com o uso intra-ocular de sulfato de condroitina 20% como protetor endotelial e como substituto lacrimal em pacientes com ceratoconjuntivite seca (HARRISON et al., 1982; RAE et al., 1983; LIMBERG et al., 1987). Entretanto, o emprego tópico do sulfato de condroitina 5% não favoreceu a cicatrização de úlceras corneanas induzidas por álcali em coelhos (TALIERI, 2000). Em decorrência das pesquisas, os glicosaminoglicanos sulfatados por via tópica estão sendo indicados no tratamento de erosões corneanas persistentes em cães (ANDREW & GELATT, 2001).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 LOCAL E PERÍODO

Todo o projeto foi desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. O Laboratório de Microbiologia Veterinária da mesma Universidade e o Laboratório de Patologia Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná foram utilizados para a preparação do material microbiológico e do material de histopatologia, respectivamente. O período para a realização da pesquisa foi de 15 meses, iniciado em setembro de 2002 e finalizado em novembro de 2003.

#### 3.2 OBTENÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* PARA INOCULAÇÃO

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada foi do tipo “American Type Culture Collection” (ATCC - 27853), adquirida na Newprov, empresa de Curitiba-PR. Esta cepa é produtora de exotoxina A, elastase e protease alcalina, conforme descrito por O'CALLAGHAN et al. (1996), e apresenta: sensibilidade à tobramicina e colistina, resistência à cefalotina, kanamicina, nitrofurantoína e penicilina. A ATCC 27853 tem sido utilizada como cepa padrão em testes de sensibilidade antimicrobiana (RELLER et al., 1974) e em estudos experimentais de ceratites bacterianas por *P. aeruginosa* em coelhos, ratos e porcos da Guinéa (HOB DEN et al., 1992; HOB DEN et al., 1993b; O'CALLAGHAN et al., 1996).

#### 3.3 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Pseudomonas aeruginosa* NA Córnea DE COELHOS

##### 3.3.1 Suspensão Bacteriana

Para preparação da suspensão bacteriana utilizaram-se as bactérias do tipo ATCC, objetivando-se obter concentrações de  $10^6$  UFC (Unidades formadoras de colônias)/ml e  $10^9$  UFC/ml para serem testadas em um pré-experimento. As mesmas foram semeadas em ágar sangue e cetrimide e incubadas por 24 horas a 37°C. Após, as colônias destas culturas foram suspensas em tubo de ensaio com solução salina estéril e refrigeradas por 24 horas. A partir de então, esta suspensão bacteriana foi preparada por meio de diluições decimais em solução NaCl

0,9% estéril,  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ , semeada e incubada, a fim de verificar-se em qual diluição seria possível a contagem das colônias, considerando-se entre 30 e 300 UFCs. Passadas 24 horas da incubação, procedeu-se a contagem nas diluições  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  e o descarte das demais placas. A cada preparação do inóculo, semearam-se as diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , por questões de segurança.

### 3.3.2 Animais

Utilizaram-se 39 coelhos fêmeas Nova Zelândia branco (*Oryctolagus cuniculus*), albinos, com idade aproximada de 120 dias e peso médio de três quilos, todos adquiridos de um mesmo criador. Após a chegada, os animais foram submetidos a exames físico, oftalmológico, coproparasitológico, hematológico e ultra-sonográfico gestacional e, uma vez constatada higidez, ausência de afecção ocular e de prenhez, os mesmos ainda foram medicados com doses de 15mg/kg de sulfadoxina e trimetoprin<sup>1</sup>, SID, por três dias e, 0,02 ml/kg de ivermectina<sup>2</sup>, ambos pela via subcutânea, para a prevenção de coccidiose e de infestação por ácaros. Estes coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração comercial<sup>3</sup> e água *ad libitum* e, hortaliças por um período de 15 dias para adaptação, antes de serem iniciados os protocolos experimentais.

O projeto desta pesquisa foi encaminhado para a Universidade Federal de Santa Maria-RS para análise em Comissão de Ética, devido a ausência desta no curso de mestrado em Medicina Veterinária da UFPR.

## 3.4 PROTOCOLO CIRÚRGICO

### 3.4.1 Pré-experimental

Para o teste de patogenicidade da *Pseudomonas aeruginosa*, inicialmente duas coelhas foram utilizadas e sorteadas ao acaso para receber uma ou outra concentração bacteriana. Feito jejum sólido e líquido prévio, as mesmas foram anestesiadas com associação de 30mg/kg de quetamina<sup>4</sup> e 3 mg/kg de xilazina<sup>5</sup>, por via intramuscular e, tiveram os fundos de saco

---

1 Borgal – Hoerchst do Brasil Química e Farmacêutica S. A.

2 Ivermectina Ouro fino – Ouro Fino S. A.

3 Ração para coelhos - Supra Alisul Alimentos S.A. e Nuvital Nutrientes S. A.

4 Vetanarcol – Laboratórios König S. A.

5 Kensol – Laboratórios König S. A.

conjuntivais de ambos os olhos limpos com cotonete embebido em uma concentração de 0,06% de iodopovidine. Após colocação de campo cirúrgico oftálmico e blefarostato estéreis, procedeu-se a ceratectomia superficial bilateral, no eixo pupilar, padronizada pelo uso de uma trefina de 6mm de diâmetro (Figura 1). Em seguida, injetaram-se as suspensões bacterianas, 10 µl de 10<sup>6</sup> UFC/ml ou 10 µl de 10<sup>9</sup>UFC/ml, com uma seringa estéril de vidro de 100 microlitros e agulha estéril de calibre 30 e 0,5 polegada de comprimento. Esta última foi direcionada e introduzida do centro da córnea para a periferia, onde se depositou a suspensão bacteriana, com cuidado de evitar-se o refluxo desta (comunicação pessoal – B. A. NASSARALLA, Instituto de Olhos de Goiânia, Goiás). Com sorteio ao acaso, os olhos esquerdos foram inoculados e, os olhos direitos somente sofreram ceratectomia como controle, a fim de verificar-se a possibilidade de contaminação pela *P. aeruginosa* inoculada no olho adelfo. Anestesia tópica da córnea não foi realizada em nenhum dos animais devido ao efeito antimicrobiano destes agentes, procedimento que poderia interferir no crescimento bacteriano. Vinte e quatro horas após a inoculação, verificou-se o sucesso da infecção experimental em ambos os olhos esquerdos, sendo mais grave naquele da coelha que recebeu 1x 10<sup>7</sup> UFCs. A partir disso, esses animais foram tratados e descartados do experimento por meio de doação e, então a dose desafio de 10.000 UFCs foi escolhida para ser utilizada nos demais coelhos do experimento. Esta infecção foi importante, no entanto, não produziu efeito colagenolítico maciço, o que inviabilizaria qualquer forma de tratamento pela liquefação corneana. Com o objetivo de consolidar o protocolo a ser seguido, mais duas coelhas tiveram seus olhos esquerdos inoculados com 10 µl de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

Todos os animais receberam doses de 10mg/kg de dipirona<sup>6</sup>, BID, durante três dias, com a finalidade de obter-se analgesia, sem interferência no processo cicatricial. Além disso, objetivando o isolamento da *P. aeruginosa*, swabs conjuntivais foram realizados nos olhos infectados em 12, 24 e 30 horas e, raspados de córnea em 18 e 24 horas, após a inoculação.

### 3.4.2 Experimental

Para este estudo utilizaram-se 35 coelhos, dos quais 23 fizeram parte do grupo da avaliação clínica e 12 do grupo da histopatologia. Nestes animais, utilizou-se o mesmo protocolo

---

<sup>6</sup> D-500 – Fort Dodge Saúde Animal Ltda.

cirúrgico, no entanto, a injeção intraestromal de 10.000 UFCs foi feita em ambos os olhos (Figura 2), após ceratectomia prévia, conforme citado acima. Estes dois grupos, histopatológico e de avaliações clínicas, foram operados e inoculados em momentos diferentes, sendo este último realizado primeiramente, devido ao insuficiente número de gaiolas. A infecção experimental foi novamente confirmada pelo exame oftalmológico (STRUBBE & GELATT, 2003), 24 horas após a inoculação da bactéria. Nestes animais foi empregado, um outro protocolo de anestesia, composto por 0,05mg/kg de midazolam<sup>7</sup> e 15mg/kg de quetamina como pré-anestésicos e 8mg/kg de propofol<sup>8</sup>, ou a anestesia dissociativa com quetamina e xilazina, conforme a disponibilidade dos agentes anestésicos. O protocolo cirúrgico foi realizado conforme descrito para o estudo pré-experimental. Perfuração corneana iatrogênica ou ausência de infecção, verificada no pós-operatório foram critérios de exclusão.

### 3.5 PROTOCOLO TERAPÊUTICO

Conforme sorteio ao acaso realizado inicialmente, os olhos esquerdos foram nomeados grupo tratamento 1 e receberam três instilações diárias (8h, 14h e 20h) de uma associação, no mesmo frasco, de sulfato de condroitina a 10% e tobramicina<sup>9</sup> 0,3% após prévia limpeza com gaze umedecida em NaCl 0,9% estéril; os olhos direitos formaram o grupo tratamento 2 e receberam cinco instilações diárias (8h, 11h, 14h, 17h e 20h) de colírio de tobramicina<sup>10</sup> 0,3%, após limpeza com gaze<sup>11</sup> umedecida em solução NaCl 0,9% estéril. Ambos tratamentos somente foram iniciados 24 horas da inoculação experimental (Figuras 3 e 4). A frequência dos colírios acima foi determinada com base na recomendação de posologia mínima de cada um dos laboratórios. O horário das instilações seguiu aquele normalmente prescrito por ocasião de tratamentos clínicos.

---

7 Dormonid – Produtos Roche químicos e farmacêuticos s/a.

8 Diprivan 1% - Zeneca Farmacêutica do Brasil Ltda.

9 Tobramax – Labyes Indústria Argentina.

10 Tobrex – Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

11 MB Têxtil Cirúrgica Ltda.

FIGURA 1 – IMAGEM FOTOGRÁFICA DE TREFINAÇÃO DA CÓRNEA DE COELHA ADULTA, REALIZADA PREVIAMENTE À INJEÇÃO INTRAESTROMAL DE SUSPENSÃO BACTERIANA DE *P. aeruginosa*, CONTENDO  $1 \times 10^4$  UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS.

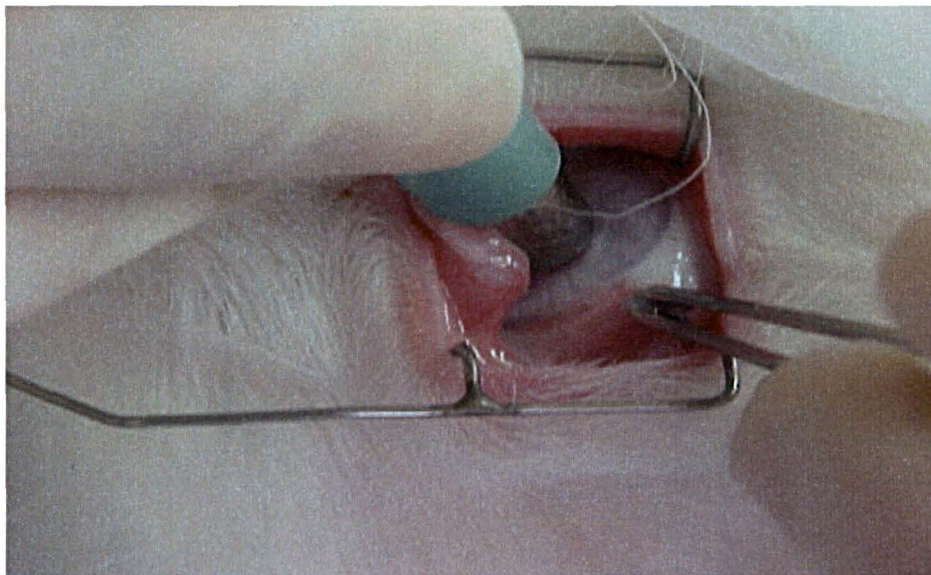


FIGURA 2 – IMAGEM FOTOGRÁFICA DA PEQUENA BOLHA (SETA) NA CÓRNEA DO OLHO ESQUERDO DE UMA COELHA, APÓS INJEÇÃO INTRAESTROMAL DE DEZ MICROLITROS DE UMA SUSPENSÃO BACTERIANA DE *Pseudomonas aeruginosa* NA CONCENTRAÇÃO DE  $1 \times 10^4$  UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS.

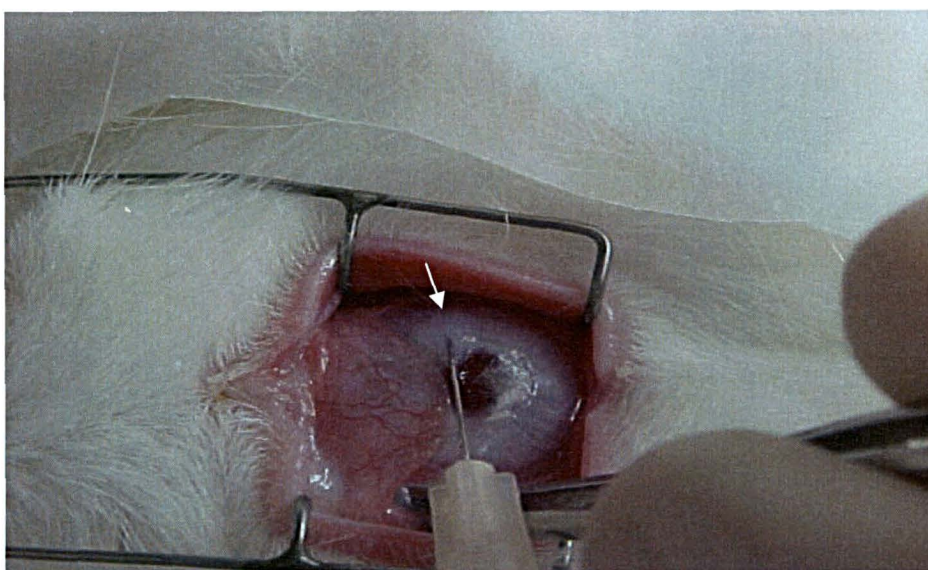


FIGURA 3 – IMAGEM FOTOGRÁFICA DA CERATITE POR *Pseudomonas aeruginosa*. OLHO ESQUERDO, GRUPO TRATAMENTO 1, DE COELHA ADULTA, NO SEGUNDO DIA PÓS-OPERATÓRIO.



FIGURA 4 – IMAGEM FOTOGRÁFICA DA CERATITE ULCERATIVA POR *P. aeruginosa* EM OLHO DIREITO, GRUPO TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, NO SEGUNDO DIA PÓS-OPERATÓRIO.



Com exceção dos três primeiros dias de pós-operatório, nos quais necessitou-se da aplicação intramuscular de dipirona, todas as coelhas permitiram sua manipulação, inclusive para a realização de todas as avaliações. Percebeu-se que após a instilação das medicações, elas faziam auto-higiene das pálpebras e, mesmo assim, optou-se pela não utilização de colares do tipo Elizabetano, a fim de evitar estresse desnecessário. Mesmo estando estes animais alojados em gaiolas individuais, dependuradas em baias, dentro de uma mesma área, não foi possível evitar-se a ocorrência de sons e ruídos altos, origem de estresse. A manipulação e alimentação foram realizadas sempre pelas mesmas duas pessoas.

### 3.6 PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO

#### 3.6.1 Avaliação Oftálmica

Devido ao prolongado período de tratamento das ceratites infecciosas, os olhos das coelhas foram avaliados a cada dois dias, sempre pelo mesmo examinador, com prova de retenção de fluoresceína<sup>12</sup> - bastão diluído em 0,5ml de NaCl 0,9%, transiluminador e oftalmoscopia direta. Utilizou-se para isto, a classificação do Sistema de Escore Ocular de Hackett-McDonald, descrito por MUNGER (2002), a qual foi adaptada para a disponibilidade dos instrumentos, e considerou-se os seguintes parâmetros: hiperemia conjuntival, quemose, secreção conjuntival, severidade da opacidade corneana, neovascularização da córnea e a intensidade da retenção da fluoresceína. Foi avaliada a opacidade corneana e não o edema, pois especificamente nesta afecção ocular, a primeira ocorre como resultado tanto do edema quanto da infiltração celular inflamatória da córnea. Além disso, blefarospasmo, fotofobia e edema de pálpebra foram classificados subjetivamente conforme o que se segue: (0) ausência de sinal clínico, (1) sinal discreto, (2) sinal moderado e (3) sinal intenso. As úlceras corneanas foram consideradas cicatrizadas quando do resultado negativo da prova de retenção da fluoresceína, momento em que foram verificadas as possíveis seqüelas resultantes da infecção corneana.

Cabe ressaltar que a primeira avaliação ocorreu previamente à instilação dos colírios para verificar o desenvolvimento da ceratite bacteriana, decorrente da infecção corneana pela *Pseudomonas aeruginosa* inoculada em todos os olhos, sendo que, a mesma correspondeu ao

---

12 Bastão de fluoresceína Ophthalmos – Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda.

primeiro dia do tratamento. As demais se seguiram a cada dois dias com o objetivo de acompanhar a evolução dos tratamentos e se seguiram até o 14<sup>a</sup> exame oftálmico, correspondendo, a cada dois dias, com o quarto, sétimo, 10<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup>, 22<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 31<sup>o</sup>, 34<sup>o</sup>, 37<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> dias de tratamento.

### 3.6.2 Histopatologia

Para este estudo, quatro coelhas foram mortas com injeção intravenosa letal de pentobarbital sódico e, posteriormente, os olhos enucleados, em cada um dos intervalos de 14, 21 e 45 dias de tratamento, totalizando 12 animais. A colheita de material para histopatologia conforme descrito acima, propositadamente recaiu naqueles períodos críticos do processo cicatricial (THOMSON, 1983; BARNETT et al., 1995). Finda a colheita dos olhos, injetou-se pequena quantidade intra-ocular de fixador de Bouin, líquido no qual os mesmos permaneceram imersos por período máximo de quatro horas. Após este procedimento, os olhos foram acondicionados em frascos plásticos individuais, devidamente identificados e contendo solução neutra de formol 10%, e armazenados em local apropriado para posterior realização da técnica histopatológica de rotina, seguida conforme descrição de BACHA JR. & WOOD (1990). Após os olhos terem sido emblocados em parafina, realizaram-se cortes histológicos de seis micrômetros de espessura.

Na seqüência, as amostras oculares foram coradas com os corantes hematoxilina/eosina (HE) e tricrômicas de Mallory e Shorr (LEESON & LEESON, 1970; BACHA JR & WOOD, 1990) e interpretadas, também às cegas, ao microscópico óptico, verificando-se o grau de organização do estroma, homogeneidade dos extratos epiteliais e eventuais distrofias. A HE é amplamente utilizada como corante de rotina em vários tecidos e, o Mallory e o Shorr são colorações específicas para visualização de tecido fibroso, justificando-se estas escolhas. As denominações dos tipos celulares encontrados na leitura microscópica do epitélio corneano foram seguidas conforme SLATTER (2001). Imagem de córnea de coelha adulta, Nova Zelândia, foi utilizada para comparação dos resultados da histopatologia (Figura 17).

### 3.6.3 Avaliação estatística

Os escores de intensidade dos parâmetros da avaliação clínica foram submetidos ao teste de Wilcoxon, indicado para comparação de duas amostras dependentes com variável aleatória não paramétrica (CURI, 1998; MONTIANI-FERREIRA et al., 2004). Para a variável tempo de cicatrização, assimétrica, utilizou-se também o teste de Wilcoxon. Calcularam-se as medianas, os primeiros e segundos quartis e a amplitude de variação para ambos os grupos. Nenhum teste estatístico foi utilizado para análise das seqüelas e complicações observadas durante e ao final do estudo, devido ao seu pequeno número, entretanto, percebeu-se a importância de informar-se as suas respectivas porcentagens. Além disso, conforme fins demonstrativos a que o estudo histopatológico foi destinado, o mesmo foi submetido à análise estatística. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## 4 RESULTADOS

Na fase pré-experimental, falhou a tentativa de isolamento da *P. aeruginosa* a partir de *swabs* conjuntivais. Entretanto, a mesma foi isolada com sucesso de amostras de raspados de córnea após a infecção experimental. Todas as coelhas utilizadas na pré-experimentação foram tratadas e doadas ao término dos tratamentos, quando da cicatrização de todos os olhos dos animais. Durante a injeção intraestromal do inóculo bacteriano, verificou-se dificuldade no controle do refluxo do inóculo e no controle do volume injetado no estroma, proposto neste estudo. Dos 23 animais inoculados para a avaliação clínica, cinco foram excluídos em detrimento dos critérios utilizados. Após a cicatrização ter se completado nos olhos de todas as fêmeas do grupo de avaliações clínicas, estas coelhas retornaram para o criador para serem utilizadas como matrizes da criação de coelhos.

### 4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

#### 4.1.1 Quemose

No primeiro dia que se seguiu após as 24 horas da inoculação experimental, o exame oftálmico nas coelhas permitiu constatar, nos olhos de ambos os grupos, a presença de quemose de intensidade leve a severa, com predomínio desta última. A quemose mínima foi verificada na maioria dos olhos dos grupos T1 e T2, do quarto ao sétimo dia após o desafio, com exceção de dois olhos de cada um dos grupos que apresentaram quemose leve do sétimo ao 10º dia. Neste dia, os demais não apresentaram mais este sinal clínico. Em dois olhos de cada grupo observou-se quemose leve até o 19º dia e, mínima até o 22º dia de tratamento. E, em outros dois olhos dos grupos T1 e T2 verificou-se quemose mínima do 13º até o 16º dia; quemose leve no 19º e quemose mínima novamente no 22º. Após o 22º dia pós-operatório, quemose não mais foi constatada. A análise de Wilcoxon não demonstrou diferença estatística significativa entre as intensidades observadas nos olhos dos dois grupos (Figura 5).

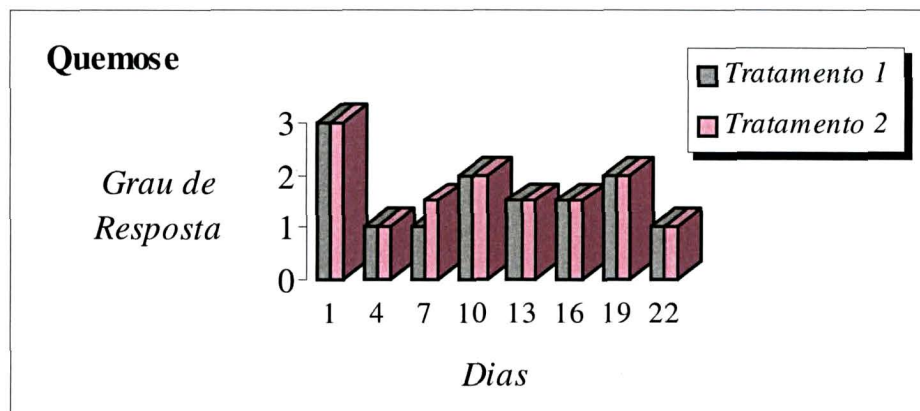
#### 4.1.2 Secreção Conjuntival

Todos os olhos de ambos os grupos apresentaram secreção ocular mucopurulenta de moderada a severa no primeiro dia. Do quarto ao 13º dia pós-operatório, observou-se secreção do tipo mucóide, nas intensidades leve a moderada, predominando esta última na maioria dos olhos do grupo tratamento 1. A partir do 16º ao 25º dia, neste mesmo grupo, predominou a intensidade leve, a qual persistiu e foi única do 28º ao 40º dia. Nos olhos do grupo tratamento 2, secreção ocular mucóide leve e moderada foi observada do quarto ao 19º dia pós-operatório; entretanto esta última intensidade só foi predominante no quarto dia. Do 22º ao 31º dia de tratamento, unicamente secreção ocular leve foi constatada nos olhos do grupo tratamento 2. Na análise estatística observou-se diferença significativa entre as intensidades obtidas nos olhos dos dois grupos, indicando que o tratamento 2 foi mais eficiente (Figura 6).

#### 4.1.3 Hiperemia conjuntival

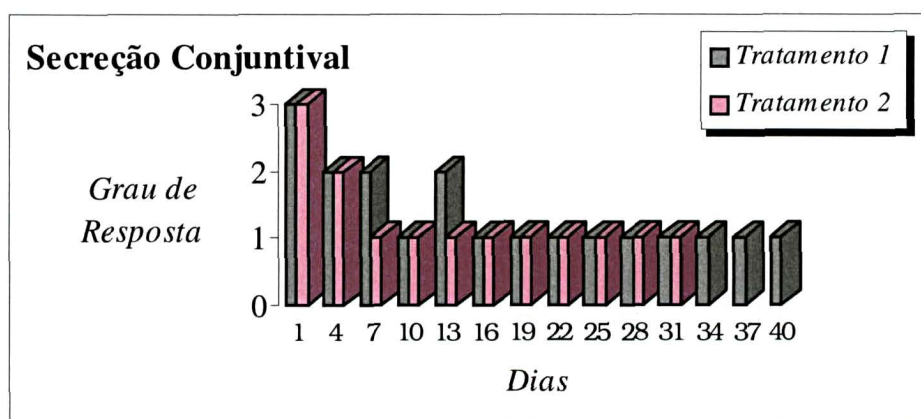
Observou-se hiperemia conjuntival severa em todos os olhos dos dois grupos até o quarto dia pós-operatório, com exceção de uma coelha que apresentou intensidade moderada no primeiro dia, em ambos os olhos. Do sétimo até 10º dia, este sinal clínico foi verificado na intensidade moderada nos olhos do grupo tratamento 2 e, até o 13º dia nos olhos do grupo tratamento 1. Do 13º dia ao 16º dia, a intensidade leve já foi observada em alguns olhos do grupo tratamento 2, entretanto, ainda predominando a hiperemia conjuntival moderada. A partir do 16º dia, nos olhos do grupo tratamento 2 foram visualizadas as intensidades moderada e leve, predominando esta última até o 28º dia e, permanecendo única até o 34º dia de tratamento. Nos olhos do grupo tratamento 1, observou-se hiperemia conjuntival leve e moderada, sendo que esta última intensidade apresentou-se na maioria dos olhos até o 22º dia pós-operatório. Do 25º dia até o 28º dia, predominou a intensidade leve e, até o 40º dia somente esta última foi verificada. Também para este sinal clínico, observou-se diferença estatística significativa entre as intensidades observadas nos olhos de ambos os grupos, indicando que o tratamento 2 foi mais eficiente (Figura 7).

FIGURA 5 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA QUEMOSE DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



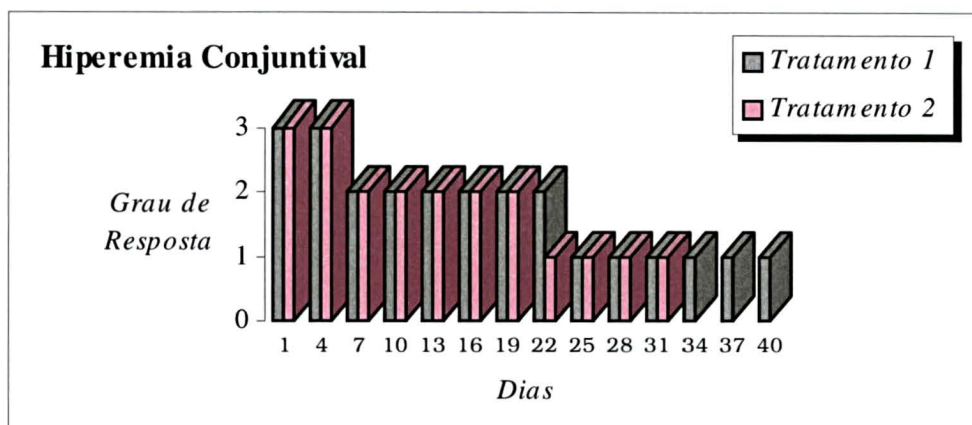
Teste de Wilcoxon ( $p= 0,57$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 22º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: leve; grau 2: moderada; grau 3: intenso.

FIGURA 6 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA SECREÇÃO CONJUNTIVAL DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



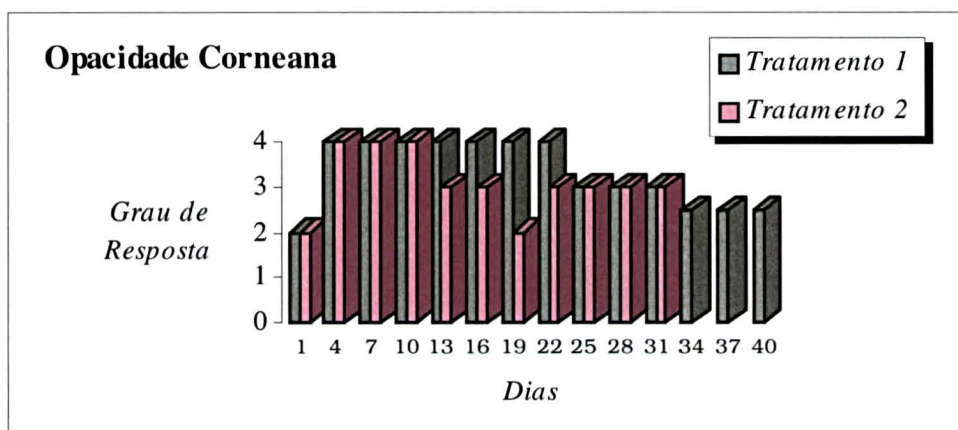
Teste de Wilcoxon ( $p= 0,002$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 31º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: leve; grau 2: moderada; grau 3: intenso.

FIGURA 7 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA HIPEREMIA CONJUNTIVAL DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



Teste de Wilcoxon ( $p = 0,002$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 31º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: leve; grau 2: moderada; grau 3: intenso.

FIGURA 8 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA OPACIDADE CORNEANA DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



Teste de Wilcoxon ( $p = 0,0004$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 31º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: tênue; grau 2: leve; grau 3: moderada; grau 4: intenso.

#### 4.1.4 Opacidade corneana

No primeiro dia, a opacidade corneana foi verificada de mínima a severa, predominando a intensidade leve nos olhos dos dois grupos. A partir do quarto até o 10º dia, este sinal clínico foi moderado e, predominantemente severo nos olhos de ambos os grupos, com exceção de um olho de cada um dos grupos, que era leve no quarto e 10º dia, respectivamente. No 13º dia, verificou-se maior predominância de opacidade moderada nos olhos do grupo tratamento 2, a qual reduziu-se para leve na grande maioria dos olhos no 16º dia e, assim permaneceu até o 25º dia pós-operatório. Do 28º ao 34º dia, verificaram-se as intensidades leve, moderada, e severa em um animal. Nos olhos do grupo T1, a opacidade corneana severa predominou ainda do 10º ao 25º dia pós-operatório, entretanto, a partir do 28º dia, as intensidades leve e moderada foram observadas até o 43º dia de tratamento. Conforme análise estatística, verificou-se diferença significativa entre as intensidades dos escores dos dois grupos, indicando que o T2 foi mais eficiente (Figura 8).

#### 4.1.5 Neovascularização corneana

Este sinal clínico não foi constatado em nenhum dos olhos dos dois grupos no primeiro dia pós-operatório. A partir do quarto dia, a neovascularização local e neovascularização da circunferência total da córnea foram observadas nos olhos de ambos os grupos, predominando o primeiro tipo. Após, do sétimo ao 43º dia pós-operatório, neovasos penetrando além de dois milímetros na córnea ou invadindo a circunferência corneana total foram observados tanto nos olhos dos grupos T1 e T2 (Figura 9). A análise de Wilcoxon revelou diferença estatisticamente significativa para as intensidades dos escores dos olhos de ambos os grupos (Figura 10), indicando que o T2 foi mais eficiente.

FIGURA 9 - IMAGEM FOTOGRÁFICA DE CERATITE ULCETATIVA POR *P. aeruginosa* EM COELHA ADULTA, NO QUARTO DIA PÓS-OPERATÓRIO. NOTAR O PADRÃO PERILIMBAL DE NEOVASCULARIZAÇÃO PROFUNDA (SETA) E A OPACIDADE CORNEANA SEVERA.

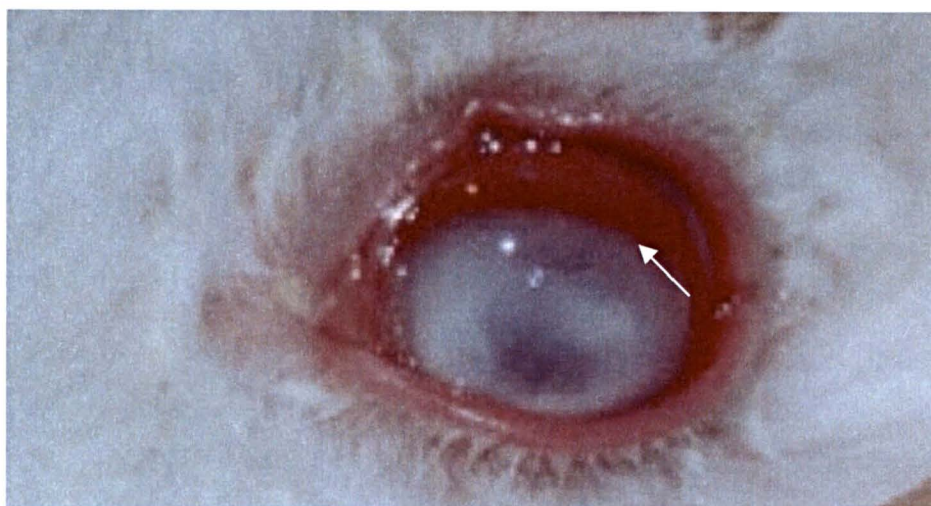
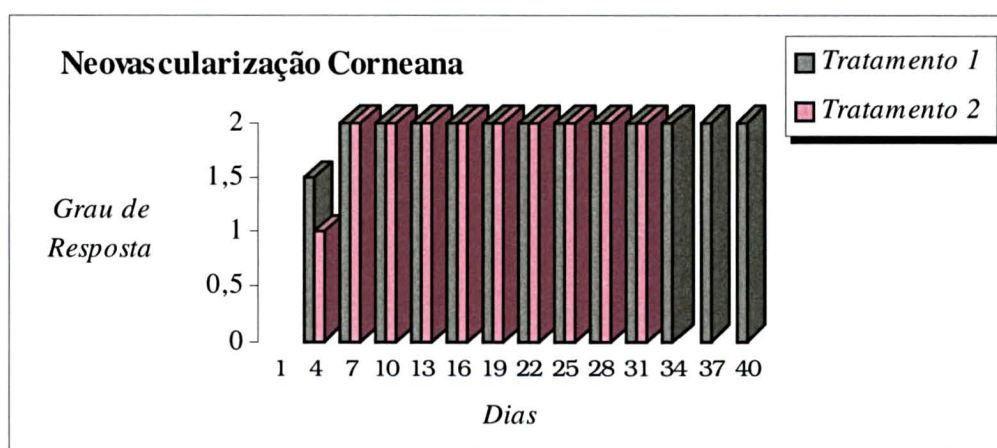


FIGURA 10 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM COM COLÍRIO DE TOBRAMICINA (T2) E UM COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



Teste de Wilcoxon ( $p=0,001$ ) para comparação entre T1 e T2, do 4º ao 31º dia pós-operatório.

Grau 1: neovascularização corneana local; grau 2: neovascularização da circunferência total. córnea

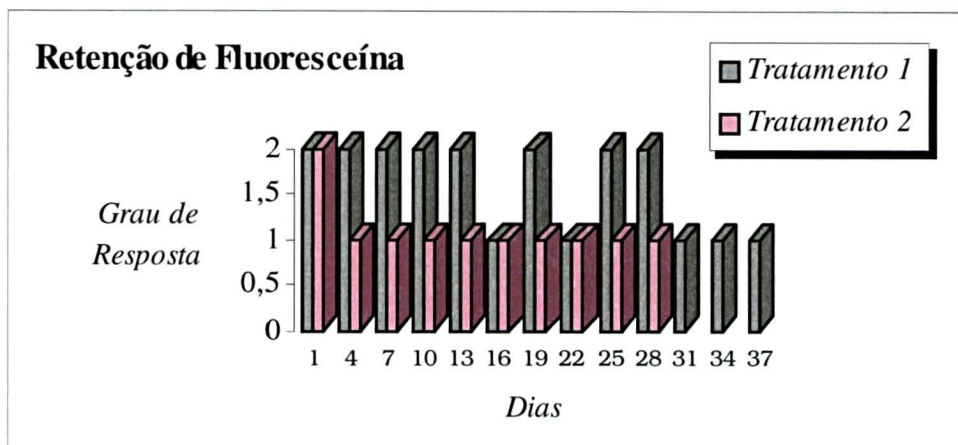
#### 4.1.6 Retenção de fluoresceína

No primeiro dia, observou-se retenção de fluoresceína de tênue a intensa nos olhos de ambos os grupos, predominando a intensidade leve. Do quarto ao 34º dia pós-operatório, verificaram-se retenções tênue a leve nos olhos do grupo tratamento 2, sendo que a retenção intensa foi constatada em dois olhos deste mesmo grupo, no quarto e sétimo dia de tratamento. Nos olhos do grupo tratamento 1, as retenções tênue, leve e intensa foram observadas do quarto ao 13º dia, com predominância da intensidade leve até o 10º dia. Do 13º ao 22º dia, retenção tênue de fluoresceína foi verificada na maioria dos olhos deste grupo; do 25º ao 28º dia predominou novamente retenção leve e, após houve retenção tênue até o 37º dia nos olhos do grupo tratamento 1. O teste de retenção de fluoresceína foi realizado até o 43º dia pós-operatório, quando da cicatrização dos últimos três olhos do grupo tratamento 1. Verificou-se diferença estatisticamente significativa nas intensidades dos escores para este parâmetro entre os dois grupos, indicando que o tratamento 2 foi mais eficiente (Figura 11).

#### 4.1.7 Edema palpebral

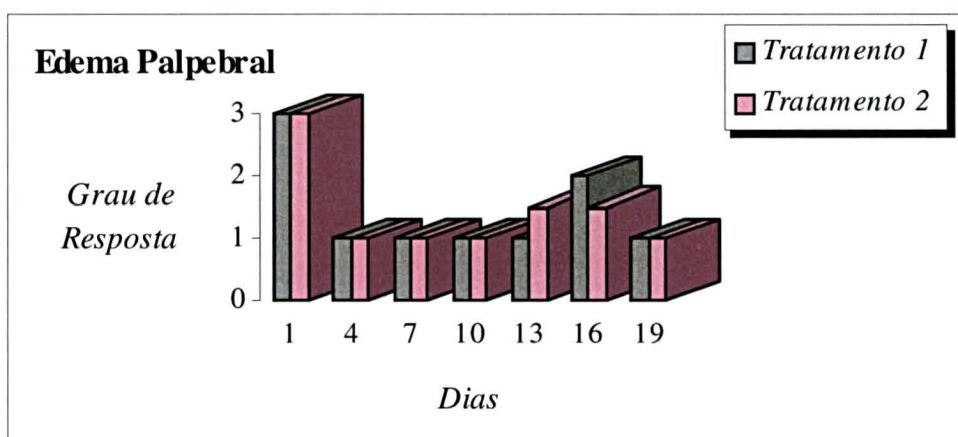
No primeiro dia predominou edema palpebral intenso na maioria dos olhos dos dois grupos, entretanto, as intensidades leve e moderada também foram constatadas em algumas coelhas e, uma redução significativa foi verificada na maioria dos olhos de ambos os grupos até o 13º dia. Do quarto ao 16º dia pós-operatório, edema de pálpebra leve e moderado foi observado nos olhos de ambos os grupos, com exceção de dois olhos, um de cada grupo, os quais permaneceram com edema palpebral intenso também no quarto dia. No 19º dia, somente edema leve foi verificado em dois olhos de cada um dos grupos. Na análise de Wilcoxon, realizada para a intensidade dos escores, observou-se somente uma tendência do tratamento 2 ser mais eficiente que o tratamento 1 (Figura 12).

FIGURA 11 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA RETENÇÃO DE FLUORESCÉINA NOS OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



Teste de Wilcoxon ( $p=0,0005$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 28º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: tênue; grau 2: leve; grau 3: moderada; grau 4: intenso.

FIGURA 12 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDROITINA A E TOBRAMICINA (T1), NO EDEMA PALPEBRAL DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



Teste de Wilcoxon ( $p=0,08$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 19º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: leve; grau 2: moderado; grau 3: intenso.

#### 4.1.8 Fotofobia e Blefarospasmo

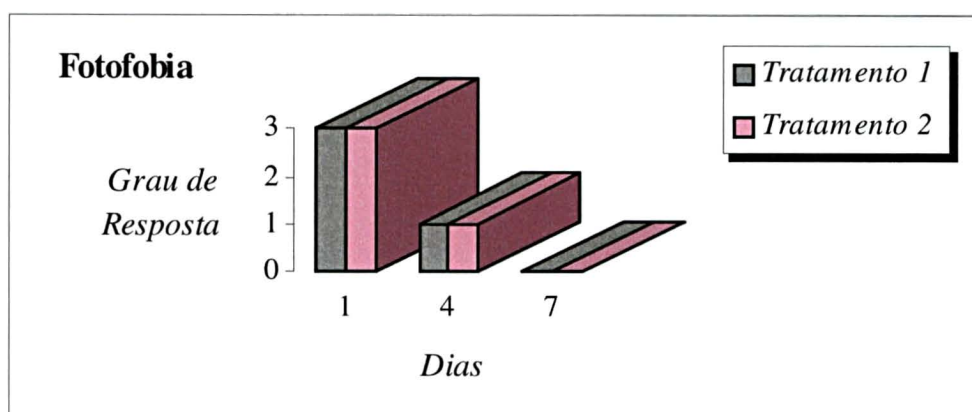
No primeiro dia, blefarospasmo e fotofobia moderados e, principalmente, intensos, foram observados nos olhos dos dois grupos. No quarto e último dia de constatação destes sinais clínicos, os mesmos foram verificados nas intensidades leve, na maioria dos olhos dos dois grupos e, moderado em dois olhos do grupo tratamento 2 e cinco do tratamento 1. Para a intensidade dos escores destes sinais clínicos, a análise de Wilcoxon não revelou diferenças estatísticas (Figuras 13 e 14), indicando igualdade entre os dois tratamentos.

#### 4.1.9 Complicações e Sequelas

A ocorrência de descemetocelose foi observada no 13º e 16º dia pós-operatório, sendo em três olhos tratamento 1 e um tratamento 2 e, dois olhos tratamento 1, respectivamente. Totalizando, cinco olhos do grupo tratamento 1 apresentaram descemetocelose (28%) comparando-se a somente uma nos olhos do grupo tratamento 2 (5,55%). Outras seqüelas, constatadas em seis coelhas, foram: *phthisis bulbi* em dois olhos, um do grupo tratamento 2 (5,55%) e um do tratamento 1 (5,55%), verificados no 19º dia de tratamento; sinéquia anterior em quatro olhos do grupo tratamento 1 (22,2%) e dois olhos do grupo tratamento 2 (11,1%); cegueira foi percebida em um animal, sendo em um olho do tratamento 1 (5,55%) e um do grupo tratamento 2 (5,55%). Leucoma foi constatado em todas as coelhas, abrangendo 100% dos olhos de ambos os grupos (Figuras 15 e 16), seguindo-se a classificação de SLATTER (2001).

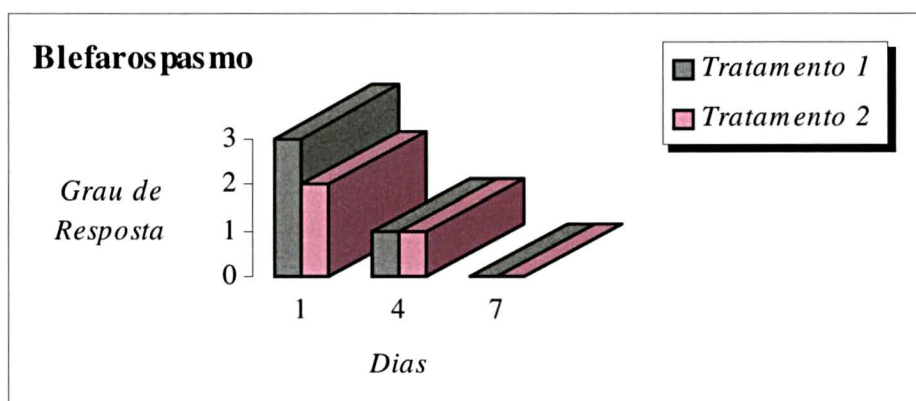
A variação do tempo total de cicatrização dos olhos dos grupos tratamento 1 e tratamento 2, assim como os respectivos valores das medianas, primeiros e segundos quartis são apresentados na Tabela 1. Na análise estatística para esta variável, constatou-se diferença estatística significativa entre os tratamentos, mostrando que o tratamento convencional com colírio de tobramicina 0,3% (T2) foi mais eficaz quanto a redução do tempo de cicatrização ( $p=0.0025$ ) que o tratamento testado com associação de sulfato de condroitina 10% e tobramicina (T1).

FIGURA 13 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NA FOTOFOBIA DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



Teste de Wilcoxon ( $p=0,46$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 4º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: leve; grau 2: moderado; grau 3: intenso.

FIGURA 14 - EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS, UM CONVENCIONAL COM TOBRAMICINA (T2) E UM NOVO COM ASSOCIAÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA A E TOBRAMICINA (T1), NO BLEFAROSPASMO DE OLHOS DE DEZOITO COELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *P. aeruginosa*.



Teste de Wilcoxon ( $p=0,31$ ) para comparação entre T1 e T2, do 1º ao 4º dia pós-operatório. Grau 0: ausência de sinal clínico; grau 1: leve; grau 2: moderado; grau 3: intenso.

TABELA 1 – EFEITO DE DOIS DIFERENTES TRATAMENTOS (T1 E T2) NO TEMPO DE CICATRIZAÇÃO DE CÓRNEAS DE DEZOITO COELHAS INFECTADAS COM *P. aeruginosa*. VALORES DAS MEDIANAS, VARIAÇÃO INTERQUARTIL E AMPLITUDE DE VARIAÇÃO PARA A VARIÁVEL NOS DOIS TRATAMENTOS. TESTE DE WILCOXON PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS.

<i>Variável Tempo de Cicatrização (dias)</i>		
<b>Grupos</b>	<b>Tratamento 1</b>	<b>Tratamento 2</b>
Medianas	26,5	22
Varição Interquartil	22,7 - 31	19,7 - 25
Amplitude de Variação	30	21

\*Teste de Wilcoxon (p= 0,0025)

FIGURA 15 – IMAGEM DE CERATITE ULCERATIVA POR *P. aeruginosa* NO OLHO ESQUERDO, GRUPO TRATAMENTO 1, DE COELHA ADULTA, NO 25º DIA PÓS-TRATAMENTO. LEUCOMA DENSO APÓS A CICATRIZAÇÃO (SETA).



FIGURA 16 – IMAGEM DA CERATITE ULCERATIVA POR *P. aeruginosa* NO OLHO DIREITO, GRUPO TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, NO 22º DIA PÓS-OPERATÓRIO. LEUCOMA MENOS DENSO APÓS CICATRIZAÇÃO (SETA).

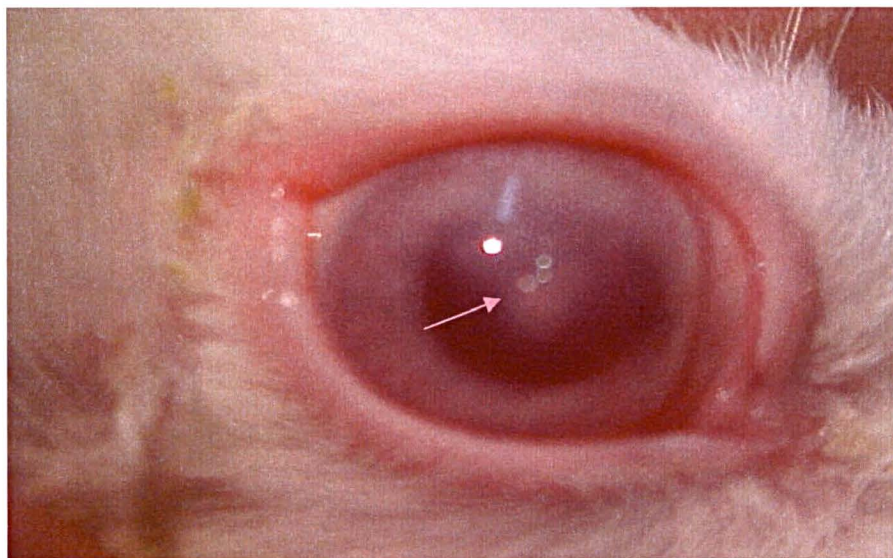
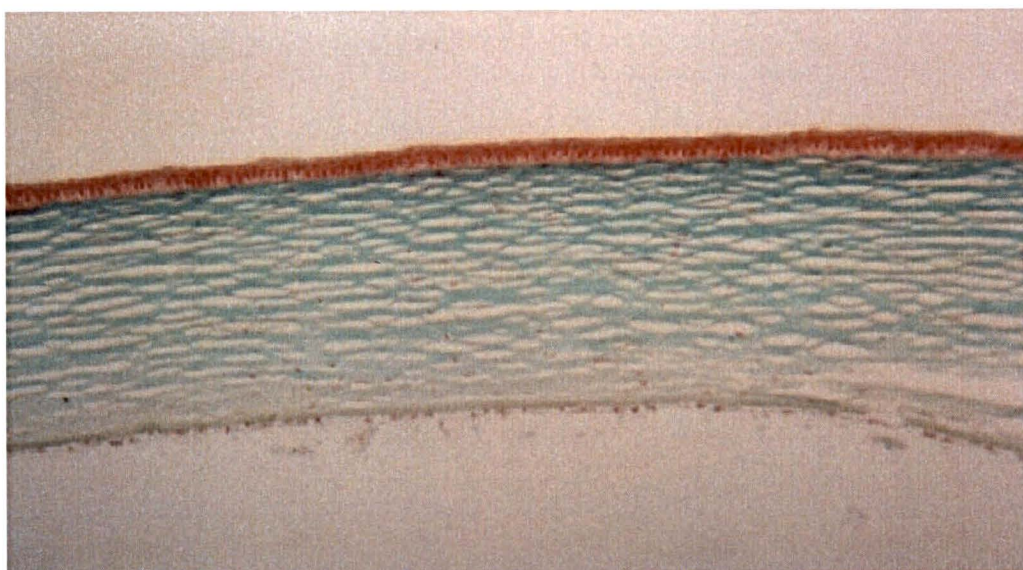


FIGURA 17 – CORTE SAGITAL DE Córnea NORMAL DE COELHA DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA ADULTA. COLORAÇÃO DE SHORR. 10X.



## 4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

### 4.2.1 Catorze dias

Em dois olhos do grupo tratamento 1 observou-se área com perda epitelial, cujo epitélio adjacente era composto por uma a duas camadas de células alares, sendo algumas delas vacuolizadas. Na área ulcerada existia edema e infiltração linfoplasmocitária e neutrofílica, neoformação vascular com endotélio jovem e fibroblastos. Nos demais olhos, dois do grupo tratamento 1 e quatro do tratamento 2, o epitélio apresentava-se íntegro e composto por uma camada de células epiteliais basais e uma a duas camadas de células alares e superficiais escamosas. O endotélio dos vasos neoformados era maduro. Fibroplasia evidente foi observada em três olhos, dois do grupo tratamento 2 e um do tratamento 1 (Figuras 18 e 19).

### 4.2.2 Vinte e um dias

Em todos os olhos dos grupos tratamento 1 e tratamento 2, verificou-se integridade do epitélio, composto por uma camada de células epiteliais basais e duas a três camadas de células alares. Ainda, em dois olhos do grupo tratamento 1 e um do grupo tratamento 2, duas a três camadas de células superficiais escamosas estavam presentes. Em dois olhos do grupo tratamento 1 e três do grupo tratamento 2 havia infiltração linfoplasmocitária com raros neutrófilos presentes no estroma, na região subepitelial difusa ou no estroma médio (Figuras 20 e 21). Nas áreas com fibroplasia, em dois olhos de cada grupo, tratamento 1 e tratamento 2, observou-se organização das fibras colágenas e poucos vasos neoformados com endotélio maduro.

### 4.2.3 Quarenta e cinco dias

O epitélio corneano dos olhos de ambos os grupos era composto por uma camada de células epiteliais basais, duas a três camadas de células alares e, duas a três camadas de células superficiais escamosas (Figuras 22 e 23). Em um olho do grupo tratamento 2 persistia fibroplasia estromal e, em um olho do tratamento 1 persistia infiltração linfoplasmocitária e neutrofílica e, em outro do mesmo grupo, havia hiperplasia epitelial focal com área de fibroplasia adjacente e sinéquia anterior, sendo que ambos apresentavam retração da membrana de descemet.

FIGURA 18 - CORTE SAGITAL DE OLHO DIREITO, TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, AOS 14 DIAS. NA IMAGEM, EPITÉLIO COMPOSTO POR UMA CAMADA DE CÉLULAS EPITELIAIS BASAIS E, DUAS A TRÊS CAMADAS DE CÉLULAS SUPERFICIAIS ESCAMOSAS. ÁREA COM FIBROPLASIA (SETA) E FIBRAS COLÁGENAS ADJACENTES NORMAIS. SHORR. 40X.

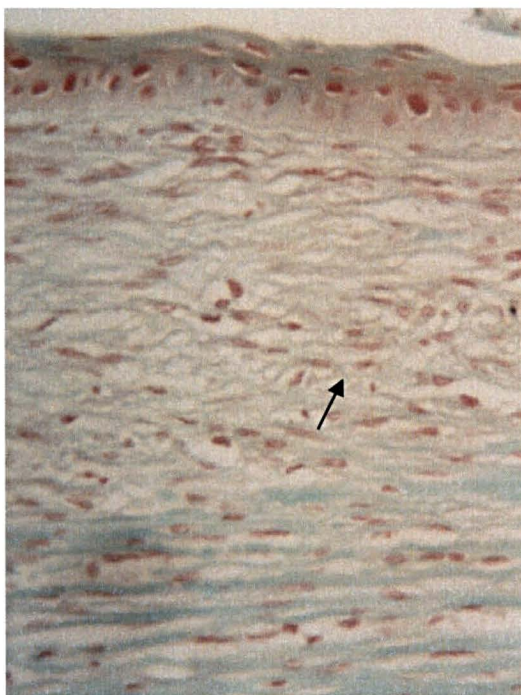


FIGURA 19 - CORTE SAGITAL DE OLHO ESQUERDO, TRATAMENTO 1, DE COELHA ADULTA, AOS 14 DIAS. EPITÉLIO COMPOSTO POR UMA CAMADA DE CÉLULAS EPITELIAIS BASAIS E, DUAS A TRÊS CAMADAS DE CÉLULAS SUPERFICIAIS ESCAMOSAS. ÁREA COM FIBROPLASIA (SETA) E FIBRAS COLÁGENAS ADJACENTES NORMAIS. SHORR. 40X.

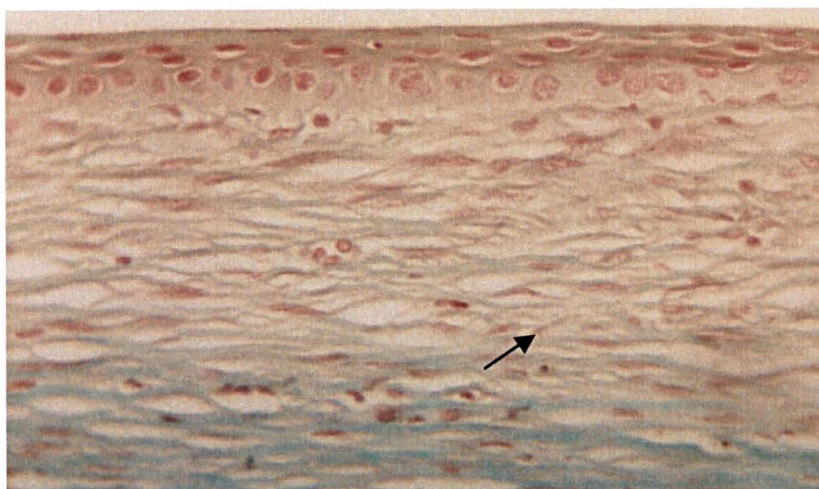


FIGURA 20 - CORTE SAGITAL DE OLHO ESQUERDO, TRATAMENTO 1, COELHA ADULTA, AOS 21 DIAS DE TRATAMENTO. EPITÉLIO E FIBRAS COLÁGENAS DO ESTROMA NORMAIS E PRESENÇA DE INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA ESCASSA NO ESTROMA DA CÓRNEA. SHORR. 10X.

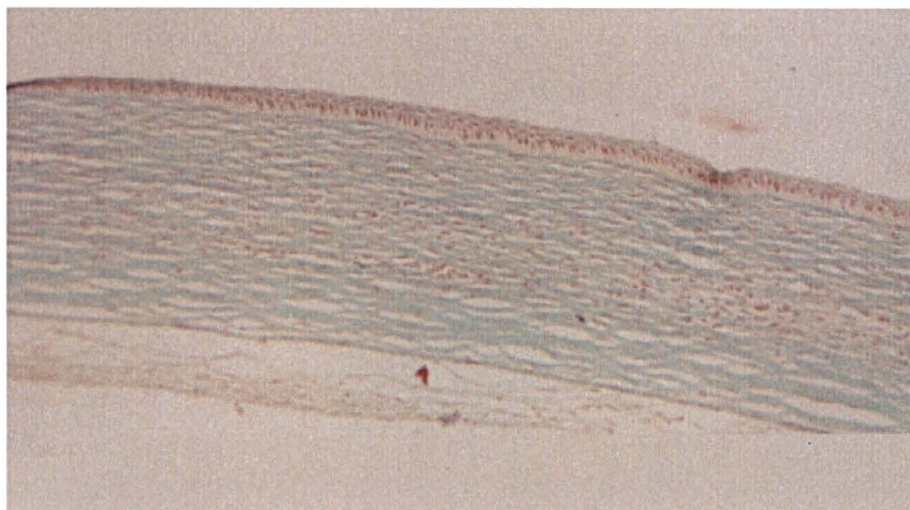


FIGURA 21 – CORTE SAGITAL DE OLHO DIREITO, TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, AOS 21 DIAS DE TRATAMENTO. IMAGEM DO EPITÉLIO CORNEANO NORMAL E, NO ESTROMA, ÁREA DE FIBROPLASIA (SETA) E FIBRAS COLÁGENAS ADJACENTES NORMAIS COM INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA. SHORR. 10X.

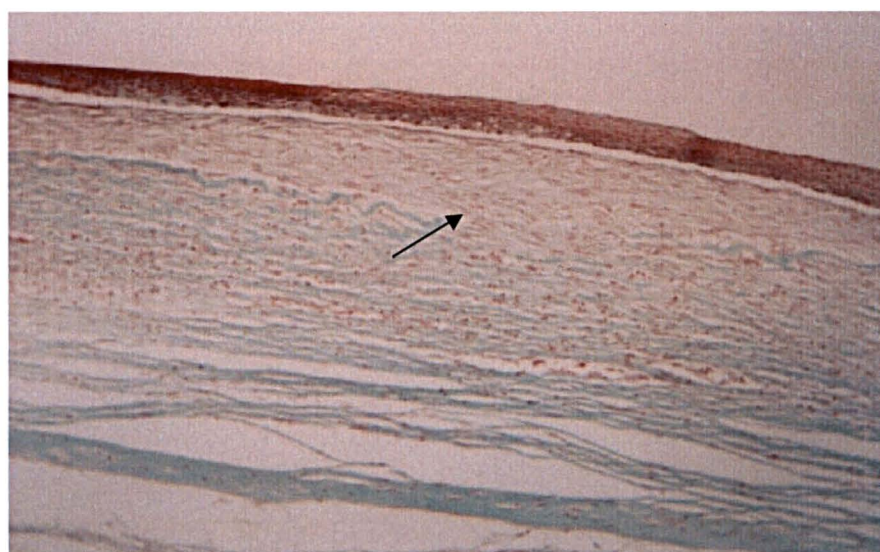


FIGURA 22 - CORTE SAGITAL DE OLHO ESQUERDO, TRATAMENTO 1, COELHA ADULTA, AOS 45 DIAS DE TRATAMENTO. IMAGEM DO EPITÉLIO E ESTROMA CORNEANOS NORMAIS. HEMATOXILINA/EOSINA. 40X.

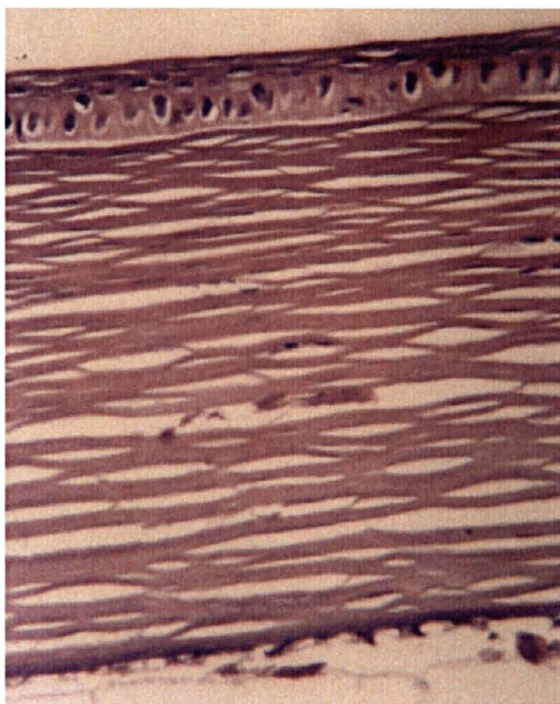
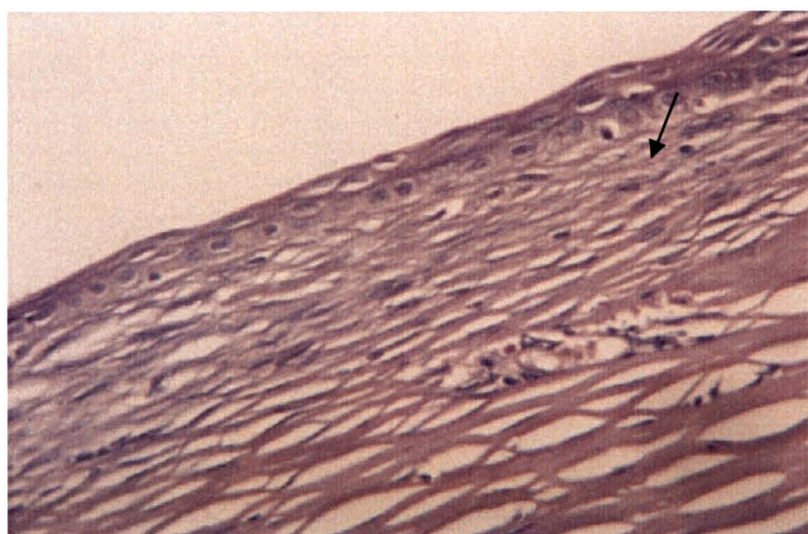


FIGURA 23 - CORTE SAGITAL DE OLHO DIREITO, TRATAMENTO 2, COELHA ADULTA, AOS 45 DIAS DE TRATAMENTO. IMAGEM DO EPITÉLIO CORNEANO COM UMA CAMADA DE CÉLULAS EPITELIAIS BASAIS E, UMA A DUAS CAMADAS DE CÉLULAS SUPERFICIAIS ESCAMOSAS. ÁREA DE FIBROPLASIA (SETA) E ESTROMA ADJACENTE NORMAL. HEMATOXILINA/EOSINA. 40X.



## 5 DISCUSSÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* causa um tipo de ceratite infecciosa de evolução rápida e fulminante, podendo resultar em perfuração da córnea em 48 horas e em importantes prejuízos à acuidade visual em seres humanos e cavalos, mesmo sob terapia adequada (BARNETT et al., 1995; Laibson *apud* GUPTA et al., 1996; KANSKI, 2000; SAUER et al., 2003). Por esta razão, há aproximadamente quatro décadas, o modelo experimental desta ceratite bacteriana, produzido através da injeção intraestromal em coelhos, ratos e porcos-da-índia, foi introduzido na pesquisa e, a partir de então, vem sendo utilizado para o estudo desta afecção ocular em seres humanos. A consolidação deste modelo e o desenvolvimento, pelo coelho, de uma lesão corneana semelhante àquela observada em cavalos e seres humanos, com necrose estromal liquefativa (KESSLER et al., 1977; VAN HORN et al., 1981; HYNDIUK et al., 1983; BARNETT et al., 1995; KANSKI, 2000; MATSUMOTO, 2000), associado a fácil disponibilidade, ao manuseio deste animal e a sua conveniência como animal de laboratório (PRIMBS et al., 1961), levou-nos a sua escolha como modelo animal para esta experimentação. Embora este modelo não represente as reais condições em que a infecção ocorre nestas espécies (PRIMBS et al., 1961) porque aborta duas importantes fases do processo infeccioso, a adesão e a penetração bacteriana (O'CALLAGHAN et al., 1996), o mesmo revelou-se um modelo experimental fiel à lesão observada em cavalos.

A associação das duas técnicas, ceratectomia prévia e subsequente injeção intraestromal da suspensão bacteriana de *P. aeruginosa*, para a produção das úlceras corneanas nas coelhas, foi utilizada com intuito de avaliar os efeitos do sulfato de condroitina A 10% sobre a cicatrização da córnea após um grande desafio, promovido pela interação das duas técnicas, é de mimetizar a lesão corneana provocada pela *Pseudomonas aeruginosa* na córnea dos cavalos, uma vez que nestes animais, a mesma parece manifestar-se de forma mais agressiva, devido a uma sensibilidade possivelmente maior da córnea à ação das enzimas líticas liberadas durante a infecção (BARNETT et al., 1995).

Durante o procedimento de injeção intraestromal, percebeu-se como dificuldades, evitar-se o refluxo do inóculo e assegurar o volume do mesmo injetado no estroma, conforme proposto neste estudo. Isto corrobora os achados de PRIMBS et al. (1961) e NASSARALLA et al. (1997),

os quais também verificaram a dificuldade de controlar precisamente a inoculação intraestromal neste mesmo modelo e, ainda, que variações na técnica podem grandemente influenciar na infecção produzida.

As várias concentrações bacterianas de inóculo que têm sido utilizadas, normalmente são preparadas em caldo de soja *trypticase* (TSB), permitindo que a bactéria continue sua multiplicação, denominada como fase logarítmica de crescimento (HOB DEN et al., 1993b; O'CALLAGHAN et al., 1996; NASSARALLA et al., 1997; DONG et al., 2000; MATSUMOTO, 2000). Entretanto, no presente estudo, realizou-se a preparação dos inóculos em solução NaCl 0,9% estéril por acreditar-se que, deixando a bactéria em uma fase de crescimento estacionado, haveria uma maior precisão da quantidade de bactérias a ser inoculada, mesmo com alguma morte bacteriana. Conforme verificado após a inoculação da bactéria, a lesão produzida apresentou sinais e evolução clínicos oftalmológicos homogêneos.

O isolamento da *Pseudomonas aeruginosa* conseguido somente a partir das amostras obtidas dos raspados corneanos, verificados neste estudo, vem confirmar que quando necessita-se realizar o diagnóstico de uma ceratite infecciosa, a cultura para isolamento e identificação do agente causal deve ser feita a partir de amostras colhidas do tecido corneano, por meio de raspados.

Variações na intensidade dos sinais clínicos podem ser verificadas em alguns animais. Isto decorre ou da concentração bacteriana do inóculo (DAVIS et al., 1975) ou da ceratopatogenicidade da *P. aeruginosa*, a qual depende da virulência intrínseca de cada cepa e pode afetar a severidade da lesão corneana (HYNDIUK et al., 1983; HOB DEN et al., 1993; ARISTOTELI & WILLCOX, 2001). A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, utilizada neste estudo, é capaz de produzir protease alcalina, elastase e exotoxina A (O'CALLAGHAN et al., 1996), enzimas que colaboram com as proteases teciduais, direta ou indiretamente, na destruição do tecido corneano, conforme pôde ser observado pela intensidade dos escores obtidos para opacidade corneana da lesão apresentada pelas coelhas deste estudo. Considera-se ainda que a severidade das ulcerações resulte também da resposta inflamatória do hospedeiro, conforme citado por vários autores (VAN HORN et al., 1981; DONG et al., 2000; MIYAJIMA et al., 2001; VYGANTAS & WHITLEY, 2003; HAZLETT, 2004). Esta resposta poderia explicar por que algumas coelhas do grupo de avaliações clínicas apresentaram escores

menos intensos para os sinais clínicos, especialmente opacidade corneana, do que outras. Além disso, não se testou a imunidade dos animais para *P. aeruginosa*, fator que também deve ser considerado, uma vez que, conforme demonstrado em alguns estudos, ratos imunizados contra *P. aeruginosa* apresentaram lesões menos severas quando comparados com ratos susceptíveis (DONG et al., 2000; HAZLETT et al., 2002).

A ectasia corneana típica decorrente da infecção por *Pseudomonas aeruginosa* não foi observada nos animais desta pesquisa, provavelmente devido ao início precoce do tratamento dos olhos, o que correspondeu as 24 horas seguintes à inoculação, pois, segundo VAN HORN et al. (1981), esta alteração é tipicamente verificada no período de 56-96 horas da progressão da lesão. Entretanto, os sinais clínicos observados nas 24 horas seguintes à inoculação experimental foram compatíveis com a infecção corneana por *Pseudomonas aeruginosa*, concordando com VAN HORN et al. (1981) e NASSARALLA et al. (1997).

O aumento da intensidade dos escores para opacidade corneana e neovascularização da córnea e o escore severo mantido para hiperemia conjuntival, verificado no quarto dia pós-operatório nos olhos de ambos os grupos, provavelmente, seja resultado da reação inflamatória e da ação das enzimas líticas liberadas pela *P. aeruginosa*, por células epiteliais, fibroblastos estromais e polimorfonucleares leucócitos degranulados (VAN HORN et al., 1981; HYNDIUK et al., 1983). Entretanto, a metodologia utilizada neste estudo não permitiu a determinação das enzimas presentes, apenas sabe-se da literatura quais estão envolvidas nesta afecção ocular e que a cepa ATCC-27853, utilizada neste estudo, é capaz de produzir protease alcalina, elastase e exotoxina A (O'CALLAGHAN et al., 1996), que devem ter atuado juntamente na destruição da córnea destas coelhas.

Os sinais clínicos, observados em quase todas as coelhas nas 24 horas após infecção, como opacidade corneana moderada, blefarospasmo, fotofobia, secreção conjuntival mucopurulenta e hiperemia conjuntival, concordam com os citados na literatura (DAVIDSON, 1991; BARNETT et al., 1995). A redução da secreção conjuntival, hiperemia conjuntival, opacidade corneana e neovascularização da córnea, e o menor tempo de cicatrização, verificados primeiramente nos olhos do grupo tratamento 2 comparados aos do grupo tratamento 1, pode ser resultado de um prévio controle da infecção bacteriana nos olhos do primeiro grupo, resultado da maior frequência de instilações do colírio, comparada ao grupo tratamento 1, que será discutida

posteriormente. Somado a isto, segundo alguns autores (NASISSE & NELMS, 1992; ENGEL et al., 1998; NAGANO et al., 2001), mesmo após a morte bacteriana mediante antibioticoterapia apropriada, a ação bacteriana e das proteases já ativadas e, em consequência, a degradação do colágeno podem persistir, resultando em importante perda tecidual (NASISSE & NELMS, 1992; ENGEL et al., 1998; NAGANO et al., 2001). É possível que a menor frequência de instilações de colírio nos olhos do grupo tratamento 1 tenha permitido um maior tempo de ação das metalo e serinoproteases, em virtude de uma esterilização corneana mais tardia e, por isso, a redução dos sinais clínicos tenha ocorrido mais lentamente, assim como o tempo de cicatrização tenha sido mais prolongado.

Os escores mais intensos para a retenção de fluoresceína, conforme obtido nos olhos do grupo tratamento 1 são, provavelmente, resultado do contraste do corante com uma córnea severamente mais opacificada, já que, segundo NASISSE & NELMS (1992), córneas extremamente edemaciadas podem tornar-se incapazes de absorver fluido adicional (a fluoresceína, por exemplo), resultando em retenção falso-negativa.

A fotofobia e o blefarospasmo são resultado da dor ocular ocasionada pela lesão e infecção bacteriana da córnea e foram observados somente até o quarto dia pós-operatório e, provavelmente, isso ocorreu devido a dois fatores: o uso da dipirona, administrada às coelhas até o segundo dia de tratamento, e a evolução do processo infeccioso na córnea, pois uma vez que as terminações nervosas subepiteliais são destruídas, com a progressão da ulceração, os sinais de dor ocular também são reduzidos (BARNETT et al., 1995).

A quemose também é citada como um dos sinais clínicos presentes nesta afecção ocular (DAVIDSON, 1991; BARNETT et al., 1995), entretanto, os escores mais intensos, conforme observados na grande maioria das coelhas 24 horas após a cirurgia, são provavelmente resultado do traumatismo decorrente da utilização da pinça de Von Graeffe, na conjuntiva bulbar para a contenção do bulbo ocular e realização dos procedimentos de trefinação e injeção intraestromal. Apesar da delicadeza da pinça utilizada, a conjuntiva bulbar dos coelhos é muito sensível, e sujeita facilmente a rompimento em caso de leve aumento na intensidade da apreensão. A quemose desapareceu na maioria dos olhos, igualmente nos grupos tratamento 1 e tratamento 2 no sétimo dia, semelhante ao obtido no estudo de NASSARALLA et al. (1997), no qual este sinal clínico não foi mais observado no oitavo dia. Entretanto, dois animais desta pesquisa ainda

permaneceram com quemose leve até o 22º dia, a qual provavelmente acompanhou uma evolução mais lenta do processo cicatricial nestes dois animais, ocorrido somente após o 25º dia de tratamento.

O edema palpebral apresentou-se com menores escores ao longo dos tratamentos nos olhos de ambos os grupos, com uma redução mais significativa até o 13º dia pós-operatório, diferentemente do observado por NASSARALLA et al. (1997), os quais verificaram o desaparecimento deste sinal no oitavo dia e sem diferenças quanto aos colírios de antibiótico associado ou não ao diclofenaco de sódio, o que também foi visto entre as medicações utilizadas neste estudo. O edema palpebral verificado em dois olhos de cada um dos grupos até o 19º dia de tratamento pode ter sido consequência de contaminação bacteriana advinda das patas das coelhas pela auto-higienização, resultando em blefarite e uma resolução mais tardia do edema.

A infiltração celular inflamatória é uma importante resposta da córnea nesta infecção bacteriana, conforme citado (KESSLER et al., 1977; VAN HORN et al., 1981; HYNDIUK et al., 1983; NASSARALA et al., 1997; MIYAJIMA et al., 2001). Juntamente com o edema, a infiltração celular produz opacidade corneana, a qual torna-se mais intensa com a progressão da lesão (KESSLER et al., 1977; HYNDIUK et al., 1983). Entretanto, ela não foi utilizada como parâmetro de avaliação clínica principalmente por falta de equipamento, no caso, o biomicroscópio em lâmpada de fenda, e por não ser sugerido na referência utilizada para a avaliação dos sinais clínicos (MUNGER, 2002).

A neovascularização corneana foi observada a partir do quarto dia pós-operatório, concordando com BANKS (1992) e discordando do observado por BARNETT et al. (1995) em cavalos, nos quais a mesma parece ser observada em 12-18 horas após a infecção, e por WYAMAN et al. (1983) que verificou neovascularização em 48 horas. É possível que neste último período, a neovascularização já estivesse presente na córnea das coelhas deste experimento, no entanto, realizando-se as avaliações clínicas conforme o previsto, estas foram feitas no primeiro e quarto dias de tratamento e, por isso os neovasos só foram constatados após 96 horas. E, considerando-se o padrão dos neovasos observados nas córneas das coelhas, o mesmo pôde ser evidenciado, na maioria dos animais, como uma borda perilimbal de neovascularização profunda (BARNETT et al., 1995). A redução nos escores, visualizada primeiramente no grupo tratamento 2, deve-se ao controle da infecção, previamente ocorrido

neste grupo, o que favoreceu a resolução do processo de cicatrização e redução na neovascularização.

A descemetocelose é uma complicação que pode resultar da ceratite bacteriana por *P. aeruginosa* (NASSARALLA et al., 1997). Nos modelos experimentais realizados com cães, coelhos e porcos-da-índia, a descemetocelose foi observada em 48 horas (WYMAN et al., 1983), no terceiro dia (NASSARALLA et al., 1997) e na segunda semana, após a infecção (KESSLER et al., 1977). No presente estudo, obteve-se resultado semelhante ao deste último autor, pois verificou-se descemetocelose nos olhos dos dois grupos no 16º e 19º dia de tratamento. Uma vez que a evolução da cicatrização era aparente nestes olhos, acredita-se que a descemetocelose possa ter resultado da pequena frequência de instilações, especialmente nos olhos do grupo tratamento 1.

Diferentemente do observado em vários estudos com infecção experimental em porcos-da-índia e coelhos (KESSLER et al., 1977; VAN HORN et al., 1981) e concordando com os resultados obtidos por NASSARALLA et al. (1997), em todos os animais, a perfuração corneana não foi observada em nenhum dos animais deste estudo, nem mesmo nos que apresentaram descemetocelose.

A uveíte anterior é uma complicação comum deste tipo de ceratite e pode resultar da estimulação nervosa reflexa e/ou da quebra na barreira hemato-aquosa, permitindo a ocorrência de efeito *tyndall* ou *aquous flare* ou mesmo formação de hipópio (NASISSE & NELMS, 1992; HAMOR & WHELAN, 1999; SLATTER, 2001). Estes parâmetros, no entanto, também não foram utilizados como critérios de avaliação clínica pela dificuldade de avaliação a partir do quarto dia de pós-operatório, em virtude de uma opacidade corneana severa na maioria das coelhas, evitando-se assim que fosse realizada uma avaliação confiável deste efeito durante todo o período de sua existência. Mas, devido às sinéquias anteriores constatadas nos olhos dos grupos tratamento 1 e tratamento 2, conclui-se que alguns animais desenvolveram uveíte anterior secundária.

Sinéquias anteriores são resultado da inflamação uveal não tratada e da não utilização de agentes midriáticos. Como se sabe, o colírio de antibiótico não possui ação antiinflamatória para controle desta complicação e, mesmo considerando a ação antiinflamatória (PIPITONE, 1991;

CASALS & DAMBIELLE, 1995; DAVIDSON, 2000) do colírio de sulfato de condroitina 10%, associado ao antibiótico, é provável que esta capacidade antiinflamatória não tenha sido suficiente para controle adequado da inflamação e, além disso, também não foi feito uso de agentes midriáticos e cicloplégicos. Nos estudos realizados, utilizando-se sulfato de condroitina 20%, associado à ciprofloxacina, no tratamento de úlceras corneanas superficiais experimentais em coelhos e cavalos, a ação antiinflamatória tópica não pode ser avaliada devido a estas lesões serem muito superficiais e resultarem em inflamação muito leve (ZULIAN, 2002; RANZANI et al., 2004). Diferentemente destes experimentos, a afecção ocular induzida no presente trabalho resultou em reação inflamatória intensa, no entanto, não se observou diferença significativa quanto à redução do edema de pálpebra, quemose, fotofobia e blefarospasmo entre os grupos tratamento 2 e tratamento 1. Portanto, a ação antiinflamatória verificada no tratamento de osteoartrites com sulfato de condroitina pela via sistêmica (MORREALE et al., 1996), não foi constatada pela via tópica. Isto pode estar associado à redução na concentração do sulfato de condroitina associado à tobramicina, necessária para a estabilização da associação destas medicações (comunicação pessoal – A. F. P. F. WOUK, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR) e na menor frequência de instilações utilizada, que será discutida mais adiante. Além disso, como não se observou efeito antiinflamatório do sulfato de condroitina durante o tratamento, concordando com RANZANI et al. (2004), na presença de uveíte anterior secundária, o uso concomitante de agentes antiinflamatórios não esteroidais, midriáticos e cicloplégicos pode minimizar complicações e seqüelas observadas em algumas coelhas deste estudo e controlar a inflamação e a dor ocular.

Mesmo com uma frequência mínima de instilações do colírio tratamento 1, a *phthisis bulbi*, as sinéquias anteriores e a evolução cicatricial observadas, durante o experimento, foram similares para ambos os grupos, o que pode ter resultado da associação dos efeitos antimicrobiano da tobramicina com o efeito inibidor da serinoprotease elastase neutrofílica pelo sulfato de condroitina 10% (Verbruggen *apud* RASHMIR-RAVEN, 1994), conforme verificado nas osteoartrites, e para os glicosaminoglicanos polissulfatados (BAICI et al. 1980). Também pode-se pensar na possível inibição de outra serinoprotease, a plasmina que, juntamente com o plasminogênio, forma uma via proteolítica de degradação de fibrina e fibronectina (BERMAN et al., 1983; BERK, 2001), as quais depositam-se sobre o estroma lesado, formando uma matriz

provisória para a adesão celular e cicatrização (FUJIKAWA et al., 1981; PHAN et al., 1989b; WOUK et al., 1998). A via proteolítica, quando em desequilíbrio com seus inibidores, contribui para a destruição do tecido corneano, conforme verificado em estudos (BERMAN et al., 1980; MATSUMOTO, 2000; HAFFNER et al., 2003). Entretanto, mediante a metodologia utilizada neste estudo, isto não pôde ser constatado.

A *phthisis bulbi* pode ocorrer como seqüela de oftalmite, decorrente de ulceração corneana e perfuração ocular (CARLTON & RENDER, 1990). No presente estudo, a *phthisis bulbi* foi constatada em duas coelhas, em um olho de cada um dos grupos, e provavelmente tenha resultado da inflamação ocular não debelada, pois nenhum destes olhos apresentaram descemetocelose. A porcentagem verificada, 5,55% dos olhos em cada um dos grupos, foi semelhante à verificada por SWEENEY & IRBY (1996), em cavalos com úlcera de córnea por *P. aeruginosa*, em torno de 4%.

Conforme indicado na literatura consultada, a freqüência de instilações do colírio antibiótico para o tratamento das úlceras corneanas, infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* em cavalos é a cada 1-2 horas no primeiro ou até o segundo dias, quando a mesma é reduzida para 4-5 vezes ao dia (MOORE, 1987; NASISSE & NELMS, 1992; HAMOR & WHELAN, 1999). Nesta pesquisa, entretanto, optou-se pela utilização da posologia mínima indicada, a fim de submeter a medicação testada a um desafio maior e, de acordo com o verificado nas coelhas, esta menor freqüência influenciou grandemente na evolução dos sinais clínicos dos olhos do grupo tratamento 1. Portanto, é possível que um aumento na posologia da instilação do colírio com sulfato de condroitina, associado à tobramicina, produza melhores resultados, considerando-se ainda que a infecção natural é menos severa quando comparada a da infecção experimental (HYNDIUK et al., 1983).

Uma outra complicação que pode resultar da infecção bacteriana da córnea por *P. aeruginosa* é a formação de cicatriz densa e exuberante, a ponto de causar danos à acuidade visual em cavalos (SAUER et al., 2003) e em seres humanos (Laibson *apud* GUPTA et al., 1996). No presente estudo, a cicatriz, na forma de leucoma, foi observada em todas as coelhas, concordando com o obtido por KESSLER et al. (1977), em intensidades variáveis entre os olhos dos grupos tratamento 1 e tratamento 2. Em alguns olhos do grupo tratamento 1, verificou-se ainda uma cicatriz exuberante, com deposição de tecido de granulação. Diferentemente do

observado na cicatrização de úlceras corneanas superficiais em coelhos (RANZANI et al., 2004) e cavalos (ZULIAN, 2002), nos quais não se verificou a ocorrência de cicatriz, nesta pesquisa constatou-se a formação de leucoma ao final do tratamento de todos os olhos dos grupos tratamento 2 e tratamento 1. Um outro fator que pode ter influenciado no resultado da cicatriz foi a concentração do sulfato de condroitina associado à tobramicina, ou seja, metade daquela utilizada nos estudos feitos por RANZANI et al. (2004) e ZULIAN (2002). Conforme verificado na literatura, o sulfato de condroitina é o glicosaminoglicano predominantemente sintetizado na segunda semana de cicatrização das lesões corneanas e após quatro meses, níveis de sulfato de queratana já são detectados e vão gradualmente substituindo o sulfato de condroitina (HASSEL et al., 1983). Uma vez que o glicosaminoglicano sulfato de condroitina foi provido na forma de colírio, a sua síntese pelos fibroblastos pode ter sido cessada e a concentração utilizada pode não ter fornecido suficiente quantidade para uma melhor qualidade cicatricial, conforme observado em avaliação histopatológica (RANZANI et al., 2004). Ainda, o fato das feridas superficiais e sem comprometimento da membrana basal evoluírem sem formação de cicatriz, somado aos efeitos do sulfato de condroitina podem produzir melhores resultados conforme observados em cavalos e coelhos.

Um fator que poderia ser considerado para explicar a variação no tempo de cicatrização nos olhos das coelhas do grupo de avaliações clínicas é a flutuação hormonal. Entretanto, conforme verificado na literatura, a atividade ovariana das coelhas diminui nos dias curtos, resultando em uma queda na atividade sexual com a proximidade dos meses de inverno (HARKNESS & WAGNER, 1993). Como os procedimentos e as avaliações clínicas nesse grupo foram conduzidas nos meses de inverno, é improvável que tenham ocorrido flutuações hormonais. Somado a isso, o tecido corneano é efetivamente tratado somente quando do uso de medicações pela via tópica, pois os medicamentos utilizados pela via sistêmica não conseguem atingir o tecido corneano ou quando o fazem, não atingem níveis terapêuticos.

Quanto a histopatologia, um aspecto que chamou atenção nos olhos dos animais utilizados foi o curso das infecções corneanas experimentais produzidas pela *P. aeruginosa*. Observou-se que, especialmente nos olhos do grupo tratamento 2, o curso da lesão foi um tanto menos severo e benigno em relação ao verificado nos olhos direitos e esquerdos dos animais utilizados para as avaliações clínicas, pois aos 14 dias, a maioria das córneas já se encontravam cicatrizadas nos

primeiros animais. Como já mencionado na literatura, é possível que isso tenha decorrido da técnica (PRIMBS et al., 1961; NASSARALLA et al., 1997) ou tenha sofrido interferência da imunidade das coelhas, uma vez que, embora os dois grupos de indivíduos tenham sido conduzidos em momentos diferentes, as condições climáticas, que poderiam influenciar nos resultados, foram muito semelhantes, conforme as anotações realizadas durante a condução dos dois grupos.

A histopatologia prestou-se muito bem ao propósito a que foi destinada, corroborando com os achados das avaliações clínicas quanto aos processos inflamatório e cicatricial e assemelhando-se aos achados em outros estudos em coelhos e cães (VAN HORN et al., 1981; WYMAN et al., 1983). Além disso, forneceu informações acerca da organização das fibras de colágeno e fibroplasia no estroma, mostrando indícios de uma melhor organização das fibras colágenas nos olhos do grupo tratamento 1 aos 21 e 45 dias. Sabe-se que, em lesões corneanas atingindo membrana basal, estroma e, em algumas vezes, membrana de descemet, a evolução normal do processo cicatricial se dá com a formação de fibroplasia estromal (WILCOCK, 1993), a qual foi observada nesta pesquisa. No entanto, um maior número de olhos para esta avaliação permitiriam uma afirmação mais precisa sobre a qualidade cicatricial, comparando-se os dois grupos.

Como escolha mais adequada, optou-se pela utilização do teste de Wilcoxon para análise estatística tanto das variáveis medidas na avaliação clínica quanto para a variável tempo de cicatrização, pois no primeiro caso, utilizou-se escalas ordinais, medidas por escores; no segundo caso, apesar de se ter uma variável cardinal, esta se comporta de modo assimétrico (CURI, 1998; MONTIANI-FERREIRA et al., 2004). Por este motivo, a média não é a melhor indicação da tendência central da amostra, uma vez que ela é grandemente influenciada por valores extremos, sendo atraída no sentido destes últimos, dando uma falsa idéia de tendência central. Conseqüentemente, utilizaram-se os primeiros e segundos quartis e as amplitudes de variação como medidas de dispersão ou variabilidade desta variável, as quais demonstraram a assimetria e a variabilidade do tempo de cicatrização observado nos olhos de ambos os grupos, mas especialmente no grupo tratamento 1. Mesmo tentando obter uma amostra homogênea, com coelhas da mesma idade, compradas do mesmo criador, e alojando-as no mesmo local, nas mesmas condições ambientais e de alimentação, estas coelhas não eram filhas dos mesmos pais e,

é possível que algumas tenham vindo de outros criadores, fatores que podem ter contribuído para esta variabilidade.

Em Medicina Veterinária, há de se considerar, no entanto, que a menor frequência de instilações é mais cômoda para a realização dos cuidados de enfermagem pelos proprietários para com seus animais, o que contribui grandemente para uma adesão facilitada dos mesmos ao tratamento destas afecções oculares. A relação custo-benefício entre cada um dos colírios utilizados também deve ser considerada, pois mesmo que o colírio de sulfato de condroitina 10% associado à tobramicina (T1) tenha um custo maior comparado ao colírio de tobramicina (T2), a menor frequência de instilações permite a utilização de um frasco por um período mais prolongado, equivalendo-se o custo das duas medicações. Por último, diferentemente do verificado em Oftalmologia humana, a ocorrência de cicatriz residual não é tão prejudicial à qualidade de vida dos animais quanto o é em seres humanos, em virtude do astigmatismo resultante, uma vez que os animais não realizam determinadas atividades que competem somente aos seres humanos, como ler e dirigir.

Uma importante questão a ser discutida ainda, diz respeito à extrapolação dos resultados obtidos no modelo experimental em coelhos para uso em cavalos. Sabe-se que, desde há muito, o coelho vem sendo utilizado como fiel modelo experimental para estudos de afecções oculares de seres humanos, devido às similaridades oculares entre estas duas espécies. Observou-se nesta pesquisa que também este modelo experimental em coelhos foi fiel às alterações oculares observadas em cavalos, uma vez que ambos desenvolvem necrose estromal liquefativa após infecção corneana pela *Pseudomonas aeruginosa* (BARNETT et al., 1995; MATSUMOTO, 2000). O que dificulta ainda a discussão é a absoluta ausência de trabalhos experimentais desta afecção ocular em cavalos, sendo encontrados somente estudos retrospectivos e relatos de caso e, por isso, a mesma foi ancorada em estudos realizados em outras espécies animais. Sendo assim e, considerando-se também que o curso da infecção experimental em coelhos é muito mais severo quando comparado à infecção natural (PRIMBS et al., 1961; HYNDIUK et al., 1983; FLEISZIG & EVANS, 2000), seria admissível pensar-se na extrapolação dos resultados obtidos em coelhos para o tratamento da afecção ocular em cavalos.

Pelo exposto acima, é necessário que novas pesquisas sejam realizadas com a utilização de uma frequência maior do colírio de sulfato de condroitina A 10% associado à tobramicina no

tratamento das úlceras corneanas infectadas por *P. aeruginosa*, já que as medicações formuladas como colírios são recomendadas para instilações freqüentes, diferente do que ocorre com as pomadas oftálmicas. Esta última poderia eventualmente permitir o uso de uma maior concentração do sulfato de condroitina A associado à tobramicina, entretanto, devido a sua interferência no metabolismo da córnea, não recomenda-se seu uso freqüente.

Além disso, é importante ressaltar que, algumas inferências feitas nesta discussão não puderam ser comprovadas com a metodologia utilizada na pesquisa, porém, as mesmas poderão futuramente ser corroboradas a partir de outros estudos com metodologias mais específicas e apropriadas. Para isto, é necessário que outros estudos sejam conduzidos a fim de obter-se uma informação mais precisa acerca do real benefício do uso do sulfato de condroitina no tratamento das úlceras corneanas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

## 6 CONCLUSÃO

Nos moldes em que a pesquisa foi conduzida, comparando-se o tratamento 1 e o tratamento 2, pôde-se concluir que:

- conforme as avaliações clínicas, o tratamento tópico à base de tobramicina (T2) foi mais eficiente que o tratamento tópico à base de sulfato de condroitina 10% associado à tobramicina (T1) no tratamento das úlceras corneanas produzidas e infectadas experimentalmente por *Pseudomonas aeruginosa* em coelhos;
- conforme os achados da histopatologia, verificaram-se indícios de uma melhor cicatrização devido à organização mais regular das fibras de colágeno aos 21 e 45 dias de pós-operatório dos olhos esquerdos, tratados com sulfato de condroitina 10% e tobramicina (T1).

Em virtude dos resultados obtidos, é necessário que estudos ulteriores histoquímicos e utilizando-se uma frequência maior de instilações do colírio de sulfato de condroitina A 10% associado à tobramicina sejam realizados para a melhor caracterização do papel do sulfato de condroitina A na cicatrização da córnea ulcerada e infectada por *Pseudomonas aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

- ABELSON, M. B., SLUGG, A. P. **Modulación de la cicatrización de las heridas corneales.** Adaptación de Review of Ophthalmology, 1999. Capturado em 07 jul. 2001. Online. Disponível na Internet <http://www.franjapubnca.../MODULACI%D3N%20DE%20LA%CICATRIZACI%D3N.html>
- AHMADI, A. J., JAKOBIEC, F. A. Corneal wound healing: citokines and extracellular matrix proteins. **International Ophthalmology Clinics. Ocular Trauma**, Hagerstown, v. 42, n. 3, p. 13-22, 2002.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. et al. Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular. **Biologia Molecular da Célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. p. 949-1009.
- ALVES, A.I.G. A vez do glicosaminoglicano. **Saúde Equina**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 13, 1998.
- ANDRADE, A. L., LAUS, J. L. Enfermidades da córnea de pequenos animais. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 3, n. 12, p. 34-39, 1998.
- ANDRESEN, J. L., LEDET, T., HAGER, H. et al. The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts. **Experimental Eye Research**, London, v. 71, n.1, p. 33-43, 2000.
- ANDREW, S.E., GELATT, K. N. Erosiones corneales persistentes en los perros. **Waltham Focus**, London, v. 11, n. 1, p. 10-15, 2001.
- ARISTOTELI, L. P., WILLCOX, M. D. P. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ocular isolates to mucin. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Berlin, v. 29, n. 3, p. 143-146, 2001.
- BACHA JR., W. J., WOOD, L. M. **Color Atlas of Veterinary Histology**. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1990.
- BAICI, A., SALGAM, P., FEHR, K. et al. Inhibition of human elastase from polymorphonuclear leucocytes by a glycosaminoglycan polysulfate (ARTEPARON). **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 29, n. 12, p. 1723-1727, 1980.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Manole. 1992.
- BARNETT, K. C., CRISPIN, S. M., LAVACH, J. D. et al. Cornea. In: **Equine Ophthalmology**. London: Mosby-Wolf. 1995. p. 98-135.
- BAZAN, H. E. P., OTTINO, P. The role of platelet-activating factor in the corneal response to injury. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 449-464, 2002.

BAZAN, H. E. P., REDDY, S. T. K., LIN, N. Platelet activating factor (PAF) accumulation correlates with injury in the cornea. **Experimental Eye Research**, London, v. 52, n. 4, p. 481-491, 1991.

BERK, R. S., KATAR, M., DONG, Z. et al. Plasminogen activators and inhibitors in the corneas of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 42, n. 7, p. 1561-1567, 2001.

BERMAN, M., LEARY, R., GAGE, J. Evidence for a role of the plasminogen activator-plasmin system in corneal ulceration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 19, n. 10, p. 1204-1221, 1980.

BERMAN, M., WINTHROP, S., AUSPRUNK, D. et al. Plasminogen activator (urokinase) causes vascularization of the cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 22, n. 2, p. 191-199, 1982.

BERMAN, M., MANSEAU, E., LAW, M. et al. Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 24, n. 10, p. 1358-1366, 1983.

BEVANS-NELSON, S. E., LAUSCH, R. N., OAKES, J. E. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and not interleukin-1 $\alpha$  is the dominant inducer of matrix metalloproteinase-9 synthesis in human corneal cells. **Experimental Eye Research**, London, v. 73, n. 3, p. 403-407, 2001.

BIROS, D. J., BROOKS, D. E., BROWN, M. P. et al. Regional and zonal variations in the sulfation patterns of chondroitin sulfate in normal equine stroma. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 1, p. 143-147, 2002.

BISTNER, S. Diseases of the eye. In: KOBLUK, C. N., AMES, T. R., GEOR, R. J. **The Horse Diseases and Clinical Management**. Philadelphia: Saunders. 1995. p. 1175-1208. v 2.

CARLTON, W. W., RENDER, J. A. Olho e ouvido. In: THOMPSON, R. G. **Patologia Veterinária Especial**. São Paulo: Manole. 1990. p. 645-694.

CARTER, G. R., CHENGAPPA, M. M. **Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology**. 4<sup>th</sup> ed. London: Lea & Febiger. 1991.

CASALS, E. E., DAMBIELLE, P. Utilización de glicosaminoglicanos sulfatados en patologías articulares en caninos – Ensayo clínico. **Pet's**, Argentina, v. 11, n. 58, p. 194-197, 1995.

CHANDRASEKHER, G., MA, X., LALLIER, T. E. et al. Delay of corneal epithelial wound healing and induction of keratocyte apoptosis by platelet-activating factor. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 43, n. 5, p. 1422-1428, 2002.

CHANG, J., GABISON, E. E., KATO, T. et al. Corneal neovascularization. **Current Opinion in Ophthalmology**, Philadelphia, v. 12, n. 4, p. 242-249, 2001.

- CHARTERS, L. Fatores de crescimento da membrana amniótica podem explicar a cicatrização. **Ophthalmology Times América Latina**, Argentina, v. 5, n. 1, p. 28-32, 2001.
- CHEN, J. H., MA, D. H., TSAI, R. J. Amniotic membrane transplantation for pseudomonal keratitis with impending perforation. **Chang Gung Medical Journal**, Taipei, v. 25, n. 3, p. 144-152, 2002.
- CHOLLET, P., MALECAZE, F., GOUZI, L. et al. Endothelin 1 is a growth factor for corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, London, v. 57, n. , p. 595-600, 1993.
- CINTRON, C., COVINGTON, H. I. Proteoglycan distribution in developing rabbit cornea. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Saettle, v. 38, n. 5, p. 675-684, 1990.
- COLE, N., BAO, S., WILLCOX, M. et al. TNF- $\alpha$  production in the cornea in response to *Pseudomonas aeruginosa* challenge. **Immunology and Cell Biology**, Carlton South, v. 77, n. 2, p. 164-166, 1999.
- COLE, N., KROCKENBERGER, M., BAO, S. et al. Effects of exogenous interleukin-6 during *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 6, p. 4116-4119, 2001.
- CONTE, A., VOLPI, N., PALMIERI, L. et al. Biochemical and Pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, Aulendorf, v. 45, n. 8, p. 918-925, 1995.
- CRISPIN, S. La película lacrimal preocular y las alteraciones de córnea y conjuntiva. In: PETERSEN-JONES, S. M., CRISPIN, S. **Manual de Oftalmología en Pequeños Animales**. Barcelona: Brace. 1999. p. 141-176.
- CURI, P. R. **Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas**. 2ª ed. Botucatu: Tipomic, 1998.
- DAVIDSON, M. G. Equine ophthalmology. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 2<sup>nd</sup> ed., London: Lea & Febiger, 1991, p. 576-610.
- DAVIDSON, G. Pharm profile. Glucosamine and chondroitin sulfate. **Compendium on Continuing Education for the Practice Veterinary**, New York, v. 22, n. 5, p. 454-458, 2000.
- DAVIS, S. D., STARFF, L. D., HYNDIUK, R. A. Topical tobramycin therapy of experimental *Pseudomonas* keratitis. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 96, n. 1, p. 123-125, 1978.
- DAVIES, Y., LEWIS, D., FULLWOOD, N. J. et al. Proteoglycans on normal and migrating human corneal endothelium. **Experimental Eye Research**, London, v. 68, n. 3, p. 303-311, 1999.

DONG, Z., GHABRIAL, M., KATAR, M. et al. Membrane-type matrix metalloproteinases in mice intracorneally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v. 41, n. 13, p. 4189-4194, 2000.

ENGEL, L. S., HILL, J. M., CABALLERO, A. R. et al. Protease IV, a unique extracellular and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 27, p. 16792-16797, 1998.

ESCO, M. A., HAZLETT, L. D., KURPAKUS-WHEATTER, M. *Pseudomonas aeruginosa* binds to extracellular matrix deposited by human corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 43, n. 12, p. 3654-3659, 2002.

EVANS, D., KUO, T., KWONG, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains with lipopolysaccharide defects exhibit reduced intracellular viability after invasion of corneal epithelial cells. **Experimental Eye Research**, London, v. 75, n. 6, p. 635-643, 2002.

FLEISZIG, S. M. J., ZAIDI, T. S., RAMPHAL, R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* invades corneal epithelial cells during experimental infections. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 8, p. 3485-3494, 1994.

FLEISZIG, S. M. J., ZAIDI, T. S., PIER, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 10, p. 4072-4077, 1995.

FLEISZIG, S. M. J., VALLAS, V., JUN, C. H. et al. Susceptibility of epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity is upregulated by hepatocyte growth factor. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3443-3446, 1998.

FLEISZEIG, S. M. J., EVANS, D. J. The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical and Experimental Optometry**, Carlton, v. 85, n. 5, p. 271-278, 2002.

FOSTER, C. S. **Fibronectin**. Massachusetts eye & ear infirmary Immunology Service. Capturado em 27 jul. 2001. Online. Disponível na Internet <http://www.uveitis.org/medical/lab/fibro.html>

FUJIKAWA, L. S., FOSTER, S., HARRIST, T. J. et al. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 45, n. 2, p. 120-129, 1981.

FUJIKAWA, L. S., FOSTER, C. S., GIPSON, I. K. et al. Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies. **The Journal Cell Biology**, Carlton South, v. 98, n. 1, p. 128-138, 1984.

GABISON, E., CHANG, J., HÉRNANDEZ-QUINTELA, E. et al. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. **Experimental Eye Research**, London, v. 78, n. 3, p. 579-589, 2004.

GAUGHAN, E. M. Managing tendinitis in horses. **Veterinary Medicine**, Kansas City, v.89, n. 8, p. 789-794, 1994.

GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6<sup>th</sup> ed. Washington: Asm Press. 1995. p. 509-519.

GUM, G. G. Physiology of the eye. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1991. p. 124-161.

GUPTA, S. K., MASINICK, S. A., HOB DEN, J. A. et al. Bacterial proteases and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mouse cornea. **Experimental Eye Research**, London, v. 62, n. 6, p. 641-650, 1996.

GYLES, C. L. *Pseudomonas* and *Moraxella*. In: GYLES, C. L., THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 2<sup>nd</sup> ed. Ames: Iowa University Press. 1993. p. 248-261.

HACKER, D. V., MURPHY, C. J., LLOYD, K. C. K. et al. Surgical repair of collagenolytic ulcerative keratitis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 22, n. 2, p. 88-92, 1990.

HAFFNER, J.C., FECTEAU, K.A., EILER, H. Inhibition of collagenase of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum and acetylcysteine. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 6, n.1, p. 67-72, 2003.

HAMOR, R. E., WHELAN, N. C. Equine infectious keratitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 15, n. 3, p. 623-646, 1999.

HARRISON, S.E., SOLL, D.B., SHAYEGAN, M. et al. Chondroitin sulfate A new and effective protective agent for intraocular lens insertion. **Ophthalmology**, New York, v. 89, n. 11, p. 1254-1260, 1982.

HASSEL, J. R., CINTRON, C., KUBLIN, C. et al. Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 222, n. 2, p. 362-369, 1983.

HAO, J., NAGANO, T., NAKAMURA, M. et al. Galardin inhibits degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases. **Experimental Eye Research**, London, v. 68, n. 5, p. 565-572, 1999a.

HAO, J., NAGANO, T., NAKAMURA, M. et al. Effect of galardin on collagen by *Pseudomonas aeruginosa*. **Experimental Eye Research**, London, v. 69, n. 6, p. 595-601, 1999b.

HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E. **Biologia e Clínica de coelhos e roedores**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 1993. p. 9-19.

HAZLETT, L. D., RUDNER, X. L., McCLELLAN, S. A. et al. Role of IL-2 and IFN- $\gamma$  in *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v. 43, n. 2, p. 419-424, 2002.

HAZLETT, L. D. Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 1-30, 2004

HIRSH, D. C. *Pseudomonas*. In: HIRSH, D. C., ZEE, Y. C. **Veterinary Microbiology**. Massachusetts: Blackwell Science. 1999. p. 100-101.

HOBDEN, J. A., O'CALLAGHAN, R. J., HILL, J. M. et al. Ciprofloxacin and prednisolone therapy for experimental *Pseudomonas* keratitis. **Current eye research**, Eynsham, v. 11, n. 3, 259-266, 1992.

HOBDEN, J. A., O'CALLAGHAN, R. J., INSLER, M. S. et al. Ciprofloxacin ointment versus ciprofloxacin drops for the therapy of experimental *Pseudomonas* keratitis. **Cornea**, New York, v. 12, n. 2, p. 138-141, 1993a.

HOBDEN, J. A., HILL, J. M., ENGEL, L. S. et al. Age and therapeutic outcome of experimental *Pseudomonas aeruginosa* keratitis treated with ciprofloxacin, prednisolone, and flurbiprofen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 37, n. 9, p. 1856-1859, 1993b.

HYNDIUK, R. A., DAVIS, S. D., HATCHELL, D. L. et al. Experimental pseudomonas keratitis: clinical and pathological observations. **Cornea**, New York, v. 2, n. 2, p. 104-114, 1983.

KANSKI, J.J. **Oftalmologia Clínica – Uma abordagem sistemática**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2000.

KARELINA, T. V., GOLDBERG, G. I., EISEN, A. Z. Matrix metalloproteinases in blood vessel development in human fetal skin and in cutaneous tumors. **Journal of Investigative Dermatology**, Malden, v. 105, n. 3, p. 411-417, 1995.

KERNACKI, K. A., BERK, R. S. Characterization of the inflammatory response induced by corneal infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Ocular Pharmacology**, New York, v. 10, n. 1, p. 281-288, 1994.

KESSLER, E., MONDINO, B. J., BROWN, S. I. The corneal response to *Pseudomonas aeruginosa*: histopathological and enzymatic characterization. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v. 16, n. 2, p. 116-125, 1977.

KIESEIER, B. C., SEIFERT, T., GIOVANNONI, G. et al. Matrix metalloproteases in inflammatory demyelination: target for treatment. **Neurology**, Hagerstown, v. 53, n. 1, p. 20-25, 1999.

KNOTTENBELT, D. C., PASCOE, R. R. Disorders of the eye. In: \_\_\_\_\_. **Diseases and disorders of the horse**. London: Mosby-Wolf. 1997. p. 307-334.

KRISHNAN, R., COLE, N., JALBERT, I. et al. Effect of topical 12-methyltetradecanoic acid during *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. **Abstract of ARVO ANNUAL MEETING – 2004**. Capturado em 31 mar. 2004. Online. Disponível na Internet <http://.../viewAbstractPrintFriendly.asp?CKey={528FFA9D-F876-410C-9CEF-E15B16986DF4}&>

KVANTA, A., SARMAN, S., FAGERHOLM, P. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. **Experimental Eye Research**, London, v. 70, n. 4, p. 419-428, 2000.

LAFORGE, H. Diagnóstico y tratamiento de las úlceras corneales. **Waltham focus**, London, v. 3, n. 1, p. 2-8, 1993.

LEESON, T. S., LEESON, C. R. **Histologia**. 2ª ed. São Paulo: Ateneu. 1970.

LI, D., LOKESHWAR, B. L., SOLOMON, A. et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. **Experimental Eye Research**, London, v. 73, n. 4, p. 449-459, 2001.

LIGHVANI, S., HUANG, X., HAZLETT, L. D. NK cells mediate resistance to *P. aeruginosa* keratitis. **Abstract of ARVO ANNUAL MEETING – 2004**. Capturado em 31 mar. 2004. Online. Disponível em <http://.../viewAbstractPrintFriendly.asp?CKey={3532FCFE-153B-4071-98^3-3BF07FB35937}&S>

LIMA, A. L. H., MELAMED, J., CALIXTO, N. **Terapêutica clínica ocular**. São Paulo: Roca. 1995.

LIMA, A. L. H., BELFORT JR., R. Ceratites bacterianas. In: BELFORT JR., R., KARA-JOSÉ, N. **Córnea Clínica e Cirurgia**. São Paulo: Roca. 1996. p. 181-188.

LIMBERG, M.B., McCAA, C., KISSLING, G. E. Topical application of hyaluronic acid and chondroitin sulfate in the treatment of dry eyes. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 103, n. 2, p. 194-197, 1987.

MATSUBARA, M., ZIESKE, J. D., FINI, M. E. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 32, n. 13, p. 3221-3237, 1991.

MATSUMOTO, K. Proteases in bacterial keratitis. **Cornea**, New York, v. 19, supl. 3, p. 160-164, 2000.

McLAUGHLIN, S. A., BRIGHTMAN, A. H., HELPER, L. C. et al. Pathogenic bacteria and fungi associated with extraocular diseases in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 182, n. 3, p. 241-242, 1983.

McNAMARA, P. S., BARR, S. C., ERB, H. N. Hematologic, hemostatic, and biochemical effects in dogs receiving an oral chondroprotective agent for thirty days. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 57, n. 9, p. 1390-1394, 1996.

MILLER, W. W. Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs. **Veterinary Medicine**, Kansas City, v. 91, n. 10, p. 916-922, 1996.

MIYAJIMA, S., AKAIKE, T., MATSUMOTO, K. et al. Matrix metalloproteinases induction by pseudomonal virulence factors and inflammatory cytokines *in vitro*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 31, n. 6, p. 271-281, 2001.

MOHAN, R. R., KIM, W. J., STARK, G. R. et al. Defective keratocyte apoptosis in response to epithelial injury in stat 1 null mice. **Experimental Eye Research**, London, v. 70, n. 4, p. 485-491, 2000.

MONTIANI-FERREIRA, F., CARDOSO, E. F., PETERSEN-JONES, S. Basic concepts in statistics for veterinary ophthalmology. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 79-85, 2004.

MOORE, C. P., FALES, W. H., WHITTINGTON, P. et al. Bacterial and fungal isolates from equidae with ulcerative keratitis. **Journal of the American Veterinary and Medical Association**, Chicago, v. 182, n. 8, p. 600-603, 1983.

MOORE, C. P. Diseases of the cornea. In: ROBINSON, E. **Current Therapy in Equine Medicine**. Philadelphia: Saunders Company. 1987. p. 450-456. v2.

MOORE, C. P., HELLER, N., MAJORS, L. J. et al. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 773-777, 1988.

MOORE, C. P., COLLINS, B. K., FALES, W. H. Antibacterial susceptibility patterns from microbial isolates associated with infectious keratitis in horses: 63 cases (1986-1994). **Journal of the American Veterinary and Medical Association**, Chicago, v. 207, n. 15, p. 928-933, 1995.

MORREALE, P., MANOPULO, R., GALATI, M. et al. Comparison of the antiinflammatory efficacy of chondroitin sulfate and diclofenac sodium in patients with knee osteoarthritis. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 23, n. 8, p. 1385-1391, 1996.

MUNGER, R. J. Veterinary ophthalmology in laboratory animal studies. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 167-175, 2002.

NAGANO, t., HAO, J., NAKAMURA, M. et al. Stimulatory effect of Pseudomonal elastase on collagen degradation by cultured keratocytes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 42, n. 6, p. 1247-1253, 2001.

NAKAMURA, Y., SOTOZONO, C., KINOSHITA, S. The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. **Experimental Eye Research**, London, v. 72, n. 5, p. 511-517, 2001.

NAKAMURA, K. Interaction between injured corneal epithelial and stromal cells. **Cornea**, New York, v. 22, n. 7, s. 1, s35-47, 2003.

NAKAZAWA, K., TAKAHASHI, I., OHNO, Y. et al. Modification of proteoglycan synthesis by corneal stromal cells on co-culture with either epithelial or endothelial cells. **Journal Biochemistry**, Bunkyo-ku, v. 122, n. 4, p. 851-858, 1997.

NASISSE, M. P., NELMS, S. Equine ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 8, n. 3, p. 537-555, 1992.

NASSARALLA, B. A., SANTOS, P. M., WANG, X. W. et al. Estudo experimental da eficácia clínica e microbiológica da associação de diclofenaco sódico e sulfato de gentamicina no tratamento de ceratite por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 60, n. 5, p. 516-521, 1997.

NI, M., EVANS, D. J., SACK, R. A. et al. Surfactant protein D is present in tear fluid and corneal epithelium and inhibits corneal epithelial invasion by *P. aeruginosa*. **Abstract of ARVO ANNUAL MEETING – 2004**. Capturado 31 mar. 2004. Online. Disponível em <http://...viewAbstractPrintFriendly.asp?CKey={E89FA4D8-4B53-4909-A8D2-ABA28246A6C9}&>

NISHIDA, T., NAKAGAWA, S., AWATA, T. et al. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 97, n. 5, p. 1653-1657, 1983.

NISHIDA, T., NAKAMURA, M., MURAKAMI, J. et al. Epidermal growth factor stimulates corneal epithelial cell attachment to fibronectin through a fibronectin receptor system. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 33, n. 8, p. 2464-2469, 1992.

NISHIMURA, T., TODA, S., MITSUMOTO, T. et al. Effects of hepatocyte growth factor, transforming growth factor- $\beta$ 1 and epidermal growth factor on corneal epithelial cells under epithelial-keratocyte interaction in reconstruction culture. **Experimental Eye Research**, London, v. 66, n. 1, p. 105-116, 1998.

O'CALLAGHAN, R. J., ENGEL, L. S., HOB DEN, J. A. et al. Pseudomonas keratitis. The role of an uncharacterized exoprotein, protease IV, in corneal virulence. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 37, n. 4, p. 534-543, 1996.

OTTINO, P., TAHERI, F., BAZAN, H. E. O. P. Platelet-activating factor induces the gene expression of TIMP-1, -2, and PAI-1: Imbalance between the gene expression of MMP-9 and TIMP-1 and -2. **Experimental Eye Research**, London, v. 74, n. 3, 393-402, 2002.

PILLAR, C. M., HOBDEN, J. A. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and keratitis in mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 43, n. 5, p. 1437-1444, 2002.

PIPITONE, V. R. Chondroprotection with chondroitin sulfate. **Drugs Experimental and Clinical Research**, Geneva, v. 17, n. 1, p. 3-7, 1991.

PHAN, T. M., FOSTER, C. S., ZAGACHIN, L. M. et al. Role of fibronectin in the healing of superficial keratectomies *in vitro*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 30, n. 3, p. 386-391, 1989a.

PHAN, T. M., FOSTER, C. S., WASSON, P. J. et al. Role of fibronectin and fibrinogen in healing of corneal epithelial scrape wounds. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 30, n. 3, p. 377-385, 1989b.

PLOTKOWSKI, M.C., TOUNIER, J. M., PUCHELLE, E. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 2, p. 600-605, 1996.

PRIMBS, G. B., SAND, B. J., STRAATSMA, B. R. Observations on experimental corneal ulcers. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 66, n. 7, p. 564-569, 1961.

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe. 1994.

RAE, S. M. M., EDELHAUSER, H. F., HYNDIUK, R. A. et al. The effects of sodium hyaluronate, chondroitin sulfate, and methylcellulose on the corneal endothelium and intraocular pressure. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 95, n. 3, p. 332-314, 1983.

RANZANI, J. J. T., CREMONINI, D. N., BRANDÃO, C. V. et al. Avaliação do uso tópico de sulfato de condroitina A (CIPROVET<sup>®</sup>) no tratamento de úlcera de córnea experimental em coelhos. **Medvep**, Curitiba, v. 2, n. 5, p. 51-56, 2004.

RASHMIR-RAVEN, A. M., COYNE, C. P., FENWICK, B. W. et al. Inhibition of equine complement activity by polysulfated glycosaminoglycans. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 87-90, 1994.

RELLER, L. B., SCHOENKNECHT, F. D., KENNEY, M. A. et al. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 130, p. 454-463, 1974.

RICHIERT, D. M., IRELAND, M. E. Matrix metalloproteinase secretion is stimulated by TGF-beta in cultured lens epithelial cells. **Current Eye Research**, Oxon, v. 19, n. 3, p. 269-275, 1999.

ROBERTS, S. M. Management of slow healing corneal ulcers. **Eye Facts and Tips**, v. 1, n. 3, 1999. Capturado em 01 ago. 2001. Online. Disponível na Internet <http://www.animaleyecenter.com/Journals/VIN3.html>

RUBIN, L. F., SAUNDERS, L. Z. **Ophthalmic Pathology of Animals: an Atlas and Reference Book**. Berlin: S. Karger. 1975.

SALONEN, E., TERVO, T., TÖRMA, E. et al. Plasmin in the tear fluid of patients with corneal ulcers: basis for new therapy. **Acta Ophthalmologica**, Hvidovre, v. 65, n. 1, p. 3-12, 1987.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic embryology and anatomy. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1991. p. 3-123.

SAUER, P., ANDREW, S. E., LASSALINE, M. et al. Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 309-313, 2003.

SCHILLING-SCHÖN, A., PLEYER, U., HARTMAN, C. et al. The role of endogenous growth factors to support corneal endothelial migration after wounding *in vitro*. **Experimental Eye Research**, London, v. 71, n. 6, p. 583-589, 2000.

SIVAK, J. M., FINI, M. E. MMPs in the: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2002.

SLATTER, D. Cornea and sclera. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Saunders. 2001. p. 260-380.

SPENCER, W. H. Cornea. In: \_\_\_\_\_. **Ophthalmic Pathology an Atlas and Textbook**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders. 1996. p. 157-333, v 1.

STADES, F. C., BOEVÉ, M. H., NEUMAN, W. et al. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 1999.

STUART, J. C., TURGEON, P. T., KOWALSKI, R. P. Apronitin treatment of pseudomonal corneal infection. **Cornea**, New York, v. 10, n. 1, p. 63-66, 1991.

STRUBBE, D. T., GELATT, K. N. Exame oftálmico e procedimentos diagnósticos. In: GELATT, K. N. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole. 2003. p. 1-26.

SWEENEY, C. R., IRBY, N. L. Topical treatment of Pseudomonas sp-infected corneal ulcers in horses: 70 cases (1977-1994). **Journal American Veterinary and Medical Association**, Chicago, v. 209, n. 5, p. 954-956, 1996.

TALIERI, I. C. **Estudo dos efeitos de uma solução tópica a 5% de glicosaminoglicanos monossulfatados e duasorb, na cicatrização de úlceras corneanas produzidas por álcali em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, Linnaeus, 1758)**. Jaboticabal, 2000. 59f. Dissertação (Área de

Cirurgia Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do campus de Jaboticabal – Universidade Estadual de São Paulo.

TAO, Y., BAZAN, H. E. P., BAZAN, N. G. Platelet-activating factor induces the expression of metalloproteinases-1 and -9, but not -2 or -3 in the corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v. 36, n. 2, p. 345-354, 1995.

TAO, Y., BAZAN, H. E. P., BAZAN, N. G. Platelet-activating factor enhances urokinase-type plasminogen activator gene expression in the corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v. 37, n. 10, p. 2037-2046, 1996.

TERSARIOL, I. L. S., PIMENTA, D. C., CHAGAS, J. R. et al. Proteinase activity regulation by glycosaminoglycans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 2, p. 135-144, 2002.

TERVO, T., SULONEN, J., VALTONEN, S. et al. Distribution of fibronectin in human and rabbit corneas. **Experimental Eye Research**, London, v. 42, n. 4, p. 399-406, 1986.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5ª ed. São Paulo: Roca. 1998.

TODAR, K. *Pseudomonas aeruginosa*. Capturado em 21 jul. 2001. Online. Disponível na Internet <http://www.bact.wisc.edu/MicrotexBook/disease/pseudomonas.html>

TWINING, S. S., ZHOU, X., SCHULTE, D. P. et al. Effect of vitamin A deficiency on the early response to experimental pseudomonas keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 37, n. 4, p. 511-522, 1996.

UESUGUI, E., GOMES, M. C. C., ATIQUE, D. et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares mais freqüentes e sua susceptibilidade *in vitro* aos agentes antimicrobiano. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 339-342, 2002.

VAN HORN, D. L., DAVIS, S. D., HYNDIUK, R. A. et al. Experimental pseudomonas keratitis in the rabbit: bacteriologic, clinical and microscopic observations. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 20, n. 2, p. 213-221, 1981.

VYGANTAS, K. R., WHITLEY, R. D. Management of deep corneal ulcers. **Compendium of Continuing Education**, Newtown, v.25, n. 3, p. 196-205, 2003.

WHITLEY, D. Canine and Feline primary ocular bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Bonne Springs, v. 30, n. 5, p. 1151-1167, 2000.

WILCOCK, B. P. The eye and ear. In: JUBB, K. V. F., KENNEDY, P. C., PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4<sup>th</sup> ed., San Diego: Academic Press, 1993. p. 441-530.

WILCOCK, B. P. **The histologic basis of ocular disease.** In: Waltham/OSU Symposium Small Animal Ophthalmology, the 25<sup>th</sup> Annual, 2001, Ontario. Capturado em 12 ago. 2003. Online. Disponível: <http://www.vin.com/OSUWaltham/2001/>

WILLCOX, M. D. P., COLE, N., BAO, S. et al. IL-6 expression in the cornea is partially protective during *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Experimental Eye Research**, London, v. 67, s. 62, 1998.

WILSON, S. E., HE, Y., WENG, J. et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypotetized role for the interleucin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. **Experimental Eye Research**, London, v. 62, n. 4, p. 325-338, 1996.

WOUK, A F. P. F., MICHELOTTO, JR. P. V., TIEPPO, T. et al. Polysulfated glycosaminoglycan used for the treatment of indolent corneal ulcers in equine patients. **Rivista SIDI**, Parma, anno 4, n. 1, p. 87-90, 1998.

WYMAN, M., SWANSON, C., KOWALSKI, J. J. et al. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* ulcerative keratitis model in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, n. 6, p.1135-1140, 1983.

YE, H. Q., MAEDA, M., YU, F. S. et al. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wound rat corneas. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Saint Louis, v. 41, n. 10, p. 2894-2899, 2000.

ZIESKE, J. D., HIGASHIJIMA, S. C., SPURR-MICHAUD, S. J. et al. Biosynthetic responses of the rabbit cornea to a keratectomy wound. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 28, n. 10, p. 1668-1677, 1987.

ZIESKE, J. D., TAKAHASHI, H., HUTCHEON, A. E. et al. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 41, n. 6, p. 1346-1355, 2000.

ZIESKE, J. D. Extracellular matrix and wound healing. **Current Opinion in Ophthalmology**, Philadelphia, v. 12, n. 4, p. 237-241, 2001.

ZULIAN, I. **Ação do sulfato de condroitina A associado a ciprofloxacina em úlceras de córnea em cavalos.** Curitiba, 2002. 67 f. Dissertação (Mestrado na área de Patologia Veterinária) – Setor de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

ANEXO

CERTIFICADO DE ANÁLISE DO PRODUTO



NOME DO PRODUTO: **PSEUDOMONAS AERUGINOSA DERIVADO DO ATCC 27853**  
(microrganismo padrão estabilizado)

DATA DE FABRICAÇÃO: FEV/03

LOTE: 1150

VALIDADE: FEV/05

APRESENTAÇÃO: Bactéria derivada da "American Type Culture Collection" sob a forma de discos de gelatina dessecados (frascos com 5 unidades).

**TESTE DE VIABILIDADE:**

Meio de propagação: Ágar para contagem em placa (Plate Count agar).  
Temperatura de incubação: 35 - 37°C.  
Tempo de incubação: 24 horas.  
Contagem de células viáveis/mL: Superior a 100.000 UFC/mL

**TESTE DE PUREZA:**

Microscopia: bacilos retos gram-negativos.  
Cultura: inoculação em ágar-sangue de carneiro e ágar Mac Conkey: colônias típicas.

**TESTES FENOTÍPICOS:**

Oxidase: +

Provas bioquímicas realizadas em aparelho automatizado Walkaway (Dade Behring):

Glicose: -    Rafinose: -    Inositol: -    Uréia: -    Lisina: -    TDA: -    Indol: -  
Citrato: +    Sacarose: -    Rannose: -    Adonitol: -    H2S: -    Arginina: +    Malonato: +  
Sorbitol: +    Arabinose: -    Melibiose: -    Ornitina: -    VP: -    Esculina: -    ONPG: -  
Oxidase: -    Acetamida: +    Nitrato: +    Cetrimide: +    Tartarato: +    OFglicose: +  
Colistina 4mcg: S    Cefalotina 8mcg: R    Kanamicina 4mcg: R    Penicilina 4 mcg: R  
Tobramicina 4mcg: S    Colistina 4mcg: S    Nitrofurantoina 64mcg: R

**PARECER TÉCNICO:** O produto encontra-se dentro das especificações exigidas.

Ref. Bibliogr.: MURRAY, P.R. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Ed. Washington, ASM Press, 1999.  
KONEMAN, F.W. et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th Ed. Philadelphia, Lippincott, 1997.

**DATA:** 10/12/03

  
Dra. Helena A.P. Homem de Mello de Souza  
RESPONSÁVEL TÉCNICO PELO CONTROLE DE QUALIDADE  
CRF - 1742 - PR // NEWPROV PRODUTOS P/ LABORATORIO LTDA