

ROBERTA JANSEN DE MELLO FARIAS

**AVALIAÇÃO DA CERATOPLASTIA LAMELAR
MANUAL COM A UTILIZAÇÃO DE TECIDO
CORNEANO LIOFILIZADO EM CERATOCONE**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA JANSEN DE MELLO FARIAS

**AVALIAÇÃO DE CERATOPLASTIA LAMELAR
MANUAL COM A UTILIZAÇÃO DE TECIDO
CORNEANO LIOFILIZADO EM CERATOCONE**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof^a Dra. Luciene Barbosa de Sousa

Co-Orientador: Dr. Acácio A. de Souza Lima Filho

São Paulo

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA

Chefe do Departamento: Ana Luísa Hoffling-Lima Farah

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Profa Dra Denise de Freitas

ROBERTA JANSEN DE MELLO FARIAS

**AVALIAÇÃO DA CERATOPLASTIA LAMELAR
MANUAL COM A UTILIZAÇÃO DE TECIDO
CORNEANO LIOFILIZADO EM CERATOCONE**

Presidente da Banca:

Profa. Dra. Luciene Barbosa de Sousa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro Nishi

Prof. Dr. Milton Ruiz Alves

Prof. Dr. Sidney Sampaio

Profa. Dra. Vera Mascaro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eneida e Afonso

Aos meus irmãos, Renata e Afonso

Ao meu esposo, Ronaldo

À minha filha Natália

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Eneida Farias, que com toda a sua alegria e energia, jamais nos deixa desanimar;

Ao meu pai, Afonso Farias, oftalmologista, a primeira pessoa a qual me espelhei para seguir a carreira em Oftalmologia.

Aos meus irmãos, Renata e Afonso, que mesmo distantes, apoiaram este caminho.

Ao meu esposo, Ronaldo, que me apoiou intensamente durante estes anos.

À minha filha Natália, que ainda no ventre materno participou ativamente para que esta tese fosse defendida.

Aos meus sogros, Maria de Lourdes e Juraci Guimarães, que de forma alegre e descontraída, nos ajudaram nesta jornada.

À minha orientadora, professora e grande inspiração em Oftalmologia, Dra. Luciene Barbosa, uma pessoa de características e qualidades incomparáveis que fazem dela um grande exemplo na Oftalmologia brasileira.

Ao meu orientador, Dr Acácio Lima Filho, pessoa de visão para a oftalmologia brasileira e pilar inicial para a realização desta tese.

À Andréa Lourenço, bioquímica, que muita paciência teve, até descobrirmos a forma ideal para liofilizar uma córnea.

À Dra. Edna Haapalainen e à toda equipe do Centro de Microscopia Eletrônica, Márcia, André, Patrícia e Isabel, amigos dedicados do

setor de Microscopia eletrônica da Escola Paulista de Medicina que trabalharam arduamente para a realização da primeira parte deste trabalho.

À Dra Eliane Mayumi, oftalmologista, que foi amiga e colaboradora dedicada a desvendar os segredos da microscopia confocal em córneas liofilizadas.

À Dra Denise de Freitas, uma pessoa especial, que nos abriu o caminho para várias alternativas e dicas para que conseguíssemos realizar o melhor nesta tese.

Ao Dr. Luís Vieira, colaborador em muitas partes neste trabalho.

À Dra. Norma Allemann que prontamente se dispôs e realizou todas as biomicroscopias ultra-sônicas dos nossos pacientes.

Aos funcionários, amigos e colegas do Banco de Olhos de Sorocaba, minha primeira escola em oftalmologia, incansáveis na hora de prontificar córneas para os nossos experimentos e, cedendo lugar para que todos os pacientes fossem triados, operados e acompanhados na sua instituição de forma ágil e com qualidade.

Aos colegas e funcionários dos setores de Córnea e Cirurgia Refrativa da Escola Paulista de Medicina, que sempre que necessário, nos ajudaram com os exames dos pacientes desta tese.

Ao Fábio Dante e ao Laércio Gonçalves, que documentaram todos os pacientes desta tese.

À Jaqueline, secretária da pós-graduação, que sempre se demonstrou prestativa a ajudar todos os pós-graduandos neste árduo caminho.

Ao Ministério da Educação e Cultura, que durante o período de oito meses entre 2006 e 2007 custeou este trabalho com uma bolsa de doutorado.

Enfim, a todos os amigos e colegas que nos apoiaram nesta longa caminhada, o muito obrigada.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Gráficos.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Histologia da córnea.....	4
2.2 Meios de preservação da córnea.....	6
2.3 Liofilização como método de preservação.....	9
2.4 Transplante lamelar anterior de córnea.....	12
3 MÉTODOS.....	14
3.1 Processo da Microscopia e experiências de Liofilização.....	14
3.2 Liofilização das córneas utilizadas para transplante em humanos.....	21
3.3. Critério de Inclusão.....	25
3.4. Critérios de exclusão.....	25
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Análise histológica da microscopia de luz e da Microscopia eletrônica.....	28
4.2 Liofilização de córneas e transplante em humanos.....	35
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	75
7 ANEXOS.....	76
8 REFERÊNCIAS.....	107
Abstract	
Bibliografia consultada	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biomicroscopia de paciente transplantado com córnea em optisol.....	46
Figura 2. Biomicroscopia de paciente transplantado com córnea liofilizada.....	46
Figura 3. Biomicroscopia de paciente transplantado com córnea optisol.....	46
Figura 4. Biomicroscopia de paciente transplantado com córnea liofilizada.....	46
Figura 5. Foto de microscopia confocal – células basais de córnea em optisol aos 21 dias após a cirurgia.....	54
Figura 6. Foto de microscopia confocal – células basais de córnea liofilizada aos 21 dias de cirurgia.....	54
Figura 7. Foto de microscopia confocal – ceratócitos de córnea em optisol no 6º mês após a cirurgia.....	55
Figura 8. Foto de microscopia confocal – ceratócitos de córnea liofilizada no 6º mês após a cirurgia.....	55
Figura 9. UBM de paciente com córnea em optisol	58
Figura 10. UBM de paciente com córnea liofilizada	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da idade e sexo entre os dois grupos.....	36
Tabela 2. Classificação quantitativa da acuidade visual.....	39
Tabela 3. Comparação dos valores do ORBSCAN® entre os dois grupos.....	41
Tabela 4. Satisfação dos pacientes com a cirurgia de acordo com o questionário de qualidade de vida.....	43
Tabela 5. Avaliação da sensibilidade ao contraste no 6º mês após a cirurgia nos dois grupos.....	44
Tabela 6. Correlação entre melhor acuidade visual corrigida e sensibilidade ao contraste no 6º mês após a cirurgia.....	45
Tabela 7. Correlação entre melhor acuidade visual corrigida e satisfação em relação à cirurgia de acordo com o questionário de qualidade de vida.....	45
Tabela 8. Correlação entre melhor acuidade visual corrigida (MAVC) e as variáveis: dobras no receptor e opacidade do doador.....	47
Tabela 9. Avaliação dos pacientes realizada pelo examinador mascarado 1 no 3º mês após a cirurgia.....	48
Tabela 10. Avaliação dos pacientes realizada pelo examinador mascarado 1 no 6º mês após a cirurgia.....	49
Tabela 11. Avaliação dos pacientes realizada pelo examinador mascarado 2 no 6º mês após a cirurgia.....	50

Tabela 12. Associação entre as variáveis: opacidade do leito receptor e transparência com a variável liofilizada de acordo com o examinador 1.....	51
Tabela 13. Associação entre as variáveis: opacidade do leito receptor e transparência com a variável liofilizada de acordo com o examinador 2.....	52
Tabela 14. Comparação entre os grupos de acordo com as medidas do leito residual no 6º mês pela microscopia confocal e pela biomicroscopia ultra-sônica.....	56
Tabela 15. Correlação entre melhor acuidade visual corrigida e as variáveis: interface e densidade de ceratócitos no confocal.....	56
Tabela 16. Correlação entre melhor acuidade visual corrigida no 6º mês e as variáveis do confocal e do UBM.....	57
Tabela 17. Correlação entre a variável espessura da lamela posterior pelo confocal e UBM e a transparência avaliada pelos examinadores mascarados no no 6º mês.....	57
Tabela 18. Correlação entre melhor acuidade visual corrigida com 6 meses e transparência da córnea de acordo com cada examinador com a qualidade da córnea doada.....	59
Tabela 19. Correlação entre melhor acuidade visual corrigida e tempo de preservação total.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolução da medida de visão sem correção em logmar entre os dois grupos.....	37
Gráfico 2. Evolução da melhor visão corrigida em logmar nos dois grupos.....	38
Gráfico 3. Evolução dos menores valores ceratométricos nos dois grupos.....	40
Gráfico 4. Evolução dos valores de paquimetria ultra-sônica entre os dois grupos.....	42
Gráfico 5. Avaliação da microscopia especular nos dois grupos durante a evolução....	43
Gráfico 6. Evolução do estroma doador na microscopia confocal entre os dois grupos.....	53
Gráfico 7. Evolução da densidade dos ceratócitos entre os dois grupos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSS	Solução salina balanceada
PBS	Solução tampão-fosfato
SF	Soro fisiológico
KM	Fixador gluteraldeído-formaldeído
AV s/c	Acuidade visual sem correção
MAVC	Melhor acuidade visual corrigida
MVC	Melhor visão corrigida
LC	Lente de contato
ORB	Orbscan
Pré	pré-operatório
UBM	Ultrasound Biomicroscopic (biomicroscopia ultra-sônica)
Confocal	Microscopia confocal
VQF	Visual Quality Function
μm	Micra
Å	Angstrom

U/ml	unidades/ mililitros
mOsm	miliosmol
g/l	gramas/litro
µg/ml	microgramas/mililitro
Mmol/L	milimol/litro
W	Taxa de evaporação ou sublimação
P _v	Pressão de vapor
M	Peso molecular
T	Temperatura
°K	Temperatura em Kelvin
°C	Temperatura em Celsius

Tabela ETDRS Tabela inicialmente usada no *Early Treatment of diabetic Retinopathy Study* (Estudo do tratamento da retionopatia diabética precoce)

RESUMO

Objetivos: Desenvolver um método para liofilizar córneas e comparar o uso de córneas liofilizadas com córneas preservadas em optisol no transplante lamelar anterior.

Métodos: As córneas liofilizadas foram avaliadas por microscopia de luz e eletrônica e comparadas com controles não liofilizados. Na segunda parte do estudo, realizou-se um ensaio clínico randomizado com 20 portadores de ceratocone e candidatos a transplante de córnea, onde 10 pacientes foram transplantados com córneas liofilizadas e outros 10 com córneas preservadas em Optisol GS[®] por até 13 dias. Os dados pré e pós-operatórios consistiram de: medidas de acuidade visual em tabela logmar, exames de topografia, orbscan, paquimetria e microscopia especular. Exames de microscopia confocal, biomicroscopia ultra-sônica, sensibilidade ao contraste e um questionário sobre qualidade de vida foram realizados no pós-operatório.

Resultados: Liofilização de córneas com sacarose 2,3 molar por 40 minutos e sua reidratação com solução salina balanceada por 30 minutos foi considerado o melhor método para preservação de córneas a longo prazo para transplante lamelar anterior. O ensaio clínico não mostrou variação significativa entre os grupos, exceto nos valores de acuidade visual sem correção que foram melhores no grupo liofilizado e nos valores de densidade de ceratócitos que foram maiores no grupo optisol.

Conclusões: Liofilização é um método eficaz para a preservação de córneas para transplante lamelar anterior. Córneas liofilizadas e utilizadas para o transplante lamelar anterior apresentaram evolução clínica semelhante a das córneas preservadas em Optisol GS[®].

Farias, Roberta Jansen de Mello

Transplante lamelar com a utilização de córneas liofilizadas.
/Roberta Jansen de Mello Farias -- São Paulo, 2007.
xvi, 114f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: Anterior lamellar transplant with lyophilized corneas.

1. Transplante de Córnea. 2. Preservação de Tecido. 3. Liofilização.
4. Ensaios Clínicos Controlados Aleatórios.

1. INTRODUÇÃO:

Transplante penetrante de córnea consiste na remoção cirúrgica de uma córnea doente e reposição através de uma córnea de espessura total de tecido doador⁽¹⁾.

Em situações de baixo risco, como no ceratocone, o transplante de córnea é um dos tipos de transplantes de maior êxito, com uma taxa de sucesso em 10 anos, definido como claridade corneana da ordem de 72 – 80%⁽²⁾. Outros autores consideram esta taxa de cerca de 95%⁽³⁾.

No ceratocone, a complicação pós-operatória mais comum do transplante de córnea é o astigmatismo, seguida da rejeição endotelial⁽⁴⁾. Ocorre em cerca de 10% dos casos de ceratocone, dois quais 90% respondem bem ao tratamento a base de esteróides tópicos e subconjuntivais⁽⁴⁾.

A rejeição de córnea continua sendo um dos maiores desafios nas ceratoplastias. Nos casos de bom prognóstico, a estimativa é que ocorra rejeição entre 2,3 a 12%⁽⁵⁾. Alguns autores têm relatado uma freqüência de 35-68%⁽⁶⁾, outros falam em cerca de 20 a 30% de rejeição imunológica no transplante penetrante de córnea⁽²⁾. Nos casos de queimaduras químicas, com alterações severas de córnea, a incidência de rejeição pode ser maior que 90%⁽⁵⁾. Além disso, a densidade endotelial continua a cair por mais de 10 anos após o transplante penetrante, numa taxa muitas vezes mais alta que a da população normal⁽²⁾.

O transplante lamelar anterior é definido como a remoção de um tecido corneano doente (epitélio, Bowman e estroma), poupando a membrana de Descemet e o endotélio do tecido receptor. Pode ser utilizado para correção óptica ou tectônica. É utilizado para o tratamento de córneas que mantêm um endotélio sadio, cujas alterações patológicas ou estruturais estão anteriores à membrana de Descemet, tais como ceratocone, opacidades estromais pós ceratites infecciosas ou trauma e distrofias corneanas anteriores⁽⁷⁾.

O primeiro transplante lamelar, com sucesso, foi realizado há cerca de 100 anos atrás por Arthur Von Hippel⁽⁸⁾. Archila, em 1984, descreveu o uso de injeção de ar no estroma corneano para facilitar a dissecação da membrana de Descemet⁽⁹⁾.

A possibilidade de rejeição endotelial, principal causa de falência do enxerto em transplante penetrante, é eliminada no transplante lamelar pois o endotélio do receptor é poupado⁽⁷⁾. Além disso, por ser um procedimento não penetrante, complicações tais como: endoftalmite, hemorragia expulsiva, glaucoma e formação de catarata são minimizadas⁽⁷⁾.

Liofilização consiste no congelamento rápido de um tecido ou substância, seguido da desidratação através de vácuo elevado. A água presente passa então do estado sólido para vapor sem passagem pela fase líquida. Tal procedimento é freqüentemente utilizado na indústria farmacêutica na preparação de farmacoterápicos. Com a retirada da água do tecido ou substância, o mesmo fica menos sujeito a ação de bactérias e conseqüentemente com menor chance de contaminação e maior tempo de preservação⁽¹⁰⁾.

Córneas liofilizadas já foram utilizadas no passado para o transplante tectônico de emergência, quando nenhum outro tecido doador estava disponível⁽¹¹⁾. Em 1992, publicou-se um artigo relatando o uso, com sucesso, de córneas liofilizadas para transplantes ópticos em ceratocone e cicatrizes corneanas⁽¹²⁾.

O uso de córneas liofilizadas simplifica a preservação e distribuição de tecidos, os quais podem ser estocados por um tempo maior que os 14 dias preconizados nos meios de preservação clássicos. Além disso, a liofilização é um método possivelmente efetivo para redução da rejeição estromal, pois o processo é capaz de reduzir a antigenicidade do tecido preservado⁽¹³⁾.

A liofilização, de forma geral, leva a um aumento da tortuosidade na estrutura da córnea e é disponível nos dias de hoje somente em tecidos pré-cortados e pré-trepanados. Além disso, os métodos de reidratação do tecido liofilizado são dispendiosos e demorados. O intuito deste trabalho é desenvolver um método

simplificado de liofilização que reduza a distorção ou irregularidade do tecido e que seja mais facilmente reidratado.

1.1. Objetivos Gerais:

- Desenvolver um método de liofilização para armazenar córneas por longos períodos no Brasil;

- Avaliar os resultados clínicos e cirúrgicos da utilização de enxertos corneanos liofilizados em comparação a enxertos preservados em optisol no transplante lamelar anterior em pacientes portadores de ceratocone.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 – Histologia da córnea

A córnea é composta de cinco camadas: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O epitélio ocupa 10% de toda a espessura corneana. É composto por cinco a seis camadas de células compreendendo 50 μ m. Estas camadas consistem de: uma camada de células basais; duas ou três camadas de células alares e duas camadas de células superficiais pavimentosas. O tempo de reposição deste epitélio é de cerca de sete dias⁽¹⁴⁾.

A camada de células basais epitelial é composta por células altas e poligonais e se estende ao longo da córnea sem variação significativa de tamanho ou formato, onde se continua com as células basais da conjuntiva. A união entre estas células é feita por desmossomos e máculas ocludentes. Linfócitos e alguns macrófagos, assim como axônios de nervos não mielinizados são observados nas camadas de células basais e alares. As duas camadas de células superficiais são longas e finas, medindo cerca de 45 μ m de comprimento e 4 μ m de espessura. A adesão entre as células é feita por desmossomos e máculas ocludentes, além de zônulas ocludentes. A zônula ocludente encontra-se nas paredes laterais das células superficiais adjacente ao filme lacrimal pré-corneano. A membrana celular anterior das células superficiais possui ainda inúmeras e pequenas microplicas e microvilosidades, importantes na retenção do filme lacrimal⁽¹⁴⁾.

Abaixo do epitélio está a membrana basal, a qual tem uma espessura uniforme e se continua com a membrana basal do epitélio limbar. Ela mantém conexões com o epitélio através de hemidesmossomos, dos quais se irradiam finas fibrilas osmiofílicas que aumentam a sua adesão ao epitélio. A microscopia eletrônica mostra que a membrana basal é uma camada osmiofílica medindo cerca de 480 Å ou 40 a 60nm, que contém fibrilas finas e matriz mucoprotéica⁽¹⁴⁾. É composta de uma camada pálida ou lâmina lúcida, imediatamente posterior a membrana celular das células basais do epitélio e de uma camada eletrodensa ou lâmina densa.

Constituída de colágeno tipo IV e laminina, sintetizados e secretados pelas células epiteliais, a membrana basal forma uma matriz na qual as células epiteliais podem migrar, exercendo um papel importante na manutenção do epitélio estratificado, assim como na cicatrização dos defeitos epiteliais⁽¹⁵⁾. É separada da camada de células basais por uma zona lúcida medindo 230Å que contém material granular⁽¹⁴⁾.

A camada de Bowman mede 8 a 14µm de espessura, sendo acelular e composta basicamente de fibras de colágeno de pequeno diâmetro (240 a 270Å) dispostas aleatoriamente. O interstício entre as fibras de colágeno está preenchido por substância própria mucoprotéica. A porção anterior da camada de Bowman, a qual está voltada para a membrana basal epitelial, é lisa, enquanto a porção posterior se imbrica de forma menos distinta com o estroma⁽¹⁴⁾.

O estroma mede aproximadamente 500µm de espessura e constitui 9/10 de toda a espessura corneana. É composto quase inteiramente de lamelas de colágeno, entre as quais se encontram fibroblastos ou ceratócitos e substância própria, composta de mucoproteína e glicoproteína. O período de *turnover* das fibras de colágeno é longo, ocorrendo pouca reposição num período de 12 meses. Além das células de Schwann ao redor dos nervos corneanos, são encontrados poucos linfócitos, macrófagos cicatriciais e raros leucócitos polimorfonucleares. Observa-se que 2,4% do estroma humano é formado por fibroblastos. O estroma possui de 200 a 250 lamelas paralelas entre si e superpostas uma à outra, com cada uma medindo cerca de 2µm de espessura. As lamelas são constituídas de fibras de colágeno, de tamanho uniforme, que também se dispõem paralelas entre si e se estendem por todo o diâmetro da córnea. As lamelas do terço superficial do estroma se encontram de forma menos organizada que os 2/3 mais profundos. Na microscopia eletrônica observa-se que os fibroblastos estão dispostos entre as lamelas e, ocasionalmente se estendem dentro das lamelas. As organelas não são numerosas no citoplasma dos fibroblastos, porém todas estão presentes, sendo mais frequentemente observados o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi⁽¹⁴⁾.

A membrana de Descemet é a membrana basal das células endoteliais, pode ser facilmente separada do estroma adjacente, assim como das células endoteliais. Gradualmente aumenta de espessura com a idade, podendo medir até $12\mu\text{m}$ ⁽¹⁴⁾. É composta por proteínas, incluindo a fibronectina, laminina, colágenos tipo IV e VIII e proteoglicanos contendo heparan-sulfato, dermatan-sulfato ou keratan-sulfato⁽¹⁶⁾. A análise histológica demonstra que a mesma é estratificada em uma fina camada não-bandeada adjacente ao estroma ($0.3\mu\text{m}$), uma zona bandeadada anterior (2 a $4\mu\text{m}$) e uma zona posterior amorfa ($>4\mu\text{m}$)⁽¹⁵⁾.

O endotélio consiste de uma camada única de células hexagonais, com aproximadamente 500.000 células, unidas entre si por zônulas de oclusão, máculas de oclusão e máculas aderentes. É responsável pelo transporte ativo para retirada de água do estroma, assim como pela secreção da membrana de Descemet⁽¹⁴⁾.

À microscopia de luz, em um corte transversal de uma córnea, observam-se as 5 a 7 camadas de epitélio estratificado, as 3 camadas de estroma, incluindo a camada de Bowman, o estroma lamelar com seus ceratócitos (anexo 4, figura 1, estruturas a, b e c, respectivamente) e a membrana de Descemet, além da camada única de células cuboidais do endotélio⁽¹⁶⁾.

À microscopia eletrônica, toda a ultra-estrutura da córnea, com seus tipos celulares, incluindo citoplasmas, núcleos, nucléolos, organelas e microvilosidades, além das suas adesões (*tight junctions*, hemidesmossomos), membrana basal, arcabouço e substância própria podem ser identificados em maior ou menor aumento.

2.2 – Meios de Preservação de córnea

Inúmeros métodos têm sido desenvolvidos para preservar a córnea antes do transplante. Globos inteiros podem ser armazenados em câmara úmida a 4°C , sendo este o método mais simples e econômico entre todos os métodos de armazenamento. Caso o tempo entre o óbito e a enucleação esteja entre 4 a 6 horas, os globos oculares podem ser mantidos em câmara úmida por 48 horas⁽¹⁷⁾.

McCarey e Kaufman em 1974 desenvolveram um meio de preservação de curta-duração contendo: meio de cultura de tecido 199, dextran 5%, 100U/ml de estreptomicina e penicilina, tendo osmolaridade de 290mOsm e pH 7.4, que inicialmente mostrou-se eficaz para armazenar córneas humanas viáveis por 1 semana⁽¹⁸⁾, entretanto novos resultados clínicos limitaram o seu uso em 3 a 4 dias^(19, 20). No Brasil, o laboratório Ophthalmos desenvolveu um meio de conservação de córneas contendo: sulfato de condroitina 25g/l e gentamicina também capaz de preservar o tecido viável por 3 dias⁽²¹⁾.

O meio japonês nomeado EP II[®] é composto de solução de Ringer-fosfato–glicose livre de bicarbonato, 3 a 5% de dextran 70, alguns eletrólitos como sulfato de magnésio e citrato de sódio, sulfato de estreptomicina 1000µg/ml e penicilina G 200U/ml, com osmolaridade de 305mOsm e pH 7.4⁽²²⁾. Este meio é capaz de preservar córneas em boas condições por 1 semana.

Kaufman desenvolveu em 1984 um meio intermediário de preservação – K-Sol[®] – que contém sulfato de condroitina 2,5%, meio de cultura de tecido 199, solução tampão HEPES (ácido hidroxietilpiperazina etano-sulfônico) e sulfato de gentamicina 100µg/ml, com uma osmolaridade de 310mOsm e pH de 7.4⁽²²⁾. Neste meio, as córneas demonstraram menos mudanças endoteliais e edema após 2 semanas de preservação quando comparadas ao meio EPII⁽²²⁾, preservando o tecido por até 10 dias a 4°C^(22, 23).

Dexsol[®] foi introduzido como meio de preservação intermediário em 1988 e contém: meio essencial mínimo, sulfato de condroitina 1,35%, dextran 1%, solução tampão HEPES, sulfato de gentamicina, 0,1mmol/L de aminoácidos não essenciais, bicarbonato de sódio, 1mmol/L de piruvato de sódio e antioxidantes adicionais, sendo capaz de preservar o tecido corneano por até 10 dias a 4°C⁽²³⁾.

Em 1991, o Optisol[®], um meio de preservação intermediário que combina as vantagens de 2 meios previamente desenvolvidos, K-Sol[®] e Dexsol[®] chegou ao mercado. Contém meio de cultura de tecido 199, sulfato de condroitina

2,5%, dextran 1%, solução tampão HEPES, sulfato de gentamicina e estreptomicina, precursores de adenosina trifosfato (adenosina, inosina e adenina), ferro, colesterol, 0,1mmol/L de aminoácidos não essenciais, bicarbonato de sódio, 1mmol/L de piruvato de sódio, L-hidroxiprolina e vitaminas (cobalamina, ácido ascórbico, α -tocoferol, D-biotina, calciferol, niacina, piridoxina e ácido p-aminobenzóico^(23, 24). É considerado o meio de escolha para a preservação de tecido corneano na atualidade, mantendo a córnea viável por até 2 semanas se armazenada a uma temperatura de 4°C⁽²³⁾.

A cultura de tecido corneano a 37°C pode preservar o tecido por até 1 mês. Este método tende a simular as condições fisiológicas normais mantendo as córneas em meio essencial mínimo de Eagle por várias semanas em incubação a 37°C⁽¹⁷⁾. Suas desvantagens são: a alta complexidade, supervisão técnica experiente, alto custo e risco de infecção⁽²⁵⁾. O processo pode ser realizado com variadas temperaturas de incubação (37°C, 34°C, 31°C, temperatura ambiente e 4°C), a qual não parece ser um fator importante a não ser que a temperatura esteja muito alta ou muito baixa⁽¹⁷⁾.

A criopreservação, inicialmente descrita por Capella e Kaufman em 1965 e seguida por outros autores⁽²⁶⁻²⁸⁾, consiste na colocação das córneas doadoras dentro de uma série de 4 soluções gradientes contendo: albumina humana, sacarose e dimetilsulfoxide com resfriamentos seqüenciais de 10 minutos a 4°C entre cada etapa. No último ciclo é feito um congelamento durante 30 minutos através de um aparelho com controle de temperatura, que utiliza o nitrogênio líquido para congelamento do tecido a -80°C. A córnea fica então armazenada em um tanque de nitrogênio líquido a -196°C, por período de tempo variável, até o momento do uso. Para ser utilizada, a córnea é mergulhada em banhos de imersão em água quente a 60°C por 45 segundos, seguido novamente da lavagem com albumina humana 25%, devendo ser utilizada imediatamente devido à perda celular⁽²⁶⁻²⁸⁾. Para este método não devem ser utilizadas córneas com tempo de óbito maior que 6 horas⁽²⁷⁾.

A partir do trabalho descrito por Capella, tentou-se simplificar o método da criopreservação utilizando outros crioprotetores, entre eles, o dimetilsulfoxide (DMSO), meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM), soro fetal de

gado (FCS) e 1,2-propanediol (PROH). Entretanto, os resultados encontrados foram muito variáveis, onde alguns autores observaram densidade endotelial de 753 ± 542 cel/mm² ⁽²⁹⁾ até 2559 cel/mm² ⁽³⁰⁾.

King em 1962 desenvolveu um meio para preservar córneas por longos períodos, sem viabilidade endotelial. No seu método, 10g de um absorvente molecular dentro de uma rede de nylon é colocado dentro de frascos de 15ml. Os frascos são então colocados em um esterilizador de calor à seco a 180°C por 1 hora. Durante o resfriamento, cada frasco é preenchido com glicerina estéril a 95%, a córnea é adicionada e o frasco é lacrado sendo deixado uma pequena bolha de ar dentro do mesmo. As córneas, por este método, foram armazenadas em temperatura ambiente por 2 a 12 meses. No momento da utilização da córnea, o frasco foi aberto sob condições estéreis e a glicerina decantou. A córnea foi então reidratada numa mistura de antibióticos por 10 minutos. Ele utilizou 8 destas córneas em 8 pacientes para transplante lamelar, tectônico ou óptico, com sucesso⁽³¹⁾.

McNair em 1954 desidratou córneas e as utilizou em gatos. No método utilizado córneas inteiras foram colocadas em solução contendo 15% de glicerina e salina isotônica. O conteúdo foi então congelado em gelo seco. Uma bomba de vácuo foi conectada ao conteúdo e a água removida. A temperatura da solução foi mantida suficientemente baixa para prevenir que a água evaporasse muito rapidamente. Com isto as córneas se mantiveram numa solução contendo 100% de glicerina. Quando toda a água foi removida e a desidratação completa, as córneas foram armazenadas em frascos lacrados em temperatura ambiente. No dia da cirurgia, as córneas foram reidratadas com solução salina por 20 minutos. Os transplantes em gatos permaneceram claros por 10 meses⁽³²⁾.

2.3 – Liofilização como método de preservação

Liofilização ou congelamento a seco permite a secagem de drogas e materiais biológicos termossensíveis em baixa temperatura, sob condições que permitam a remoção da água por sublimação, ou mudança do estado sólido para o

vapor sem passar pela fase líquida. Uma vez que a secagem ocorre em baixas temperaturas, a decomposição química é mínima⁽¹⁰⁾.

A liofilização como processo comercial foi introduzida durante a 2^a guerra mundial para a preservação de plasma sanguíneo e produção da penicilina e outros antibióticos. Este processo continua sendo amplamente utilizado pela indústria farmacêutica na confecção de vacinas, esteróides e vitaminas⁽¹⁰⁾.

Para liofilizar um produto, primeiro o mesmo é congelado a uma temperatura baixa o suficiente que permita a solidificação completa do conteúdo dentro do frasco. Então a câmara de liofilização é evacuada até que a pressão seja menor que a pressão de vapor do gelo na temperatura do produto. Após esta pressão ser alcançada, é aplicado calor nas prateleiras para fornecer a energia necessária para a sublimação do gelo. Durante o processo de secagem a camada de gelo reduz de espessura, enquanto o conteúdo sólido parcialmente seco aumenta de espessura. Esta fase é conhecida como secagem primária. Quando todo o gelo é retirado, um tempo adicional de secagem é necessário para remover a água aprisionada na matriz sólida. Esta fase é conhecida como secagem secundária. Quando o produto está suficientemente seco, os frascos são automaticamente lacrados por compressão hidráulica da prateleira, o que empurra o lacre do frasco para a sua posição inicial sob vácuo⁽¹⁰⁾.

Observa-se que a liofilização ocorre antes de atingir o triplo ponto (0,0098°C e 4,58mmHg de pressão de vapor de água) onde gelo, água e vapor de água coexistem em equilíbrio. Abaixo do triplo ponto, a água passa do estado sólido para o vapor sem a fase intermediária líquida. A sublimação pode ocorrer em pressão atmosférica desde que a pressão de vapor de água esteja abaixo de 4,58mmHg e este processo é muito longo, uma vez que depende da difusão molecular da água contra um gradiente de pressão⁽¹⁰⁾.

Para garantir a eficiência máxima do processo de liofilização, é importante que a temperatura do produto seja mantida o mais alto possível, sem exceder a temperatura máxima permitida durante a secagem. E, esta temperatura máxima do produto permitida é determinada ou pela temperatura eutética de degelo ou

pela temperatura de colapso do produto. Caso esta temperatura seja excedida, o produto pode se tornar inaceitável⁽¹⁰⁾.

A taxa de evaporação ou sublimação (W) de qualquer substância pode ser calculada pela seguinte fórmula: $W = 5,83 \times 10^{-5} P_{\mu} (M/T)^{1/2} \text{ g cm}^{-2}\text{s}^{-1}$, onde P_{μ} é a pressão de vapor em μmHg , M é o peso molecular da substância e T é a temperatura em $^{\circ}\text{K}$. Com isto observa-se que esta taxa de sublimação é um processo muito rápido, não sendo este um fator limitante durante o processo de liofilização⁽¹⁰⁾.

Para um produto estar bem liofilizado é necessário que o mesmo recupere a sua origem química ou potência biológica após a sua reconstituição, tenha uma dissolução rápida e completa e apresente um nível apropriado de umidade⁽¹⁰⁾.

Em 1947, córneas de coelho foram liofilizadas e transplantadas. Os tecidos foram imersos diretamente em nitrogênio líquido a -195°C e após o congelamento, foram transferidos para frascos que estavam conectados a um vácuo entre 1-5mmHg. A evacuação do tecido foi realizada por quatro a cinco dias numa temperatura constante de -38°C e por mais um dia adicional a 20°C , para eliminar qualquer umidade residual do mesmo. Os frascos foram então lacrados a vácuo. Durante a reidratação, o frasco inteiro foi mergulhado em álcool por 10 minutos e lavado com solução salina. A tampa do frasco era então imersa e quebrada na solução reidratante, para que o líquido fosse sugado para dentro do frasco pelo vácuo e a córnea entre 30 a 60 minutos tornava-se clara. As soluções reidratantes usadas foram: Ringer-lactato, cloreto de sódio a 0,9%, 1,2% e 1,5%, soro ou humor aquoso. Com este método foram transplantadas 59 córneas liofilizadas, onde 19 apresentaram neovascularização corneana, seis tiveram sinais de infecção e nove apresentaram edema corneano persistente. Vinte e cinco enxertos não apresentaram nenhuma complicação, entretanto, por este método nenhuma das 59 córneas liofilizadas ficaram transparentes durante os 6 meses de observação⁽³³⁾.

Payrau em 1957 realizou 6 transplantes lamelares e 1 transplante penetrante tectônico com córneas liofilizadas em humanos. Três dos 6 transplantes lamelares tiveram sucesso, assim como o transplante penetrante de 5mm realizado em

uma úlcera infectante perfurada, apesar de este último apresentar descemet e endotélio opacificados⁽³⁴⁾.

Maguen em 1983 realizou , com sucesso, ceratoplastia refrativa com córnea liofilizada em animais. Neste trabalho, a córnea era embebida por quatro horas em 0,5ml de solução crioprotetora, a qual consistia de 37ml de plasma fresco congelado, 3ml de dimetilsulfoxide, 4g de cristais de sacarose e 81mg de kiton verde. O material congelado foi esculpido para epiceratofacia e liofilizado no liofilizador Labconco 5 a -35°C e 10mTorr de vácuo por 16 horas. O aquecimento secundário foi então iniciado e atingiu 24°C, quando então o conteúdo estaria pronto⁽³⁵⁾.

Em 1992, Chau realizou, com êxito, 3 transplantes lamelares com córnea liofilizada em humanos⁽¹²⁾. Estes casos relatados foram em um paciente com ceratocone, um com cicatriz de herpes zoster e outro com pterígio avançado⁽¹²⁾. E, em 2001 foi publicado um estudo retrospectivo de transplante lamelar profundo com córnea liofilizada pelo *Keratec Eye Bank* em pacientes portadores de ceratocone, onde os resultados foram bastante animadores, porém não há relatos no artigo de como o tecido foi liofilizado⁽³⁶⁾.

2.4 – Transplante lamelar anterior de córnea

Transplante lamelar anterior profundo de córnea, como anteriormente comentado, consiste na colocação de uma córnea doadora dentro de um leito preparado a partir de dissecação lamelar profunda⁽³⁷⁾. A técnica de dissecação é o fator mais importante para obter um leito receptor liso, o qual pode garantir uma acuidade visual pós-operatória superior e baixo astigmatismo⁽¹²⁾.

A dissecação intralamelar pode ser realizada por diferentes técnicas, tais como por ar, metilcelulose, solução salina balanceada e por reflexão em espelho. Anita Panda em 2000 publicou um artigo comparando as diferentes técnicas. Foi observado encurtamento do tempo de dissecação lamelar, quando alguma substância (ar, BSS ou metilcelulose 2%) era injetada intraestromal. Entretanto, a dificuldade em injetar metilcelulose pode causar difusão irregular da mesma na interface em córneas

com cicatriz, resultando em uma dissecação irregular⁽³⁸⁾. Além disso, caso exista alguma patologia estromal, em que a estrutura das fibras de colágeno esteja perdida com formação de cicatriz, o BSS não consegue penetrar no estroma, ocorrendo pouco embranquecimento e edema, o que dificulta a dissecação. No seu trabalho não houve diferença estatisticamente significativa em termos de acuidade visual, refração ou contagem celular nas diferentes técnicas empregadas⁽³⁸⁾.

Em 14 olhos transplantados por transplante lamelar com córneas preservadas em optisol, a média da melhor acuidade visual corrigida foi de 20/28 e a média de ceratometria pós-operatória foi de 46.733 dioptrias após seis meses de acordo com Caporossi⁽³⁹⁾. Price realizou o procedimento em 10 olhos, em três teve que converter a cirurgia para transplante penetrante e nos outros sete teve uma acuidade visual que variou de 20/25 a 20/60⁽⁴⁰⁾. Em outro trabalho de transplante lamelar profundo por dissecação intracorneana, obteve-se média de melhor acuidade visual corrigida em tabela logmar de 0.104 ± 0.068 ao final de um ano⁽⁴¹⁾.

Outro estudo demonstra não haver diferença significativa na sensibilidade ao contraste entre pacientes que fizeram transplante lamelar e os que fizeram transplante penetrante ($p = 0.38$) e a análise do subgrupo transplante lamelar profundo demonstrou que recipientes com leito residual = $80\mu\text{m}$ na biometria ultrassônica (UBM) tendem a ter uma redução da sensibilidade ao contraste em condições fotópicas⁽⁴²⁾.

A média paquimétrica final encontrada em pacientes operados por ceratocone por Fogla foi de $531 \pm 35.9\mu\text{m}$ ($490 - 614\mu\text{m}$)⁽⁴³⁾.

Foi observado queda da contagem de células endoteliais de 9% no transcorrer de 12 meses e estabilização da contagem celular após este período em 81 pacientes transplantados em um serviço da Itália⁽⁴⁴⁾. Outros trabalhos demonstram contagem celular endotelial mais alta e maior que $2.200 \text{ cel}/\text{mm}^2$ após 6 meses e 1 ano de cirurgia em pacientes operados por transplante lamelar quando comparados a transplante penetrante⁽⁴⁵⁾.

3. MÉTODOS:

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Banco de Olhos de Sorocaba e pelo Comitê de Ética em pesquisa da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP (anexo 1).

O processo de liofilização foi realizado na Ophthalmos Indústria. Os estudos de microscopia eletrônica e de microscopia de luz foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da UNIFESP. Os transplantes foram realizados no Hospital Banco de Olhos de Sorocaba.

3.1. Processo da Microscopia:

Para a conclusão do melhor método de liofilização a ser utilizado em nossos pacientes, foram realizadas diversas tentativas de liofilizar córneas e lamelas, as quais foram avaliadas e comparadas pela microscopia de luz e eletrônica com lamelas não liofilizadas. As lamelas foram confeccionadas a partir de córneas desprezadas pelo Banco de Olhos de Sorocaba devido à sorologia positiva ou por não apresentarem qualidade suficiente para realização de transplante de córnea.

O protocolo para a realização do estudo de microscopia de luz e eletrônica de transmissão consistiu em 6 fases:

Fase I - Fixação I:

Adicionou-se ao tecido avaliado, solução fixadora contendo: glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1mol com pH 7,2.

Fase II – Lavagem I:

Foram feitas três lavagens de 30 minutos cada, com tampão cacodilato de sódio 0,1mol pH 7,2.

Então, lavou-se novamente o conteúdo, deixando-o na solução por um período de 12 horas.

Fase III – Fixação II:

Colocou-se o tecido no tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1mol por duas horas. Esta fase teve por finalidade fazer o contraste das membranas.

Fase IV – Lavagem II:

Foram feitas novamente duas lavagens de 15 minutos cada, com tampão cacodilato de sódio 0,1mol.

Fase V – Desidratação:

Foi realizada com etanol em concentrações crescentes, sendo uma lavagem com etanol 70% por 30 minutos, uma com etanol 90% por 30 minutos e duas com etanol 100% por 30 minutos cada. Após a segunda lavagem com etanol 100%, foram feitas duas lavagens de 30 minutos cada, com óxido de propileno.

Fase VI – Infiltração

Consistiu no preparo dos blocos de parafina para confecção de cortes para microscopia de luz e eletrônica.

Primeiro infiltrou-se o tecido desidratado com mistura de resina tipo Epon com óxido de propileno na proporção de 1:2 por uma hora; a seguir, 1:1 por uma hora; a seguir, 2:1 por uma hora; a seguir, 3:1 por 12 horas. No dia seguinte, infiltrou-se novamente a resina pura por duas horas e em seguida, utilizou-se o vácuo por duas horas para retirar as bolhas do bloco. O mesmo foi então colocado em aparelho de polimerização por 48 horas a 60°C para endurecimento e posterior confecção dos cortes para estudo.

Todas as fotografias de microscopia de luz foram realizadas com aumento de 20x, totalizando nesta apresentação um corte de 50 micra. As fotos de microscopia eletrônica foram tiradas com aumento de 2.500x, 5.000x e 12.000x. As mesmas foram duplicadas na apresentação deste trabalho, sendo seu aumento real de 5.000x, 10.000x e 24.000x, respectivamente.

As várias tentativas de liofilização de tecido corneano testadas até a considerada reprodutível e de qualidade suficiente para transplante lamelar anterior seguem descritas abaixo. Ressalta-se ainda que em algumas etapas, uma córnea do lote liofilizado foi retirada ao término da liofilização para controle de esterilidade através do teste de esterilidade por método direto. Neste método, cortou-se uma córnea ao meio e colocou-se uma metade no caldo de cultura caseína soja e a outra metade no tioglicolato com indicador. O caldo de cultura caseína soja detecta bactérias aeróbias e o tioglicolato detecta bactérias anaeróbias e aeróbias facultativas. O teste demora 14 dias para dar uma resposta que pode se apresentar como turvação ou ausência de turvação do meio, que se traduz em contaminação ou esterilidade do produto, respectivamente.

Para o controle dos resultados de microscopia de luz e eletrônica, utilizaram-se duas córneas com endotélio inviável e duas lamelas de córneas com endotélio inviável, preservadas em optisol GS[®]. Todos os cortes foram avaliados por uma única bióloga especialista em microscopia eletrônica na UNIFESP.

a) 1ª Experiência: Liofilização de lamelas ou *flaps* de córneas sem a utilização de criopreservante:

a.1 – Processo empregado:

1 – Duas lamelas corneanas foram lavadas com solução salina balanceada (BSS);

2 – Colocação das lamelas em frascos estéreis, com cerca de 1ml de BSS em cada frasco;

3 – Disposição dos frascos contendo as lamelas de córneas com BSS em bandeja e colocação de gelo seco circundando os frascos;

4 – Adição de álcool isopropílico no gelo seco para acelerar a redução de temperatura e, por conseguinte, o congelamento da córnea;

5 – Os frascos foram deixados no gelo seco por 1 hora;

6 – Colocação dos frascos contendo as córneas dentro da torre do aparelho liofilizador modelo Modulyon D (BOC Edwards, Surrey, UK) por 23 horas à -40°C e vácuo entre 1 e 2mbar;

7 – Após a 23ª hora na torre, fez-se o fechamento a vácuo dos frascos e iniciou-se o aquecimento ou secagem secundária;

8 – Completada a liofilização, após sete dias, as lamelas foram reidratadas, sendo uma delas com 5ml de água destilada por 30 minutos e a outra colocada diretamente no fixador gluteraldeído-formaldeído (KM).

9 – Análise das lamelas pela microscopia de luz e microscopia eletrônica.

b) 2ª Experiência: Liofilização de lamelas de córneas, utilizando substância criopreservante – sacarose 2,3 molar:

Nesta etapa, foram utilizadas cinco lamelas de córneas que durante 60 minutos, foram protegidas para a criopreservação com sacarose 2,3 molar. Para a reidratação, utilizaram-se substâncias variadas, no intuito de descobrir a que preservaria mais a estrutura da córnea. O fixador foi novamente utilizado em uma das lamelas para determinar se o nosso processo de liofilização estava sendo deletério ou não para a córnea. Uma das córneas liofilizadas, não foi reidratada para ser enviada para o teste de esterilidade.

b.1 – Processo empregado:

1 – Cinco lamelas corneanas foram lavadas com BSS;

2 – Colocação das lamelas em frascos estéreis, com cerca de 1,5ml de sacarose 2,3 molar por 60 minutos em cada frasco;

3 – Disposição dos frascos em bandeja e colocação do gelo seco circundando os frascos;

4 – Repetiu-se as fases de quatro a sete da primeira experiência

5 – Completada a liofilização, após sete dias, quatro lamelas foram reidratadas, sendo que uma foi colocada no fixador gluteraldeído-formaldeído (KM); uma foi reidratada com 5ml de água destilada por 30 minutos; outra foi reidratada com 5ml de solução tampão-fosfato (PBS) e a última reidratada com 5ml de BSS. A quinta lamela foi enviada sem reidratação para o controle de esterilidade;

6 – Análise das lamelas pela microscopia de luz e microscopia eletrônica.

c) 3ª Experiência: Liofilização de lamelas corneanas com a utilização de sacarose como crioprotetor e distribuição das mesmas segundo o tempo de preservação e forma de reidratação:

Nesta etapa, as lamelas foram distribuídas em dois grupos principais de liofilização: córneas novas (córneas com até 10 dias de preservação) e córneas antigas (córneas com mais de 10 dias de preservação). Os dois grupos foram novamente redistribuídos, onde um foi escolhido para controle (sem liofilização), outro para reidratação com optisol ou BSS.

Nesta fase foi feito o cálculo de osmolaridade para reidratação das córneas e encontrou-se o valor de 11ml de solução de reidratação quando são utilizados 1,5ml de sacarose para atingir-se uma osmolaridade de 314mOsm/l, que seria o mais próximo da córnea normal. As córneas ficaram embebidas na sacarose por 40 minutos.

c.1 – Processo empregado:

- 1 – Oito lamelas corneanas foram lavadas com BSS;
- 2 – Colocação em frascos estéreis, com 1,5ml de sacarose 2,3 molar em cada frasco por 40 minutos;
- 3 – Colocação dos frascos contendo as lamelas com sacarose em bandeja e colocação do gelo seco circundando os frascos;
- 4 – Repetiu-se as etapas de quatro a sete da primeira experiência.

5 – Completada a liofilização, após sete dias, as lamelas foram reidratadas em três lavagens num total de 30 minutos, sendo quatro lamelas com 11ml de optisol e quatro com 11ml de BSS;

6 – Análise das lamelas pela microscopia de luz e microscopia eletrônica.

d) 4ª Experiência: Liofilização das lamelas de córneas novas com sacarose e reidratação com BSS:

Nesta nova etapa, tentou-se avaliar a reprodutibilidade do método desenvolvido, sendo utilizadas para a liofilização, córneas contaminadas ou classificadas para anátomo-patológico, com tempo de preservação de até 10 dias. A sacarose foi novamente o crioprotetor, sendo utilizado no volume de 1,5ml e sendo as lamelas reidratadas com três lavagens de 11ml de BSS. A reidratação foi realizada após 15 dias, 30 dias e um ano da liofilização. Outra córnea foi enviada para o teste de esterilidade.

d.1 – Processo empregado

1 – Sete lamelas corneanas foram lavadas com BSS;

2 – Colocação em frascos estéreis, com 1,5ml de sacarose 2,3 molar em cada frasco por 40 minutos;

3 – Colocação dos frascos contendo sacarose em bandeja e colocação do gelo seco circundando os frascos;

4 – Repetiram-se as etapas de quatro a sete da primeira experiência;

5 – Completada a liofilização, após 15 dias, 30 dias e um ano, seis lamelas foram reidratadas com três lavagens de 11 ml de BSS num total de 30 minutos; Uma lamela foi enviada sem reidratação para o controle de esterilidade.

6 – Análise das lamelas pela microscopia de luz e microscopia eletrônica.

e) 5ª experiência: Liofilização de córneas inteiras e de lamelas corneanas:

Esta etapa visou estabelecer se existia alguma diferença entre a liofilização de córneas inteiras ou de lamelas corneanas. Novo controle de esterilidade foi realizado.

e.1 – Processo empregado:

1 – Três córneas e de duas lamelas de córneas foram lavadas com BSS;

2 – Colocação em frascos estéreis, com 1,5ml de sacarose 2,3 molar em cada frasco por 40 minutos;

3 – Colocação dos frascos contendo sacarose em bandeja e colocação do gelo seco circundando os frascos;

4 – Repetiram-se as etapas de quatro a sete da primeira experiência

5 – Completada a liofilização, após sete dias, duas lamelas e duas córneas foram reidratadas com três lavagens de 11ml de BSS durante 30 minutos. Uma lamela foi enviada para o controle de esterilidade;

6 – Análise dos tecidos pela microscopia de luz e microscopia eletrônica.

3.2. Liofilização das córneas utilizadas para transplante de córnea em humanos:

Um ensaio clínico prospectivo e randomizado foi realizado em 20 pacientes portadores de ceratocone, indicados para cirurgia de transplante de córnea no Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo e no Banco de Olhos de Sorocaba / Hospital de Olhos de Sorocaba. Formaram-se dois grupos de pacientes, sendo que no grupo de intervenção (grupo um) foram utilizados enxertos de córneas liofilizadas para o transplante lamelar e no grupo controle (grupo 2), enxertos de córneas preservadas em Optisol GS®.

Nesta etapa, dez botões de córneas, com endotélios não viáveis e preservados em optisol GS[®], após a autorização e liberação da Central de Transplantes de São Paulo, foram liofilizados e transplantados nos pacientes que participaram do protocolo e que foram randomizados para o grupo da liofilização. As córneas possuíam tempo de preservação em optisol de até 14 dias

Processo empregado:

1 – Dez córneas com endotélio inviável, preservadas em optisol GS[®], foram lavadas com BSS;

2 – Colocação das córneas em frascos estéreis, com cerca de 1,5ml de sacarose 2,3 molar em cada frasco. As córneas foram deixadas na sacarose por 40 minutos;

3 – Colocação dos frascos contendo sacarose em bandeja e colocação do gelo seco circundando os frascos;

4 – Adição de álcool isopropílico no gelo seco para acelerar a redução de temperatura e, por conseguinte, o congelamento da córnea;

5 – Os frascos foram deixados no gelo seco por uma hora;

6 – Colocação dos frascos contendo as córneas dentro da torre do aparelho liofilizador por 23 horas à -40°C e vácuo entre 1-2mbar;

7 – Após a 23^a hora na torre, foi feito o fechamento à vácuo dos frascos e iniciou-se a secagem secundária;

8 – A liofilização está completa;

9 – No dia da cirurgia, as córneas foram reidratadas por 30 minutos com três lavagens, sendo cada uma por 10 minutos com 11ml de BSS.

A técnica cirúrgica utilizada foi a de dissecação por ar, que consistiu nestes pacientes, na demarcação da córnea em 8,0mm com um trépano manual Katena[®], seguida da inserção de ar por uma agulha de insulina no estroma profundo, com o intuito de separar o estroma da membrana de Descemet. Em seguida, com uma lâmina 11, foi realizada uma incisão na córnea receptora até a Descemet. Com uma espátula de íris e a lâmina 11, divulsionou-se o estroma da Descemet, em passos de dividir e conquistar e ressecou-se o resto do estroma com tesoura. A córnea doadora foi trepanada através de um punch de 8,0mm da Katena[®] e suturada sobre o leito

receptor com 16 pontos interrompidos, sem retirarmos a sua Descemet. Os pacientes foram operados pelo mesmo cirurgião e acompanhados pelo mesmo examinador.

No pós-operatório, os pacientes utilizaram colírio de acetato de prednisolona 1%, 8 x dia por 20 dias, com redução gradual da medicação até o terceiro mês. A moxifloxacina 0.5% foi utilizada 4 x dia por 20 dias. Não foi realizado tarsorrafia ou utilização de toxina botulínica em nenhum dos dois grupos. Os pontos foram retirados segundo o astigmatismo refracional e a topografia a partir do terceiro mês.

Nos dois grupos, o pós-operatório dos pacientes foi acompanhado regularmente pelo mesmo examinador através da medida visão pela tabela do ETDRS (Logmar), pressão ocular através do tonômetro de aplanção de Goldmann e biomicroscopia óptica em lâmpada de fenda Topcon SL-E para avaliar a clareza do enxerto, existência ou não de rejeição, dobras do leito receptor e opacidade do tecido doador.

Os seguintes exames complementares foram realizados: topografia ou videoceratografia computadorizada, topografia de varredura em fenda (ORBSCAN[®]), microscopia especular, paquimetria ultra-sônica, microscopia confocal, biomicroscopia ultra-sônica (UBM) e avaliação da sensibilidade ao contraste.

O exame de topografia ou videoceratografia computadorizada foi realizado no pré-operatório e mensalmente no pós-operatório pelo topógrafo Eyemap EH-290 win (Alcon Laboratories Inc, Irvine, CA, USA) por tecnóloga treinada do Banco de Olhos de Sorocaba (BOS).

O exame de topografia de rastreamento em fenda foi realizado pelo aparelho ORBSCAN IIZ *Anterior Segment Analyzer Acquisition* (Bausch & Lomb Incorporated, Rochester, NY, USA) no pré-operatório e a cada três meses após a cirurgia por tecnóloga treinada do BOS.

A microscopia especular da córnea foi realizada pelo aparelho de não contato SP 2000P (Topcon Corporation, Tokyo, Japan) no pré-operatório e a cada

três meses após a cirurgia por uma tecnóloga do BOS. O exame foi aferido três vezes na região central da córnea de cada paciente.

A paquimetria corneana foi realizada pelo paquímetro ultra-sônico Ultrasonic Pachymeter (Alcon Surgical, Forth Worth, TX, USA) no pré-operatório e a cada três meses por tecnóloga do BOS. Foram realizadas quatro medidas na região da córnea central do paciente e quatro medidas da córnea periférica, sendo que o resultado obtido refere-se ao valor de menor espessura da córnea central. Este resultado foi comparado com a paquimetria óptica obtida pelo ORBSCAN®.

A microscopia confocal que consiste num método não invasivo para estudo histológico *in vivo* da córnea, foi realizada no 21º dia e no terceiro mês de pós-operatório através do aparelho Heidelberg Retina Tomograph II/ Rostock Córnea Module (HRT II/ RCM) da Heidelberg Engineering por uma médica oftalmologista observadora da Escola Paulista de Medicina que desconhecia qual o tipo de tecido foi usado. A finalidade maior da realização deste exame era avaliar os ceratócitos no estroma doador, os quais eram identificados como estruturas hiper-refletivas de limites bem determinados (aparecem em branco). A contagem foi realizada no estroma médio entre 150 e 200µm, no centro da córnea, numa área equivalente a 0,1539 mm².

No sexto mês de pós-operatório, a microscopia confocal foi realizada pelo aparelho Confoscan II (Nidek, Gamagori, Japan) pela mesma médica observadora no Hospital Santa Cruz. Isto ocorreu devido a problemas técnicos com o aparelho anterior, que não conseguiram ser solucionados até o fim deste trabalho.

A técnica de biomicroscopia ultra-sônica ou ultra-sonografia de alta frequência foi realizada em todos os olhos no sexto mês pós-operatório através do biomicroscópio ultra-sônico (Ultrasound Biomicroscope, Humphrey Instruments Inc. San Leandro, Califórnia, EUA) que utiliza um transdutor de 50 MHz por uma médica especialista no exame na Escola Paulista de Medicina. A técnica consiste em: paciente colocado em decúbito dorsal horizontal, instilação de colírio anestésico (Anestalcon, Alcon, Brasil), posicionamento de cuba de acrílico entre as pálpebras e preenchimento

do espaço com colírio de solução de metilcelulose a 2% (farmácia Ophthalmos, Brasil), acionando-se o pedal para permitir imagem em tempo real.

As imagens capturadas consistiram em cortes axiais, adquiridas com ganho de 60 dB e com foco na córnea. Após captura e gravação das imagens, foi realizada a mensuração da espessura de: córnea total, lamela anterior transplantada e leito receptor. A espessura foi medida utilizando-se um instrumento de medição incorporado no equipamento, em que se posiciona uma extremidade de um segmento de reta (*segment*) no limite posterior da estrutura a ser medida e mobiliza-se a outra extremidade até seu limite anterior, obtendo-se o valor da espessura da estrutura no monitor, em milímetros (Ex: *segment* = 0,xxx mm).

A sensibilidade ao contraste foi realizada no sexto mês de pós-operatório através do aparelho *Functional Acuity contrast Test* (F.A.C.T.) (Stereo Optical Co, Inc, Chicago, IL, USA) para perto pela própria autora. O exame consiste na observação pelo paciente de cinco linhas contendo nove quadrados que no seu interior apresentam linhas de contraste e espessura cada vez mais tênues ora inclinadas para a esquerda, ora para a direita e ora retas. A tabela de sensibilidade é colocada a 46cm do paciente, o qual está usando a melhor correção. A tabela é iluminada por um foco de luz e o paciente é sequencialmente perguntado sobre a inclinação das linhas dentro dos quadrados. A melhor resposta foi anotada e a acuidade visual foi comparada com a acuidade visual de Snellen que está sobreposta na tabela⁽⁴⁶⁾.

No terceiro e no sexto mês de pós-operatório um questionário de avaliação de qualidade de vida para portadores de catarata, adaptado a partir do *Visual Function Quality test* (VFQ) para o Brasil, foi aplicado nos pacientes. Este questionário consiste de 25 perguntas e avalia as condições de saúde geral; atividades de vida diária como: ler jornal, costurar, cozinhar, ler placas, dirigir, descer escadas, conversar com pessoas, diferenciar cores, além de questões psicológicas⁽⁴⁷⁾.

No 21º dia, no terceiro mês e no sexto mês de pós-operatório, o olho operado foi documentado por fotografia em lâmpada de fenda por tecnólogo treinado da Escola Paulista de Medicina. No terceiro mês, houve a avaliação da córnea transplantada por um examinador mascarado. No sexto mês de pós-operatório, dois

examinadores mascarados, especialistas em córneas, avaliaram os pacientes, a qualidade do tecido transplantado e tinham por finalidade identificar se a córnea avaliada era liofilizada ou não.

3.3. Critérios de inclusão:

- Pacientes com diagnóstico de ceratocone, e com acuidade visual menor ou igual a 20/60 mesmo com uso de lente de contato e/ou intolerantes ao uso de lente de contato com indicação para transplante de córnea.

3.4. Critérios de exclusão:

- Pacientes com opacidade profunda secundária à rotura de Descemet;

- Pacientes que não tenham compreendido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2);

- Presença de gestação ou doenças reumatológicas.

Foi realizada uma avaliação da qualidade das córneas doadas e transplantadas para possível comparação com os resultados encontrados em termos de qualidade de visão dos pacientes transplantados. No anexo 3, observam-se as características das córneas utilizadas para transplantes.

Antes e após os transplantes os pacientes realizaram os exames anteriormente citados e seus dados foram estatisticamente analisados por uma bioestatística pelo sistema SPSS para Windows versão 12.0.

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta e relativa (%) e as quantitativas por média, desvio padrão (dp), mediana, valores mínimo e máximo.

Testes não paramétrico foram utilizados devido ao pequeno número de casos e à natureza das variáveis. As variáveis ordinais foram recodificadas em números para possibilitar aplicação de teste estatístico.

As técnicas foram comparadas quanto às variáveis quantitativas pela Prova de Mann-Whitney e quanto às variáveis qualitativas pelo Teste do Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher.

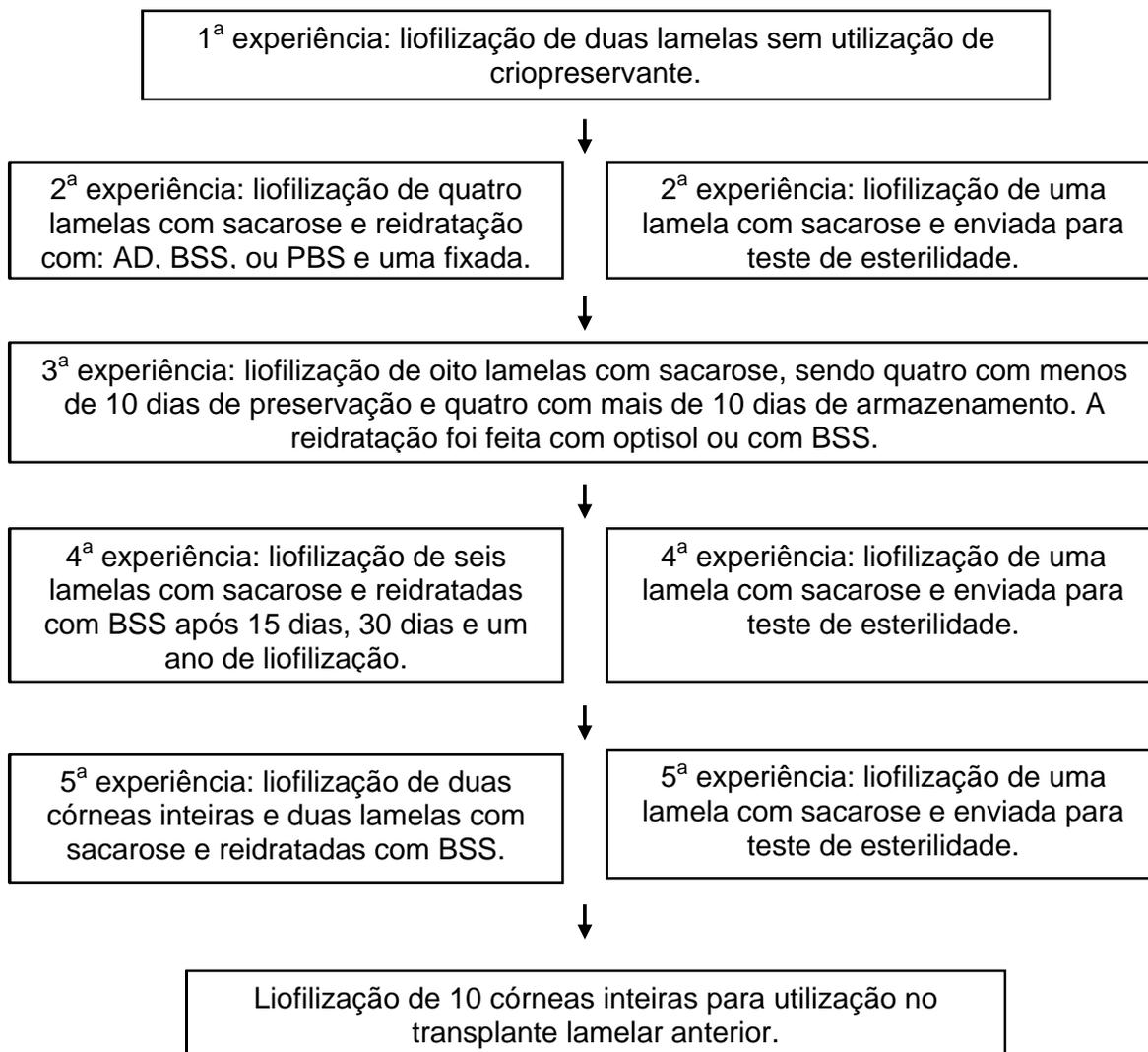
A concordância entre as avaliações de um mesmo examinador e entre os examinadores foi avaliada pelo Teste de McNemar.

Os grupos de resposta quanto ao tecido ser liofilizado foram comparados quanto à opacidade do doador e transparência pela Prova de Kruskal-Wallis e as diferenças localizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

A Prova de Friedman foi aplicada para comparar as diferentes avaliações no decorrer do tempo.

A Prova de Wilcoxon foi aplicada para comparar as medidas de confocal e UBM, paquimetria do orbscan e paquimetria ultra-sônica. A presença de correlação entre variáveis quantitativas foi avaliada pelo coeficiente de correlação por postos de Spearman (r_s).

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$) em todos os testes estatísticos realizados.

Gráfico 1: Fluxograma do resumo das tentativas de liofilização:

4. RESULTADOS

No transcorrer da metodologia desta pesquisa, observou-se a necessidade da utilização de um criopreservante que, no caso, foi a sacarose. A utilização desta tinha por finalidade impedir a desestruturação interna dos componentes da córnea e a destruição do arcabouço ou estrutura anatômica geral da córnea.

Outro passo importante foi a reidratação. Pois algumas substâncias quando entravam em contato com a córnea liofilizada, aceleravam a destruição celular com rotura de suas membranas.

Após a descrição da anatomia histológica dos controles, os resultados de cada experiência de liofilização estão demonstrados, desde a primeira tentativa até a considerada de melhor conservação: liofilização com sacarose e reidratação com BSS.

4.1. Análise histológica com a Microscopia de luz e com a Microscopia eletrônica:

a – Controles: córneas não liofilizadas preservadas em optisol por até 14 dias (anexo 4, figuras 1 e 2 e anexo 5, figuras 19, 21 e 23):

Na microscopia de luz, a estrutura geral da córnea encontrou-se preservada, em cujo corte transversal da córnea nova (anexo 4, figura 1) se observou o epitélio com cinco camadas e o paralelismo estromal com a presença dos ceratócitos.

Na microscopia eletrônica, o paralelismo normal das fibras de colágeno encontrava-se mantido em todas as disposições. O ceratócito preenchia todo o seu espaço, porém algumas vezes apresentava descontinuidade da sua membrana celular, conforme a figura 19 do anexo 5. Foram observados o núcleo e o citoplasma com as diversas organelas, porém com excesso de vacúolos no ceratócito, indicando sofrimento do mesmo.

Observou-se o epitélio estratificado pavimentoso com três camadas, a membrana basal epitelial e a camada de Bowman com sua zona anterior densa e a mais profunda, mais clara e de padrão reticulado, conforme a figura 21 do anexo 5. O estroma anterior também pode ser observado com um ceratócito entremeando as fibras de colágeno.

b – 1ª experiência de liofilização: sem utilização de criopreservantes.

b.1 – Lamelas de córnea liofilizadas com BSS e reidratadas com água destilada (anexo 4, figura 3):

À microscopia de luz observou-se desorganização da estrutura da córnea, com lamelas de colágeno irregulares e ausência de ceratócitos entre as mesmas. À microscopia eletrônica, observou-se edema do ceratócito com irregularidade e destruição de sua membrana celular, além de desorganização estrutural da córnea, semelhante ao encontrado na figura 17 do anexo 5. Observou-se ainda perda da membrana basal epitelial nos cortes estudados.

b.2 – Lamela de córnea liofilizada com BSS e sem reidratação (anexo 4, figura 4 e anexo 5, figura 17):

Foi observada irregularidade da estrutura da córnea com alteração das lamelas estromais, ora com espaçamento aumentado entre si, ora com compactação e apinhamento da sua estrutura. Evidenciou-se a presença de fragmentos de ceratócitos entre lamelas. À microscopia eletrônica, observou-se

irregularidade das fibras de colágeno estromais, perda da membrana basal epitelial e presença de raros ceratócitos, os quais se encontravam compactados com descontinuidade da sua membrana celular.

c - 2ª experiência de liofilização: criopreservação com sacarose

c.1 – Liofilização com sacarose por 1 hora, fixação com gluteraldeído-formaldeído, porém sem reidratação (anexo 4, figura 5 e anexo 5, figura 18):

Através da microscopia de luz observou-se a preservação da estrutura corneana, porém com raros ceratócitos. À microscopia eletrônica, os ceratócitos estavam presentes, alguns com membrana celular íntegra, porém com ausência de organelas visíveis. O núcleo encontrava-se compactado e com cromatina disposta na periferia. O paralelismo e organização das fibras de colágeno estavam mantidos. Observou-se a integridade da camada de Bowman e membrana basal epitelial (semelhante ao anexo 5, figura 24).

c.2 – Liofilização com sacarose por uma hora e reidratação com água destilada (anexo 4, figura 6):

Nas microscopias de luz e eletrônica, observou-se a arquitetura corneana desorganizada e tortuosa, não ocorrendo os espaçamentos regulares entre as lamelas. Algumas áreas apresentavam ceratócito colapsado com aumento do espaço entre as fibras onde o mesmo deveria estar alojado. O paralelismo das fibras de colágeno estava mantido, contudo os espaços entre as lamelas eram variáveis.

c.3 – Liofilização com sacarose por uma hora e reidratação com solução salina balanceada (BSS) (anexo 4, figura 7):

À microscopia de luz, a estrutura corneana encontrava-se mantida, com paralelismo e espaçamento normal entre as lamelas. À microscopia eletrônica,

observou-se alteração do ceratócito, com compactação do núcleo e do citoplasma, porém com membrana celular descontínua. O paralelismo e a disposição das fibras de colágeno estavam mantidos, porém com discreta tortuosidade das mesmas em alguns cortes. A membrana basal epitelial encontrava-se íntegra e, em algumas regiões, podiam-se visualizar os hemidesmosmosos. A disposição aleatória das fibras de colágeno da camada de Bowman encontrava-se mantida (semelhante ao anexo 5, figuras 20 e 24).

c.4 – Liofilização com sacarose por uma hora e reidratação com solução tampão fosfato-salina (PBS) (anexo 4, figura 8):

À microscopia de luz observou-se entrelaçamento e compactação da arquitetura estromal, com alguns ceratócitos presentes. À microscopia eletrônica, observou-se a perda total da estrutura do ceratócito, não preenchendo o espaço entre as lamelas. Fibras de colágeno íntegras, com preservação do paralelismo.

d – 3ª experiência de liofilização: A partir daqui, padronizou-se a utilização da sacarose como crioprotetor por 40 minutos com o intuito de obter uma menor desidratação do interior das células.

d.1 – Lamela de córnea nova liofilizada com sacarose por 40 minutos e reidratada com BSS (anexo 4, figura 9):

Na microscopia de luz observou-se o arcabouço corneano preservado, com manutenção do paralelismo das lamelas estromais e com densidade de ceratócitos entre lamelas relativamente normais. O epitélio encontrava-se presente, porém com menor número de células e com algumas delas com alterações de suas estruturas. O epitélio apresentou-se relativamente separado da camada de Bowman quando comparado à córnea nova não liofilizada (anexo 4, figura 1).

Na microscopia eletrônica, alguns ceratócitos encontravam-se inteiros, porém com mais vacúolos no seu interior. Os núcleos apresentavam-se colapsados com eucromatina alterada. As fibras de colágeno apresentavam disposição e estrutura preservadas. O epitélio apresentava-se frouxamente aderido à camada de Bowman, porém com visualização da membrana basal epitelial contínua, com presença de hemidesmossomos (anexo 5, figuras 20, 22 e 24).

d.2 - Lamela de córnea nova liofilizada com sacarose por 40 minutos e reidratada com optisol GS[®] (anexo 4, figura 10):

Os achados de microscopia de luz foram semelhantes aos da córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS, exceto pela redução na densidade de ceratócitos estromais. Na microscopia eletrônica, poucos ceratócitos conservavam a estrutura. As fibras de colágeno mantiveram-se inalteradas. A membrana basal epitelial e a camada de Bowman eram normais semelhantes ao controle.

d.3 – Lamela de córnea antiga liofilizada com sacarose e reidratada com BSS (anexo 4, figura 11):

Através da microscopia de luz observou-se a preservação da estrutura anatômica da córnea, porém com resquício de epitélio e densidade reduzida de ceratócitos. Foi observado discreto aumento de tortuosidade entre as lamelas.

Na microscopia eletrônica, observaram-se ceratócitos rotos ou com descontinuidade de sua membrana celular. As fibras de colágeno apresentavam estrutura e disposição preservadas. A camada de Bowman encontrava-se íntegra semelhante ao anexo 5, figura 24.

d.4 – Lamela de córnea antiga liofilizada com sacarose e reidratada com optisol GS® (anexo 4, figura 12):

Na microscopia de luz observou-se arcabouço corneano preservado, porém com discreto aumento da irregularidade entre lamelas. À microscopia eletrônica, a lamela encontrava-se semelhante a da córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS.

e) 4ª experiência de liofilização: Análise da reprodutibilidade do método com leitura das lâminas após 15 dias, 30 dias e 1 ano da liofilização.

e.1 - Liofilização de lamelas de córneas novas com sacarose por 40 minutos e reidratação com BSS por 30 minutos após 15 dias da liofilização (anexo 4, figura 13 e anexo 5, figura 22):

Na microscopia de luz observou-se a preservação da estrutura anatômica da córnea, porém o espaçamento entre as lamelas era variável e dependia da persistência ou não de ceratócitos ou restos deles entre as lamelas. Entretanto, isto é apenas um achado, pois na grande maioria das vezes, as células não eram funcionais.

À microscopia eletrônica, a lamela apresentou ceratócito compacto com núcleo uniforme, sem grumos de cromatina. A membrana basal e a camada de Bowman com o seu aspecto de fibras de colágeno entrelaçadas estavam preservadas. As fibras de colágeno do estroma encontravam-se inalteradas.

e.2 - Liofilização de lamelas de córneas novas com sacarose por 40 minutos e reidratação com BSS por 30 minutos após 30 dias da liofilização (anexo 4, figura 14):

Os achados de microscopia de luz e eletrônica foram semelhantes aos encontrados após 15 dias de liofilização.

e.3 – Liofilização de lamelas de córneas e reidratação após 1 ano (anexo 4, figura 15 e anexo 5, figuras 20 e 24):

Observou-se novamente que a estrutura geral da córnea encontrava-se preservada, com manutenção do paralelismo das lamelas estromais e integridade da camada de Bowman. Através da microscopia eletrônica, a integridade das fibras de colágeno e sua disposição inalterada foram observadas (anexo 5, figura 20, estruturas a, b e c). A membrana basal epitelial com hemidesmossomos estava presente, assim como a persistência do padrão reticulado da camada de Bowman (anexo 5, figura 24, estruturas a, b e c, respectivamente).

f) 5ª experiência de liofilização: Liofilização de lamelas e córneas inteiras

f.1 - Liofilização de lamelas de córneas com sacarose por 40 minutos e reidratação com BSS por 30 minutos após 7 dias (semelhante à figura 9 do anexo 4):

À microscopia de luz, os ceratócitos estavam presentes com boa proporção entre celularidade e estroma, porém em menor número quando comparado com córneas inteiras. À microscopia eletrônica, o ceratócito encontrava-se compacto com núcleo uniforme, sem grumos de cromatina. A membrana basal estava íntegra e a camada de Bowman apresentava o aspecto de fibras de colágeno entrelaçadas preservadas. O estroma das lamelas de córneas encontrava-se com fibras de colágeno preservadas, porém com aumento da tortuosidade das mesmas quando comparadas ao estroma das córneas inteiras liofilizadas.

f.2) Liofilização de córneas inteiras com sacarose por 40 minutos e reidratação com BSS por 30 minutos após sete dias (anexo 4, Figura 16):

Na microscopia de luz, o arcabouço corneano encontrava-se preservado, com paralelismo das lamelas estromais. Foi encontrada menos tortuosidade do estroma em córneas inteiras do que em lamelas. A densidade de ceratócitos era normal quando comparada com a das lamelas, apesar de na microscopia eletrônica, na maior parte das vezes, não se encontrarem viáveis. A microscopia eletrônica (semelhante ao anexo 5, figuras 20, 22 e 24) mostrou uma membrana basal íntegra e camada de Bowman mantendo o aspecto de fibras de colágeno entrelaçadas inalteradas. O estroma, com suas fibras de colágeno, encontrava-se preservado, observando-se o bandeamento normal das suas fibras.

g) Resultados dos controles de esterilidade do processo de liofilização: Toda a análise de cultura foi feita pelo controle de qualidade do laboratório Ophthalmos, através do teste de esterilidade por método direto.

Foi observada ausência de turvação, ou seja, esterilidade, em todas as córneas avaliadas.

- Controle da lamela de córnea nº 15.503 E: Estéril.
- Controle da lamela de córnea nº 15.561 D: Estéril.
- Controle de córnea nº 16.514 D: Estéril.

4.2. Liofilização de córneas e transplante em humanos

Os pacientes foram acompanhados durante 6 meses e os dados foram analisados estatisticamente por um centro de estatística através do programa SPSS para Windows versão 12.0.

A média de idade dos pacientes no grupo transplantado com córneas liofilizadas era de $29,8 \pm 7,3$ anos e no grupo transplantado com córneas preservadas em optisol era de $30,9 \pm 6,6$ anos ($p = 0,727$). Seis pacientes eram do sexo masculino, conforme demonstra a tabela 1.

Tabela 1: Distribuição da idade e sexo entre os dois grupos (Prova de Mann-Whitney).

Variáveis	Grupos		Comparação
	G1 - Liofilizada (n = 10)	G2 - Optisol (n = 10)	
Idade			
Média (dp)	29.8 (7.3)	30.9 (6.6)	$p = 0,727$
Mediana	28.5	32	
Mínimo – máximo	18 – 41	20 – 41	
Sexo – n (%)			
Feminino	4 (40.0)	4 (40.0)	$p = 1,000$
Masculino	6 (60.0)	6 (60.0)	

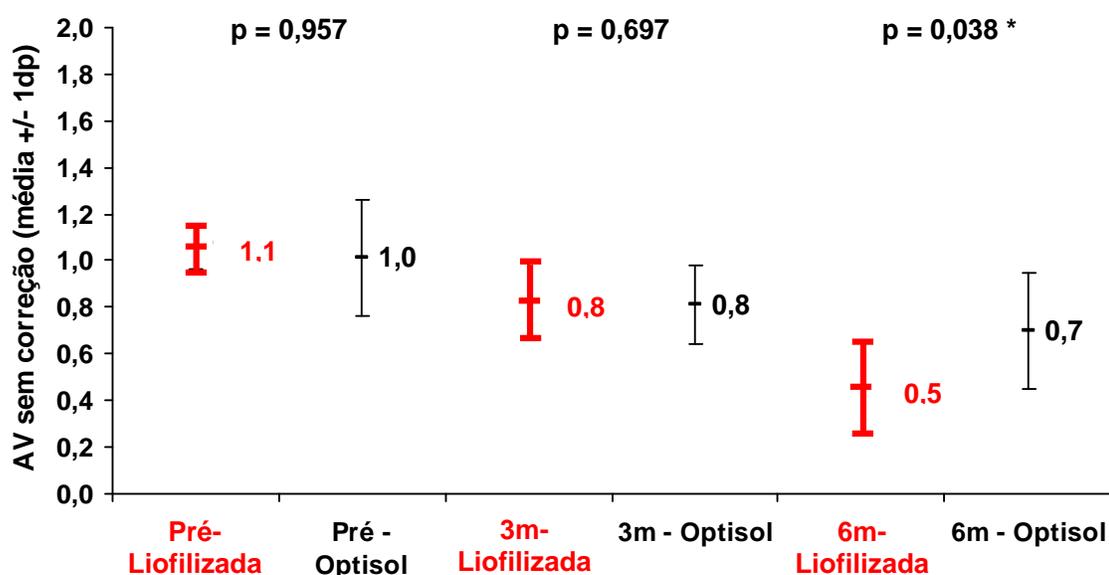
Extrapolando a tabela logmar além do valor 1.0 (20/200) e considerando 1.1 como sendo a visão pior que 1.0 ou 20/200, a média da visão pré-operatória sem correção em logmar no grupo liofilizado foi de 1.06 ± 0.10 com valores mínimo de 0.8 e máximo de 1.1. Enquanto no grupo optisol foi de 1.01 ± 0.25 com valores mínimo de 0.3 e máximo de 1.1, com $p = 0,957$.

No terceiro mês pós-operatório, a visão sem correção melhorou nos dois grupos, tendo média de 0.83 ± 0.17 (0.5 – 1.0) no grupo liofilizado e de 0.81 ± 0.17 (0.4 – 1.0) no grupo optisol, com $p = 0,697$.

No grupo liofilizado, a medida de visão sem correção no sexto mês teve média de 0.46 ± 0.20 (0.3 -0.8), enquanto no grupo optisol foi de 0.70 ± 0.25 (0.3 – 1.0), com $p = 0,038$. Sendo assim, observa-se que a medida de visão sem correção (tabela logmar) melhorou nos dois grupos, tendo agora uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com a visão pré-operatória; sendo $p < 0,001$ no grupo liofilizado e $p = 0,006$ no grupo optisol. A evolução da medida de visão sem correção pode ser vista no gráfico 1.

Ao analisar a quantidade de visão dos pacientes em grupos, observou-se que no sexto mês de pós-operatório, quatro pacientes do grupo liofilizado apresentavam acuidade visual sem correção de 20/40 (logmar 0.3), enquanto apenas um paciente do grupo optisol apresentava esta acuidade visual sem correção. Somente dois pacientes apresentavam acuidade visual sem correção de 20/80 ou pior (logmar < 0.6) no grupo liofilizado contra sete pacientes do grupo optisol (tabela 2).

Gráfico 1: Evolução da medida de visão sem correção (logmar) entre os dois grupos.



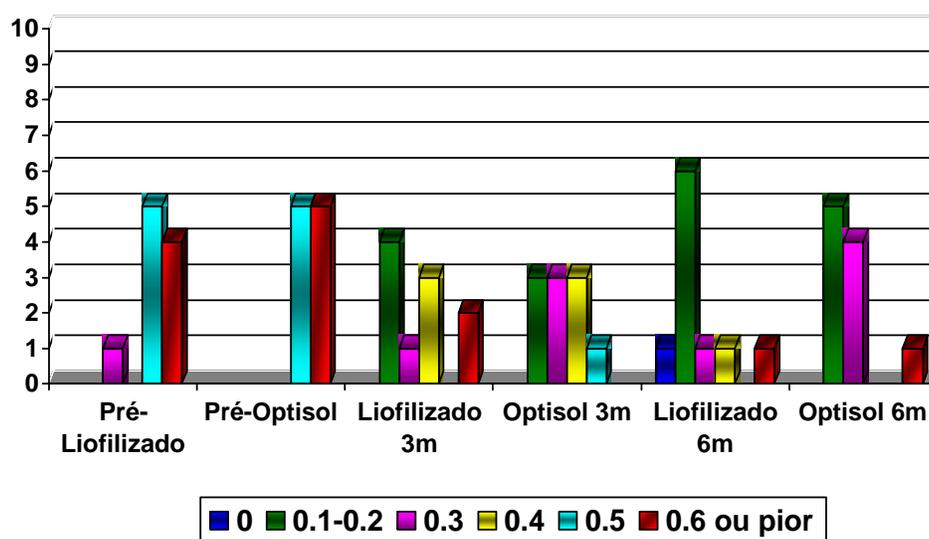
A melhor visão corrigida no pré-operatório em logmar era de 0.67 ± 0.28 (0.3 – 1.1) no grupo liofilizado e de 0.62 ± 0.17 (0.5 – 1.1) no grupo optisol, $p = 1,000$. Estes valores melhoraram para 0.16 ± 0.10 (0.0 – 0.3) no grupo liofilizado e para 0.26 ± 0.14 (0.1 – 0.6) no grupo optisol no sexto mês de pós-operatório, $p = 0,074$.

Na comparação entre as avaliações de melhor visão corrigida pré e pós-operatória no grupo liofilizado, foi encontrada variação estatisticamente significativa ($p < 0,001$), onde a avaliação de seis meses apresentou valores significativamente melhores do que na avaliação de 3 meses, a qual apresentou valores melhores do que na avaliação pré-operatória.

Na comparação entre as avaliações de melhor medida de visão corrigida pré-operatória e pós-operatória no grupo optisol, foi encontrada variação estatisticamente significativa ($p = 0,001$), onde a avaliação de seis meses apresentou valores de visão significativamente melhores do que na avaliação pré-operatória. A avaliação de três meses não se diferenciou de forma significativa das demais avaliações.

No sexto mês a melhor acuidade visual corrigida (MAVC) no grupo liofilizado foi de 20/20 (logmar 0.0) em um paciente, 20/25 – 20/32 (logmar 0.1-0.2) em sete pacientes e de 20/40 (0.3) em dois pacientes. No grupo optisol, a MAVC foi 20/25 – 20/32 (logmar 0.1-0.2) em seis pacientes, 20/40 (0.3) em três pacientes e em um foi de 0.6 ou pior. Estes dados estão demonstrados na tabela 2 e no gráfico 2.

Gráfico 2: Evolução da melhor visão corrigida em logmar nos dois grupos.

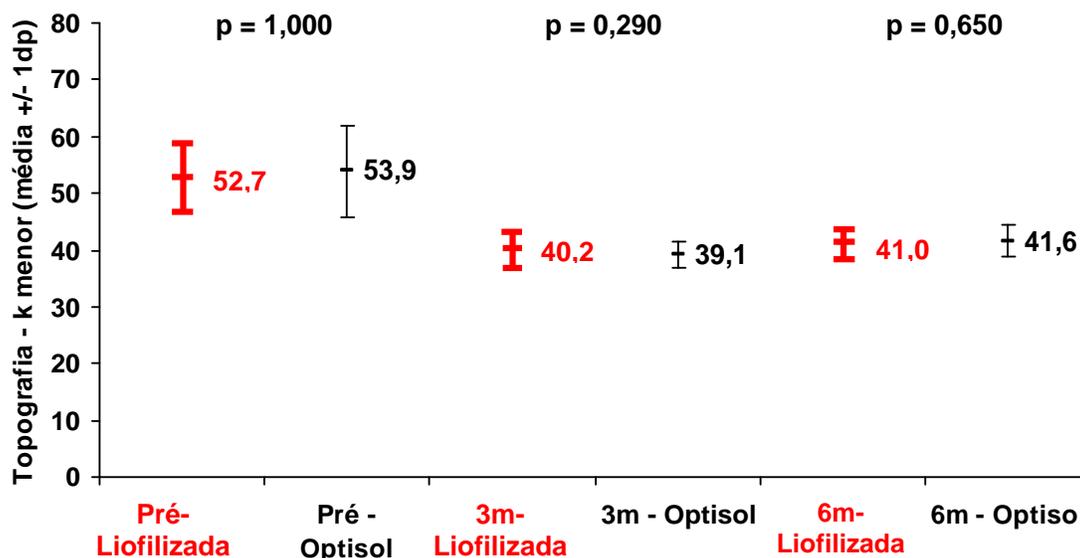


No gráfico 3, observa-se que os valores de menor ceratometria pela topografia pré-operatória no grupo liofilizado foram de 52.7 ± 5.8 (43.2 – 64.5) e no grupo optisol foram 53.9 ± 8.1 (44.4 – 67.5). No sexto mês após a cirurgia, este valor caiu para 41 ± 2.5 (38.2 – 45.6) no grupo liofilizado e para 41.6 ± 2.7 (37 – 45.4) no grupo optisol.

Observa-se assim, que fazendo uma comparação entre as avaliações da menor ceratometria da topografia (topo K menor) no grupo liofilizado, foi encontrada variação estatisticamente significativa ($p = 0,001$), onde a avaliação pré-operatória apresentou valores de ceratometria significativamente maiores do que nas avaliações de três meses e de seis meses, que não se diferenciaram de forma significativa. Isto também foi observado no grupo optisol ($p < 0,001$).

Tabela 2: Classificação quantitativa da acuidade visual (teste do qui-quadrado)

Variáveis	Grupos	
	G1 - Liofilizado (n = 10)	G2 – Optisol (n = 10)
AV s/c pré-operatória – n (%)		
0.3	0 (0.0)	1 (10.0)
0.6 ou pior	10 (100.0)	9 (90.0)
AV s/c 3m – n (%)		
0.4	0 (0.0)	1 (10.0)
0.5	1 (10.0)	0 (0.0)
0.6 ou pior	9 (90.0)	9 (90.0)
AV s/c 6m – n (%)		
0.3	4 (40.0)	1 (10.0)
0.4	2 (20.0)	2 (20.0)
0.5	2 (20.0)	0 (0.0)
0.6 ou pior	2 (20.0)	7 (70.0)
MAVC pré-operatória – n (%)		
0.3	1 (10.0)	0 (0.0)
0.5	5 (50.0)	5 (50.0)
0.6 ou pior	4 (40.0)	5 (50.0)
MAVC 3m – n (%)		
0.1 – 0.2	4 (40.0)	3 (30.0)
0.3	4 (40.0)	4 (40.0)
0.4	0 (0.0)	3 (30.0)
0.5	2 (20.0)	0 (0.0)
MAVC 6m – n (%)		
0	1 (10.0)	0 (0.0)
0.1 – 0.2	7 (70.0)	6 (60.0)
0.3	2 (20.0)	3 (30.0)
0.6 ou pior	0 (0.0)	1 (10.0)

Gráfico 3: Evolução dos menores valores ceratôméticos nos dois grupos:

Na tabela 3, ao se comparar os valores de menor ceratometria do ORBSCAN® no grupo liofilizado, foi encontrada variação estatisticamente significante ($p < 0,001$), pois a avaliação pré-operatória apresentou valores de ceratometria significativamente maiores do que nas avaliações de três meses e de seis meses, as quais não se diferenciaram de forma significante. Resultados semelhantes foram encontrados no grupo optisol, com $p < 0,001$ ao se analisar valores pré e pós-operatórios.

Na comparação entre as avaliações de curvatura posterior no grupo 1 (liofilizado), foi encontrada variação estatisticamente significante ($p < 0,001$), onde a avaliação pré-operatória apresentou valores de curvatura posteriores significativamente maiores ($58,2 \pm 3,6$) do que nas avaliações do 3º e do 6º mês ($45,2 \pm 6,7$ e $47,8 \pm 4,5$), que não se diferenciaram de forma significante. No grupo 2 (optisol), também foi observada variação estatisticamente significante ($p = 0,001$), quando a avaliação pré-operatória apresentou valores de curvatura posterior ($60,1 \pm 5,5$) maiores do que nas avaliações de 3 meses e de 6 meses ($45,2 \pm 4,5$ e $46,4 \pm 5,7$), as quais também não se diferenciaram de forma significante (tabela 3).

Os valores de paquimetria do ORBSCAN® se elevaram de forma significante nos dois grupos. No grupo 1 (liofilizado), os valores pré-operatórios de

387.3 ± 56.8 aumentaram para 548.7 ± 138.7 no 3º mês e para 580.8 ± 65.2 no 6º mês (p = 0,002). No grupo 2 (optisol), a avaliação pré-operatória era de 358.2 ± 73.7 e passou à 589.7 ± 35.9 no 3º mês e 606 ± 31.4 no 6º mês (p < 0,001).

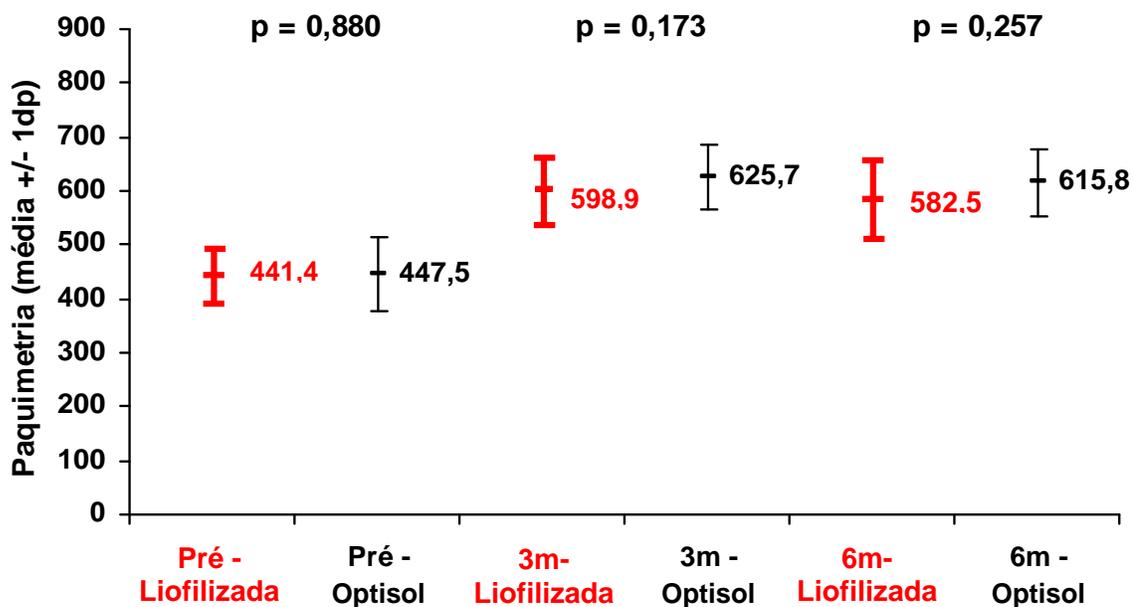
Tabela 3: Comparação dos valores de ORBSCAN® (Orb) entre os dois grupos (Prova de Mann-Whitney):

Variáveis	Grupos		Comparação
	G1 - Liofilizada (n = 10)	G2 - Optisol (n = 10)	
Menor ceratometria do Orb pré			
Média (dp)	51.8 (5.9)	51.4 (7.8)	p = 0,775
Mediana	50.8	52.1 (n = 9)	
Mínimo – máximo	40.7 – 61.2	40.7 – 65.5	
Menor ceratometria do Orb 3m			
Média (dp)	38.5 (3.2)	36.4 (3.2)	p = 0,112
Mediana	39.7	36.9	
Mínimo – máximo	33.4 – 41.6	31.8 – 42.7	
Menor ceratometria do Orb 6m			
Média (dp)	40.5 (2.8)	39.5 (2.6)	p = 0,325
Mediana	41.1	40.0	
Mínimo – máximo	36.9 – 45.7	35.1 – 43.4	
Curvatura posterior do Orb pré			
Média (dp)	58.2 (3.6)	60.1 (5.5)	p = 0,406
Mediana	58.9	60.1	
Mínimo – máximo	53.1 – 62.7	52.4 – 70.0	
Curvatura posterior do Orb 3m			
Média (dp)	45.2 (6.7)	45.2 (4.5)	p = 0,705
Mediana	48.4	45.9	
Mínimo – máximo	36.3 – 53.5	35.4 – 50.5	
Curvatura posterior do Orb 6m			
Média (dp)	47.8 (4.5)	46.4 (5.7)	p = 0,791
Mediana	47.9	47.7	
Mínimo – máximo	41.2 – 56.0	33.6 – 53.6	

Comparando-se os valores de paquimetria ultra-sônica durante a evolução no gráfico 4, observa-se que houve variação estatisticamente significativa no grupo 1 (p = 0,006), uma vez que os valores pré-operatórios de 441.4 ± 49.6 aumentaram no terceiro e sexto mês de cirurgia para 598.9 ± 61.4 e 582.5 ± 73.7. No

grupo 2, a média de 447.5 ± 68.7 aumentou para 625.7 ± 61.8 e 615.8 ± 61.2 no terceiro e sexto mês após a cirurgia ($p < 0,001$).

Gráfico 4: Evolução dos valores de paquimetria ultra-sônica entre os dois grupos:



No gráfico 5, observamos que na comparação entre as avaliações de microscopia especular, não foi encontrada variação estatisticamente significativa no grupo 1 ($p = 0,082$) ou no grupo de córneas preservadas em optisol ($p = 0,607$) em relação ao pré e pós-operatório, não sendo observado perda celular após a cirurgia.

Na aplicação do questionário sobre satisfação em relação à visão, no 6º mês de cirurgia, os dois grupos de pacientes estavam mais satisfeitos com a cirurgia e visão que no terceiro mês. No sexto mês, a média de satisfação com a visão e com a cirurgia no grupo liofilizada era de 72.4 ± 13.6 e no grupo optisol era de 73 ± 15.4 . Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos nos meses avaliados ($p=0,545$ e $p=0,940$), como mostra a tabela 4.

Gráfico 5: Avaliação da microscopia especular nos dois grupos durante a evolução.

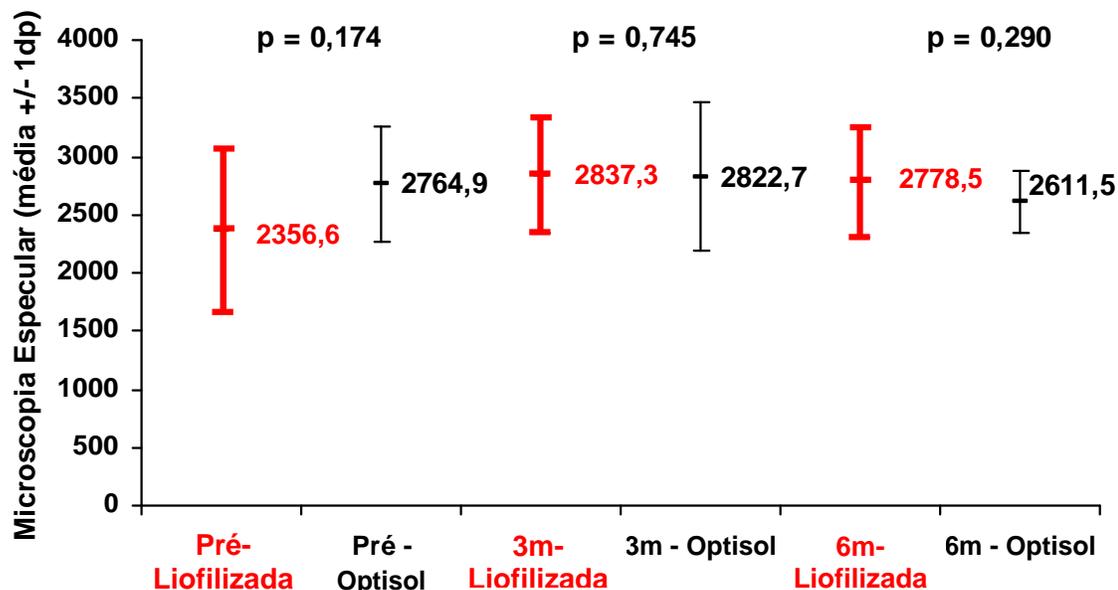


Tabela 4: Satisfação dos pacientes quanto à cirurgia de acordo com o questionário de qualidade de vida (Prova de Mann-Whitney).

Variáveis	Grupos		Comparação
	G1 - Liofilizada (n = 10)	G2 - Optisol (n = 10)	
Questionário 3m			
Média (dp)	62.2 (13.5)	64.9 (9.5)	p = 0,545
Mediana	61.5	65.3	
Mínimo – máximo	43 – 85	50 – 81	
Questionário 6m			
Média (dp)	72.4 (13.6)	73.0 (15.4)	p = 0,940
Mediana	75.1	81.2	
Mínimo – máximo	51.0 – 87.5	48.9 – 89.0	

Na tabela 5, observamos que a sensibilidade ao contraste também não mostrou nenhuma diferença entre os dois grupos.

Tabela 5: Avaliação da sensibilidade ao contraste no sexto mês após a cirurgia nos dois grupos (Prova de Mann-Whitney).

Variáveis	Grupos		Comparação
	G1 - Liofilizada (n = 10)	G2 - Optisol (n = 10)	
Sensibilidade ao contraste			
Média (dp)	0.45 (0.29)	0.53 (0.27)	p = 0,354
Mediana	0.45	0.60	
Mínimo – máximo	0.1 – 1.0	0.2 – 1.0	

Na sensibilidade ao contraste pela tabela FACT, foi observado que dois pacientes do grupo liofilizado mantiveram-se dentro da curva de normalidade, com acuidade visual por volta de 20/30 e 20/25. Outros dois pacientes também conseguiram realizar a curva, porém abaixo do limite inferior da normalidade. A melhor acuidade visual percebida nestes pacientes foi de 20/30. Três pacientes apresentavam-se normais para alta frequência, com valores abaixo do normal para frequências intermediárias e, com valores em zero para baixas frequências. Os outros três pacientes apresentaram todos os valores abaixo da curva de normalidade, tendo aproveitamento melhor para altas frequências, médio para frequências intermediárias e muito baixo ou nulo para frequências baixas.

Nenhum paciente do grupo optisol conseguiu se manter dentro da curva de normalidade. Dois pacientes conseguiram realizar a curva, porém com valores abaixo do limite inferior da normalidade, com acuidade visual na tabela de contraste de 20/30. Uma paciente apresentou-se normal para frequências altas e intermediárias, e abaixo da normalidade para frequências baixas. Três pacientes apresentaram-se normais para frequências altas e abaixo da normalidade para frequências intermediárias ou baixas. Os outros quatro pacientes apresentaram todos os valores bem abaixo da curva de normalidade, sendo que três com frequências intermediárias e baixas nulas.

Tabela 6: Correlação entre MAVC e sensibilidade ao contraste no sexto mês após a cirurgia (Prova do coeficiente de correlação por postos de Spearman).

Variáveis	MAVC c/ 6m
Sensibilidade ao contraste	rs = 0.62
	p = 0,004*
	n = 20

Foi encontrada correlação positiva estatisticamente significativa entre melhor acuidade visual corrigida no sexto mês e sensibilidade ao contraste (rs = 0,62 p = 0,004), indicando que valores melhores de acuidade visual estão relacionados a melhor sensibilidade ao contraste. Da mesma forma, valores piores de acuidade visual estão relacionados com pior sensibilidade ao contraste.

Tabela 7: Correlação entre Melhor acuidade visual corrigida e satisfação em relação à cirurgia de acordo com o questionário de qualidade (Prova do coeficiente de correlação por postos de Spearman).

Variáveis	MAVC	
	3m	6m
Pontuação no questionário	rs = -0.04	rs = 0.03
	p = 0,877	p = 0,916
	N = 20	N = 20

As correlações entre melhor acuidade visual corrigida e pontuação no questionário de qualidade de vida foram não significantes nas avaliações de 3 meses (rs = -0,04) e de 6 meses (rs = 0,03).

As figuras 1 a 4 correspondem a alguns dos pacientes transplantados neste trabalho.

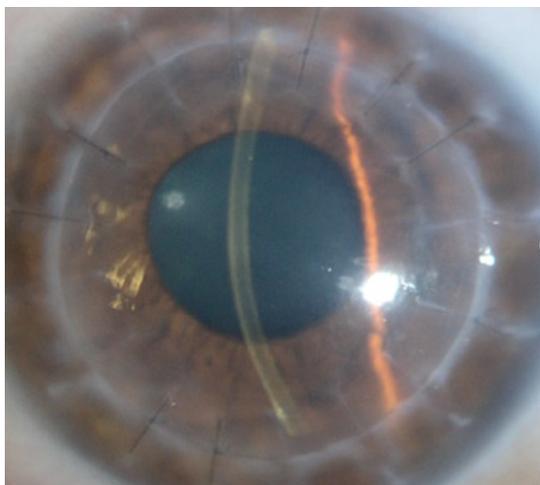


Figura 1: Paciente LPS. Córnea em optisol. MAVC 0.3 ou 20/40

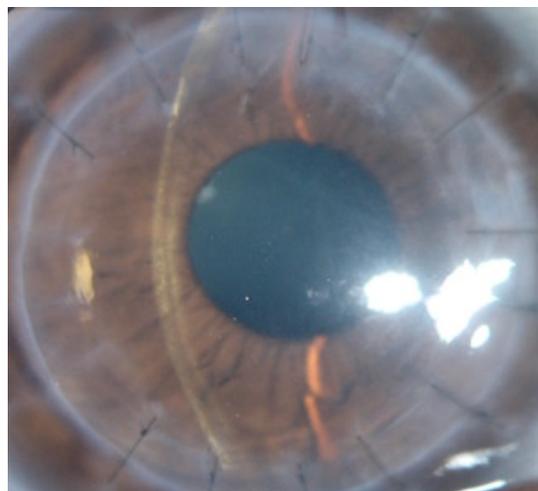


Figura 2: Paciente SCN. Córnea liofilizada. MAVC 0.3 ou 20/40

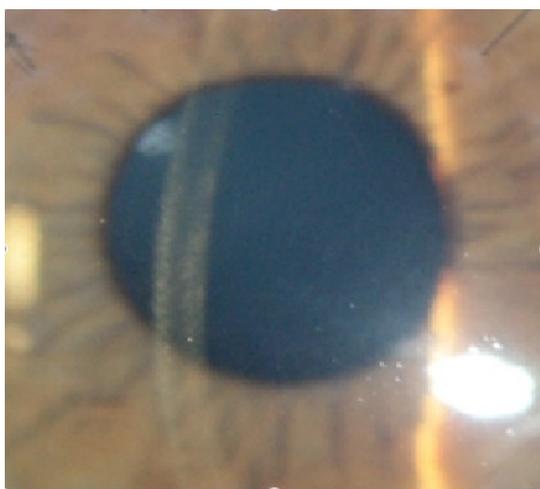


Figura 3: Paciente NRF. Córnea em optisol. MAVC 0.1 ou 20/25.



Figura 4: Paciente ILS. Córnea liofilizada. MAVC 0.0 ou 20/20.

A epitelização do transplante se completou de forma igual nos dois grupos por volta do quinto dia, entretanto, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as técnicas quanto à presença de ceratite por volta do sétimo dia ($p = 0,021$), onde no grupo liofilizado os graus de ceratite foram significativamente menores do que os do grupo optisol. Durante o resto da evolução, não houve diferença estatística entre os dois grupos.

As dobras no leito receptor diminuíram com o transcorrer do tempo nos dois grupos, com diferença significativa entre o sétimo dia e o sexto mês, com $p = 0,026$ no grupo liofilizado e $p = 0,739$ no grupo optisol. Não foi encontrada variação estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à opacidade no botão doador.

Na tabela 8 foi encontrada correlação negativa estatisticamente significativa entre MAVC e opacidade no doador na avaliação de três meses ($r_s = -0,44$ $p = 0,049$), indicando que graus maiores de opacidade no doador estão relacionados a valores piores de acuidade visual corrigida. O mesmo acontece com graus menores de opacidades que estão relacionados a valores melhores de acuidade visual.

Tabela 8: Correlação entre melhor acuidade visual corrigida (MAVC) e as variáveis: dobras no receptor e opacidade do doador (Prova do coeficiente de correlação por postos de Spearman)

MAVC	Dobras no receptor	Opacidade no doador
3 meses	$r_s = 0.28$	$r_s = -0.44$
	$p = 0.234$	$p = 0.049^*$
	$n = 20$	$n = 20$
6 meses	$r_s = 0.28$	$r_s = 0.27$
	$p = 0.234$	$p = 0.250$
	$n = 20$	$n = 20$

As demais correlações entre MAVC e dobras no receptor e opacidade do doador foram não significantes nas avaliações de três meses e de seis meses ($> 0,05$ para todas as correlações).

Na avaliação de três meses pelo examinador 1 (tabela 9) foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as técnicas quanto à resposta da pergunta “Você acha que o tecido é liofilizado?” ($p = 0,003$). Nas demais avaliações não foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre os grupos ($p > 0,05$ em todas as comparações).

Tabela 9: Avaliação dos pacientes realizada pelo examinador mascarado 1 no terceiro mês após a cirurgia.

Variáveis: Examinador 1 – 3m	Grupos		Comparação
	G1 - Liofilizado (n = 10)	G2 – Optisol (n = 10)	
Opacidade no leito receptor – n (%)			
Ausente	1 (10,0)	1 (10,0)	p = 0,218
Leve	2 (20,0)	6 (60,0)	
Moderada	4 (40,0)	1 (10,0)	
Intensa	3 (30,0)	2 (20,0)	
Dobras no centro do receptor – n (%)			
Ausente	4 (40,0)	2 (20,0)	p = 0,674
Leve	4 (40,0)	7 (70,0)	
Moderada	2 (20,0)	1 (10,0)	
Estrias no leito doador – n (%)			
Ausente	9 (90,0)	8 (80,0)	p = 0,626
Leve	0 (0,0)	2 (20,0)	
Moderada	1 (10,0)	0 (0,0)	
Transparência – n (%)			
Excelente	4 (40,0)	6 (60,0)	p = 0,551
Boa	6 (60,0)	3 (30,0)	
Razoável	0 (0,0)	1 (10,0)	
Ceratite – n (%)			
Ausente	6 (60,0)	4 (40,0)	p = 0,341
Leve	3 (30,0)	4 (40,0)	
Moderada	1 (10,0)	1 (10,0)	
Intensa	0 (0,0)	1 (10,0)	
Tecido Normal ?– n (%)			
Sim	10 (100,0)	10 (100,0)	p = ---
Tecido Liofilizado ?– n (%)			
Não	4 (40,0)	9 (90,0)	p = 0,003 *
Talvez	6 (60,0)	0 (0,0)	
Sim	0 (0,0)	1 (10,0)	

Na avaliação de 6 meses pelo examinador 1 (tabela 10) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0,05$ em todas as comparações).

Tabela 10: Avaliação dos pacientes, realizada pelo examinador mascarado 1 no sexto mês após a cirurgia.

Variáveis: Examinador 1 – 6m	Grupos		Comparação
	Liofilizado (n = 10)	Optisol (n = 10)	
Opacidade no leito receptor – n (%)			
Ausente	0 (0,0)	1 (10,0)	p = 0,676
Leve	5 (50,0)	4 (40,0)	
Moderada	4 (40,0)	5 (50,0)	
Intensa	1 (10,0)	0 (0,0)	
Dobras no centro do receptor – n (%)			
Ausente	2 (20,0)	2 (20,0)	p = 0,963
Leve	7 (70,0)	7 (70,0)	
Moderada	1 (10,0)	0 (0,0)	
Intensa	0 (0,0)	1 (10,0)	
Estrias no leito doador – n (%)			
Ausente	8 (80,0)	7 (70,0)	p = 0,549
Leve	2 (20,0)	2 (20,0)	
Moderada	0 (0,0)	1 (10,0)	
Transparência – n (%)			
Excelente	4 (40,0)	2 (20,0)	p = 0,862
Boa	4 (40,0)	8 (80,0)	
Razoável	1 (10,0)	0 (0,0)	
Ruim	1 (10,0)	0 (0,0)	
Ceratite – n (%)			
Ausente	4 (40,0)	0 (0,0)	p = 0,085
Leve	3 (30,0)	6 (60,0)	
Moderada	3 (30,0)	1 (10,0)	
Intensa	0 (0,0)	3 (30,0)	
Tecido Normal ? – n (%)			
Não	1 (10,0)	0 (0,0)	p = 1,000
Sim	9 (90,0)	10 (100,0)	
Tecido Liofilizado ? – n (%)			
Não	5 (50,0)	6 (60,0)	p = 0,512
Talvez	2 (20,0)	3 (30,0)	
Sim	3 (30,0)	1 (10,0)	

Na tabela 11, observa-se que o examinador 2 encontrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à opacidade no doador ($p = 0,021$) no sexto mês após a cirurgia.

Tabela 11: Avaliação dos pacientes realizada pelo examinador mascarado 2 no sexto mês após a cirurgia.

Variáveis: Examinador 2 – 6m	Grupos		Comparação
	G1 - Liofilizada (n = 10)	G2 – Optisol (n = 10)	
Opacidade no leito receptor – n (%)			
Ausente	0 (0,0)	4 (40,0)	p = 0,021 *
Leve	9 (90,0)	6 (60,0)	
Moderada	1 (10,0)	0 (0,0)	
Dobras no centro L. receptor – n (%)			
Ausente	3 (30,0)	3 (30,0)	p = 1,000
Leve	7 (70,0)	7 (70,0)	
Estrias no leito doador – n (%)			
Ausente	3 (30,0)	5 (50,0)	p = 0,374
Leve	7 (70,0)	5 (50,0)	
Transparência – n (%)			
Excelente	6 (60,0)	7 (70,0)	p = 0,648
Boa	4 (40,0)	3 (30,0)	
Ceratite – n (%)			
Ausente	1 (10,0)	1 (10,0)	p = 1,000
Leve	8 (80,0)	8 (80,0)	
Moderada	1 (10,0)	1 (10,0)	
Tecido Normal ? – n (%)			
Sim	10 (100,0)	10 (100,0)	P = ---
Tecido Liofilizado ? – n (%)			
Não	6 (60,0)	7 (70,0)	p = 0,812
Talvez	2 (20,0)	2 (20,0)	
Sim	2 (20,0)	1 (10,0)	

Na comparação entre as avaliações de seis meses dos examinadores 1 e 2, foram encontradas discordâncias estatisticamente significantes nas variáveis: opacidade do leito receptor ($p = 0,002$) e transparência ($p = 0,008$). Nas demais variáveis não foram encontradas discordâncias estatisticamente significantes entre os examinadores ($p > 0,05$ em todas as comparações).

Tabela 12: Correlação entre as variáveis opacidade do leito receptor e transparência com a variável liofilizado de acordo com o examinador 1.

Variáveis: Examinador 1 – 6m	Você acha que o tecido é liofilizado?			Comparação
	Não (n = 11)	Talvez (n = 5)	Sim (n = 4)	
Opacidade no leito receptor – n (%)				
Ausente	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	p = 0,065
Leve	7 (63,6)	2 (40,0)	0 (0,0)	
Moderada	4 (36,4)	2 (40,0)	3 (75,0)	
Intensa	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	
Transparência – n (%)				
Excelente	6 (54,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	p = 0,012 *
Boa	5 (45,5)	5 (100,0)	2 (50,0)	
Razoável	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	
Ruim	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a resposta sobre o tecido ser liofilizado e a classificação quanto à opacidade do doador ($p = 0,065$) de acordo com o examinador 1 no exame de 6 meses. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a resposta sobre o tecido ser liofilizado e a classificação de transparência ($p = 0,012$) de acordo com o examinador 1, onde no grupo de olhos com resposta sim para tecido liofilizado foram encontrados graus de transparência significativamente piores do que os do grupo de olhos com resposta não para tecido liofilizado. O grupo de olhos com resposta talvez, não se diferenciou de forma significativa dos demais grupos.

Observa-se na tabela 13 que não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a resposta sobre o tecido ser liofilizado e a classificação de opacidade no leito receptor ($p = 0,128$) de acordo com o examinador 2 no exame de 6 meses. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a resposta sobre o tecido ser liofilizado e a classificação de transparência ($p = 0,021$) do examinador 2, onde no grupo de olhos com resposta sim para tecido liofilizado foram encontrados graus de transparência significativamente piores do que os do grupo de olhos com resposta não para tecido liofilizado. O grupo de olhos com resposta talvez, não se diferenciou de forma significativa dos demais grupos.

Tabela 13: Associação entre as variáveis: opacidade do leito receptor e transparência com a variável liofilizado de acordo com o examinador 2.

Variáveis: Examinador 2 – 6m	Você acha que o tecido é liofilizado?			Comparação
	Não (n = 13)	Talvez (n = 4)	Sim (n = 3)	
Opacidade no leito receptor – n (%)				
Ausente	4 (30,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	p = 0,128
Leve	9 (69,2)	3 (75,0)	3 (100,0)	
Moderada	0 (0,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	
Transparência – n (%)				
Excelente	11 (84,6)	2 (50,0)	0 (0,0)	p = 0,021 *
Boa	2 (15,4)	2 (50,0)	3 (100,0)	

Na avaliação da microscopia confocal foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao estroma do doador ($p < 0,001$) no 21º dia, onde no grupo 1 (liofilizado) a proporção de casos acelulares (90%) foi significativamente maior do que no grupo 2 (optisol) (10%). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à distribuição da densidade dos ceratócitos ($p < 0,001$) no 21º dia, onde no grupo 1, os valores de densidade foram significativamente menores do que no grupo optisol (gráficos 6 e 7).

No terceiro mês foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à distribuição da densidade de ceratócitos ($p < 0,001$), onde no grupo 1 os valores de densidade foram significativamente menores do que nos do grupo 2 (gráfico 7).

No gráfico 7, vemos que a média de densidade dos ceratócitos foi novamente menor no grupo de córneas liofilizadas ($p = 0,003$) em seis meses, entretanto apenas três dos pacientes transplantados com córneas liofilizadas, permaneceram acelulares no sexto mês de pós-operatório, não levando a diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,211$).

Na comparação entre as avaliações de estroma doador no grupo 1, temos:

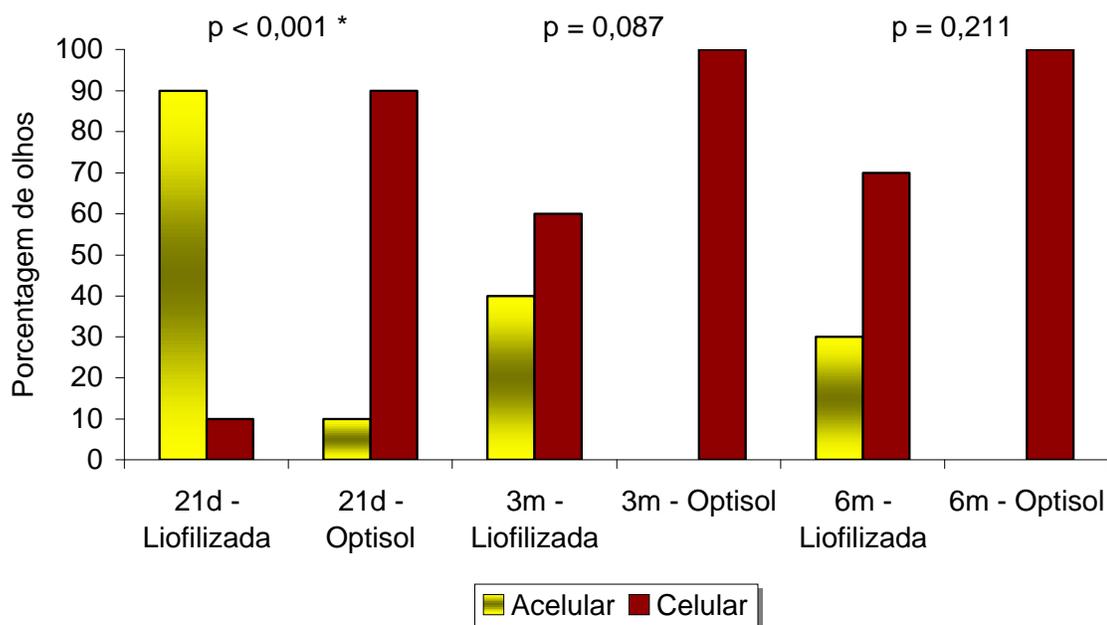
- Não foi encontrada variação estatisticamente significativa entre as avaliações de 21 dias e três meses ($p = 0,063$), onde cinco (50%) olhos passaram de acelular em 21d para celular em 3 meses;

- Não foi encontrada variação estatisticamente significativa entre as avaliações de três meses e seis meses ($p = 1,000$), onde um (10%) olho passou de acelular em três meses para celular em seis meses;

- Foi encontrada variação estatisticamente significativa entre as avaliações de 21 dias e seis meses ($p = 0,031$), onde seis (60%) olhos passaram de acelular no 21º dia para celular em seis meses.

Na comparação entre as avaliações de estroma doador no grupo 2, apenas um olho era acelular com 21 dias e passou para celular em três meses, impossibilitando aplicação de teste estatístico.

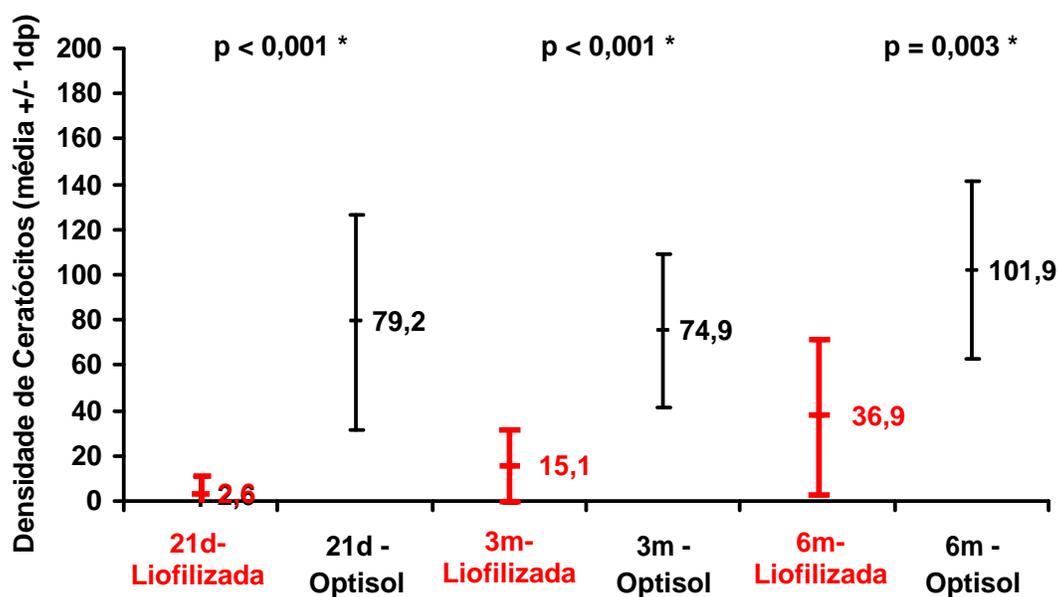
Gráfico 6: Evolução do estroma doador no confocal entre os dois grupos:



No gráfico 7, observamos a comparação entre as avaliações de densidade de ceratócitos no grupo 1, a qual sofreu variação estatisticamente significativa ($p = 0,004$), onde a avaliação de seis meses apresentou valores de densidade significativamente maiores do que na avaliação de três meses que apresentou valores de densidade significativamente maiores do que na avaliação de 21

dias. Na comparação entre as avaliações de densidade de ceratócitos no grupo 2, não foi encontrada variação estatisticamente significativa ($p = 0,900$).

Gráfico 7: Evolução da densidade de ceratócitos entre os dois grupos:



As figuras 5 a 8 abaixo, referem-se aos achados de microscopia confocal em alguns pacientes deste estudo.

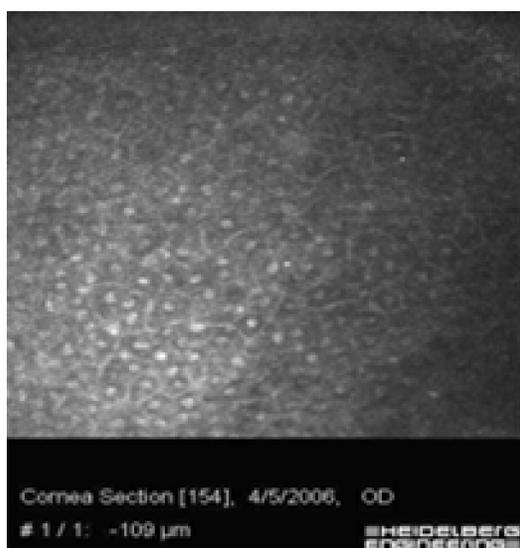


Figura 5: AMB, Células basais aos 21 dias de córnea em optisol.

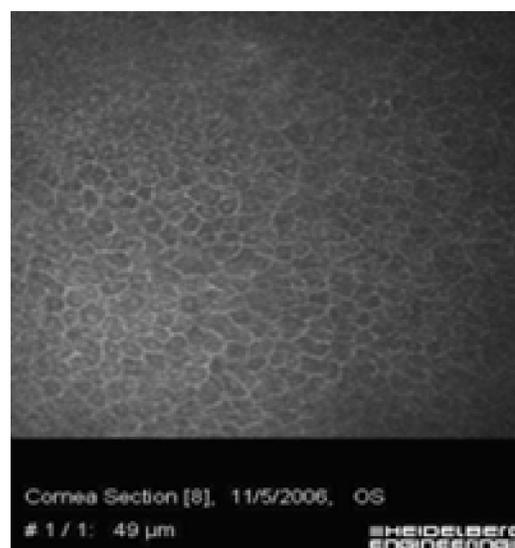


Figura 6: NFG, Células basais aos 21 dias de córnea liofilizada.

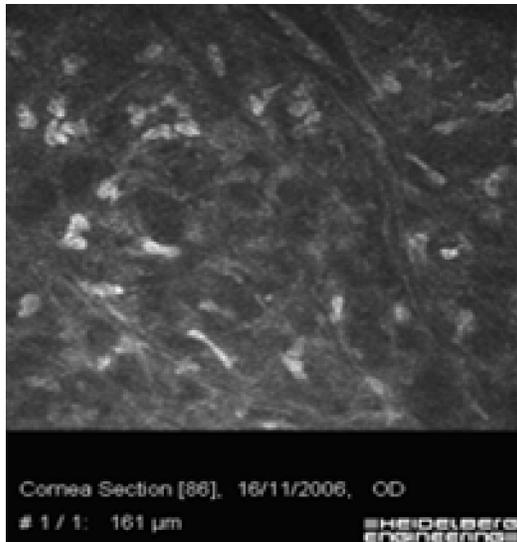


Figura 7: AMB, estroma doador no sexto mês após cirurgia com córnea em optisol.

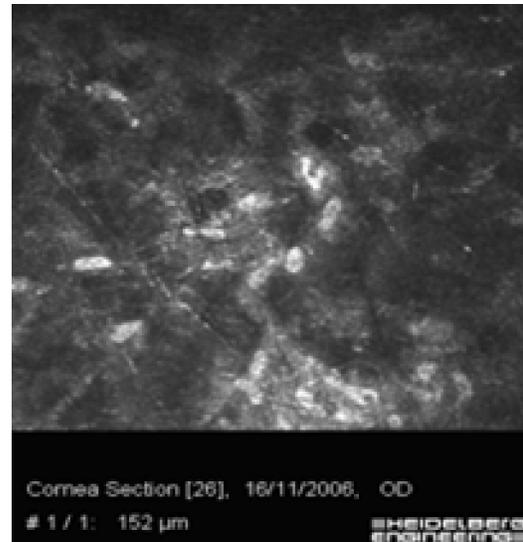


Figura 8: MNS, estroma doador no sexto mês após cirurgia com córnea liofilizada.

Na tabela 15, observa-se que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as técnicas quanto às variáveis: lamela anterior no confocal, lamela posterior no confocal, lamela anterior no UBM e lamela posterior no UBM ($p > 0,05$ em todas as comparações).

Na tabela 16, observamos que as correlações entre melhor acuidade visual corrigida (MAVC) e interface pelo confocal foram negativas e não significantes nas avaliações de três meses ($r_s = -0,26$) e de seis meses ($r_s = -0,01$). As correlações entre MAVC e densidade de ceratócitos foram positivas e não significantes nas avaliações de três meses ($r_s = 0,29$) e de seis meses ($r_s = 0,1$).

Na tabela 17, observam-se que as correlações entre MAVC no 6° mês após a cirurgia e espessura de lamela anterior e lamela posterior no confocal foram positivas e não significantes ($r_s = 0.30$, $r_s = 0.14$, respectivamente). Isto quer dizer que para o confocal, quanto maior a espessura das lamelas, pior seria a acuidade visual.

As correlações entre MAVC no 6° mês pós-operatório e espessura de lamela anterior e lamela posterior no UBM foram negativas e não significantes ($r_s = -0.02$, $r_s = -0.24$ respectivamente). Isto quer dizer que para o UBM, quanto maior a

espessura das lamelas, melhor seria a acuidade visual. Entretanto, em nenhum dos aparelhos, estas variáveis foram significantes.

Tabela 14: Comparação entre os grupos de acordo com as medidas do leito residual no sexto mês pela Microscopia confocal e pela biomicroscopia ultra-sônica.

Variáveis	Grupo		Comparação
	G1 - Liofilizada (n = 10)	G2 - Optisol (n = 10)	
Lamela anterior confocal			
Média (dp)	471,4 (101,3)	476,3 (103,7)	P = 0,820
Mediana	463,5	470,0	
Mínimo – máximo	340 – 700	320 – 700	
Lamela posterior confocal			
Média (dp)	155,0 (44,5)	154,5 (62,4)	P = 0,673
Mediana	135	130	
Mínimo – máximo	120 – 230	110 – 315	
Lamela anterior UBM			
Média (dp)	445,5 (65,8)	454,0 (22,4)	P = 0,111
Mediana	417	452	
Mínimo – máximo	387 – 590	417 – 498	
Lamela posterior UBM			
Média (dp)	145,9 (51,3)	121,6 (27,4)	P = 0,543
Mediana	127,5	133	
Mínimo – máximo	93 – 249	81 – 151	

Tabela 15: Correlação entre Melhor acuidade visual corrigida (MAVC) e as variáveis: Interface e densidade de ceratócitos no confocal.

MAVC	Interface	Densidade de ceratócitos
3 meses	rs = -0,26	rs = 0,29
	p = 0,273	p = 0,216
	n = 20	n = 20
6 meses	rs = -0,01	rs = 0,17
	p = 0,954	p = 0,467
	n = 20	n = 20

Tabela 16: Correlação entre Melhor Acuidade Visual Corrigida no sexto mês e as variáveis do confocal e do UBM.

MAVC 6m x lamela anterior no confocal	MAVC 6m x lamela posterior no confocal
rs = 0.30	rs = 0.14
p = 0,199	p = 0,546
n = 20	n = 20
MAVC 6m x lamela anterior UBM	MAVC 6m x lamela posterior UBM
rs = -0.02	Rs = -0.24
p = 0,919	p = 0,309
n = 20	n = 20

Tabela 17: Correlação entre a variável espessura de lamela posterior pelo Confocal e UBM e a transparência avaliada pelos examinadores mascarados no sexto mês.

Variável	Examinador 1 – transparência 6m	examinador 2 – transparência 6m
Lamela posterior confocal	rs = -0,16 p = 0,499 n = 20	Rs = -0,11 p = 0,643 n = 20
Lamela posterior UBM	rs = -0,32 p = 0,171 n = 20	Rs = 0,20 p = 0,395 n = 20

Na tabela 17, as correlações entre a transparência avaliada pelos examinadores no sexto mês após a cirurgia e a espessura das lamelas posteriores (leito residual) foram todas não significantes ($p > 0,05$ para todas as correlações).

As figuras 9 e 10 referem-se ao leito residual (lamela posterior) encontrada no UBM de dois pacientes e o resultado visual alcançado.



Figura 9: FSA, optisol. UBM: leito residual 81 μ m. Confocal: 130 μ m. MAVC: 0.2 ou 20/32

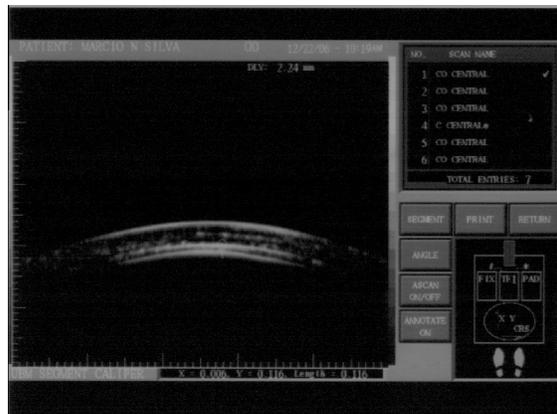


Figura 10: MNS, liofilizada. UBM: leito residual 116 μ m. Confocal: 120 μ m. MAVC: 0.1 ou 20/25

Na tabela 1 do anexo 3, observou-se que a média da idade dos doadores de córnea foi mais alta no grupo de córneas liofilizadas com 71,4 anos contra 68,5 anos no grupo de córneas preservadas em optisol, porém sem diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença estatística em relação ao tempo entre o óbito e enucleação (TOE) ou em relação ao tempo entre óbito e preservação (TOP) nos dois grupos.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as técnicas quanto ao tempo de preservação total ($p < 0,001$), onde na técnica liofilizada os tempos de preservação foram significativamente maiores do que os da técnica optisol. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as córneas quanto às demais variáveis ($p > 0,05$ em todas as comparações).

Na tabela 18, não foi observada associação entre a melhor acuidade visual corrigida no sexto mês, assim como entre a transparência da córnea de acordo com os examinadores mascarados e a qualidade da córnea doada.

Não foi possível avaliar associação entre a opinião dos examinadores quanto a ser liofilizado por se tratar de uma variável qualitativa, com três categorias (não, talvez e sim) e com baixa representatividade em cada uma dessas categorias.

Tabela 18: Correlação entre melhor acuidade visual corrigida com seis meses e transparência da córnea de acordo com cada examinador com a qualidade da córnea doada.

Variável	Idade do doador	Tempo de preservação total
MAVC 6m	rs = 0,29 p = 0,211 n = 20	Rs = -0,28 p = 0,225 n = 20
Transparência 6m (examinador 1)	rs = 0,12 p = 0,619 n = 20	Rs = 0,07 p = 0,770 n = 20
Transparência 6m (examinador 2)	rs = 0,08 p = 0,731 n = 20	Rs = 0,00 p = 1,000 n = 20

Tabela 19: Correlação entre melhor acuidade visual corrigida e tempo de preservação total.

Variável	MAVC	
	3m	6m
Tempo de preservação total	rs = -0,06 p = 0,808 n = 20	Rs = -0,17 p = 0,469 n = 20

Na tabela 19, observa-se que as correlações entre melhor acuidade visual corrigida e tempo de preservação total foram negativas, isto quer dizer que quanto maior o tempo de preservação (córneas liofilizadas), pior seria a acuidade visual, porém estes resultados não foram significantes nas avaliações de três meses (rs = -0,06) e de seis meses (rs = -0,17).

4.3. Resumo dos resultados encontrados:

1 – Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de pacientes transplantados nos critérios melhor visão corrigida, valores ceratométricos de topografia, valores paquimétricos, valores de microscopia especular,

valores de sensibilidade ao contraste e pontuação no questionário de avaliação de qualidade de vida após o transplante aos três meses e seis meses após a cirurgia.

2 – Houve diferença estatisticamente significativa na acuidade visual sem correção de seis meses entre os dois grupos, onde o grupo liofilizado apresentou média de valores melhores do que o grupo optisol.

3- Houve diferença estatisticamente significativa entre os valores pré-operatórios e pós-operatórios de três meses e seis meses em todas as variáveis avaliadas nos dois grupos.

4 – Foram encontradas variações estatisticamente significantes entre as avaliações de 21 dias e de seis meses ($p=0,031$) no grupo liofilizado, quando seis das 10 córneas liofilizadas passaram de acelular para celular.

5 – Foram encontradas variações estatisticamente significantes ($p = 0,004$) em relação à densidade de ceratócitos entre as avaliações de seis meses e 21 dias. Aos seis meses a densidade no grupo liofilizado aumentou em relação aos três meses e aos 21 dias. Não foi encontrada variação significativa no grupo optisol.

6 – Foram encontradas associações fracas entre a melhor acuidade visual corrigida e a densidade de ceratócitos, assim como entre melhor acuidade visual corrigida e espessura da lamela posterior.

7 – Foram observadas associações fracas entre a espessura da lamela posterior e a transparência da córnea.

8 – Foram observadas fortes associações entre a melhor acuidade visual corrigida e a sensibilidade ao contraste nos dois grupos ($p = 0,004$).

9 – Para os examinadores mascarados a redução da transparência da córnea seria um fator preditivo para determinar se a mesma era liofilizada, entretanto, não se conseguiu demonstrar uma associação forte entre estas duas variáveis.

5. DISCUSSÃO

A sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) é um carboidrato do tipo dissacarídeo, formado pela união de dois monossacarídeos: glicose e frutose, produzida pela planta ao realizar o processo de fotossíntese⁽⁴⁸⁾. Experimentos com espermatozóides humanos mostraram que diluentes com glicerol aumentam em muito a sobrevivência de espermatozóides após a vitrificação, sendo que a concentração do diluente não pode ultrapassar 5%, pois os imobilizariam⁽⁴⁹⁾. Polge e cols trabalharam com sêmen de aves e mostraram que grande quantidade de água pode ser retirada do sêmen a baixas temperaturas sem matá-los devido a ação do glicerol⁽⁴⁹⁾.

A ausência de criopreservativos ou, até mesmo a sua presença em concentrações inadequadas, pode levar a danos durante o congelamento por alterar as propriedades dos solutos e por levar a um congelamento intracelular⁽⁵⁰⁾. Mazur estudou o congelamento de células e mostrou que células congeladas rapidamente são mortas pela formação de gelo intracelular durante a fase de congelamento e seu subsequente crescimento por recristalização durante o aquecimento, enquanto células congeladas lentamente são mortas pela longa exposição aos solutos alterados formados pela conversão de água em gelo nos meios extras e intracelulares. Estas alterações incluem concentração e precipitação dos solutos, desidratação e mudanças de pH⁽⁵⁰⁾.

Ele mostrou ainda que a fração de congelamento de células de hamster chineses não deveria ser de $1^{\circ}C/min$ como antes se pensava, mas estende-se entre 10 a $300^{\circ}C/min$. Além disso, a proteção do criopreservante não parece está relacionada com a molaridade do aditivo ou sua habilidade em permear as células⁽⁵⁰⁾.

A glicose penetra mais lentamente nas membranas celulares que outros agentes criopreservantes, porém geralmente está associada a menos toxicidade química direta que outros agentes, inclusive do dimetilsulfoxide⁽⁵¹⁾.

Maguen et al liofilizaram lentículas para epiceratofacia em gatos e as utilizaram para o preparo do tecido: 37ml de plasma fresco congelado, 3ml de dimetilsulfoxide, 4g de sacarose e 81mg de kiton verde e o deixou neste liquido por

quatro horas. No seu estudo, todos os gatos permaneceram com as lenticulas claras por 10 semanas e sem sinais de efeitos adversos sistêmicos ou oculares⁽³⁵⁾. Com esta solução crioprotetora, os autores conseguiram manter o tecido estruturalmente intacto, porém sem ceratócitos viáveis⁽⁵²⁾.

O *Keratec Eye Bank* liofiliza e disponibiliza córneas para o mundo todo. As córneas são colocadas em sistema de cultura de órgãos por seis semanas. Durante este tempo, a sorologia do doador é acessada para investigação de infecção por HIV, hepatite B, enquanto o sistema de cultura é avaliado para contaminação microbiológica. Córneas com baixa contagem de células são preparadas para transplante lamelar. Os segmentos córneo-esclerais são retirados do meio de cultura, sendo o epitélio, endotélio e membrana de Descemet removidos com uma micro-esponja. O botão é trepanado com um trépano de 8,0mm e a córnea é embebida em sacarose, e deixada para ressecar por 24 horas numa placa de PMMA. O tecido é então cortado em espessura uniforme com um instrumento de diamante, reidratado com solução de antibiótico e liofilizado. O tecido liofilizado fica guardado em temperatura ambiente por até três meses⁽⁵³⁾.

A forma de liofilização empregada neste trabalho consistiu primeiramente em crioprotéger a córnea inteira com sacarose 2,3 molar por 40 minutos para depois congelar o tecido no gelo seco por uma hora e depois no liofilizador por 24 horas. Com isto tentamos simplificar o método de criopresevar para liofilização, mantendo a mesma qualidade da córnea como pode ser percebida nas figuras 18, 20, 22 e 24 do anexo 5, além das características observadas por outros autores.

Diferentes métodos de reidratação de córneas já foram tentados. Maguen et al reidrataram as lenticulas utilizadas em gatos por 30 minutos com o meio de McCarey - Kaufman⁽³⁵⁾. Em outro trabalho, Maguen cita a necessidade de reidratar o tecido com solução de glicerina a 50% por 5 minutos, glicerina a 30% por cinco minutos e glicerina a 20% por 20 minutos. Verity et al reidrataram córneas liofilizadas por 10 minutos em glicerina a 50%, 10 minutos em glicerina a 30% e 10 minutos em glicerina a 20%. Com isso, obtiveram um aumento da espessura do tecido de 16% sobre a espessura original e demonstraram, através de microscopia eletrônica, preservação de toda a arquitetura lamelar com destruição total dos ceratócitos. Além disso, observaram

uma aparência ondulada das lamelas de colágeno devido a desidratação, a qual não permanecia na córnea fresca⁽⁵⁴⁾.

Leopold e Adler utilizaram diferentes soluções para reidratação por 30 a 60 minutos, tais quais, ringer com lactato, cloreto de sódio a 0.9%, 1.2% e 1.5%, soro ou humor aquoso. Com isto não perceberam nenhuma diferença na velocidade de reidratação ou no grau final de transparência da córnea⁽³³⁾. Com o método que estes dois autores desenvolveram para liofilizar e reidratar córneas, o estudo histológico mostrou um estroma diferente do normal, com núcleos picnóticos e espessamento do mesmo. O epitélio estava presente, porém com apenas duas camadas. No estudo histológico das córneas liofilizadas e transplantadas, não foi observado células inflamatórias⁽³³⁾.

Na primeira tentativa desta técnica, foi realizada apenas uma lavagem e percebeu-se que a sacarose continuava aderida à córnea, dificultando o seu manuseio. Percebeu-se então, que a reidratação com BSS ou com optisol por 30 minutos, distribuídos em três lavagens de 10 minutos, era importante para manter a arquitetura corneana e a integridade da camada de Bowman e membrana basal epitelial, porém com destruição dos ceratócitos, além da retirada completa do resto da sacarose, o que facilita o seu manuseio. Como as duas formas de reidratação eram muito semelhantes, decidimos manter a reidratação apenas com BSS com o intuito de simplificar e tornar mais barato o método. Chau et al também reidrataram as córneas com BSS antes de utilizarem em seus pacientes⁽¹²⁾.

Observou-se entretanto que na liofilização sem reidratação, as fibras de colágeno estão extremamente próximas, tocando suas fibras umas às outras e que com a reidratação, se tornam mais separadas e uma organização mais próxima do normal é mais evidente (Anexo 5, figura 20 maior em comparação com o controle no quadro menor). Percebemos também que algumas vezes, a água em excesso na córnea liofilizada não está distribuída de forma tão uniforme, podendo formar pequenos lagos entre as fibras, caso a córnea liofilizada reidratada contenha mais que 74,3 – 81,6% de água em seu peso total. Estes achados foram bastante semelhantes aos da literatura⁽⁵⁵⁾. Essas alterações sutis, muitas vezes imperceptíveis, não alteram o

paralelismo e integridade das fibras, não interferindo com o resultado final da córnea liofilizada transplantada.

Na figura 20 do anexo 5, vê-se no detalhe superior, uma foto de microscopia eletrônica de uma córnea preservada em optisol por 11 dias. A foto maior é de uma córnea liofilizada e reidratada após um ano. Percebe-se com isso, que uma córnea em optisol com mais de 10 dias de preservação, no que tange a integridade do ceratócito, encontra-se bastante semelhante a uma córnea liofilizada, ou seja, com descontinuidade de sua membrana celular e vacuolização de seu estroma, o que demonstra o sofrimento da célula. Entretanto, a integridade deste ceratócito não é fundamental para o sucesso de um transplante lamelar anterior⁽⁵⁶⁾.

As ondulações ou tortuosidades das lamelas de colágeno observadas por Verity et al⁽⁵⁴⁾ foram contornadas por este grupo ao se liofilizar córneas inteiras e não lamelas feitas por microcerátomo (figura 16, anexo 4).

Os resultados experimentais deste estudo com córneas liofilizadas por até um ano demonstraram manutenção da estrutura anatômica da córnea anterior (anexo 4, figura 15) e preservação da camada de Bowman e membrana basal epitelial (anexo 5, figura 24), o que evitaria a existência de defeito epitelial persistente no pós-operatório dos pacientes.

No caso das córneas que foram utilizadas para o transplante lamelar nesta pesquisa, como foi realizado um estudo experimental demonstrando que os cortes histológicos permaneceram iguais após sete dias, quinze dias, trinta dias e um ano da liofilização, não foram necessários a utilização de córneas que tivessem sido liofilizadas por longos períodos. Ainda assim, a média do tempo de preservação total da córnea foi significativamente maior no grupo de córneas liofilizadas em comparação com o grupo de córneas em optisol e, este tempo de preservação teve correlação negativa e não significativa com a melhor acuidade visual corrigida.

Dos trabalhos disponíveis em literatura, foram transplantadas córneas desidratadas em animais após período de três dias até um ano de armazenamento^(32,57, 58). Outras córneas liofilizadas para epiceratofacia foram utilizadas

em animais por não mais que uma semana⁽⁵⁹⁾. Em humanos, foi utilizada para transplante lamelar após período de até três meses de liofilização⁽⁶⁰⁾. Outros estudos que utilizaram córneas liofilizadas, não especificam por quanto tempo as mesmas ficaram armazenadas^(35, 36, 52, 53, 61-63).

O transplante lamelar anterior realizado neste estudo foi feito pela técnica de dissecação intralamelar com ar e durante a sua execução, não foram observados problemas com a técnica, tal qual ruptura da membrana de Descemet. Em outros estudos em que se fez a dissecação lamelar simultânea com ar e com BSS, observou-se nove (20%) casos de ruptura de Descemet, cinco casos (11%) de formação de dupla câmara, dois casos (5%) de defeito epitelial persistente, um caso (2%) de midríase fixa e um caso (2%) de uveíte recorrente⁽³⁶⁾.

Não foram observados problemas de epitelização nos dois grupos de pacientes transplantados nesta pesquisa. A córnea estava completamente epitelizada por volta do quinto dia após a cirurgia. Não foram realizadas tarsorrafia, aplicação de toxina botulínica ou colocação de lente de contato terapêutica em nenhum paciente no nosso estudo. Em trabalhos de epiceratofacia com córneas liofilizadas, a reepitelização completa ocorreu cerca de seis dias após a cirurgia⁽⁶³⁾. Coombes recomendou no seu estudo de transplante lamelar anterior com córneas liofilizadas, realizar tarsorrafia em todos os pacientes ou, naqueles que isto não fosse possível, induzir uma ptose por toxina botulínica e proteção com lente de contato terapêutica. Com isto, a média de epitelização era de 3,8 dias⁽³⁶⁾. Ele ressaltou esta necessidade, pois na ausência da realização destas medidas preventivas em suas mãos, houve dois casos de defeito epitelial persistente, sendo um com melting do tecido⁽³⁶⁾.

A média da idade dos pacientes transplantados no grupo liofilizado era de 29,8 anos e no grupo optisol era 30,9 anos, semelhante à média da idade encontrada em outros trabalhos que foi de 29,8 anos⁽³⁶⁾.

Observamos que a média da visão não corrigida em logmar após seis meses do transplante foi de 0.46 (por volta de 20/50) no grupo liofilizado e de 0.70 (20/100) no grupo optisol. Em outros estudos, a média da visão não corrigida foi de 6/36 (equivalente a 20/200) após 1 ano⁽³⁶⁾. A melhor medida de visão corrigida no

grupo liofilizado teve média de 0.16 (por volta de 20/25) e no grupo optisol foi de 0.26 (por volta de 20/32). Coombes obteve a média da melhor visão corrigida após 1 ano por volta de 6/9 (equivalente a 20/30) ⁽³⁶⁾.

Ao detalharmos a melhor visão corrigida em logmar alcançada no grupo liofilizado, ela foi melhor ou igual a 0.2 ou 20/32 em 8(80%) dos pacientes e em dois (20%) era de 0.3 ou 20/40. Ressalta-se que um (10%) paciente deste grupo chegou a atingir 0.0 ou 20/20. No grupo optisol, seis (60%) dos pacientes atingiram visão entre 0.1-0.2 ou 20/25 – 20/32, três (30%) dos pacientes alcançaram 0.3 ou 20/40 e um (10%) obteve visão de 0.6 ou 20/80. Estes dados corroboram com a literatura em que 95.8% de pacientes com transplante lamelar por córnea liofilizada atingiram uma visão de 6/9 ou melhor (20/30 ou melhor) ⁽³⁶⁾. Neste mesmo estudo, após 1 ano, os pacientes apresentaram visão de 6/9 ou 20/30 em 64% dos pacientes e 40% atingiram 6/6 ou 20/20⁽³⁶⁾. Em outro trabalho, os quatro pacientes transplantados com córnea liofilizada, apresentavam a melhor visão pós-operatória corrigida como sendo melhor ou igual a 6/12 (equivalente a 20/40) ⁽¹²⁾. Tayyib transplantou seis pacientes com cicatrizes corneanas, utilizando córneas liofilizadas e obteve no final de seu estudo a melhor visão corrigida estendendo-se de 6/6 a 6/60 (20/20 a 20/200)⁽⁶⁰⁾. Em outro trabalho de transplante lamelar por outras patologias, que não o ceratocone e sem utilizar córnea liofilizada, a melhor visão corrigida foi de 20/50 ou melhor em 62.8% dos pacientes e em 12 pacientes, a visão não passou de 20/200⁽⁶⁴⁾.

Houve um aplanamento acentuado da córnea nos dois grupos, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. No grupo liofilizado, a média da menor ceratometria era de 52.7 dioptrias e caiu para 41.00 dioptrias ($p = 0,001$), representando um aplanamento de 11.7 dioptrias. No grupo optisol, uma queda semelhante na média da ceratometria também foi observada, passando de 53.9 dioptrias no pré-operatório para 41.6 dioptrias aos seis meses ($p < 0,001$), representando um aplanamento de 12.3 dioptrias.

Fogla realizou transplante lamelar anterior pela técnica de *Big-bubble*, com retirada da Descemet da córnea doadora em 12 pacientes com ceratocone. A ceratometria pré-operatória nestes pacientes era de 49.8 dioptrias, caindo para 44.5 dioptrias no pós-operatório⁽⁴³⁾. Em outros estudos de transplante

lamelar anterior, a ceratometria média pré-operatória era de 56.2 dioptrias e caiu para 44.5 dioptrias em 6 meses⁽⁶⁵⁾.

Houve um aumento da espessura corneana estatisticamente significativa nos dois grupos após a cirurgia. A média da paquimetria ultra-sônica prévia era de 441 μm no pré-operatório e aumentou para 582.5 μm após seis meses de acompanhamento no grupo liofilizado, sem evidências de edema. No grupo optisol era de 447.5 μm e aumentou para 615.8 μm após seis meses. Os valores de paquimetria do ORBSCAN[®] também se elevaram de forma significativa nos dois grupos. No grupo liofilizado subiu de 387.3 μm para 580.8 μm no sexto mês. No grupo optisol, a avaliação pré-operatória era de 358.2 μm e passou a 606 μm no sexto mês.

Os trabalhos em literatura existentes retiram a membrana de Descemet e o endotélio da córnea doadora para a realização do transplante lamelar, logo é de se esperar que alguns dos seus valores sejam menores que os nossos. Shimazaki et al, por exemplo, encontraram espessura corneana mais fina após transplante lamelar anterior quando comparado ao penetrante em pacientes com cicatrizes ou distrofias de córnea, porém estes valores permaneceram estáveis durante o acompanhamento⁽⁶⁶⁾. No seu trabalho, os valores pré-operatórios caíram de 556 μm para 485 μm após 1 ano⁽⁶⁶⁾. Outros encontraram médias pós-operatória de 531 \pm 35.9 μm (490 - 614 μm)⁽⁴³⁾. Em outro trabalho, a paquimetria central variou de 620 a 730 μm ⁽⁶⁷⁾.

Não ocorreu variação estatisticamente significativa entre a contagem de células endoteliais entre o pré e o pós-operatório dos dois grupos. Não pode ser caracterizado desta forma, perda endotelial após a cirurgia.

Estes dados não estão totalmente de acordo com a literatura, uma vez que Sugita observou uma perda de células endoteliais de cerca de 13% em dois anos após transplante lamelar anterior⁽⁶⁴⁾. A média da celularidade endotelial após 6 meses em outro trabalho foi de 2899 \pm 499 cel/mm²⁽⁴³⁾. Em outro trabalho, observou-se perda da celularidade endotelial por seis meses e após este período, houve estabilização dos valores⁽⁶⁶⁾. Panda et al observaram contagem celular estável com

seis e doze meses, sendo $> 2200 \text{ cel/mm}^2$ em todos os seus pacientes, entretanto, não puderam comparar estes resultados com valores pré-operatórios, uma vez que não foram aferidos⁽⁴⁵⁾. Em outro trabalho em que foram utilizadas córneas liofilizadas, a média da densidade pós-operatória foi de 2417 cel/mm^2 , com uma tendência a diminuição da celularidade com o aumento da idade do paciente⁽⁶⁸⁾.

Com o exame de microscopia confocal, tentamos avaliar a celularidade do estroma doador e a integridade da membrana basal epitelial durante a evolução do pós-operatório, uma vez que durante o processo de liofilização, como já sabíamos, a córnea torna-se acelular.

A camada basal nos dois grupos durante a evolução apareceu como um mosaico uniforme de células com bordos claros (figuras 5 e 6), como em outro trabalho⁽⁶⁹⁾, entretanto, aos 21 dias, alguns pacientes apresentavam um certo aumento da refletividade dos núcleos das células basais, indicando o processo de recuperação das mesmas. Ao contrário deste estudo, existe outro mostrando que o rearranjo da camada basal epitelial só se restabelece após 6 meses do transplante⁽⁷⁰⁾.

Aos 21 dias após a cirurgia, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à distribuição da densidade dos ceratócitos ($p < 0,001$), onde no grupo liofilizado os valores de densidade foram significativamente menores do que no grupo optisol.

Entretanto esta celularidade aumentou no decorrer da evolução, quando no terceiro mês, seis pacientes transplantados com córneas liofilizadas já apresentavam ceratócitos no estroma doador, sendo esta densidade também mais baixa quando comparada a córneas preservadas em optisol.

Percebe-se assim, que ocorre migração dos ceratócitos para a córnea transplantada pelo lado não transplantado, como em outro estudo⁽⁷¹⁾ e, que foi encontrada variação estatisticamente significativa entre as avaliações de 21 dias e seis meses ($p = 0,031$), onde seis (60%) olhos passaram de acelular no 21º dia para celular em seis meses, totalizando sete córneas liofilizadas apresentando ceratócitos neste período, porém com densidade mais baixa que as do grupo optisol (figuras 7 e 8), que

ainda assim é mais baixa do que córneas não transplantadas⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. Observa-se um aumento da refletividade dos núcleos dos ceratócitos nos dois grupos em alguns cortes, sendo mais intensa no grupo liofilizado, indicando atividade dos mesmos, como em outro trabalho com córneas transplantadas⁽⁷⁰⁾.

Ao contrário das células endoteliais, ceratócitos podem ser repostos por divisão celular em primatas, caso sejam danificados⁽⁷⁵⁾. Entretanto, não se sabia, se os ceratócitos da córnea central (os quais foram transplantados) se dividem para repovoar os seus números ou se novas células migram da periferia⁽⁷³⁾. Em nosso trabalho percebemos que como na liofilização todos os ceratócitos estão mortos, os ceratócitos que foram encontrados após seis meses, provavelmente migraram da periferia da córnea receptora para o leito doador.

Bourne mostrou também que a densidade de ceratócitos em córneas transplantadas é mais baixa quando comparada a controles, além disso parece que os ceratócitos aparecem ativados após a cirurgia⁽⁷³⁾. Em outro trabalho em que foi realizada a contagem de ceratócitos em córneas transplantadas por transplante penetrante, observou-se que a densidade permaneceu constante num período de 12 meses, porém com média de densidade mais baixa que nos controles de cerca de 23%⁽⁷⁰⁾. Com 57 semanas, o núcleo do ceratócito apresentava aspecto morfológico igual ao do olho normal⁽⁷⁰⁾.

Em outros trabalhos, a média da densidade celular em medidas bidimensionais como as utilizadas neste trabalho, foi de 328cel/mm²⁽⁷⁴⁾ e 265cel/mm²⁽⁷⁶⁾ em pacientes normais sem transplante.

Patel observou ainda maior densidade de ceratócitos no estroma anterior que no posterior e redução da densidade com a idade de cerca de 0.45% por ano⁽⁷⁴⁾. Em nosso estudo, como a córnea transplantada era classificada como tectônica nos dois grupos (endotélio não viável) e acelular no grupo liofilizado, observou-se maior densidade de ceratócitos no estroma posterior, e não no anterior como em outros trabalhos.

Este fenômeno de desaparecimento dos ceratócitos não é exclusivo da criopreservação ou da liofilização. Existem argumentos fortes demonstrando a apoptose dos ceratócitos numa profundidade de 50% ou mais devido a injúria epitelial, com pequeno dano para o tecido estromal circunjacente⁽⁷⁷⁾. Alguns autores acreditam ser necessária uma densidade de ceratócitos mínima para manter a transparência da córnea⁽⁷⁸⁾, enquanto outros acreditam que isto não seja necessário, uma vez que a cicatrização estromal e a transparência de um tecido congelado transplantado ocorre através do tecido receptor em casos de transplantes⁽⁷¹⁾, concordando com os resultados deste estudo.

Foi demonstrada a presença de antígenos de histocompatibilidade da classe I (HLA-A, B e C) no epitélio corneano e ceratócitos⁽⁷⁹⁾. Além disso, estes antígenos nos ceratócitos e células endoteliais podem funcionar como alvo para a destruição imunológica, mesmo que o epitélio do doador seja removido antes da cirurgia⁽⁷⁹⁾. A importância destes antígenos é demonstrada por trabalhos que apontam longas sobrevivências de transplantes mediante a compatibilidade HLA - A e HLA- B^(80, 81).

A ausência de ceratócitos na córnea doadora, talvez seja um fator protetor contra a rejeição. Um trabalho experimental em animais mostrou que o tecido corneano liofilizado não é rejeitado, mesmo que seja transplantado em receptores pré-sensibilizados, enquanto lenticulas de epiceratofacia preparadas com tecido fresco podem sofrer rejeição quando transplantadas em recipientes pré-sensibilizados ou em leitos vascularizados⁽⁸²⁾. Em um estudo experimental, observou-se a presença de antígenos HLA nos remanescentes de ceratócitos de lenticulas liofilizadas, porém apenas a presença destes não é suficiente para estimular uma rejeição imune⁽⁸³⁾. A viabilidade das células é provavelmente essencial para ativar o processo de rejeição e, como as mesmas não são viáveis após a liofilização, sua imunogenicidade é mínima⁽⁸³⁾.

Durante o curso desta pesquisa, não tivemos nenhum caso de rejeição em nenhum dos dois grupos. Entretanto, um paciente (JVF) do grupo optisol, o qual era extremamente alérgico, apresentou entre o segundo e o terceiro mês de pós-operatório, intensa reação de hiperemia e edema de conjuntiva em região perilímbica

ao se reduzir o corticóide. Com isso, fomos forçados a retirar todos os pontos alternados no terceiro e no quarto mês, com o intuito de prevenir uma rejeição estromal. No estudo, tivemos outros pacientes alérgicos, mas nenhum outro apresentou uma reação igual a deste paciente. Cabe-se aqui questionar, se caso tivesse sido utilizada uma córnea liofilizada neste paciente, se o mesmo apresentaria esta reação.

As correlações entre MAVC e densidade de ceratócitos foram positivas e não significantes nas avaliações de três meses ($r_s = 0,29$) e de 6 meses ($r_s = 0,17$). Isto quer dizer que, em tabela logmar, quanto maior a densidade de ceratócitos no estroma doador, pior seria a visão corrigida neste paciente. Estes dados, ainda que não significantes, nos apontam que a presença ou quantidade de ceratócitos não interfere na visão do paciente.

No sexto mês foi realizada a medida da lamela posterior tanto pelo confocal quanto pelo UBM, no intuito de avaliar se a quantidade do leito residual deixado durante a cirurgia interferiria na qualidade de visão do paciente.

No UBM esta medida é feita diretamente após confecção da foto e aferição pelo instrumento de mensuração do aparelho. Já no confocal, estas medidas são indiretas a partir da identificação da interface. Nele, a lamela anterior corresponderia a tudo que estiver anterior a região de interface e a lamela posterior, a tudo que estiver depois da interface (figuras 9 e 10).

Neste estudo, observou-se que as medidas da microscopia confocal e do UBM são semelhantes, sem diferença estatisticamente significativa entre si e entre o tipo de córnea utilizada, porém com valores discretamente mais elevados pela aferição do confocal, que pela aferição do UBM.

Observou-se ainda que a correlação entre MAVC no sexto mês e espessura da lamela posterior no confocal foi positiva e não significativa ($r_s = 0.14$), de tal forma que para o confocal, quanto maior o leito residual, pior seria a acuidade visual aferida. Para o UBM, esta correlação foi negativa e não significativa ($r_s = -0.24$). Isto quer dizer que para o UBM, quanto maior a espessura das lamelas, melhor seria a

acuidade visual. Entretanto, como em nenhum dos aparelhos, estas variáveis foram significantes, não se pode concluir que a quantidade de leito residual deixado no transplante lamelar tem interferência, com a quantidade de visão do paciente. Um trabalho publicado este ano, não mostrou nenhuma influência da espessura do leito residual na sensibilidade ao contraste, porém olhos com leito residual maior que $80\ \mu\text{m}$ tendem a apresentar redução da sensibilidade ao contraste em condições fotópicas, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa⁽⁴²⁾.

Por exemplo, nas figuras 9 e 10, temos pacientes nos quais se deixou pouco leito residual e apresentaram uma boa acuidade visual. Da mesma forma, temos pacientes, como o ILS com córnea liofilizada, em que foi deixado um leito residual de $185\ \mu\text{m}$ pelo UBM e mesmo assim, ele apresentou a MAVC de 20/20 (logmar 0.0). Em contrapartida, temos o caso da paciente CS com córnea em optisol, que com um leito residual de $93\ \mu\text{m}$, sua MAVC aos seis meses, não passou de 20/80 (logmar 0.6).

Da mesma forma ao se correlacionar, a espessura do leito residual com a transparência da córnea avaliada pelo examinador mascarado, observam-se correlações negativas e não significantes, tanto para o UBM quanto para o confocal (exceto para o examinador 2 e para a lamela posterior quando examinada pelo UBM). Isto quer dizer que de forma geral, porém estatisticamente não significante, a transparência será melhor, quanto menor o leito residual deixado.

De acordo com o examinador 1 não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto as variáveis avaliadas com três meses e seis meses ($p > 0,005$).

O examinador 2 encontrou diferença estatisticamente significativa no quesito opacidade do leito receptor, onde mais córneas liofilizadas foram ditas como tendo uma opacidade leve no leito receptor do que córneas em optisol ($p = 0,021$). Não houve diferença em termos de transparência ou ceratite. Os dois grupos foram considerados normais para o examinador 2 e ele não conseguiu concluir se o tecido avaliado era liofilizado ou não ($p = 0,812$).

Ao se comparar a avaliação feita pelos dois examinadores, observou-se diferença estatisticamente significativa nos quesitos: opacidade do leito receptor ($p=0,002$) e transparência ($p=0,008$). O examinador 1 classificou um paciente do grupo liofilizado, com opacidade do leito receptor como sendo intensa, enquanto o examinador 2 não observou opacidade tão intensa em nenhum dos dois grupos. Da mesma forma, a transparência foi classificada como razoável e ruim em dois pacientes com córneas liofilizadas. O examinador 2 classificou a transparência dos dois grupos como sendo excelente ou boa para todos os pacientes.

Analisando estatisticamente a resposta de ambos os examinadores, observou-se que o critério transparência os influenciou na classificação da córnea como liofilizada. Entretanto, esta correlação nem sempre se associou a uma resposta real, uma vez que uma córnea em optisol foi erroneamente classificada como liofilizada pelos dois examinadores, como também cinco córneas liofilizadas foram classificadas como preservadas em optisol pelos dois examinadores. Não há dados na literatura para compararmos estes resultados.

Na avaliação da sensibilidade ao contraste, somente dois pacientes do grupo liofilizado apresentavam-se dentro da curva de normalidade, desta forma, decidimos optar por uma classificação de acordo com a melhor acuidade visual apresentada pelos pacientes dentro do gráfico FACT. De forma geral, os pacientes do grupo liofilizado apresentaram resultados melhores de acuidade visual na sensibilidade ao contraste que pacientes do grupo optisol uma vez que seis (60%) dos pacientes do grupo liofilizado apresentaram acuidade visual na sensibilidade ao contraste =20/40, enquanto quatro (40%) dos pacientes do grupo optisol apresentaram acuidade visual =20/40, entretanto estes resultados não foram estatisticamente significantes ($p=0,354$).

Foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre MAVC e sensibilidade ao contraste ($r_s = 0,62$ $p = 0,004$), indicando que quanto melhor a acuidade visual corrigida, melhor seria a sensibilidade ao contraste.

Shimazaki não observou diferença na sensibilidade ao contraste ou no teste de glare entre pacientes operados com transplante penetrante ou com transplante lamelar⁽⁶⁶⁾. Mannis observou que a curva de sensibilidade ao contraste em

olhos com transplante penetrante era mais baixa quando comparada com olhos de mesma acuidade visual porém não transplantados, exceto para frequências espaciais mais baixas, entretanto, estes mesmos olhos apresentavam resultados melhores que o olho contralateral doente e não transplantado⁽⁸⁴⁾. Infelizmente não há dados na literatura relacionando sensibilidade ao contraste com uso de córneas liofilizadas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ao que tange a satisfação e qualidade de vida após a cirurgia. No grupo liofilizado, a pontuação média foi de 72 e no grupo optisol foi de 73. Além disso, a associação entre MAVC e pontuação no questionário foi fraca e não significativa tanto no 3º como no 6º mês após a cirurgia. Em um trabalho realizado no Brasil em que avalia a qualidade de vida após pelo menos 1 ano de transplante penetrante pelo questionário VF-14, obteve-se pontuação mais baixa que a nossa, com média de 69,3 e uma fraca correlação entre acuidade visual pós-operatória e pontuação no questionário⁽⁸⁵⁾. Em outro estudo também no Brasil, a pontuação média foi de 78,7 e novamente foi encontrada fraca associação entre acuidade visual e pontuação no VF-14⁽⁸⁶⁾. Não há questionários aplicados a pacientes com transplante lamelar para que possamos comparar com o nosso estudo.

6. CONCLUSÕES

1 – Liofilizar córneas, crioprotendendo-as com sacarose por 40 minutos e reidratá-las com solução salina balanceada por 30 minutos, demonstrou ser um método eficaz para preservar córneas por longos períodos em temperatura ambiente para transplantes lamelares anteriores.

2 – A microscopia de luz e a microscopia eletrônica demonstraram preservação do arcabouço geral da córnea liofilizada, manutenção das lamelas de colágeno, porém com destruição dos ceratócitos.

3 – A liofilização é um método seguro para a utilização em transplante lamelar anterior em pacientes portadores de ceratocone, com resultados clínicos e cirúrgicos semelhantes aos de pacientes que receberam transplantes com córneas preservadas em optisol.

7. ANEXOS

Anexo 1.

Parecer do Comitê de Ética Médica das duas instituições em que foi realizado o estudo: UNIFESP e BOS.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 13 de abril de 2006.
CEP 0165/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) **ROBERTA JANSEN DE MELLO FARIAS**
Co-investigadores: Marta Sartori (orientadora), Roberta Farias
Disciplina/Departamento: Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Análise comparativa entre o uso do anel intraestromal e o transplante penetrante de córnea para tratamento do ceratocone**".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção terapêutica - cirúrgica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco médio, desconforto leve, envolvendo cirurgia ocular.

OBJETIVOS: Comparação de 2 grupos de pacientes portadores de ceratocone tratados cirurgicamente, sendo 1 com transplante penetrante de córnea e o outro com o implante de segmentos do anel intra-estromal ou anel de Ferrara.

RESUMO: Participarão do estudo, pacientes portadores de ceratocone graus III e IV, distribuídos em 2 grupos de tratamento: um para o uso do anel de Ferrara e outro para o transplante penetrante de córnea. Serão realizadas avaliações pré-operatória e pós-operatória, constando o exame oftalmológico de: avaliação da acuidade visual para longe, com luz acesa, biomicroscopia em lâmpada de fenda, avaliação da topografia corneana por disco de Plácido, tonometria de aplanção, mensuração das paquimetrias central da córnea e do ápice do ceratocone, mapeamento de retina com lente de 20D, teste de sensibilidade, aberrometria..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo visa comparar o uso do anel intra-estromal de Ferrara e o transplante penetrante de córnea para tratamento do ceratocone. Estudo fundamentado, utilizando o anel de Ferrara, liberado pelo CFM em fevereiro de 2005..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados nas avaliações..

TCLE: Adequado, de acordo com a resolução 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo - R\$ 635,00.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: sem objetivo acadêmico.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **8/4/2007 e 2/4/2008**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo



**Hospital
Oftalmológico
Sorocaba**

C.N.P.J. (MF) 50.795.566/0002-06
Rua Nabeck Shiroma, 210
Cep 18031-060 - Sorocaba/SP
Tel.: (15) 3212.7000
e-mail: hos@hosbos.com.br
www.hosbos.com.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Sorocaba, 18 de Novembro de 2005.

Pesquisador (a): **ROBERTA JANSEN DE MELLO FARIAS**

Disciplina/Departamento: **OFTALMOLOGIA**

Ref.: **Projeto de Pesquisa**

TRANSPLANTE LAMELAR COM A UTILIZAÇÃO DE CÔRNEAS LEOFILIZADAS

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Oftalmológico de Sorocaba **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto acima.
Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

4. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise da mudanças proposta .
5. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo
6. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente

Dra. Luciene Barbosa de Sousa
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do
Hospital Oftalmológico de Sorocaba

Devolver a visão a um Deficiente Visual é um Milagre que Você também pode fazer

**Banco de
Olhos de
Sorocaba**
CNPJ (MF) 50.795.566/0001-25

Anexo 2.

Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TRANSPLANTE LAMELAR COM A UTILIZAÇÃO DE TECIDO CORNEANO

LIOFILIZADO

Este estudo consiste de um modelo prospectivo, caso-controle, randomizados cujas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar o resultado e satisfação cirúrgica com dois procedimentos já conhecidos.

Pacientes portadores de ceratocone e que apresentem AV<20/60 ou intolerância ao uso de lente de contato, serão submetidos a procedimento cirúrgico para correção do astigmatismo.

O transplante lamelar é procedimento de conhecimento da população que consiste na permuta da córnea doente por uma córnea sadia de cadáver. É realizado mediante o uso de anestesia local com sedação e sutura do botão doador.

Haverá dois grupos de pacientes para cirurgia. Um fará o transplante com uso de enxerto de cadáver liofilizado e o outro com uso de enxerto de cadáver preservado em Optisol GS.

Aproximadamente 20 pacientes participarão deste estudo no Hospital Oftalmológico de Sorocaba e Universidade Federal de São Paulo. Antes da cirurgia, você deverá responder a várias perguntas e realizar exames para garantir a sua possibilidade de para participar deste estudo. Então, se desejar participar, será solicitado que você assine este termo de consentimento livre e esclarecido, que indica que você recebeu informações sobre os possíveis riscos e benefícios envolvidos em sua participação. Você será então admitido no estudo.

Antes da cirurgia, você será submetido a uma avaliação oftalmológica completa, incluindo exames de microscopia especular, topografia, paquimetria ultrasônica, refração e teste de lente de contato.

Depois que todos os exames forem concluídos e você continuar sendo um paciente elegível para a participação no estudo, você será sorteado (randomizado, decisão do tipo sorteio) para um dos dois grupos de tratamento descritos acima.

Após a cirurgia você utilizará colírios por pelo menos três meses e será submetido à exames periódicos oftalmológicos com 1 dia, 7 dias, 30, 60, 90 dias, 6 meses e 12 meses.

Durante este estudo de 12 meses, seu médico poderá solicitar a realização de outros exames oftalmológicos quando necessários.

O desconforto em relação às cirurgias consiste no próprio ato cirúrgico, na anestesia e nos retornos frequentes em ambulatório durante um ano.

Somente no final do estudo poderemos concluir a melhor técnica cirúrgica para o tratamento do ceratocone. O paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra Roberta Jansen de Mello Farias, que pode ser encontrado no endereço **Rua Botucatu 622**, telefone(s) 5084-4832 e (11) 9312-0872. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – Cj. 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem

direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Transplante lamelar com uso de córnea liofilizada”. Discuti com a Dra. Roberta Jansen de Mello Farias ou com a Dra. Luciene Barbosa de Sousa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, além das garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 3

Tabela com os resultados de todas as córneas doadas para os transplantes

Tabela 1: Avaliação das córneas doadas para liofilização ou preservação em optisol

Variáveis	Grupos		Comparação
	Liofilizado (n = 10)	Optisol (n = 10)	
Idade do doador			
Média (dp)	71,4 (16,7)	68,5 (22,9)	p = 0,570
mediana	78	72	
Mínimo – máximo	30 – 86	18 – 94	
Tempo entre o óbito e enucleação TOE (horas)			
Média (dp)	3,65 (1,49)	4,45 (2,72)	p = 0,466
mediana	3	4	
Mínimo – máximo	2 – 7	1 – 10	
Tempo entre o óbito e enucleação			
≤ 6 horas	9 (90,0)	8 (80,0)	p = 0,542
> 6 horas	1 (10,0)	2 (20,0)	
Tempo entre o óbito e a preservação TOP (horas)			
Média (dp)	13,8 (4,6)	8,8 (6,0)	p = 0,061
mediana	13	5	
Mínimo – máximo	5 – 20	3 – 19	
Tempo de preservação em optisol			
Média (dp)	9,4 (2,4)	10,3 (3,2)	p = 0,361
mediana	9	11,5	
Mínimo – máximo	7 – 14	4 – 13	
Tempo de liofilização			
média (dp)	7,6 (3,2)		p = ---
mediana	9	---	
mínimo – máximo	4 – 11		
Tempo de preservação total			
Média (dp)	17,0 (2,7)	10,3 (3,2)	p < 0,001 *
mediana	16,5	11,5	
Mínimo – máximo	14 – 23	4 – 13	
Halo senil – n (%)			
0	0 (0,0)	1 (10,0)	p = 0,059
1	0 (0,0)	1 (10,0)	
2	2 (20,0)	4 (40,0)	
3	8 (80,0)	4 (40,0)	
Edema estromal – n (%)			
1	5 (50,0)	4 (40,0)	p = 0,707
2	4 (40,0)	5 (50,0)	
3	1 (10,0)	1 (10,0)	

Anexo 4**Fotos das lâminas de Microscopia de Luz**

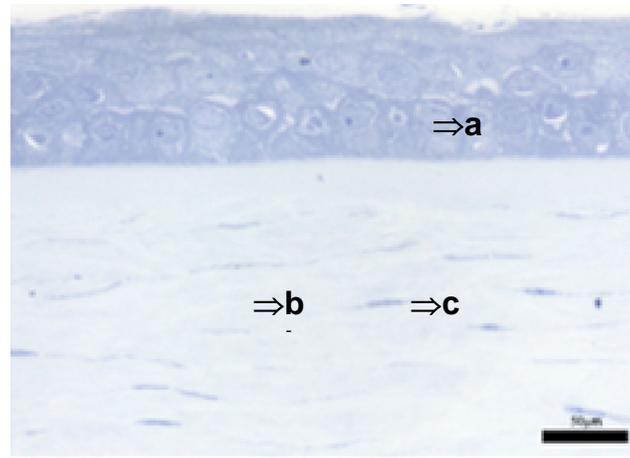


Figura 1: Lamela de córnea nova sem liofilização (aumento 20x, barra 50µm) a: epitélio; b: estroma; c: ceratócito.

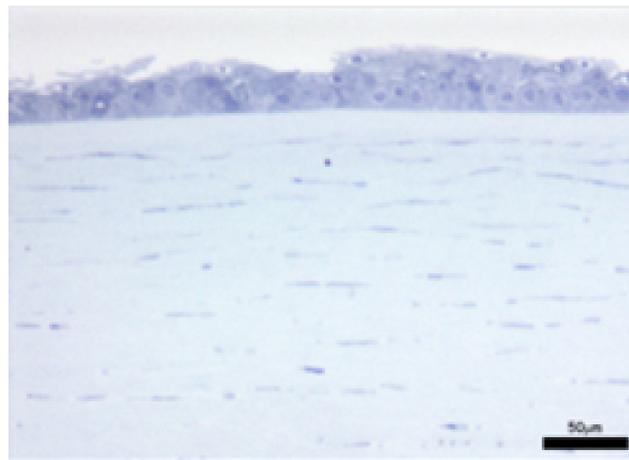


Figura 2: Lamela de córnea antiga sem liofilização (aumento 20x, barra 50µm).



Figura 3: Lamela de córnea liofilizada sem criopreservante e reidratada com água destilada (aumento 20x, barra 50µm).

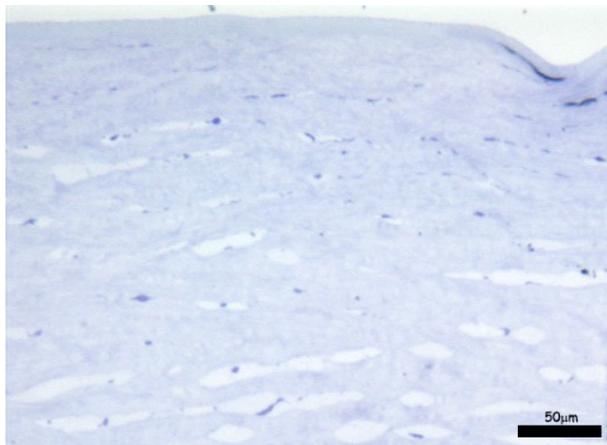


Figura 4: Lamela de córnea liofilizada sem criopreservante e sem reidratação (aumento 20x, barra 50μm).

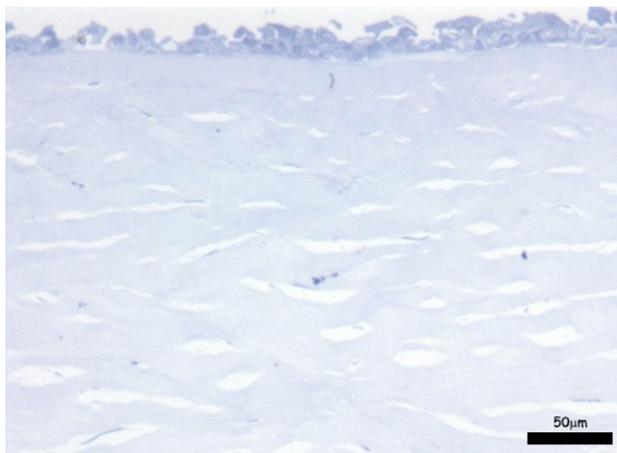


Figura 5: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e sem reidratação (aumento 20x, barra 50μm).

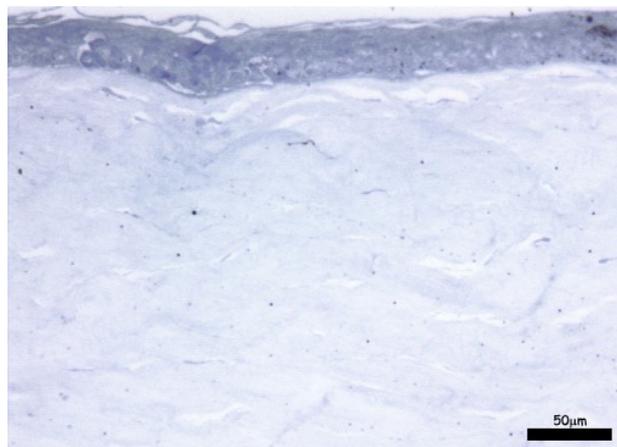


Figura 6: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratado com água destilada (aumento 20x, barra 50μm).

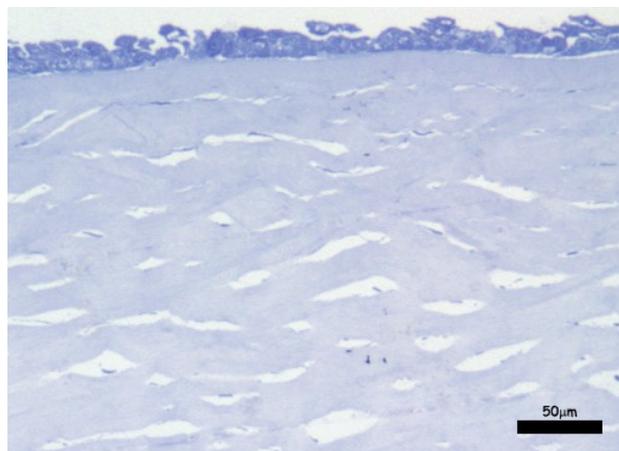


Figura 7: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratado com BSS (aumento 20x, barra 50μm).

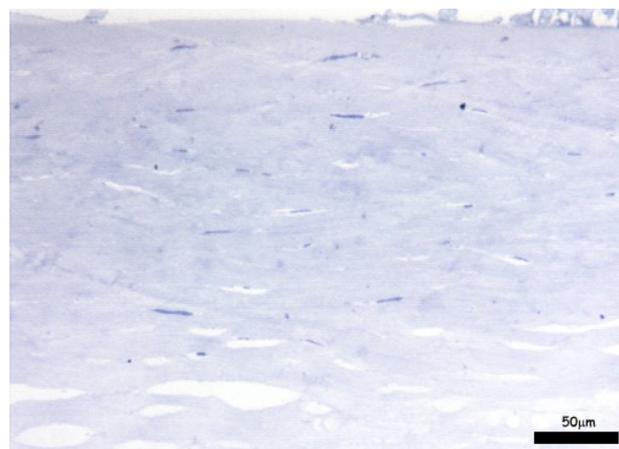


Figura 8: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratado com PBS (aumento 20x, barra 50μm).

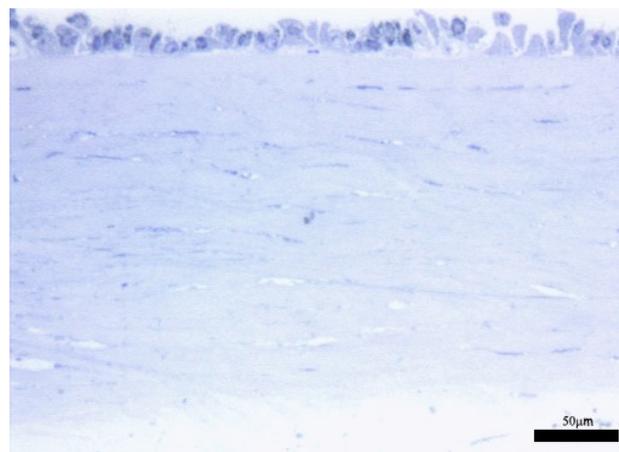


Figura 9: Lamela de córnea nova liofilizada com sacarose e reidratada com BSS (aumento 20x, barra 50μm).



Figura 10: Lamela de córnea nova liofilizada com sacarose e reidratada com optisol GS (aumento 20x, barra 50µm).

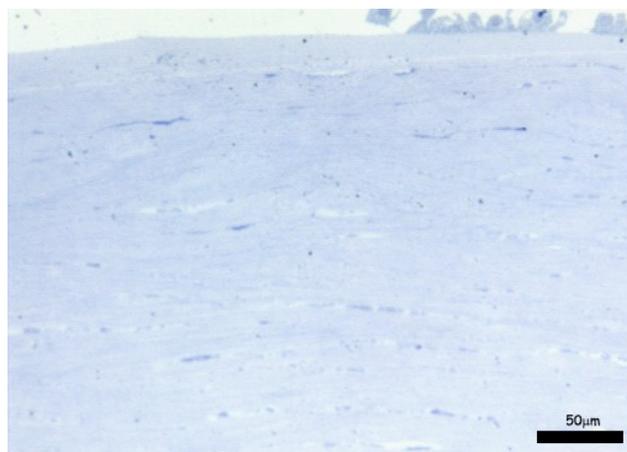


Figura 11: Lamela de córnea antiga liofilizada com sacarose e reidratada com BSS (aumento 20x, barra 50µm).

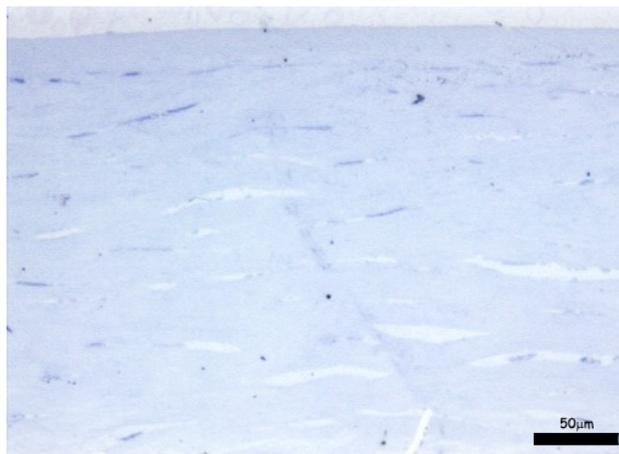


Figura 12: Lamela de córnea antiga liofilizada com sacarose e reidratada com optisol (aumento 20x, barra 50µm).



Figura 13: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS após 15 dias de liofilização (aumento 20x, barra 50 μ m).



Figura 14: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS após 30 dias de liofilização (aumento 20x, barra 50 μ m).



Figura 15: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS após 1 ano de liofilização (aumento 20x, barra 50 μ m).



Figura 16: Córnea inteira liofilizada com sacarose e reidratada com BSS (aumento 20x, barra 50µm).

Anexo 5**Fotos das Lâminas de Microscopia Eletrônica**

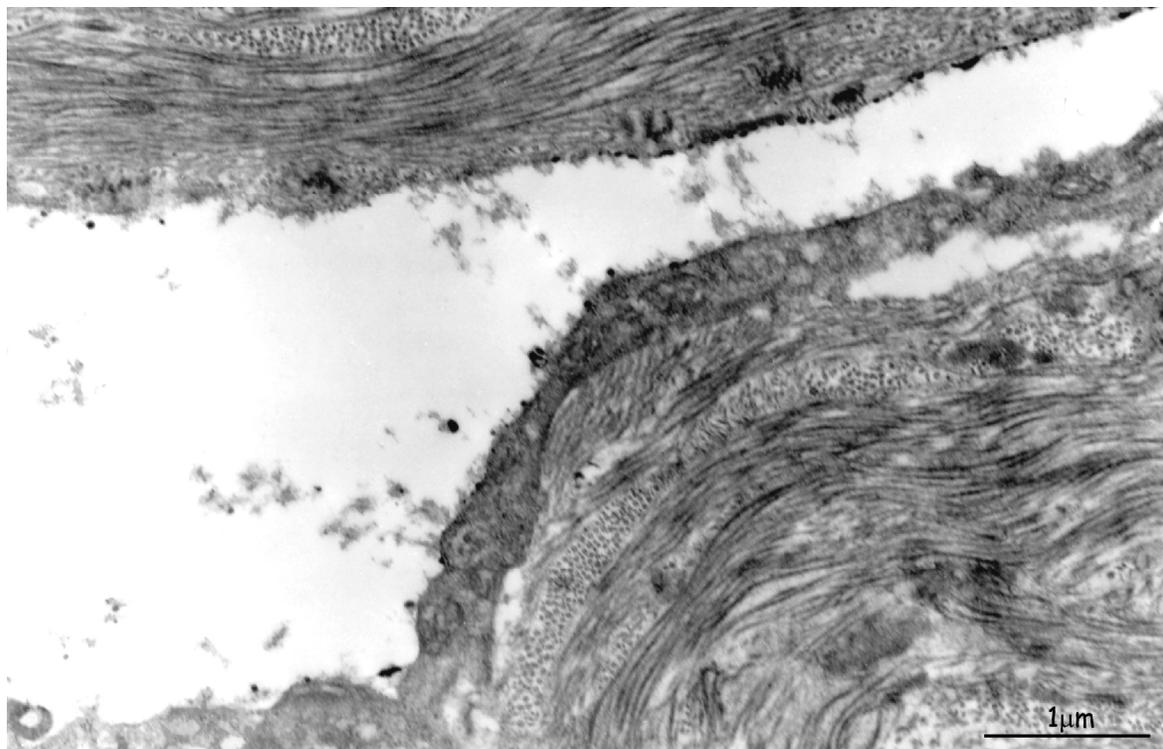


Figura 17: Lamela de córnea liofilizada sem criopreservante e sem reidratação. Região do estroma (aumento 20.000x ou 20K, barra 1 μ m).

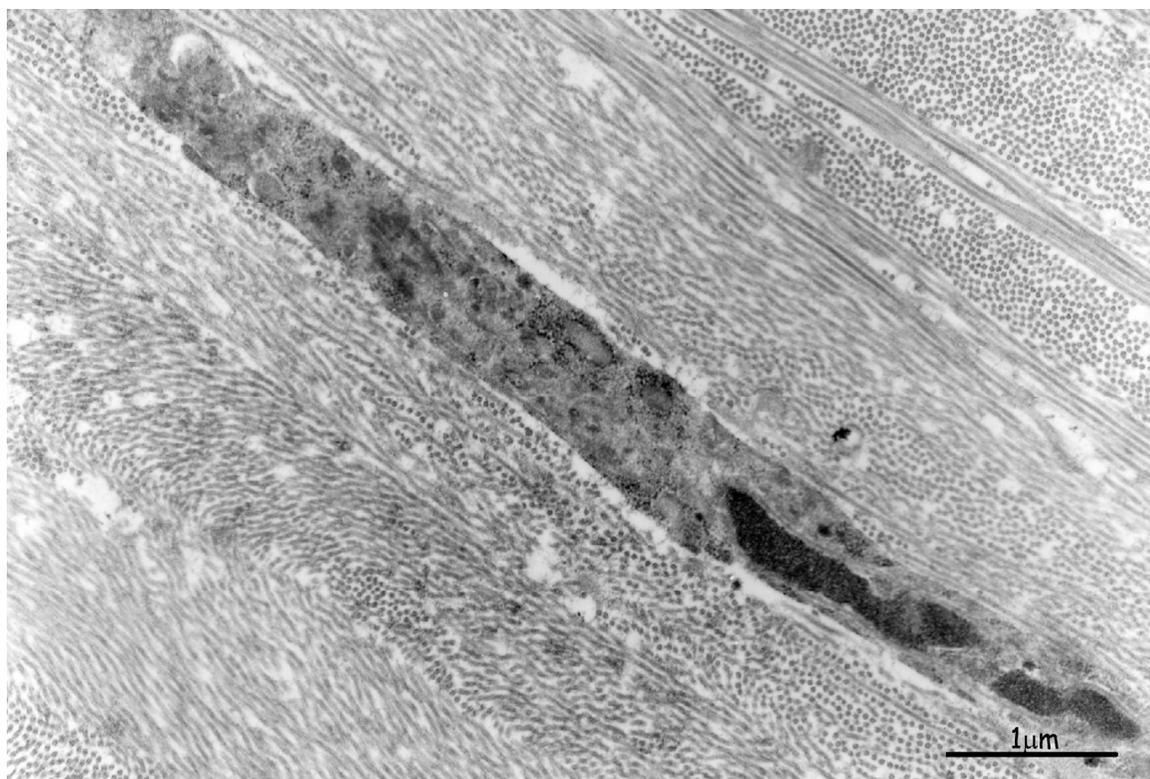


Figura 18: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e sem reidratação. Região do estroma (aumento 20.000x ou 20K, barra 1 μ m).

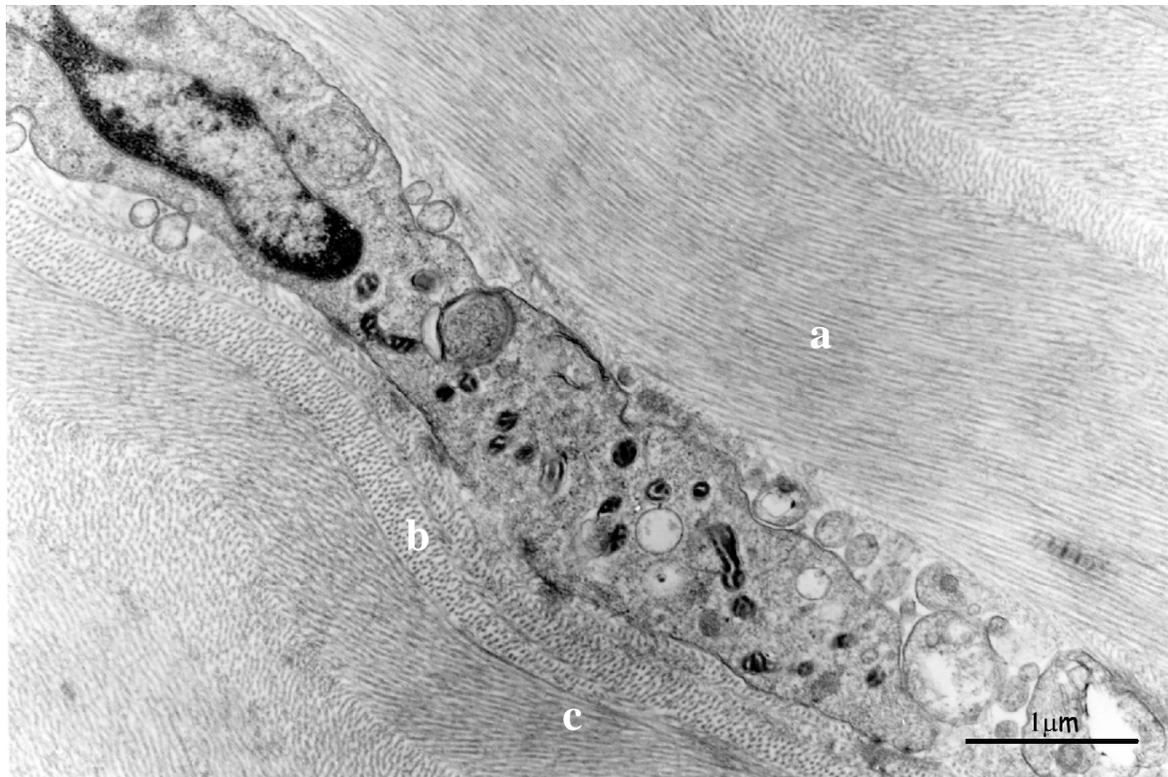


Figura 19: Lamela de córnea sem liofilização. Região do estroma (aumento 20.000x ou 20K, barra 1 μ m): a: corte de fibras longitudinais; b: transversal e c: oblíqua.



Figura 20: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS após um ano. Região do estroma (aumento 20.000x, barra 1 μ m): a: corte longitudinal, b: transversal e c: oblíqua.

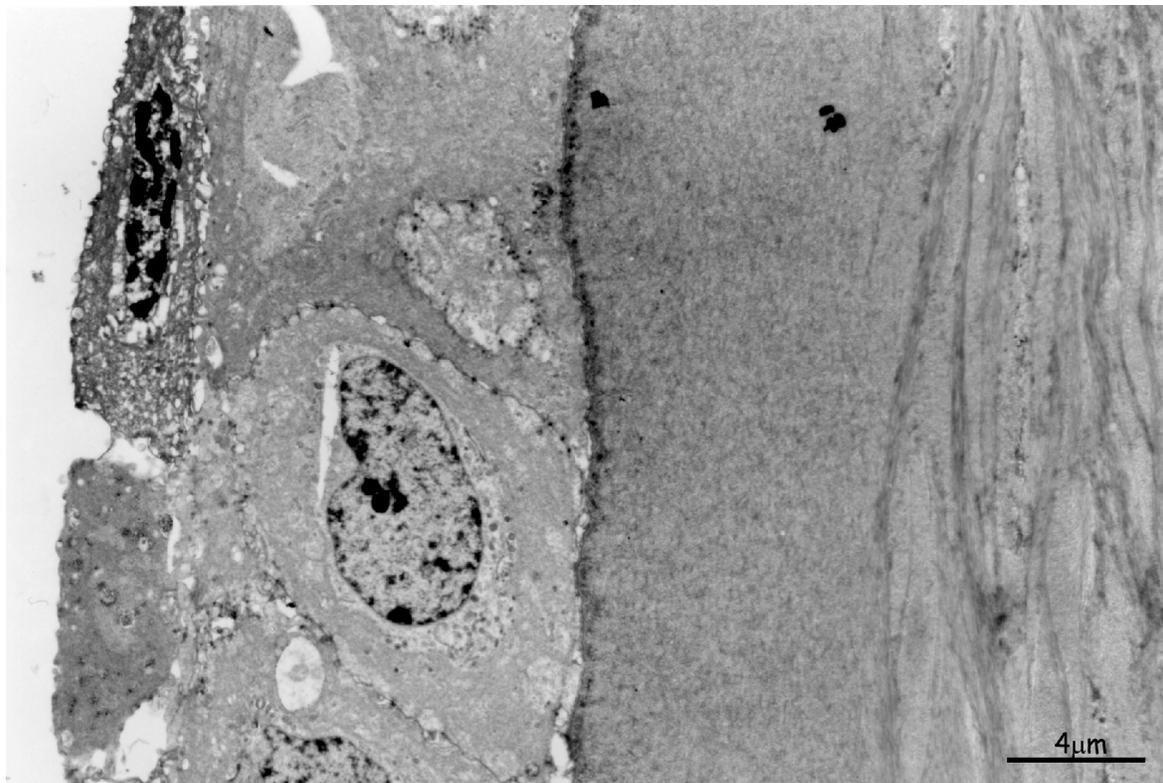


Figura 21: Lamela de córnea sem liofilização. Epitélio, membrana basal epitelial e camada de Bowman (aumento de 5.000x, barra 4 μ m).

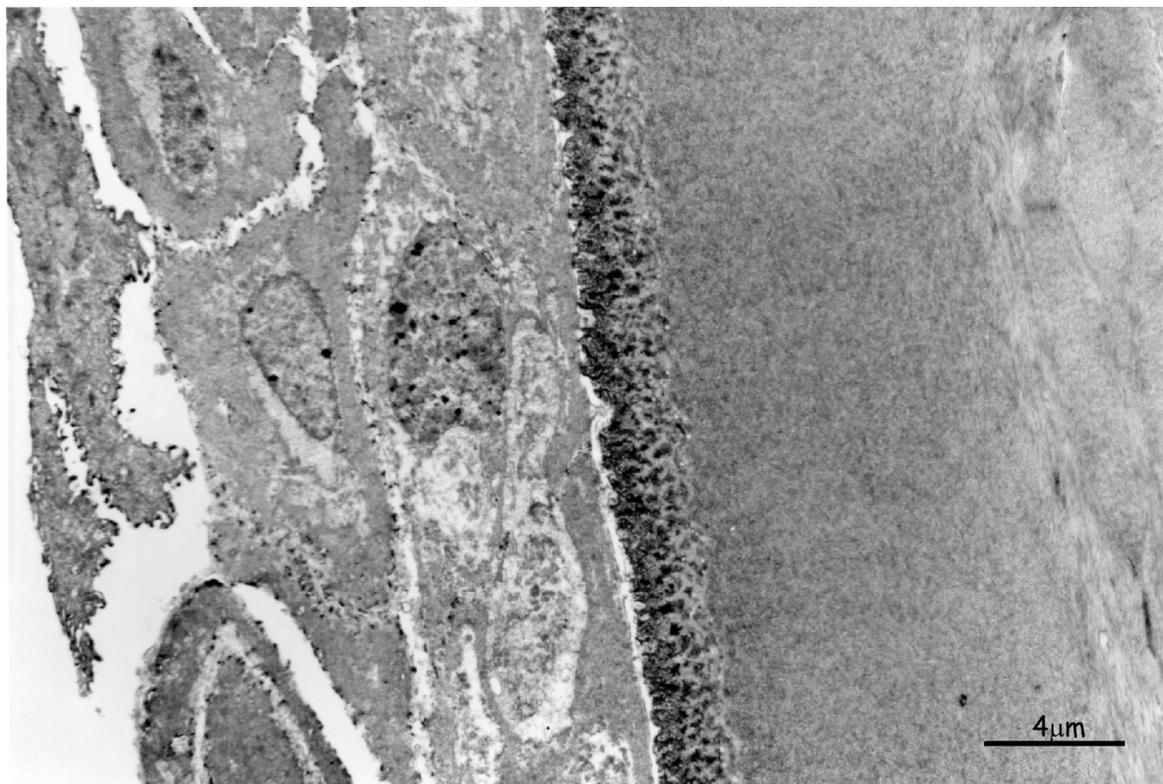


Figura 22: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS após 15 dias. Epitélio, membrana basal epitelial e camada de Bowman (aumento de 5.000x, barra 4 μ m).

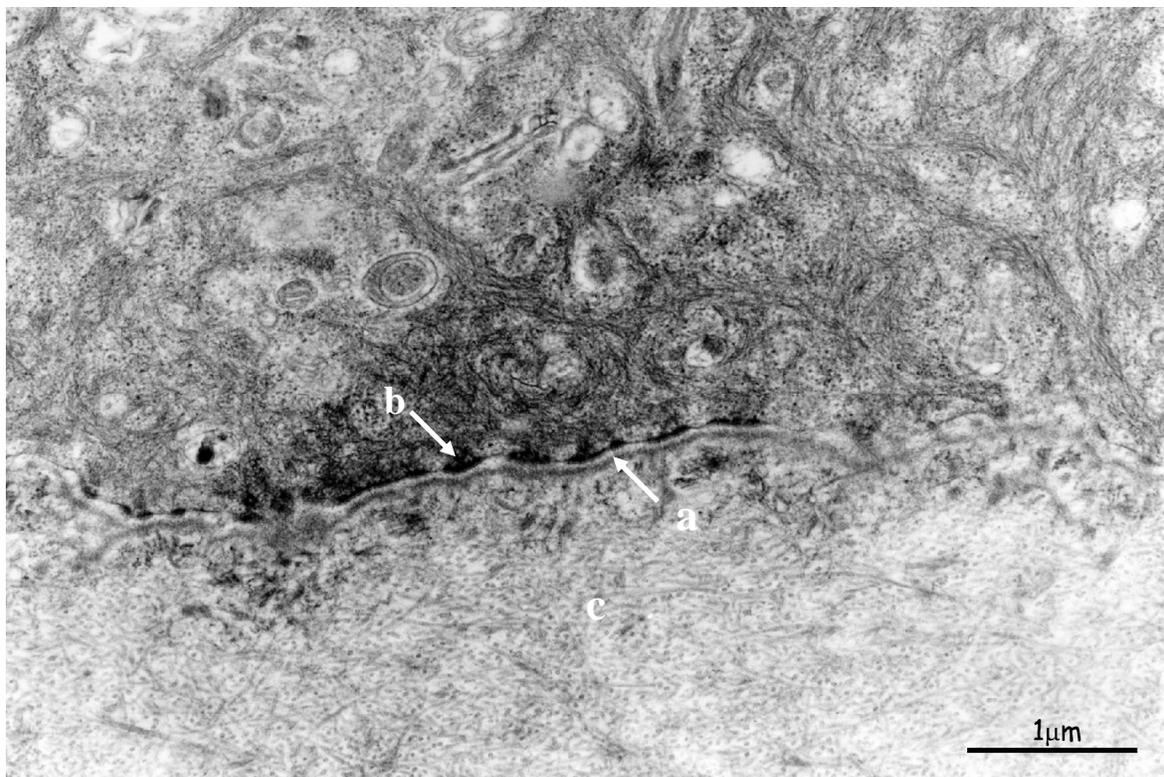


Figura 23: Lamela de córnea sem liofilização. Membrana basal epitelial e camada de Bowman (aumento de 12.000x, barra 1 μ m) a: membrana basal; b: hemidesmosomos; c: Bowman.

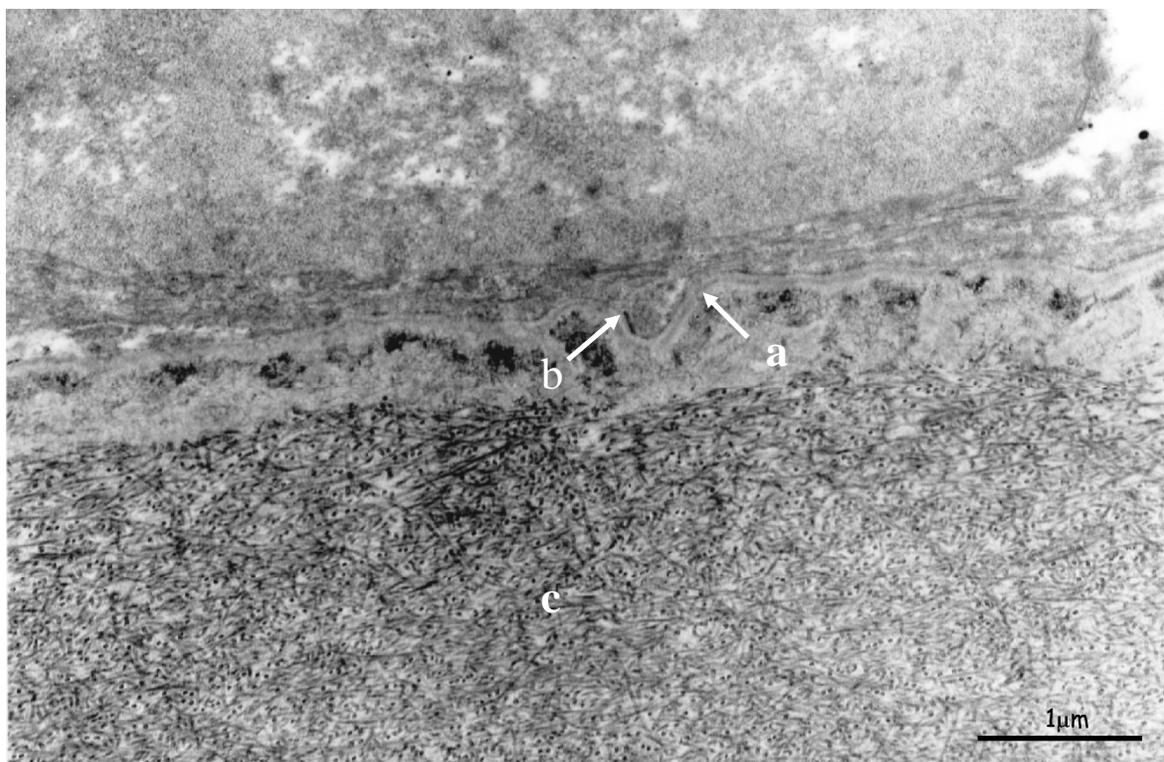


Figura 24: Lamela de córnea liofilizada com sacarose e reidratada com BSS após um ano. Membrana basal epitelial e camada de Bowman (aumento de 12.000x, barra 1 μ m) a: membrana basal; b: hemidesmosomos; c: Camada de Bowman.

ANEXO 6

Questionário aplicado aos pacientes para avaliar a qualidade de visão e de vida após o transplante.

Questionário adaptado do VFQ

Parte 1 – Saúde geral e visão.

1 – Como você acha que está a sua saúde?

Excelente	1
Muito boa	2
Boa	3
Regular	4
Ruim	5

2 – Como você acha que está a sua visão (com óculos ou lente de contato, se usuário)?

Excelente	1
Muito boa	2
Boa	3
Regular	4
Ruim	5

3 – Você tem se preocupado com sua visão?

Não	1
Um pouco	2
Algumas vezes	3
A maior parte do tempo	4
O tempo todo	5

4 – Você tem sentido dor ou desconforto nos seus olhos (por ex: coceira, queimação, dor)? Sim ou não? Esta dor ou desconforto é:

Não sinto	1
Fraca	2
Moderada	3
Severa	4
Muito severa	5

Parte 2: Dificuldades com atividades diárias.

5 – Você tem dificuldade para ler jornal, livro ou revista?

Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3
Muita dificuldade	4
Deixou de ler por causa da visão	5
Deixou de ler por outros motivos, ou não se interessa por leitura	6

6 – Você tem dificuldade para cozinhar, costurar ou ver coisas de perto?

Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3
Muita dificuldade	4
Deixou de fazer por causa da visão	5
Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso	6

7 – Por causa da sua visão, você tem tido dificuldade para achar coisas quando se encontram misturados a outros objetos (talher, sapato, roupa)?

Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3
Muita dificuldade	4
Deixou de fazer por causa da visão	5
Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso	6

8 – Você tem dificuldade para ler placas na rua ou letreiro do ônibus?

Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3
Muita dificuldade	4
Deixou de ler por causa da visão	5

Deixou de ler por outros motivos, ou não se interessa por leitura 6

9 – Você tem tido dificuldade para descer escadas?

Não tenho dificuldade 1

Pouca dificuldade 2

Dificuldade moderada 3

Muita dificuldade 4

Deixou de fazer por causa da visão 5

Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6

10 – Você tem tido dificuldade para enxergar os objetos a seu lado quando você está andando sozinho (anda tropeçando nas coisas)?

Não tenho dificuldade 1

Pouca dificuldade 2

Dificuldade moderada 3

Muita dificuldade 4

Deixou de fazer por causa da visão 5

Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6

11 – Você tem dificuldade para conversar com os amigos ou parentes por causa da visão?

Não tenho dificuldade 1

Pouca dificuldade 2

Dificuldade moderada 3

Muita dificuldade 4

Deixou de fazer por causa da visão 5

Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6

12 – Você tem dificuldade, por causa da visão, para diferenciar cores?

Não tenho dificuldade 1

Pouca dificuldade 2

Dificuldade moderada 3

Muita dificuldade 4

Deixou de fazer por causa da visão 5

Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6

13 – Você tem dificuldade, por causa da visão, para reunir-se com os amigos ou parentes em suas casas, em festas ou em reuniões?

Não tenho dificuldade 1

Pouca dificuldade 2

Dificuldade moderada 3

Muita dificuldade 4

Deixou de fazer por causa da visão 5

Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6

14 – Você tem dificuldade, por causa da visão, para olhar as pessoas quando estão do outro lado da rua?

Não tenho dificuldade 1

Pouca dificuldade 2

Dificuldade moderada 3

Muita dificuldade 4

Deixou de fazer por causa da visão 5

Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6

15 – Você dirige, mesmo de vez em quando?

Sim 1 (vá para a questão 15c)

Não 2

15a – Você nunca dirigiu ou desistiu de dirigir?

Nunca dirigiu 1 (vá para a parte 3, questão 17)

Desistiu 2

15b – Se você desistiu, foi devido à visão, por outras razões ou as duas coisas ao mesmo tempo?

Principalmente pela visão 1 (vá para a parte 3, questão 17)

Por outros motivos 2 (vá para a parte 3, questão 17)

Pela visão e outros motivos 3 (vá para a parte 3, questão 17)

15c – Você tem dificuldade para dirigir durante o dia, em lugares conhecidos?

Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3
Muita dificuldade	4
Deixou de dirigir por causa da visão	5
Deixou de dirigir por outros motivos, ou não se interessa por isso	6

16 – Você tem dificuldade para dirigir durante a noite?

Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3
Muita dificuldade	4
Deixou de dirigir por causa da visão	5
Deixou de dirigir por outros motivos, ou não se interessa por isso	6

Parte 3: Questões para problemas visuais

17 – Você tem deixado de realizar coisas que gosta por causa da visão?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

18 – Você se acha limitado para trabalhar ou realizar outras atividades por causa da visão?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

19 – Você sente desconforto nos olhos ou em volta deles (por ex: queimação, coceira, dor) que faz você deixar de fazer as coisas que gosta?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

20 – Você fica muito tempo em casa por causa da sua visão?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

21 – Você tem se sentido triste por causa da sua visão?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

22 – Por causa da visão: Você tem sentido receio de fazer coisas que estava acostumado a fazer (cozinhar, lavar roupa, trabalhar com ferramentas)?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

23 – Por causa da visão: Você depende do que as outras pessoas falam?

Sempre	1
A maioria das vezes	2

De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

24 – Por causa da sua visão: Você tem precisado da ajuda dos outros?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

25 – Por causa da sua visão: Você tem tido receio de fazer as coisas com medo de passar vergonha, por exemplo, entrar no banheiro errado, não falar com pessoas conhecidas, urinar fora do sanitário?

Sempre	1
A maioria das vezes	2
De vez em quando	3
Poucas vezes	4
Nunca	5

REFERÊNCIAS

1. Mabon M, Boisjoly H. Penetrating keratoplasty. In: Foster CS, Azar DT, Dohlman CH, editors. *The Cornea Scientific foundations & clinical practice*. 4th edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1021-42.
2. Ing JJ, Ing HH, Nelson LR, et al. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1998; 105:1855-65.
3. Arentsen JJ. Corneal transplant allograft rejection: possible predisposing factors. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1983;81:361-402.
4. Bechara SJ, Kara-Jose N. Ceratocone. In: Belfort Jr R, Kara-José N, editors. *Córnea - Clínica e Cirúrgica*. São Paulo: Roca; 1997. p. 359-66.
5. Polack FM. Rejeição no transplante de córnea. In: Cvintal T, editor. *Complicações do transplante de córnea*. São Paulo: Santos Livraria Editora; 2004. p. 203 - 8.
6. Chandler JW, Kaufman HE. Graft reactions after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1974;77:543.
7. Goosey JD, Sturbaum CW. Lamellar Keratoplasty. In: Foster CS, Azar DT, Dohlman CH, editors. *The Cornea Scientific foundations & clinical practice*. 4th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1043-55.
8. Von Hippel A. Eine neue methode der hornhauttransplantation. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol*. 1888;34:108.
9. Archila EA. Deep lamellar keratoplasty for dissection of host tissue with intrastromal air injection. *Cornea*. 1984;3:217-8.
10. Nail SL, Gatlin LA. Freeze drying: Principles and Practice. In: Rey L, May JC, editors. *Freeze drying/ Lyophilization of pharmaceutical and biological products*. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 163 - 233.
11. Boke W, Thiel HJ. [Tectonic and curative keratoplasty after perforating herpetic keratitis. A contribution to the use of lyophilized cornea for emergency transplantation (author's transl)]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 1974 Jul;165(1):153-9.
12. Chau GK, Dilly SA, Sheard CE, Rostron CK. Deep lamellar keratoplasty on air with lyophilized tissue. *Br J Ophthalmol*. 1992 Nov;76(11):646-50.
13. Tsutsui K, Watanabe S, Murakami B. Lyophilized cornea in experimental heterografts. *Am J Ophthalmol*. 1962;64:265.
14. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell J. The Cornea. In: Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell J, editors. *Histology of the human eye*. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1971. p. 55-111.

15. Nishida T. Cornea. In: Krashmer JH, Mannis MJ, Holland E, editors. Cornea - Fundamental, diagnosis and management. 2nd Ed ed. Philadelphia: Elsevier-Mosby; 2005. p. 3-26.
16. Gipson IK, Joyce NC, Zieske JD. The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus, conjunctiva and adnexa. In: Foster CS, Azar DT, Dohlman CH, editors. The Cornea - Scientific foundations & clinical practice. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1-35.
17. Basu P. A review of methods for storage of corneas for keratoplasty. Indian J Ophthalmol. 1995;43(2):55-8.
18. McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. Invest Ophthalmol. 1974;13(3):165-73.
19. Van Horn DL, Schultz RO, J DB. Endothelial Survival in cornea tissue stored in M-K medium. Am J Ophthalmol. 1975;80:642-7.
20. Aquavella JV, Van Horn DL, CJ H. Corneal preservation using M-K medium. Am J Ophthalmol. 1975;80:791-9.
21. Sousa LB. Meios para preservação de córnea e esclera. In: Olhos AP-AdBd, editor. VII Curso Certificado de Treinamento Técnico e científico em Banco de olhos no Brasil. São Paulo: Bausch Lomb, Alcon e Allergan; 2006. p. 1-7.
22. Tamaki K, Yamaguchi T, Varnell ED, Kaufman HE. Histological study of corneas preserved in two new media. Br J Ophthalmol. 1987;1987(71):570-7.
23. Kaufman HE, Beuerman RW, Steinemann TL, Thompson HW, Varnell ED. Optisol corneal storage medium. Arch Ophthalmol. 1991 june;109:864-8.
24. Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, Laing RA, al e. Optisol corneal storage medium. Am J Ophthalmol. 1992 sept;114:345-56.
25. Larsen PA, Linstrom RL, Doughman DJ. *Torulopsis glabrata* endophthalmitis after keratoplasty with an organ cultured cornea. Arch Ophthalmol. 1978;96:1019-22.
26. Capella JA, Kaufman HE, Robbins JE. Preservation of viable corneal tissue. Arch Ophthalmol. 1965;74:669-73.
27. Slappey TE. Corneal Preservation. Transplantation Proceedings. 1976;8(2(1)):223-7.
28. Ohno K, Nelson LR, K. M, William MB. Transplantation of cryopreserved human corneas in xenograft model. Cryobiology. 2002;44:142-9.
29. Canals M, Garcia J, Potau JM, Dalmases C, al a. Optimization of a method for the cryopreservation of rabbit corneas: attempted application to human corneas. Cell and Tissue Banking. 2000;1:271-8.

30. Ehlers N, Sperling S, Olsen T. Post-operative thickness and endothelial cell density in cultivated, cryopreserved human corneal grafts. *Acta Ophthalmol.* 1982;60:935-44.
31. King Jr JH, McTigue JW. A simple method of preservation of corneas for lamellar keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 1962 june;53:445-9.
32. McNair JN, King Jr JH. Preservation of cornea by dehydration; a preliminary report. *AMA Arch Ophthalmol.* 1954;53(4):519-21.
33. Leopold IH, Adler FH. Use of frozen-dried cornea as transplant material. *Arch Ophthalmol.* 1947;37:268-76.
34. Payrau P. Résultats cliniques de kératoplasties pratiquées à l'aide de greffons lyophilisés homogènes et hétérogènes. *Bull Soc Ophthal Franc.* 1957;7-8:392-7.
35. Maguen E, Pinhas S, Verity SM, Nesburn AB. Keratophakia with lyophilized cornea lathed at room temperature: new techniques and experimental surgical results. *Ophthalmic Surg.* 1983 Sep;14(9):759-62.
36. Coombes AGA, Kirwan JF, Rostron CK. Deep lamellar keratoplasty with lyophilised tissue in the management of keratoconus. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(7):788-91.
37. Benson WH, Goosey JD. Lamellar Keratoplasty. In: Krashmer JH, Mannis MJ, Holland E, editors. *Cornea - Surgery of the Cornea and Conjunctiva.* Philadelphia: Elsevier - Mosby; 2005. p. 1685-94.
38. Panda A, Singh R. Intralamellar dissection techniques in lamellar keratoplasty. *Cornea.* 2000;19(1):22-5.
39. Caporossi A, Balestrazzi A, Simi C, Caporossi T, Traversi C. Manual deep lamellar keratoplasty: Alternative methods and air-guided technique. *Transplantation Proceedings.* 2005;37:2697-701.
40. Price FW. Air Lamellar keratoplasty. *Refract Corneal Surg.* 1989;5:240-3.
41. Marchini G, Mastropasqua L, Pedrotti E, Nubile M, Ciancaglini M, al e. Deep lamellar keratoplasty by intracorneal dissection. *Ophthalmology.* 2006;113(8):1289-300.
42. Ardjomand N, Hau S, McAlister JC, Bunce C, Galaretta D, al e. Quality of vision and graft thickness in deep anterior lamellar and penetrating corneal allografts. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(2):228-35.
43. Fogla F, Padmanabhan P. Results of deep lamellar keratoplasty using the big-bubble technique in patients with keratoconus. *American Journal of Ophthalmology.* 2006;141(2):254-9.
44. Fontana L, Parente G, Tassinari G. Clinical Outcomes after deep anterior lamellar keratoplasty using the big-bubble technique in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2007;143:117-24.

45. Panda A, Bageshwar LMS, Ray M, Singh JP, Kumar A. Deep lamellar keratoplasty versus penetrating keratoplasty for corneal lesions. *Cornea*. 1999;18(2):172-5.
46. Ginsburg AP. *Functional Acuity Contrast Test - F.A.C.T.* Chicago: A Gerber Cobum Company; 1983.
47. Ferraz EVAP, Lima CA, Cella W, Arieta CEL. Adaptação de questionário de avaliação de qualidade de vida para aplicação em portadores de catarata. *Arq Bras Oftalmol*. 2002;65(3):293-8.
48. Chemello E. A química na cozinha apresenta: o açúcar. www.ciadaescola.com.br: Companhia da Escola; 2005.
49. Polge C, Smith AU, Parkers AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949;164:666.
50. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exptl Cell Res*. 1972;71:345-55.
51. Bourne WM, Shearer DR, Nelson LR. Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propanediol and 2,3-butanediol. *Cryobiology*. 1994;31:1-9.
52. Maguen E, Nesburn AB. A new technique for lathing lyophilized cornea for refractive keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 1982 Jan;100(1):119-21.
53. Rostron CK. Deep anterior lamellar keratoplasty with vacuum-dried corneal tissue - a versatile approach. *Refract Corneal Surg*. 1993;9:140-2.
54. Verity SM, Maguen E, Pinhas S, Nesburn AB. Rehydration characteristics and histological properties of lyophilized corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;22(3):241.
55. Quantock AJ, Verity SM, Schanzlin DJ. Organization of collagen in the lyophilized cornea. *J Refract Surg*. 1997;13(167-170).
56. Rostron CK. Epikeratophakia: the living contact lens. *Hospital Update*. 1987;13:819-29.
57. King Jr JH, Townsend WM. The prolonged storage of donor corneas by glycerine dehydration. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1984;LXXXII:106-10.
58. Eastcott HHG, Cross AG, Leigh AG, North DP. Preservation of corneal grafts by freezing. *The Lancet*. 1954;30:237-9.
59. Moore MB, Gebhardt BM, Verity SM, McDonald MB. Fate of lyophilized xenogeneic corneal lenticules in intrastromal implantation and epikeratophakia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987 Mar;28(3):555-9.
60. Tayyib M, Sandford-Smith JH, Sheard CE, Rostron CK. Lamellar keratoplasty with lyophilized tissue for treatment of corneal scarring. *Refract Corneal Surg*. 1993 Mar-Apr;9(2):140-2.

61. Rostron CK. Epikeratophakia: Clinical results and experimental development. *Eye*. 1988;2:56-62.
62. Rostron CK, Sandford-Smith JH, Morton DB. Experimental epikeratophakia using tissue lathed at room temperature. *Br J Ophthalmol*. 1988;72:354-60.
63. Busin M, Spitznas M, Hockwin O. Evaluation of functional and morphologic parameters of the cornea after epikeratophakia using prelathed, lyophilized tissue. *Ophthalmology*. 1990 Mar;97(3):330-3.
64. Sugita J, Kondo J. Deep lamellar Keratoplasty with complete removal of pathological stroma for visual improvement. *Br J Ophthalmol*. 1997;81:184-8.
65. Benson WH, Goosey CB, Prager TC, Goosey JD. Visual improvement as a function of time after lamellar keratoplasty for keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 1993;116:207-11.
66. Shimazaki J, Shimmura S, Ishioka M, Tsubota K. Randomized clinical trial of deep lamellar keratoplasty vs penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2002;134(2):159-65.
67. Mellis GRJ, Lander F, Rietveld FJR, Remeijer L, al e. A new surgical technique for deep stromal, anterior lamellar keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:327-33.
68. Morris E, Kirwan JF, Sujatha S, Rostron CK. Corneal endothelial specular microscopy following deep lamellar keratoplasty with lyophilised tissue. *Eye*. 1998;12 (Pt 4):619-22.
69. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, al e. In vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in indian eyes. *Indian J Ophthalmol*. 2003;51:225-30.
70. Hollingsworth JG, Efron N, Tullo AB. A longitudinal case series investigating cellular changes to the transplanted cornea using confocal microscopy. *Cont Lens anterior eye*. 2006;29(3):135-41.
71. Rich LF, Friedlander MH, Kaufman HE, Granet N. Keratocyte survival in keratophakia lenticules. *Arch Ophthalmol*. 1981;99:677-80.
72. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, al e. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea*. 1998;17(5):485-92.
73. Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea*. 2001;20(6):560 - 9.
74. Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:333-9.
75. Yoon YD, Waring GO, Stulting RD. Keratocyte repopulation in epikeratoplasty specimens. *Cornea*. 1998;17:180-4.

76. Prydall JI, Franc F, Dilly PN. Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images. *Eye*. 1998;12:337-42.
77. Wilson SE, Kim WJ. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(2):220-6.
78. Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(2):320-6.
79. Whitsett CF, Stulting RD. The distribution of HLA antigens on human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25(5):519-24.
80. Batchelor JR, Casey TA, Gibbs DC, Lloyd DF, al e. HLA matching and corneal grafting. *Lancet*. 1976;1:551-4.
81. Foulks GH, Sanfilippo F. Beneficial effects of histocompatibility in high-risk corneal transplantation. *Am J Ophthalmol*. 1982;94:622-9.
82. Frantz JM, Gebhardt BM, Reidy JJ, McDonald MB. Immunogenicity of epikeratophakia tissue lenses containing living donor keratocytes. *Refract Corneal Surg*. 1991 Mar-Apr;7(2):141-5.
83. Tabandeh H, Morris E, Rostron CK, Corbishley C. HLA antigens in lyophilised corneal lenticules. *Acta Ophthalmol Scand*. 1998 Dec; 76(6):653-7.
84. Mannis MJ, Zadnik K, Johnson CA, Adams C. Contrast sensitivity after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 1987;105(9):1220-3.
85. Atique D, Goulart DG, Lake JC, Lima FA, al e. Qualidade de vida após transplante penetrante de córnea. *Arq Bras Oftalmol*. 2002;65(3):351-4.
86. Cavalcanti MTD, Mahon M, Nóbrega DAT, Remígio MCA, Pires CS. Ceratocone: resultados visuais, complicações e qualidade de vida após ceratoplastia penetrante realizada por médico residente. *Arq Bras Oftalmol*. 2004; 67:415-8.

ABSTRACT

Purpose: To develop a method to lyophilize corneas and to compare the use of lyophilized corneas with corneas preserved in optisol for anterior lamellar transplant.

Methods: Lyophilized corneas were evaluated by light and electronic microscopy and were compared to controls preserved in optisol GS[®]. A randomized clinical trial was performed in 20 patients with keratoconus that were electible for transplant. Ten patients were transplanted with lyophilized grafts and 10 patients with grafts preserved in optisol. Follow-up exams included visual acuity (ETDRS chart), topography, pachymetry, specular microscopy, contrast sensitivity and confocal microscopy.

Results: Lyophilization with saccharosis 2,3 molar for 40 minutes and rehydration with based saline solution was considered the best method to lyophilize corneas for anterior lamellar transplant. Variables were similarly improved in both groups, without any statistical difference between them, except at uncorrected visual acuity in the 6th month, which was better in the lyophilized group and at keratocyte density which was greater on the optisol group.

Conclusions: Lyophilization is a safe method to preserve corneas for deep anterior lamellar transplant (DALK). Lyophilized corneas used for DALK had similar clinical improvement when compared it to Optisol GS[®] preserved corneas.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1 – Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo; 2005.

2 – Foster CS, Azar DT, Dohlman CH. The Cornea. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.

3 – Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Cornea – Fundamentals, Diagnosis and management. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)