

Ana Cecília de Souza Leão Escarião



**EFEITO TERAPÊUTICO DO *CROSSLINKING* CORNEAL
NA CERATITE INFECCIOSA**

**RECIFE/PE
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Ana Cecília de Souza Leão Escarião

**EFEITO TERAPÊUTICO DO *CROSSLINKING* CORNEAL
NA CERATITE INFECCIOSA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador

Dr. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Titular do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Linha de Pesquisa

Infecção Cirúrgica

RECIFE/PE
2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa. CRBA-1010

O72c Escarião, Ana Cecília de Souza Leão
 Efeito terapêutico do crosslinking corneal na ceratite infecciosa
 / Ana Cecília de Souza Leão Escarião. – 2014.
 61 f.: il.; tab. 30 cm.

 Orientador: Carlos Teixeira Brandt
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2014.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Crosslinking corneal. 2. Ceratite infecciosa. 3. Olho.
 I. Brandt, Carlos Teixeira. (Orientador). II. Título.

612.665 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-095)

“EFEITO TERAPÊUTICO DO CROSSLINKING CORNEAL NA CERATITE INFECCIOSA”.

ANA CECÍLIA DE SOUZA LEÃO ESCARIÃO

APROVADA EM: 03/09/2012

ORIENTADOR INTERNO: DR. CARLOS TEIXEIRA BRANDT

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. DR. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ - CCS/UFPE

PROF. DR. JOSEMBERG MARINS CAMPOS - CCS/UFPE

DR. TIAGO EUGÊNIO FARIAS ARANTES - FUNDAÇÃO ALTINO VENTURA/
PE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

DEDICATÓRIA

A minha família, *Paulo, Henrique e Marina*, pelo amor e carinho. Vocês são o motivo de todo o meu esforço e dedicação.

Aos meus pais *Roberto e Margaret* por sempre me darem forças para alcançar meus objetivos e que, desde cedo, me ensinaram a importância da educação.

Aos meus irmãos, *Rodrigo e Juliana*, e aos meus sogros *Ana Heloísa e Francisco Pojucan*, pelo apoio, amizade e por estarem sempre presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, força imprescindível em minha vida.

Ao *Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt*, orientador desta tese, pelo constante incentivo à pesquisa e ao estudo. Serei sempre grata pelos ensinamentos que recebi desde o início da minha carreira.

Aos *pacientes* que confiaram nessa pesquisa e voluntariamente dispuseram-se a participar do estudo.

A *Fundação Altino Ventura* local onde foi realizado a pesquisa e onde realizei minha residência em oftalmologia.

Ao *Dr. Ronald Cavalcanti*, pelo incentivo e apoio durante toda a minha formação como oftalmologista.

Aos *Dra. Liana Ventura* e *Dr. Marcelo Ventura*, por todo o aprendizado e incentivo científico e pelo apoio a esta pesquisa.

A todos os *residentes da Fundação Altino Ventura*, nominalmente a *Priscilla Almeida* e *Edilana Sá*, por terem ajudado na captação dos pacientes.

À *Elvislene Leite* pela análise da microbiologia.

Ao *Dr Bernardo Cavalcanti* pelo envio dos artigos solicitados.

Aos *Professores e Colegas* do programa de pós-graduação em Cirurgia, pela convivência, amizade e ajuda na formação do espírito crítico.

Ao *Departamento de Córnea e Doenças Externas* da Fundação Altino Ventura e Hospital de Olhos de Pernambuco pelo apoio e viabilização na realização deste trabalho.

À *Takayuki Nagasaki* e *Dr Richard Braunstein* por todos os ensinamentos científicos e éticos e por ter incentivado meu desenvolvimento científico.

À *Isabela Pimentel*, secretaria da pós-graduação em cirurgia, pelo auxílio e empenho no cumprimento dos trâmites formais do processo desta dissertação.

À *Camila Sarteschi*, pela avaliação estatística dos resultados.

À *Márcia* e *Mércia Virgínio*, pelo auxílio na formatação e editoração gráfica deste trabalho.

A *CAPES*, pelo papel fundamental que desempenha na formação de pesquisadores.

A *todos*, que de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do *crosslinking* (CXL) no tratamento de ceratite infecciosa, resistente ao tratamento clínico, e investigar a relação com o agente etiológico.

Métodos: Foram incluídos 11 pacientes com diagnóstico de ceratite infecciosa de etiologia bacteriana (sete olhos) e fúngica (quatro olhos) na Fundação Altino Ventura (FAV) no período de outubro de 2011 a maio de 2012. Os pacientes incluídos estavam em uso de colírios há pelo menos sete dias e não apresentavam melhora da infecção. Estes foram avaliados antes da realização do CXL e no período pós-operatório, até cicatrização da úlcera. Para realização do CXL foram instilados gotas de riboflavina a 0,1% e dextrano a 20%, a cada cinco minutos em um período de 30 minutos antes do procedimento, e durante a aplicação da luz ultravioleta A (UVA). A córnea foi exposta a UVA com comprimento de onda de $370\text{nm} \pm 5\text{nm}$ e uma irradiância de $3\text{mW}/\text{cm}^2$. **Resultados:** Os pacientes com infecção bacteriana obtiveram cura do processo infeccioso após o CXL e nenhum paciente com ceratite fúngica apresentou cicatrização. Observou-se associação significativa ($p=0,003$) entre o agente etiológico e a cicatrização. **Conclusão:** O CXL mostrou-se eficaz no tratamento de ceratite bacteriana resistente ao tratamento clínico, evitando a realização de transplante tectônico. Em relação a ceratite fúngica, o este procedimento não influenciou para a melhora do processo infeccioso.

Descritores: Córnea; *Crosslinking*; Ceratite infecciosa; Ceratite bacteriana; Ceratite fúngica

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the effect of corneal *crosslinking* (CXL) in the treatment of infectious keratitis resistant to medical treatment, and investigate the relation with the CXL outcome to the etiologic agent. **Methods:** The study included 11 patients who were diagnosed with bacterial (seven eyes) or fungal keratitis (four eyes) at Fundação Altino Ventura from October 2011 to May 2012. All patients were using antibiotic eye drops for at least 7 days and have had no infection improvement. Patients were evaluated prior to CXL and the postoperative period until healing of the keratitis. For CXL, eyes were first instilled with a solution containing 0.1% riboflavin and 20% dextran for 30 min at a 5-minutes interval. Riboflavin-soaked eyes were then irradiated with UVA light ($370 \pm 5\text{nm}$) at $3\text{mW}/\text{cm}^2$ for 30 minutes. **Results:** Eyes with bacterial infection exhibited improvement of infectious symptoms after CXL whereas eyes with fungal keratitis showed no improvement. Thus, there was a statistically significant correlation ($p = 0.003$) between the etiologic agent and the effectiveness of healing. **Conclusion:** CXL was effective in the treatment of bacterial keratitis resistant to clinical treatment, eliminating the need for surgery. However, CXL was not effective in managing fungal keratitis.

Keywords: Cornea, *Crosslinking*; Infectious keratitis, Bacterial keratitis, Fungal keratitis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Corneal Crosslinking System</i> (Opto®)- fonte autor	16
Figura 2	Paciente realizando CXL para ceratite infecciosa	17
Figura 3	Úlcera de cornea etiologia fúngica- <i>Fusarium sp</i>	19
Figura 4	Úlcera bacterina por <i>Staphylococs aureus</i>	20
Figura 5	Cultura de <i>Fusarium sp</i>	20
Figura 6	Dispersão entre a área da úlcera e o Tempo de cura do processo infeccioso	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição amostral segundo as variáveis demográficas	21
Tabela 2	Perfil amostral segundo as variáveis clínicas	21
Tabela 3	Distribuição da amostra segundo o tamanho da úlcera, área, cicatrização e cultura	22
Tabela 4	Relação entre acuidade visual e cultura	24
Tabela 5	Relação entre Cura do processo infeccioso e Cultura	24
Tabela 6	Relação entre Cura do processo infeccioso e idade dos pacientes	25
Tabela 7	Relação entre tipo de cultura, complicação e procedimento cirúrgico adicional	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVL	acuidade visual
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CXL	<i>crosslinking</i>
FAV	Fundação Altino Ventura
LASIK	<i>laser in situ keratomileusis</i>
PRK	ceratectomia fotorefrativa
SPSS	Statistical Package for the Social Science
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UVA	ultravioleta A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Apresentação do problema	01
1.2 Justificativa	02
1.3 Objetivos	02
1.3.1 Geral	02
1.3.2 Específicos	02
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Definição e epidemiologia de ceratite infecciosa	03
2.2. Mecanismo de defesa corneal	03
2.3 Patógenos envolvidos na ceratite bacteriana	04
2.4 Sinais e sintomas de ceratite bacteriana	05
2.5 Cultura e citologia	05
2.6 Tratamento de ceratites bacterianas	07
2.7 Epidemiologia da ceratite fúngica	08
2.8 Etiologia da ceratite fúngica	09
2.9 Tratamento de ceratites fúngicas	09
2.10 Tratamento cirúrgico de úlcera infecciosas	10
2.11 Definição e histórico de <i>crosslinking</i>	11
2.12 Mecanismo de ação do <i>crosslinking</i>	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.2 Local de estudo	14
3.3 Seleção	14
3.3.1 Critérios de inclusão	14
3.3.2 Critérios de exclusão	15
3.3.3 Procedimentos técnicos	15
3.3.4 Procedimentos analíticos	17
3.3.5 Procedimentos éticos	18
4. RESULTADOS	19

5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE	45
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	45
ANEXO	48
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	48



1.1 Apresentação do problema

A ceratite infecciosa constitui uma condição comum e prevenível de morbidade visual¹⁻⁴. É uma das principais causas de cegueira monocular nos países em desenvolvimento¹⁻⁵. A principal etiologia das ceratites infecciosas é bacteriana, podendo também ser causada por fungos, protozoários e vírus⁶⁻¹⁰.

O tratamento das ceratites infecciosas baseia-se no emprego de antimicrobianos tópicos^{4,11,12}. Mesmo com sua utilização correta e instituída no tempo apropriado, o processo inflamatório pode progredir com piora da ulceração, desenvolvimento de *melting* corneal e perfuração ocular^{4,8,13}. Quando ocorre falha no tratamento clínico, procedimentos cirúrgicos como recobrimento conjuntival ou transplante de córnea podem ser utilizados¹⁴⁻¹⁷.

Foram relatados casos de úlcera corneais, tratados com sucesso pelo *crosslinking* (CXL)¹⁸⁻²⁵. Em estudo experimental, foi demonstrado aumento da resistência contra a digestão enzimática pela collagenase, pepsina e tripsina em córneas que tinham sido submetidas ao tratamento com CXL corneal²⁶. A luz ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina atua como fotomediador que acarreta perda do equilíbrio interno das moléculas de riboflavina, criando radicais livres de oxigênio que induzem novas ligações entre fibrilas de colágeno. Esta reestruturação das fibras de colágeno provoca aumento da força biomecânica da córnea. Radicais livres de oxigênio têm efeito antimicrobiano por interferir na integridade da membrana celular bacteriana. Assim, a combinação da UVA e os radicais livres de oxigênio produzido pelo CXL podem agir de forma sinérgica para o tratamento de úlceras corneais tanto pela ação antimicrobiana como pela proteção do colágeno contra a degradação de enzimas proteolíticas²⁷⁻³¹.

1.2 Justificativa

A indicação clínica atual do CXL corneal geralmente é feita para os casos de ceratocone³⁰, degeneração marginal pelúcida³¹, ectasias iatrogênicas após cirurgias refrativas com *laser in situ keratomileusis* (LASIK) e ceratectomia fotorefrativa (PRK)³⁰ e ceratopatia bolhosa dolorosa³². Os efeitos terapêuticos do CXL na ceratite infecciosa ainda não estão bem definidos¹⁸⁻²⁶.

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral

Avaliar o efeito do CXL no tratamento de ceratite infecciosa resistente ao tratamento clínico.

1.3.2 Específicos

- Comparar a acuidade visual encontrada, em LogMar, pré e após tratamento com CXL;
- Relacionar o efeito terapêutico do CXL com o agente etiológico da ceratite;
- Avaliar a necessidade de recobrimento conjuntival ou transplante de córnea por falha do CXL.

REVISÃO DA LITERATURA



2.1 Definição e epidemiologia de ceratite infecciosa

A ceratite infecciosa caracteriza-se por inflamação corneal associada à erosão epitelial, com ou sem envolvimento estromal, causada por bactérias, fungos, protozoários ou vírus³³. Constitui uma condição comum e prevenível de morbidade visual¹. É uma das principais causas de cegueira monocular nos países em desenvolvimento^{1,5}, o que torna seu tratamento um assunto de saúde pública.

A incidência de ceratite infecciosa no Brasil não é conhecida. Dados disponíveis indicaram que em 1993 nos Estados Unidos ocorreram onze casos de úlcera corneal por 100.000 habitantes³⁴; na Índia, este número foi de 113 casos por 100.000 habitantes por ano³⁵. Em outros países, como o Nepal, este valor chegou a 799 casos por 100.000 pessoas por ano³⁶. Estima-se que úlcera de córnea juntamente com trauma ocular resulte em cerca de 1,5 a 2,0 milhões de casos de cegueira anualmente em todo o mundo¹.

2.2. Mecanismo de defesa corneal

A presença de ceratite infecciosa associa-se frequentemente a alterações nos mecanismos de defesa da córnea ou a fatores predisponentes. Mecanismos de defesa local impedem o desenvolvimento de ceratites infecciosas em hospedeiros normais apesar da presença de flora microbiana diversa nas pálpebras e conjuntiva. Constituem parte da defesa: epitélio corneal íntegro, filme lacrimal com imunoglobulinas e enzimas, como a lisozima, e a ação de limpeza das pálpebras durante o piscar. Este conjunto de fatores torna o ambiente da superfície ocular desfavorável para o crescimento de bactérias na córnea^{37,38}.

Alterações nas pálpebras ou no seu fechamento podem levar à exposição corneal, aumentando o risco para infecções. O piscar palpebral normal promove uma distribuição uniforme do filme lacrimal e efeito de drenagem de agentes patógenos. Alterações no volume do filme lacrimal, nos seus componentes ou no sistema de

drenagem levam ao comprometimento da defesa ocular. No filme lacrimal encontram-se imunoglobulinas, fatores do complemento, lisozima, lactoferrina, betalinas e ceruloplasmina que possuem efeito antimicrobiano³⁹.

O epitélio corneal é um importante mecanismo de defesa. Enquanto a maioria das bactérias são incapazes de ultrapassar a barreira epitelial, *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacteria diphtheria*, *Hemophyilus aegyptius* e *Listeria sp* podem invadir o epitélio corneal íntegro. Área de desepitelização induzido por lente de contato, trauma ou cirurgia ocular, síndrome de erosão recorrente, ceratopatia bolhosa, olho seco são fatores predisponentes à ceratite infecciosa⁴⁰. O uso indiscriminado de lentes de contato aumentou consideravelmente a incidência de ceratite, passando a ser o principal fator de risco, na maioria dos estudos atuais⁴¹⁻⁴³.

2.3 Patógenos envolvidos na ceratite bacteriana

Uma grande variedade de micro-organismos podem estar envolvidos nas ceratites. A prevalência de um agente depende da localização geográfica, fatores climáticos e de fatores de risco para infecção⁴².

É de extrema importância a identificação dos fatores etiológicos causadores da úlcera de córnea e dos patógenos envolvidos, para o desenvolvimento de estratégias no que se refere ao diagnóstico e tratamento apropriado. O tipo de tratamento baseia-se nos achados clínicos e laboratoriais³⁷.

Os patógenos mais frequentemente encontrados na ceratite bacteriana são, *Staphylococos aureus*, *Staphylococos epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococos sp*⁴⁴. *Pseudomonas* é o organismo mais frequentemente isolado na ceratite infecciosa de usuários de lentes de contato hidrofílicas^{45,46}.

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo que tipicamente produz úlcera extensa, rapidamente progressiva, frequentemente com hipópio, podendo levar a descemetocle e perfuração corneal⁴⁶. Sua virulência deve-se provavelmente à mobilidade e produção de collagenase cálcio-dependente. Muitas cepas de *Pseudomonas* produzem enzimas proteolíticas que causam rápida destruição corneal^{33,46}.

Staphylococcus é um patógeno gram-positivo que está usualmente presente na flora conjuntival. São subdivididos em três espécies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus aureus* são patógenos mais frequentes nas ceratites infecciosas e geralmente ocorrem em córneas com patologias associadas como ceratopatia bolhosa, ceratite herpética crônica, ceratoconjuntivite seca e atópica⁴⁷. Tendem a produzir infiltrado corneal rapidamente progressivo e reação de câmara anterior com formação de hipópio⁴⁸.

A úlcera causada por *Streptococcus sp.* é na maioria dos casos de evolução rápida, central e profunda, podendo apresentar abscesso estromal, hipópio e depósito endotelial de fibrina⁴⁸.

2.4 Sinais e sintomas de ceratite bacteriana

Os sintomas incluem dor, lacrimejamento, fotofobia, diminuição da visão e presença de secreção purulenta. Podem-se observar sinais de edema palpebral, hiperemia conjuntival, quemose e injeção ciliar. O epitélio corneal pode estar ulcerado, há infiltração estromal com ou sem necrose tecidual. A córnea apresenta com frequência edema ao redor do infiltrado. Também podem existir células na câmara anterior, placas inflamatórias endoteliais e hipópio³³.

Com a resposta inflamatória ao patógeno ocorre liberação de citocinas e fatores quimiotáticos que resultam em infiltrado polimorfonuclear com o objetivo de fagocitose e eliminação do micro-organismo. Se a infecção é contida pela ação dos antibióticos e respostas do hospedeiro, ocorre reparação do tecido com formação de cicatriz. Se a infecção progride, destruição tissular e eventual perfuração podem ocorrer³⁸.

2.5 Cultura e citologia

Apenas com o exame clínico não é possível a identificação do agente etiológico, visto que, bactérias e fungos podem causar quadro clínico semelhante⁴⁹.

Para obtenção de material para citologia, bacterioscopia e cultura remove-se o material purulento sobre a úlcera após a instilação de anestésico tópico. Com

espátula de Kimura colhe-se material da região da margem da úlcera. Coloca-se o raspado em lâminas de vidro para coloração com Gram e Giemsa e em placas de cultura (ágar-sangue, agar-chocolate e ágar-sabourad). Exames específicos devem ser realizados frente a suspeita de microrganismo mais incomum. Em alguns casos, biópsia de córnea pode ser necessária^{49,50}.

Na citologia, o *Staphylococcus sp.* apresenta infiltrados intensos de polimorfonucleares, pouca fibrina, células corneais e cocos gram-positivos isolados. Na cultura, assumem morfologia de cacho-de-uva. Os *Staphylococcus sp.* desenvolvem-se facilmente em qualquer meio de cultura, rotineiramente são utilizadas placas de ágar-sangue que mostram o grau de hemólise ao redor das colônias⁵¹.

O *Streptococcus sp.* apresenta na citologia infiltrados de polimorfonucleares, pouca fibrina, células epiteliais e cocos gram-positivos tipicamente em cadeia. São considerados anaeróbios facultativos e produzem colônias pequenas e normalmente, a área de hemólise é maior que o tamanho da colônia⁵¹.

A citologia das ceratites por *Pseudomonas aeruginosa* mostra polimorfonucleares, fibrina, células epiteliais corneais e bacilos gram-negativos. Geralmente encontram-se em forma isolada no esfregaço das culturas, com aspecto de bacilo discretamente curvado e extremidade arredondada. Possuem flagelos que dão mobilidade e desenvolvem-se bem em qualquer meio de cultura, apresentando odor característico adocicado. A hemólise é uma característica importante para sua identificação⁵¹.

Na citologia dos fungos leveduriformes, encontram-se polimorfonucleares, fibrina, células epiteliais e corpúsculo cocóides livres sugestivos de *Candida Sp.* O aspecto da colônia sobre ágar-sabouraud ou mesmo ágar-sangue é de colônia pequena, branca, lisa e de consistência mole, que se diferencia do aspecto da cultura de fungos filamentosos⁵¹.

A ceratite por fungos filamentosos apresenta, na citologia, infiltrado polimorfonuclear, fibrina, células epiteliais e hifas. Na cultura, a característica morfológica é de conídia em forma de banana com hifas laterais. A colônia é normalmente esbranquiçada na sua fase inicial tornando-se amarelada e pigmentada a medida que a cultura envelhece. Existem aproximadamente 40 espécies de

Fusarium, sendo o *Fusarium solani* o principal fungo causador de úlcera de córnea⁵¹.

2.6 Tratamento de ceratites bacterianas

O tratamento das ceratites bacterianas consiste no emprego de antibióticos tópicos após a coleta de material para citologia e cultura⁵².

Se o paciente já estiver sendo medicado, a suspensão da medicação entre 24h e 48h aumenta a positividade do exame laboratorial. Não se deve suspender a medicação nos casos de úlceras graves e rapidamente progressivas. Nos usuários de lentes de contato pode ser útil o exame da lente, do estojo e das soluções utilizadas na manutenção da lente^{49,52}.

Em alguns casos, é necessário modificar o esquema antimicrobiano inicial de acordo com a resposta terapêutica. A resposta geralmente depende da presença de patologias associadas, da virulência do micro-organismo e da extensão da úlcera no tempo de apresentação⁴.

Após a coleta de material para citologia e cultura, empregam-se antibióticos para o tratamento inicial de ceratites bacterianas que devem ser efetivos contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Nos casos de úlceras superficiais, com menos de 3 mm de diâmetro e localizadas na periferia da córnea pode ser instituída monoterapia, empregando-se fluorquinolonas disponíveis comercialmente (moxifloxacino 0.5%, gatifloxacino 0.3%, besifloxacino 0.6%, ciprofloxacina 0,3%, ofloxacina 0,3%)⁵³⁻⁵⁵.

Nos casos de úlceras graves, o tratamento inicial consiste na aplicação tópica de uma combinação de dois agentes fortificados, um com espectro voltado preferencialmente para gram-positivos e outro para gram-negativos (amicacina 5%, vancomicina 5%, gentamicina 2%, cefazolina 5%). Uso de antibiótico subconjuntival ou sistêmico está indicado na presença de comprometimento escleral ou intra-ocular⁵⁶. Os colírios fortificados são manipulados e não apresentam conservantes e devem ser mantidos em geladeira e substituídos frequentemente por apresentarem tempo de validade curto⁵⁷.

A terapêutica inicial deve ser modificada baseando-se na identificação do

organismo ou, se há progressão da infecção combinada com resistência demonstrada do micro-organismo aos antibióticos empregados⁴. Mesmo com a utilização correta da antibioticoterapia instituída no tempo apropriado, o processo inflamatório pode progredir com piora da ulceração, desenvolvimento de *melting* corneal e perfuração ocular⁵².

Infecções corneais severas e resistentes ao tratamento convencional necessitam de cirurgia. Estatísticas afirmam que cerca de 18.4% dos transplantes de córnea ocorrem devido a ceratite infecciosa⁵⁸. Em estudo realizado em Pernambuco, lesões ulcerativas foi responsáveis por 21.3% dos transplantes penetrantes⁵⁹.

2.7 Epidemiologia da ceratite fúngica

Tem sido observado um aumento na incidência de ceratites causadas por fungos nas últimas décadas^{2,60}. O aumento da utilização de antibióticos tópicos de amplo espectro que permitem um ambiente favorável para o crescimento fúngico e o uso tópico de corticosteróide, que também favorece pela supressão da resposta imunológica do hospedeiro, levaram ao aumento da frequência dessas ceratites². Associa-se também os avanços nas técnicas de diagnóstico permitindo a identificação do patógeno de um modo mais preciso⁶¹. Apesar do progresso no diagnóstico e tratamento, a ceratite fúngica continua sendo um desafio para os oftalmologistas, representando uma das mais difíceis ceratites infecciosas para diagnóstico e tratamento adequados⁶¹.

Nos países desenvolvidos, os casos de ceratite fúngicas estão associados ao aumento do uso de lentes de contato e à imunossupressão, enquanto nos países em desenvolvimento, a maior parte dos casos ocorre entre os trabalhadores rurais, vítimas de trauma ocular com matéria vegetal^{60,62,63}.

A ceratite fúngica apresenta alta incidência em países em desenvolvimento, acometendo principalmente a população rural, trabalhadores, na sua maioria agricultores e pacientes com baixo nível sociocultural e econômico. Estes fatores dificultam o tratamento pelo difícil acesso ao profissional médico encontrado nestas

regiões, além do baixo poder aquisitivo dos pacientes associado à dificuldade dos mesmos na compreensão e execução do tratamento proposto⁶⁴.

2.8 Etiologia da ceratite fúngica

Candida sp, *Aspergillus sp*, e *Fusarium sp* são os principais agentes etiológicos de úlcera fúngica⁶⁰. *Fusarium solani* é o principal agente causador de ceratite fúngica em regiões de clima quente. Encontra-se presente no solo e nas plantas, sendo um patógeno relativamente comum na agricultura^{60,65}. A toxicidade do *Fusarium* está relacionada à sua micotoxina e sua habilidade de replicação a 35°C^{66,67}. Enquanto em clima frio, predominam os fungos leveduriformes, geralmente decorrentes de infestação por *Candida albicans* e usualmente estão associados à presença de doenças sistêmicas como diabetes mellitus e imunossupressão ou doenças oculares, como problemas palpebrais e olho seco e ainda em pacientes com uso prolongado de colírios antibióticos ou corticóides tópicos⁶⁷. Em nosso meio, o *Fusarium sp*, participa em mais da metade dos casos de ceratite⁶⁰.

Os fungos normalmente não penetram na córnea com epitélio íntegro e apesar da presença de muitos saprófitas compondo a microbiota conjuntival normal, existe a necessidade de ruptura do epitélio corneal para que ocorra a penetração dos mesmos. A virulência do fungo é devido a sua capacidade de resistir às defesas do hospedeiro e de penetrar através da membrana de Descemet íntegra, atingindo a câmara anterior. Pode ainda causar necrose tecidual através da produção de enzimas. A resposta inflamatória resultante contribui para o dano tecidual^{67,68}.

2.9 Tratamento de ceratites fúngicas

Ceratites causadas por fungos filamentosos continuam sendo consideradas de difícil tratamento, apesar da existência de novos medicamentos e cirurgias adjuvantes, como transplante de córnea. Os medicamentos de primeira escolha são a anfotericina B e a natamicina e devem ser preparados na forma de colírios fortificados. São empregados em casos iniciais, enquanto o fluconazol em casos refratários⁶⁹.

A natamicina tem pequena penetração no estroma corneal devido a sua massa molecular, sendo recomendado debridamento esporádico no intuito de atingir maiores concentrações no estroma corneal. Está disponível em suspensão na concentração de 5%. Tem boa ação contra fungos filamentosos, em especial o *Fusarium*⁷⁰.

Anfotericina B é usada como colírio na concentração de 0,15% para tratamento de ceratites por *Candida* e *Aspergillus*. Tem penetração pobre no epitélio intacto, sendo recomendado debridamento^{69,71}.

2.10 Tratamento cirúrgico de úlcera infecciosas

O tratamento cirúrgico das ceratites infecciosas é indicado em caso de falha do tratamento clínico, presença de descemetocle com risco de perfuração ou perfuração presente⁷². Apesar dos avanços na terapia antibacteriana e antifúngica, a ceratite infecciosa pode progredir rapidamente em extensão e profundidade, com afinamentos e perfurações^{58,73}. Perfurações corneais pequenas podem ser tratadas com adesivos orgânicos ou cola assim como úlceras progressivas podem ser resolvidas com recobrimento conjuntival^{72,74}. Para perfurações corneais maiores que 2mm e para úlceras profundas com acometimento intraocular, o transplante tectônico ou terapêutico está indicado^{72,75,76}.

Estudos relatam que a necessidade de cirurgia para erradicar a infecção na ceratite bacteriana (3 a 6%) é menor do que na ceratite fúngica (18 a 29%). Isto ocorre devido disponibilidade de mais opções de antibioticoterapia tópica para tratamento das infecções bacterianas e antibióticos cada vez mais potentes, com menor possibilidade de desenvolver resistência bacteriana. Para as ceratites fúngicas, existem menos opções de antifúngicos tópicos e o diagnóstico é geralmente mais tardio, a identificação do fungo no laboratório é mais difícil e o tratamento específico muitas vezes é iniciado quando a doença está em fase avançada^{58,77-80}.

O recobrimento conjuntival, total ou parcial, pode ser utilizado no tratamento dos defeitos epiteliais de difícil fechamento, sejam eles de causa estéril ou infecciosa. Cabe ressaltar que o mesmo possui diversas limitações técnicas como sangramento e

friabilidade do tecido decorrente do olho inflamado. Deve-se considerar que o mesmo não elimina o material infectado e dificulta a avaliação da córnea durante o acompanhamento⁸¹.

Casos de perfurações menores que 2mm, pode ser utilizado adesivos teciduais como o N-butil-cianocrilato. Estes devem ser mantidos na lesão até que caiam espontaneamente ou haja disponibilidade de córnea para transplante. Em muitos casos é relatado fechamento da lesão, dispensando a necessidade da cirurgia de transplante de córnea em um olho inflamado^{82,83}. Porém, em olhos com infecção ativa, os adesivos devem ser evitados por dificultarem a penetração do medicamento no estroma profundo⁸⁴.

Ceratite infecciosa resistente a tratamento clínico é a principal indicação de transplante terapêutico⁷². Quando, apesar da máxima terapia medicamentosa, a infecção progride com perfuração ou risco iminente de perfuração, o transplante terapêutico torna-se mandatório para remoção do agente infeccioso e restabelecimento da integridade do bulbo ocular^{72,85}. A transparência do botão corneal transplantado até 12 meses após a cirurgia está fortemente relacionada com o tamanho do enxerto e o agente agressor^{72,78,86-88}.

Complicações após o transplante terapêutico tendem a ser mais frequentes do que no transplante óptico. O tamanho da área submetida à trepanação deve ser o menor possível, mas deve englobar toda a área acometida pelo processo infeccioso, o que pode resultar em botões corneais grandes e descentrados, portanto com maior risco de astigmatismo e rejeição. Outras complicações, como aumento da pressão intraocular e catarata, são influenciadas pela gravidade ou intensidade da inflamação na ocasião da cirurgia^{78,86-88}.

2.11 Definição e histórico de *crosslinking*

O *crosslinking* (CXL) do colágeno corneal é uma técnica utilizada para fortalecer mecanicamente a córnea. Isto ocorre pela indução de ligações covalentes entre as fibras de colágeno corneal⁸⁹⁻⁹².

A indução de ligações covalentes é um procedimento já bem estabelecido na

química de polímeros a fim de aumentar a resistência dos materiais. No final dos anos 60, o uso do glutaraldeído foi proposto como agente químico capaz de promover a reticulação do colágeno existente nos tecidos utilizados para confecção de próteses valvulares cardíacas⁹³. Com esse tratamento foi possível retardar a degradação dos tecidos colágenos e prolongar a vida útil das biopróteses, como as válvulas cardíacas de porco, próteses de vasos sanguíneos e enxertos de menisco⁹³⁻⁹⁵. Na oftalmologia, o CXL já foi aplicado na produção de biomateriais de colágeno para a epiceratoplastia sintética⁹⁴.

No final da década de 90, foi proposto o uso de luz ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina, um agente fotossensibilizante para indução do CXL. A técnica demonstrou ser capaz de enrijecer a córnea e apresentou-se como uma opção de tratamento conservador para as ectasias corneais^{29,30,92}.

A principal indicação clínica para o CXL é o ceratocone sendo capaz de inibir a progressão da doença^{29,30,95-98}. Além do ceratocone, pode ser utilizado para inibir a progressão da degeneração marginal pelúcida, corrigir ectasia iatrogênica secundária ao LASIK ou PRK^{28,29,99}. Alguns estudos têm mostrado benefício do CXL no tratamento de úlceras infecciosas e ceratopatia bolhosa^{18-26,30}.

2.12 Mecanismo de ação do *crosslinking*

A riboflavina ou vitamina B2 é uma substância fotossensível que ao ser irradiada libera radicais livres, aumentando o número de ligações covalentes entre as fibrilas colágenas, promovendo maior resistência mecânica na córnea^{29,30,92,100}.

A riboflavina é conhecida por ter função dupla de agir como fotossensibilizante para a produção de radicais livres de oxigênio, absorvendo a irradiação com luz UVA e prevenindo dano às estruturas oculares posteriores como o endotélio corneal, cristalino e a retina. A produção de radicais livres de oxigênio induz a formação de ligações covalentes do colágeno pela via natural da lisil oxidase. Para que ocorra formação adequada das ligações é necessário que haja penetração adequada da riboflavina em todo o tecido estromal e exposição à UVA em um comprimento de onda que não seja danoso à córnea e que seja efetivo na interação com a molécula de riboflavina. Consegue-se este objetivo irradiando-se UVA com comprimento de onda

de 370nm¹⁰⁰⁻¹⁰².

A riboflavina aplicada topicamente pode difundir no interior do estroma. O epitélio intacto é uma barreira que retarda a absorção da riboflavina no interior da córnea. Por esta razão, o epitélio deve ser debridado na área de intenção de tratamento, removendo a barreira para a molécula da riboflavina e aumentando a velocidade de saturação estromal⁹⁵. Nos pacientes com ceratite infecciosa, existe uma ulceração epitelial o que se faz desnecessário o debridamento epitelial¹⁹.

O CXL do colágeno aumenta a resistência à digestão pela collagenase, pepsina e tripsina, especialmente na metade anterior da córnea. Botões corneais porcinos tratados com o CXL foram dissolvidos pela pepsina e collagenase apenas no décimo terceiro e décimo quarto dia respectivamente e no sexto dia de córneas controles não tratadas. A digestão pela tripsina foi observada no quinto dia em córneas tratadas e no segundo dia em córneas controles. Assim, justifica-se o uso do CXL para o tratamento de úlceras corneais que exibem elevada atividade da collagenase²⁶.

Já foi estabelecido que a associação UVA com a riboflavina tem efeito antimicrobiano. Desenvolvimento de técnicas utilizando o princípio do CXL foi utilizada para eliminação de patógenos de componentes sanguíneos para transfusão^{101,102}.

A técnica tem-se mostrado segura, não havendo dano endotelial se a córnea for mais espessa que 400µm, sem perda da transparência corneal e sem alterações das estruturas mais profundas do olho. Pesquisas mostram que o CXL gera alteração significativa na elasticidade corneal e aumento da rigidez em 328%. A exposição à radiação de 5,4J/cm² e irradiância de 3mW/cm² utilizada usualmente está abaixo do limiar conhecido de dano para o endotélio, cristalino e retina^{90,103,104}.

MATERIAIS E MÉTODOS



3.1 Tipo de estudo

Foi realizado estudo de intervenção, clínico, não randomizado.

3.2 Local de estudo

Os pacientes foram selecionados no ambulatório de córnea e doenças externas e na emergência da Fundação Altino Ventura (FAV) no período compreendido entre outubro de 2011 a maio de 2012.

3.3 Seleção

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos onze pacientes com idade entre 18 e 70 anos com diagnóstico de úlcera de córnea de etiologia bacteriana e fúngica. Todos os pacientes selecionados estavam em uso de colírios há pelo menos sete dias e não apresentavam melhora do processo infeccioso, definida como diminuição da dor, diminuição da densidade do infiltrado e do edema estromal, reepitelização, margens com aspecto mais delimitado, diminuição da reação de câmara anterior ou diminuição do hipópio.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes que apresentavam perfuração ou afinamento corneal, endoftalmite, pacientes com alterações na posição ou na função das pálpebras e os que não concordaram em participar do estudo.

3.3.3 Procedimentos técnicos

Foi coletado material para citologia, bacterioscopia e cultura no início do quadro quando o paciente procurou a FAV. Com espátula de Kimura, colheu-se material da região da úlcera. Foi realizada semeadura em placas de ágar-sangue, ágar-chocolate, ágar-Sabouraud, meio líquido enriquecido com *Brain Heart Infusion* (BHI) e o exame direto realizado pelas técnicas de coloração de Gram e Giemsa. A análise do material foi realizada pelo Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e pelo Laboratório do Hospital das Clínicas da UFPE.

Os pacientes com ceratite bacteriana estavam em uso de colírios antibióticos conforme protocolo da unidade, o qual consiste no uso de fluoroquinolonas disponíveis comercialmente (moxifloxacino ou gatifloxacino) para os casos de úlceras superficiais, com menos de 3mm, em qualquer de suas dimensões, e localizadas na periferia da córnea. Nesses casos, a dosagem inicial do colírio era de uma gota a cada minuto por cinco minutos (cinco gotas), seguido de uma gota de cinco em cinco minutos por 15 minutos (três gotas) e então passar para uma gota a cada hora.

Nos casos de úlceras graves, maior que 3mm, em qualquer de suas dimensões, ou acometendo eixo visual o tratamento inicial consistiu na aplicação tópica de uma combinação de dois agentes fortificados (um com espectro voltado preferencialmente contra gram-positivos e outro contra gram-negativos). Para gram-positivo, a cefazolina (50mg/dL) ou vancomicina (25mg/dL) e para gram-negativo, tobramicina (14mg/dL), gentamicina (14mg/dL) ou amicacina (25mg/dL).

Os pacientes com úlcera fúngica estavam em uso de colírio de natamicina 5% ou anfotericina B 0.15% (1,5mg/dL) a cada hora associado ao uso de cetoconazol, via oral, 400mg por dia.

Os pacientes foram avaliados antes da realização do *crosslinking* (CXL) e durante o período pós-operatório até cicatrização do processo infeccioso. Foi realizado exame oftalmológico, incluindo: medida da acuidade visual (AVL), biomicroscopia, na qual foram observados a superfície da córnea com e sem instilação de fluoresceína, medida da úlcera de córnea em suas maiores dimensões

horizontal e vertical e representação gráfica do quadro. Ultrassonografia foi realizada para exclusão de endoftalmite.

Para realização do CXL foram instilados gotas da solução de riboflavina 0,1% e dextrano 20% a cada cinco minutos intercaladas com colírio anestésico (proximetacaína), em um período de 30 minutos antes do procedimento e durante a aplicação da radiação. Se houvesse a presença de algum epitélio na área a ser tratada, esse foi removido com lâmina de bisturi número 15. A córnea foi exposta a luz UVA com comprimento de onda de $370\text{nm} \pm 5\text{nm}$ e uma irradiância de $3\text{mW}/\text{cm}^2$ por um período total de 30 minutos, correspondendo a uma dose total de $3,4\text{J}$ ou a uma exposição de radiação de $5,4\text{J}/\text{cm}^2$ de córnea. Foi utilizado para esta exposição o aparelho *X-Link, Corneal Crosslinking System* (Opto®). Ao final, o tratamento clínico com antibióticos e antifúngicos foi mantido. Figura 1 e 2.

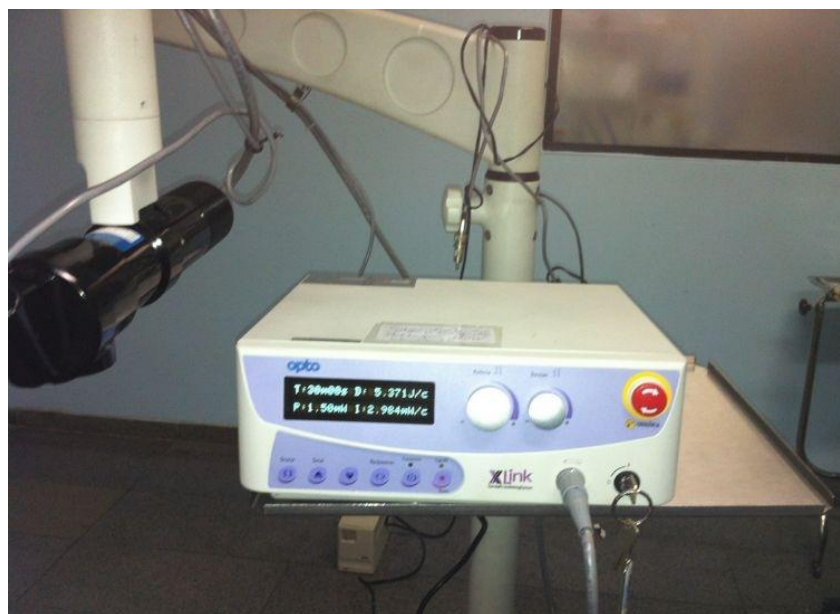


Figura 1. *Corneal Crosslinking System* (Opto®)- fonte autor



Figura 2. Paciente realizando *Crosslinking* para ceratite infecciosa- fonte autor

Foram avaliados a idade dos pacientes em anos, profissão, AVL, medida em LogMar¹⁰⁵, pré e pós realização do CXL, tamanho da úlcera medida pela estimativa da área multiplicando o tamanho horizontal pelo vertical em milímetros (mm), se houve a cura do processo infeccioso, o tempo levado para cura e a agente etiológico da infecção. Os pacientes, quanto à idade, foram estratificados em dois subgrupos de 18 a 50 anos e acima de 50 anos.

Foi definido como cura do processo infeccioso ausência de infiltrado estromal com ou sem re-epitelização.

3.3.4 Procedimentos analíticos

Os resultados das variáveis qualitativas foram apresentados em forma de tabelas com as frequências relativas e absolutas. Para as variáveis quantitativas foram utilizadas médias, medianas e desvios-padrão, mínimo e máximo para indicar a variabilidade dos dados.

Para verificar se existia associação entre cura do processo infeccioso e a variável tipo de agente etiológico e idade foi aplicado o teste Exato de Fisher, devido ao número pequeno da amostra.

Para verificar se havia correlação entre a área da úlcera e o tempo de cura do processo infeccioso foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

Para verificar a diferença entre a acuidade visual pré e pós realização do CXL foi utilizado teste não paramétrico de Wilcoxon.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de *p*) foram inferiores a 0,05. Os cálculos estatísticos foram realizados no software SPSS for Windows versão 18.0 - *Statistical Package for the Social Science*.

3.3.5 Procedimentos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAV número do processo 048/2011 (Apêndice A). Todos os indivíduos que participaram do estudo foram previamente esclarecidos sobre o objetivo e o método do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

O procedimento usado foi considerado seguro para os pacientes e sem problemas significativos a longo prazo quanto à perda de transparência corneal e do cristalino, quanto à contagem de células endoteliais no pós-operatório e quanto a danos na retina²⁶⁻²⁹.

RESULTADOS



A distribuição da amostra segundo as variáveis demográficas encontra-se na tabela 1. Dos onze pacientes, sete (63,6%) apresentaram positividade para bactérias e quatro (36,4%) para fungos. As bactérias encontradas foram: *Staphylococcus aureus* (dois pacientes), *Staphylococcus epidermidis* (um paciente), *Streptococcus sp* (um paciente), *Pseudomonas aeruginosa* (um paciente). Dois pacientes apresentaram cultura negativa, porém com citologia evidenciando presença de cocos gram-positivo. Os fungos encontrados foram: *Fusarium sp.* (três pacientes) e *Aspergillus sp.* (um paciente). Figuras 3, 4 e 5.

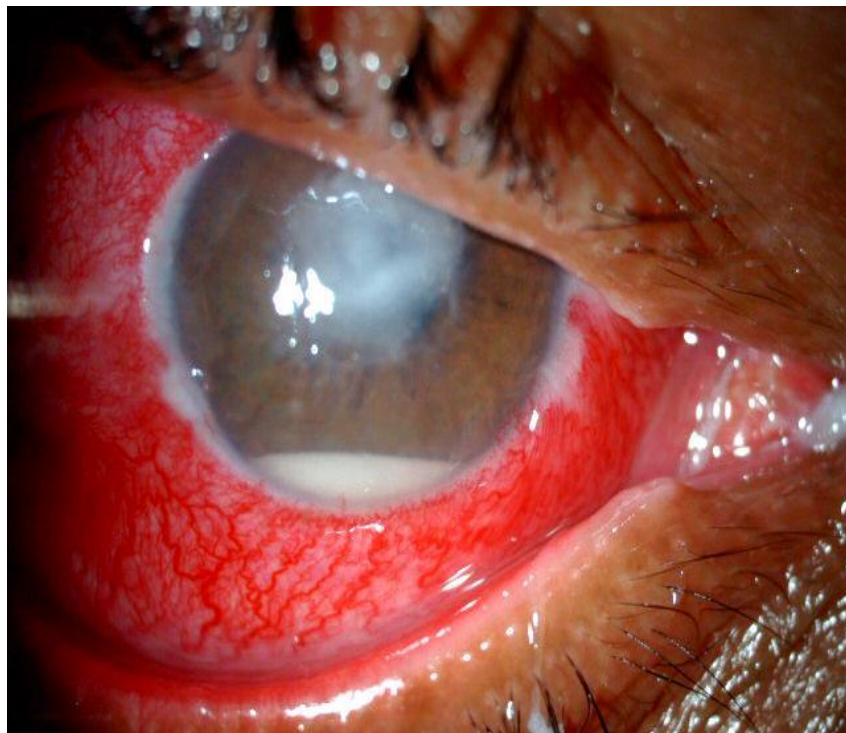


Figura 3 - Úlcera de cornea etiologia fúngica- *Fusarium sp.* Paciente número 10.



Figura 4 - Úlcera bacterina por *Staphylococs aureus*-Paciente número 1.



Figura 5 - Cultura de *Fusarium sp.* Cultura de paciente número 7.

Tabela 1: Distribuição amostral segundo as variáveis demográficas.

Variáveis	
Sexo Masculino	7 (63,6%)
Idade (anos)	
Média (DP)	43,9 (14,5)
Mínimo - Máximo	18 - 69
DM	1 (9,1%)
Profissão	
Agricultor	2 (18,2%)
Cabeleireiro	1 (9,1%)
Doméstica	2 (18,2%)
Estudante	2 (18,2%)
Motorista	1 (9,1%)
Pedreiro	1 (9,1%)
Serralheiro	1 (9,1%)
Serviços Gerais	1 (9,1%)

Base: 11 pacientes

DP: Desvio Padrão

DM: Diabetes mellitus

A característica da amostra segundo os parâmetros clínicos da úlcera de córnea estão na tabela 2.

Tabela 2: Perfil amostral segundo as variáveis clínicas

Variáveis	
Tamanho da úlcera	
Média (DP)	23,1 (10,6)
Mínimo - Máximo	8,7 - 48,2
Etiologia	
Bacteriano	7 (63,6)
Fungo	4 (36,4)
Cura do processo infeccioso	
Não	4 (36,4)
Sim	7 (63,6)
Tempo de cura do processo infeccioso (dias)*	
Média (DP)	14,4 (2,4)
Mínimo - Máximo	11 - 18
Cirurgia adicional	6 (54,5)

Base: 11 pacientes

DP: Desvio Padrão

* Apenas para os 7 casos que tiveram cura do processo infeccioso

A distribuição da amostra segundo a cultura, características da úlcera e tempo de cura do processo infeccioso está representada na tabela 3.

Tabela 3: Distribuição da amostra segundo o tamanho da úlcera, área, tempo de cura do processo infeccioso e cultura

Paciente	Tamanho da úlcera (horizontal X vertical) (mm)	Área estimada da úlcera (mm ²)	Cura do processo infeccioso	Tempo para cura do processo infeccioso	Cultura
1	5,0X4,0	20,00	Sim	13 dias	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	5,8X5,2	30,16	Sim	15 dias	Negativo*
3	3,2X7,0	22,40	Sim	18 dias	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4	6,6X7,3	48,18	Sim	17 dias	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	4,0X6,5	26,00	Sim	14 dias	Negativo*
6	3,7X3,9	14,43	Sim	13 dias	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
7	5,0X4,5	22,50	Não	Não cicatrizou	<i>Fusarium sp.</i>
8	5,7X2,4	13,68	Sim	11 dias	<i>Streptococcus sp.</i>
9	3,1X2,8	8,68	Não	Não cicatrizou	<i>Fusarium sp.</i>
10	5,0X5,8	29,00	Não	Não cicatrizou	<i>Fusarium</i>
11	4,5X4,2	18,90	Não	Não cicatrizou	<i>Aspergillus</i>

* Citologia mostrando cocos gram-positivo
mm= milímetros

A análise de correlação entre a área da úlcera e o tempo de cicatrização dos sete pacientes com úlcera bacteriana apresentou uma tendência positiva de quanto maior o tamanho da úlcera, maior o tempo em dias para sua cicatrização ($r=0,775$ $p=0,041$ – teste de correlação de Spearman). Figura 6.

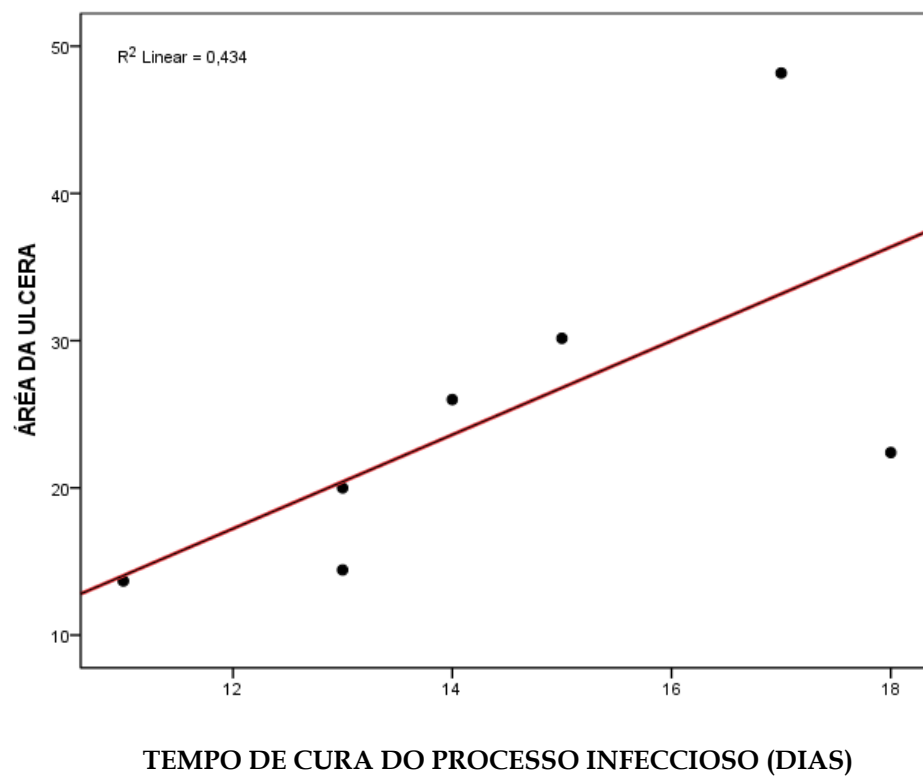


Figura 6. Dispersão entre a área da úlcera e o Tempo de cura do processo infeccioso

Em relação à melhor acuidade visual (AVL) final corrigida comparada com a AVL inicial, seis (54,5%) pacientes apresentaram melhora, dois (18,2%) mantiveram-se inalterados e três (27,3%) pacientes pioraram (tabela 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a AVL final e AVL inicial ($p=0.4393$).

Tabela 4 : Relação entre acuidade visual pré e pós realização do CXL

Paciente	AVL	
	Inicial (LogMar)	Final (LogMar)
1	0.92	0.60
2	2.00	1.80
3	3.00	3.00
4	1.92	1.70
5	2.00	1.80
6	2.00	1.60
7	3.00	3.00
8	2.00	0.92
9	0.60	2.00
10	1.80	2.00
11	1.70	1.92
Média e DP	1.90 ±0.72	1.85±0.72

valor $p = 0,4393$ (teste de Wilcoxon)

AVL=Acuidade Visual Longe

DP=Desvio Padrão

Todos os pacientes que apresentaram piora da AVL apresentavam diagnóstico de úlcera fúngica.

Na tabela 5, observa-se que existe associação estatisticamente significativa ($p=0,003$) entre o agente etiológico e a cicatrização.

Tabela 5: Relação entre o desfecho da ceratite e os diferentes agentes etiológicos

Tipo de cultura	Cura do processo infeccioso				Total	
	Não		Sim			
	n	%	n	%	n	%
Bacteriano	0	0	7	100,00	7	63,6
Fungo	4	100,00	0	0	4	36,4
Total	4	100,00	7	100,00	11	100,00

valor $p = 0,003$ (teste de Fisher)

Observa-se que os pacientes entre 18 e 50 anos, seis (55%) apresentaram cura do processo infeccioso e dois (18%) não esses apresentavam diagnóstico de ceratite fúngica. Entre os pacientes acima de 50 anos, dois (18%) com diagnóstico de úlcera fúngica não apresentaram cura do processo infeccioso (tabela 6).

Tabela 6: Relação entre cicatrização e idade dos pacientes.

Cura do processo infeccioso	18-50 anos		> 50 anos		Total	
	n	%	n	%	n	%
Sim	6	55	1	9	7	64
Não	2	18	2	18	4	36
Total	8	73	3	27	11	100

valor $p = 0,4909$ (teste de Fisher)

Dois pacientes (18,2%) com úlcera bacteriana, apesar de apresentarem resolução do processo infeccioso após a realização do *crosslinking*, necessitaram de cirurgia de recobrimento conjuntival para resolução do defeito epitelial (Tabela 7).

Os quatro pacientes com úlcera fúngica (36,4%) necessitaram de cirurgia adicional para melhora do processo infeccioso. Três pacientes foram submetidos a transplante de córnea tectônico e um paciente necessitou recobrimento conjuntival associado a lavagem de câmara anterior com anfotericina B (Tabela 7).

Tabela 7: Relação entre tipo de cultura, complicação e procedimento cirúrgico adicional.

Paciente	Cultura	Tempo de cura do processo infeccioso (dias)	Complicação	Procedimento cirúrgico adicional
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	13		
2	Negativo*	15		
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18	Defeito Epitelial sem infecção	Recobrimento conjuntival
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	17		
5	Negativo*	14		
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13		
7	<i>Fusarium sp.</i>	Não	Persistência da infecção	Transplante tectônico
8	<i>Streptococcus sp</i>	11	Defeito Epitelial sem infecção	Recobrimento conjuntival
9	<i>Fusarium sp.</i>	Não	Persistência da infecção	Lavagem de câmara anterior + recobrimento conjuntival
10	<i>Fusarium sp.</i>	Não	Persistência da infecção e Perfuração corneal	Transplante tectônico
11	<i>Aspergillus sp.</i>	Não	Persistência da infecção e afinamento corneal	Transplante tectônico

* Citologia mostrando cocos gram-positivo

A ceratite infecciosa é uma condição de risco para perda da visão que requer tratamento eficaz e precoce. O terapêutica padrão atual para o tratamento das ceratites bacterianas e fúngicas baseia-se na utilização de antibióticos e antifúngicos^{4,52,69-71}. Apesar desse tratamento ser eficaz na maioria dos casos, já foi demonstrado que existem microorganismos resistentes às classes de antimicrobianos disponíveis¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

Diferentes estratégias têm sido propostas para manejar a infecção causada por micro-organismos resistentes à múltiplas drogas. Já se tem descrito casos de infecção ocular causadas por bactérias resistentes aos mais novos antibióticos o que aumenta a preocupação de que o arsenal de antibióticos disponíveis hoje não seja suficiente para o futuro¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

Em caso de falência do tratamento com antimicrobianos pode ser necessário o uso de terapia adicional. Alguns pacientes evoluem com afinamento corneal e risco de perfuração ou desenvolvimento de endoftalmite. Nestes casos, são utilizados cola adesiva com cianoacrilato, lentes de contato terapêutica, recobrimento conjuntival, transplante tectônico de córnea^{72,81,83,84}.

O estudo atual foi desenvolvido para investigar a riboflavina juntamente com a luz ultravioleta A (UVA) como um método para tratamento de ceratite infecciosa refratária ao tratamento clínico. Foram incluídos onze pacientes com úlcera de córnea infecciosa resistente ao tratamento clínico habitual. Todos os pacientes, caso não realizassem o *crosslinking* (CXL), iriam ser submetidos à cirurgia para controle da infecção e evitar perfuração corneal ou extensão do processo infeccioso para estruturas intraoculares.

No presente estudo, foi observado maior número de pacientes do sexo masculino (63,6%). Este fato pode ser atribuído à maior exposição do homem aos fatores predisponentes, como o traumatismo corneal⁵⁹. Baixo nível socioeconômico e cultural consiste em um fator de risco para úlcera de córnea^{2,62}. Pacientes com atividade de agricultores, pedreiro e serralheiro estão predispostos a infecção corneal

por maiores chances de traumatismo ocular durante as atividades profissionais, e muitos demoram a procurar serviços de saúde especializados, fato que agrava o prognóstico da úlcera corneal.

Foi observado diferença estatisticamente significativa entre o tamanho da úlcera e a cura do processo infeccioso, e nem relação entre sua área estimada e o tempo de cicatrização para os pacientes com ceratite bacteriana. O cálculo da área da úlcera foi obtido multiplicando sua maior dimensão horizontal pela maior dimensão vertical, e obtendo uma área estimada, todavia, próximo do real, mas não o valor exato.

Com relação à idade, a distribuição das frequências de cura da ceratite entre pacientes abaixo e acima de 50 anos revelou que não existe diferença significativa entre estes diferentes extratos. Todos os casos de pacientes que não evoluíram para êxito da terapêutica tinham cultura positiva para fungos, o que representa o fator primordial para a falta de resultados nesse tipo de úlcera.

Alguns estudos descreveram a eficácia do tratamento da ceratite infecciosa com o CXL^{19-21,24,25}. Foi relatado um caso de ceratite infecciosa tratado com o CXL, apresentando melhora da sintomatologia em 24 horas após o tratamento, completa cicatrização e melhora da acuidade visual (AVL), medida pela escala de Snellen, que antes do CXL era de 20/1000 e após resolução da infecção foi para 20/30²⁰. No presente estudo, apesar de seis entre os sete pacientes que apresentaram cura do processo infeccioso após o CXL, apresentarem melhora da acuidade visual, esta ainda permaneceu baixa devido a presença da cicatrização corneal. Provavelmente devido a todos os casos do presente estudo serem refratários ao tratamento clínico e já apresentarem ulceração atingindo eixo visual. Transplante óptico será requerido no futuro para reabilitação visual desses pacientes, porém realizado de uma forma planejada, com menos inflamação ocular e com melhor qualidade óptica da córnea doadora^{2,58}.

Foi relatado sete olhos de seis pacientes com ceratite infecciosa e *melting* corneal tratados com CXL, que apresentaram melhora dos sintomas dentro de 24 horas com completa cicatrização em todos os casos¹⁹. Outro estudo mostrou a eficácia do CXL no tratamento de cinco pacientes com ceratite infecciosa evitando a

realização de transplante de urgência²¹. Já em outro estudo o CXL realizado em seis pacientes com úlcera infecciosa apresentou melhora em quatro e não evitou a realização do transplante tectônico em dois pacientes²⁵. Assim o CXL parece ser uma alternativa para evitar um transplante de emergência em pacientes com úlcera resistente a tratamento clínico, mas não mostrou ser eficiente para todos os casos.

Neste estudo, o CXL associado com o tratamento tópico resultou na cicatrização do processo infeccioso em todos os pacientes com úlcera bacteriana e nenhum desses pacientes necessitou da realização de transplante tectônico. Porém devido ao número pequeno da amostra, não é possível afirmar que todos os pacientes com ceratite bacteriana resistentes ao tratamento clínico apresentarão melhora com o tratamento do CXL.

Inativação de patógenos por meio de fotossensibilização da riboflavina, usando UVA, foi reconhecida pela primeira vez na década de 1960¹¹⁰. Já foi utilizado riboflavina associada à UVA para desinfecção de patógenos em transfusões de componentes do sangue^{101,102}. O CXL corneal apresenta a possibilidade dos micro-organismos serem danificados pelo stress oxidativo, pelos radicais de oxigênio interferindo na integridade da membrana celular e a luz UVA destruir os patógenos por causar danos irreversíveis para o DNA e RNA^{27,111}.

Em estudo clínico no qual utilizou-se a riboflavina e UVA como tratamento primário e sem o uso de antibióticos tópicos para tratamento de úlcera bacteriana, causada por bactérias, entre elas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, quatorze pacientes dos dezesseis incluídos apresentaram cicatrização e conseqüentemente melhora da acuidade visual sem a necessidade de administração de antibióticos²⁴.

Foi estudado *in vitro* a resposta de cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* quando submetidos ao CXL. A combinação UVA e riboflavina foi mais potente em reduzir o número de bactérias quando comparado com a radiação UVA sozinha. Esse efeito foi maior para as bactérias gram-positivo comparado com *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse estudo, riboflavina sozinha não mostrou haver efeito como agente antibacteriano²⁷.

Em outro estudo *in vitro*, observou-se que uma dose de 10.8J/cm²,

correspondendo a um tempo de radiação UVA de 60 minutos, obteve mais alto grau de erradicação de cada bactéria estudada. O aumento na duração da radiação UVA foi mais efetivo no combate ao crescimento bacteriano provavelmente pelo aumento do estresse oxidativo¹¹². No presente estudo, o tempo de radiação foi de 30 minutos e a dose de 5,4J/cm². Esta dose e tempo baseia-se em protocolos de tratamento para ceratocone e está abaixo do limiar conhecido de dano para o endotélio, cristalino e retina. Há possibilidade de que o tempo de radiação ou concentração da riboflavina possa ser diferente para o tratamento da ceratite infecciosa e até mesmo para a espécie microbiana a ser tratada. Cada bactéria pode responder diferentemente ao CXL, indicando uma variação na sensibilidade entre os diferentes micro-organismos a depender possivelmente da duração do ciclo celular e da estrutura da parede celular.

Outra questão, seria a possibilidade de repetir o procedimento para casos de refratários mesmo após o CXL, nesse caso, estudos devem ser desenvolvidos para garantir a segurança de repetidos procedimentos em curto período de tempo.

No presente estudo as bactérias isoladas foram *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus sp* e houve resposta positiva para o tratamento com CXL em todos. Porém, devido ao pequeno número da amostra, não se pode concluir qual a bactéria que melhor respondeu ao CXL.

Pacientes que evoluem com *melting* corneal, apresentam uma destruição das camadas de colágeno da córnea pela presença de enzimas como proteases, collagenases e elastase. Tais pacientes têm risco aumentado para perfuração ocular. Estas enzimas são liberadas no sítio da lesão por bactérias e por células inflamatórias do próprio organismo². Associado ao efeito antibacteriano, o CXL torna o estroma corneal mais resistente aos efeitos de enzimas como pepsina, collagenase e tripsina²⁶. Estudos mostram que o CXL gera alteração significativa na elasticidade corneal, aumento da rigidez em 328% e aumento da resistência a enzimas proteolíticas. Assim, aumenta a resistência contra a degradação microbiana e o *melting* corneal^{26,90,97,103,104}.

O CXL pode também evitar o *melting* corneal por estimular a apoptose dos ceratócitos, já que durante o processo inflamatório, os ceratócitos participam desse

processo através da produção de fatores estimuladores de granulócitos e monócitos, diminuindo a resposta inflamatória¹¹³.

Apesar de alguns autores, tanto em estudos clínicos como em estudos experimentais, terem demonstrado melhora de úlcera fúngica com o CXL^{21,23,110,113}, não foi observado nos pacientes do presente estudo resposta eficaz com este tratamento. Todos os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico adjuvante para cura do processo infeccioso.

Foi relatado um paciente com diagnóstico de ceratite fúngica causada por *Fusarium*, com progressão da úlcera, apesar de tratamento com natamicina a 5% e voriconazol a 1%. Foi oferecido tratamento com CXL como alternativa ao transplante de córnea imediato. O paciente apresentou uma melhora inicial, mas após três semanas, houve uma piora do quadro, sendo necessário o transplante penetrante que ocorreu sem intercorrências. O material corneal excisado foi examinado por microscopia eletrônica e apresentou cultura negativa para fungos e a histologia apresentou granulócitos e mastócitos, mas não células fúngicas²¹.

Fungos têm maior capacidade invasiva sobre o tecido corneal, podendo atingir a câmara anterior mesmo com a membrana de Descemet íntegra. Esse potencial de invasão acontece pela capacidade dos fungos de produzirem enzimas que destroem os tecidos e proteínas antimicrobianas e a capacidade de sobrevivência a elevadas temperaturas⁶⁸.

Foi demonstrado em estudo *in vitro* que, a combinação de anfotericina B com o CXL, pode ser mais eficaz para o combate de fungos (*Candida albicans*, *Fusarium sp* e *Aspergillus sp*) do que quando utilizado a anfotericina B sozinha, provavelmente pelo CXL permite uma maior difusão corneal da anfotericina B¹¹⁰. Em outro estudo experimental, foi demonstrado que córneas após o tratamento com o CXL apresentavam diminuição da permeabilidade corneal para um antibiótico (ofloxacino) e para um antifúngico (voriconazol)¹¹⁴. No presente estudo, todos os pacientes com úlcera fúngica estavam em uso de anfotericina B, e mesmo assim não apresentaram melhora do quadro infeccioso.

O efeito do CXL ocorre no estroma anterior da córnea até, aproximadamente, os 300µm anteriores¹⁰⁰. Assim, infiltrados infecciosos corneais localizados mais

profundamente poderiam ser menos influenciados pela ação do CXL. Os fungos têm a capacidade de penetrar no estroma corneal profundo o que poderia justificar a menor eficácia do tratamento para este tipo de infecção.

Estudos mostram que transplantes terapêuticos correspondem a 2,6% à 17,9% do total de transplantes penetrantes realizados. A principal indicação para realização de transplante terapêutico no Brasil são as ceratites bacteriana e fúngica⁵⁸. No presente estudo, foi evitado a realização de transplante terapêutico em 100% dos pacientes com ceratite bacteriana resistente ao tratamento clínico. Complicações após esses transplantes tendem a ser mais frequentes do que no transplante óptico. Portanto, a realização do CXL pode evitar a realização do transplante de emergência. O transplante realizado nestas situações tem a desvantagem de, em geral, ser necessário a técnica de transplante penetrante ao invés de enxertos lamelares. Além disso, mesmo com o transplante penetrante existe a chance de recorrência da infecção em até 15% dos casos. A taxa de rejeição do transplante nestes casos também é alta, variando de 14,6 à 52,0%^{78,79,86-88}.

No presente estudo, dois pacientes com ceratite bacteriana necessitaram de cirurgia adicional, porém o processo infeccioso foi resolvido e o recobrimento conjuntival foi realizado apenas para fechamento de defeito epitelial persistente. Foi descrito em uma série de 16 olhos tratados com o CXL, apenas um necessitou de cirurgia para tratamento de defeito epitelial com recobrimento de membrana amniótica²⁴.

Até então, milhares de olhos já foram tratados no mundo inteiro e sem problemas significativos a longo prazo quanto à perda de transparência corneal e do cristalino, quanto à contagem de células endoteliais no pós-operatório e quanto a danos na retina^{29,100,103}. É possível que no futuro o uso do CXL para tratamento de ceratite infecciosa seja incorporado e assim, encurtando o tempo de tratamento, diminuindo os efeitos tóxicos dos antibióticos de uso ocular e evitando problemas de resistência bacteriana, porém, mais estudos precisam ser realizados.

CONCLUSÕES



A análise dos resultados permite concluir que o uso terapêutico do *crosslinking* (CXL) corneal através da aplicação de luz ultravioleta A (UVA) e riboflavina, associado ao tratamento clínico, mostrou-se eficaz no tratamento de úlcera infecciosa bacteriana resistente ao tratamento clínico evitando a realização de transplante de córnea tectônico. Todavia, a cura da ceratite não foi acompanhada de melhora da acuidade visual. Em relação à ceratite fúngica resistente ao tratamento clínico, o CXL não influenciou para melhora do processo infeccioso.

REFERÊNCIAS



1. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79:214-21.
2. Furlanetto RL, Andreo EG, Finotti IG, Arcieri ES, Ferreira MA, Rocha FJ. Epidemiology and etiologic diagnosis of infectious keratitis in Uberlandia, Brazil. *Eur J Ophthalmol.* 2010;20:498-503.
3. Keay L, Edwards K, Naduvilath T, Taylor HR, Snibson GR, Forde K, Stapleton F. Microbial keratitis predisposing factors and morbidity. *Ophthalmology.* 2006;113:109-16.
4. Gopinathan U, Sharma S, Garg P, Rao GN. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol.* 2009;57:273-9.
5. Srinivasan M, Gonzales CA, George C, Cevallos V, Mascarenhas JM, Asokan B, et al. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, South India. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:965-71.
6. Loh AR, Hong K, Lee S, Mannis M, Acharya NR. Practice patterns in the management of fungal corneal ulcers. *Cornea.* 2009;28:856-9.
7. Feilmeier MR, Sivaraman KR, Oliva M, Tabin GC, Gurung R. Etiologic diagnosis of corneal ulceration at a tertiary eye center in Kathmandu, Nepal. *Cornea.* 2010;29:1380-5.4.
8. Cariello AJ, Passos RM, Yu MC, Hofling-Lima AL. Microbial keratitis at a referral center in Brazil. *Int Ophthalmol.* 2011;31:197-204.
9. Chew HF, Yildiz EH, Hammersmith KM, Eagle RC Jr, Rapuano CJ, Laibson PR, Ayres BD, Jin YP, Cohen EJ. Clinical outcomes and prognostic factors associated with *acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 2011;30:435-41.
10. Tabbara KF, Al Balushi N. Topical ganciclovir in the treatment of acute herpetic keratitis. *Clin Ophthalmol.* 2011;4:905-12.
11. Constantinou M, Daniell M, Snibson GR, Vu HT, Taylor HR. Clinical efficacy of moxifloxacin in the treatment of bacterial keratitis: a randomized clinical trial. *Ophthalmology.* 2007;114:1622-9.

12. Prajna NV, Mascarenhas J, Krishnan T, Reddy PR, Prajna L, Srinivasan M, Vaitilingam CM, Hong KC, Lee SM, McLeod SD, Zegans ME, Porco TC, Lietman TM, Acharya NR Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(6):672-8.
13. Burton MJ, Pithuwa J, Okello E, Afwamba I, Onyango JJ, Oates F, Chevallier C, Hall AB. Microbial keratitis in East Africa: why are the outcomes so poor? *Ophthalmic Epidemiol*. 2011;18(4):158-63.
14. Sharma N, Sachdev R, Jhanji V, Titiyal JS, Vajpayee RB. Therapeutic keratoplasty for microbial keratitis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010 Jul;21(4):293-300. Review.
15. Khodadoust A, Quinter AP. Microsurgical approach to the conjunctival flap. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(8):1189-93.
16. Sano FT, Dantas PE, Silvino WR, Sanchez JZ, Sano RY, Adams F, Nishiwaki-Dantas MC. Trends in the indications for penetrating keratoplasty. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(3):400-4.
17. Joshi SA, Jagdale SS, More PD, Deshpande M. Outcome of optical penetrating keratoplasties at a tertiary care eye institute in Western India. *Indian J Ophthalmol*. 2012;60(1):15-21.
18. Al-Sabai N, Koppen C, Tassignon MJ. UVA/riboflavin crosslinking as treatment for corneal melting. *Bull Soc Belge Ophtalmol*. 2010;(315):13-7.
19. Makdoui K, Mortensen J, Crafoord S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea*. 2010;29(12):1353-8.
20. Morén H, Malmjö M, Mortensen J, Ohrström A. Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking of the cornea for the treatment of keratitis. *Cornea*. 2010;29(1):102-4.
21. Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier J, Seiler T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea*. 2008;27(5):590-4.
22. Kymionis GD, Kankariya VP, Kontadakis GA. Combined treatment with flap amputation, phototherapeutic keratectomy, and collagen crosslinking in severe intractable post-LASIK atypical mycobacterial infection with corneal melt. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(4):713-5.

23. Anwar HM, El-Danasoury AM, Hashem AN. Corneal collagen crosslinking in the treatment of infectious keratitis. *Clin Ophthalmol*. 2011;5:1277-80.
24. Makdoui K, Mortensen J, Sorkhabi O, Malmvall BE, Crafoord S. UVA-riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012;250(1):95-102.
25. Müller L, Thiel MA, Kipfer-Kauer AI, Kaufmann C. Corneal cross-linking as supplementary treatment option in melting keratitis: a case series. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2012;229(4):411-5.
26. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. 2004;29(1):35-40.
27. Martins SA, Combs JC, Noguera G, Camacho W, Wittmann P, Walther R, Cano M, Dick J, Behrens A. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(8):3402-8.
28. Spoerl E, Seiler T. Techniques for stiffening the cornea. *J Refract Surg*. 1999;15:711-13.
29. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:620-627.
30. Hersh PS, Greenstein SA, Fry KL. Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(1):149-60.
31. Kymionis GD, Karavitaki AE, Kounis GA, Portaliou DM, Yoo SH, Pallikaris IG. Management of pellucid marginal corneal degeneration with simultaneous customized photorefractive keratectomy and collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg*. 2009;35(7):1298-301.
32. Ghanem RC, Santhiago MR, Berti TB, Thomaz S, Netto MV. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. *J Cataract Refract Surg*. 2010;36(2):273-6.
33. Huang AJW, Wichiensin P, Yang M. Bacterial Keratitis. In Krachmer Mannis Holland. *Cornea Fundamentals, Diagnosis and Management*. 2nd Edition. p.1005-33.

34. Eric JC, Nevitt MP, Hodge DO. Incidence of ulcerative keratitis in a defined population from 1950–1988. *Arch Ophthalmol*. 1993;111:1665–71.
35. Gonzales CA, Srinivasan M, Whitcher JP, Smolin G. Incidence of corneal ulceration in Madurai District, South India. *Ophthal Epidemiol*. 1996;3:159–66.
36. Upadhyay MP, Karmacharya PC, Koirala S, Shah DN, Shakya S, Shrestha, J.K. The Bhaktapur eye study: ocular trauma and antibiotic prophylaxis for prevention of corneal ulceration in Nepal. *Br J Ophthalmol*. 2001;85: 388-92.
37. Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(7):834-8.
38. Alves MR, Kara José N. Resposta corneana às infecções. In: Belfort RB, Kara José N. *Córnea Clínica-cirúrgica*. São Paulo: Roca; 1996. p.163-71.
39. Resistance to infection of the external eye: the role of tears. Selinger DS, Selinger RC, Reed WP. *Surv Ophthalmol*. 1979;24(1):33-8.
40. Chusid MJ, Davis SD. Pathogenesis of corneal and conjunctival infections. In: Tabbara KF, Hyndrick RA. Editors. *Infections of the eye*. Boston: Little Brown; 1986. p.45-62.
41. Schaefer F, Bruttin O, Zografos L, Guex-Crosier Y. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(7):842-7.
42. Green M, Apel A, Stapleton F. A longitudinal study of trends in keratitis in Australia. *Cornea*. 2008;27. (1):33-9
43. Green M, Apel A, Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*. 2008;27(1):22-7.
44. Rocha GA, Silva RF, Lopes MF, Pereira NC, Sousa LB. Main pathogens and in vitro antimicrobial susceptibility in bacterial keratitis: 5-year study, 2005-2009. *Arq Bras Oftalmol*. 2011;74(1):28-32.
45. Mohammadpour M, Mohajernejzhadfar Z, Khodabande A, Vahedi P. Antibiotic susceptibility patterns of pseudomonas corneal ulcers in contact lens wearers. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2011;18(3):228-31.
46. Liesegang TJ. Contact lens-related microbial keratitis: Part 1: Epidemiology. *Cornea*. 1997;16:125-13.

47. Lichtinger A, Yeung SN, Kim P, Amiran MD, Iovieno A, Elbaz U, Ku JF, Wolff R, Rootman DS, Slomovic AR Shifting Trends in Bacterial Keratitis in Toronto: An 11-Year Review. *Ophthalmology*. 2012; 23.
48. Mascarenhas J, Srinivasan M, Chen M, Rajaraman R, Ravindran M, Lalitha P, Oldenburg CE, Ray KJ, Glidden DV, Costanza S, Lietman TM, Acharya NR. Differentiation of etiologic agents of bacterial keratitis from presentation characteristics. *Int Ophthalmol*. 2012; 30.
49. Lima Filho AA, Yu MCZ, Lima ALH: Técnicas de diagnóstico laboratorial em Oftalmologia. In Lima, ALH, Dantas ACN, Alves MR. Doenças Externas Oculares e Córnea. Rio De Janeiro, Cultura Médica, 1999, pp.128-54
50. Khanal B, Deb M, Panda A, Sethi HS Laboratory diagnosis in ulcerative keratitis.. *Ophthalmic Res*. 2005;37(3):123-7.
51. Tomimatsu PI, Belfort Jr. R, Kara José N. Microbiologia e citologia da córnea. In: Belfort Júnior R, Kara Jose N. Córnea clínica e cirúrgica. São Paulo: Roca;1997. p.65-95.
52. Glasser DB, Baum J. Medical management in Bacterial Keratitis. In Stenson, SM. ed - Surgical management in external diseases of the eye. New York, Igaku-Shoin, 1995, pp.107-32.
53. Sanders ME, Norcross EW, Moore QC 3rd, Shafiee A, Marquart ME. Efficacy of besifloxacin in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis.
54. Sanders ME, Moore QC 3rd, Norcross EW, Sanfilippo CM, Hesje CK, Shafiee A, Marquart ME. Comparison of besifloxacin, gatifloxacin, and moxifloxacin against strains of *Pseudomonas aeruginosa* with different quinolone susceptibility patterns in a rabbit model of keratitis. *Cornea*. 2011;30(1):83-90.
55. Chawla B, Agarwal P, Tandon R, Titiyal JS, Sharma N, Agarwal T, Navak N, Satpathy G. In vitro susceptibility of bacterial keratitis isolates to fourth-generation fluoroquinolones. *Eur J Ophthalmol*. 2010;20(2):300-5.
56. Thomas PA, Geraldine P. Infectious keratitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(2):129-41.
57. Al-Mujaini A, Al-Kharusi N, Thakral A, Wali UK. Bacterial keratitis: perspective

- on epidemiology, clinico-pathogenesis, diagnosis and treatment. Sultan Qaboos Univ Med J. 2009;9(2):184-95.
58. Oliveira FC, Dantas PE, Marco ES, Oliveira AC, Nishiwaki-Dantas MC. Transplante terapêutico de córnea: resultados prolongados de series de casos. Arq Bras Oftalmol. 2007;70(4):625-31.
59. Amaral Cde S, Duarte JY, Silva PL, Valbuena R, Cunha F. Indications for penetrating keratoplasty in Pernambuco. Arq Bras Oftalmol. 2005 Sep-Oct;68(5):635-7. Epub 2005 Nov 28.
60. Ibrahim MM, Vanini R, Ibrahim FM, Fioriti LS, Furlan EM, Provinzano LM, De Castro RS, Sousa SJ, Rocha EM. Epidemiologic aspects and clinical outcome of fungal keratitis in southeastern Brazil. Eur J Ophthalmol. 2009;19(3):355-61.
61. Hofling-Lima AL, Forseto A. Laboratory study of the mycotic infectious eye diseases and factors associated with keratitis. Arq Bras Oftalmol. 2005;68(1):21-7.
62. Rosa RH, Miller Jr. D. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. Ophthalmology. 1994;101(6):1005-13.
63. Edwards, S. G. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. Toxicol Lett. 2004;153(1):29-35.
64. Upadhyay MP, Srinivasan M. Microbial keratitis in the developing world: does prevention work? Int Ophthalmol Clin. 2007;47(3):17-25.
65. Leck AK, Thomas PA, Hagan M, Kaliamurthy J, Ackuaku E. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. Br J Ophthalmol. 2002;86:1211-1215.
66. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, Padmavathy S, Shivakumar C. Microbial keratitis in South India: influence of risk factors, climate, and geographical variation. Ophthalmic Epidemiol. 2007;14:61-69.
67. Tanure MA, Cohen EJ. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania. Cornea, 2000;19(3):307-12.
68. Laspina F, Samudio M, Cibils D, Ta CN, Farina N. Epidemiological characteristics of microbiological results on patients with infectious corneal ulcers: a 13-year survey in Paraguay. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.

2004;242:204–209.

69. Vieira LA, Belfort Jr. R. Ceratite Micótica. In: Belfort Jr., Kara-José N. *Córnea clínica - cirúrgica*. São Paulo: Roca; 1996. p. 189-203.
70. Kalavathy CM, Parmar P. Comparison of topical itraconazole 1% with topical natamycin 5% for the treatment of filamentous fungal keratitis. *Cornea*. 2005; 24(4):449-52.
71. Morand K, Bartoletti AC, Bochot A, Barratt G, Brandely ML, Chast F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability. *Int J Pharm*. 2007 Nov 1;344(1-2):150-3..
72. Sato EH, Belfort Jr R. Tratamento cirúrgico da ceratites infecciosas. In: Kara-José N, Belfort Jr R. *Córnea: cirúrgica clínica*. São Paulo: Roca; 1997. p.505-11.
73. Vanathi M, Sharma N, Titiyal JS, Tandon R, Vajpayee RB. Tectonic grafts for corneal thinning and perforations. *Cornea*. 2002;21(8):792-7.
74. Improved conjunctival transplantation for corneal ulcer. Zhou Q, Long X, Zhu X. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010 Aug;35(8):814-8.
75. Arentesen JJ, Laibson PR, Cohen EJ. Management of corneal descemetecles and perforations. *Ophthalmic Surg*. 1995;16(1):29-33
76. Nobe JR, Robin JB, Smith RE. Results of penetrating keratoplasty for the treatment of corneal perforations. *Arch Ophthalmol*. 1990;108(7):939-41.
77. Foster RK, Rebell G. Therapeutic surgery in failures of medical treatment for fungal keratitis. *Br J Ophthalmol*. 1975;59(7):366-71.
78. Hill JC. Use of penetrating keratoplasty in acute bacterial keratitis. *Br J Ophthalmol*. 1986;70(7):502-6.
79. Xie L, Zhai H, Shi W. Penetrating keratoplasty for corneal perforations in fungal keratitis. *Cornea*. 2007;26:158-162.
80. Chen WL, Wu CY, Hu FR, Wang IJ. Therapeutic penetrating keratoplasty for microbial keratitis in Taiwan from 1987 to 2001. *Am J Ophthalmol*. 2004;137(4):736-43.
81. Alino AM, Perry HD. Conjunctival flaps. *Ophthalmology*. 1998;105(6):1120-3.
82. Agarwal VJ. Current perspectives in infectious keratitis. *Indian J Ophthalmol*. 1994;42(4):171-92.

83. Hick S, Demers PE, Brunette I, La C, Mabon M, Duchesne B. Amniotic membrane transplantation and fibrin glue in the management of corneal ulcers and perforations: a review of 33 cases. *Cornea*. 2005;24(4):369-77.
84. Byun YS, Kim MS. Superimposed fungal ulcer after fibrin glue sealant in infectious corneal ulcer. *Korean J Ophthalmol*. 2011;25(6):447-50.
85. Miedziak AL, Miller MR, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ. Risk factors in microbial keratitis leading to penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1999;106(6):1166-70.
86. Killingsworth DW, Stern GA, Driebe WT, Knapp A, Dragon DM. Results of therapeutic penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 1993;100(4):534-41.
87. Sukhija JM, Jain AK. Outcome of therapeutic penetrating keratoplasty in infectious keratitis. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005;36(4):303-9.
88. Sony P, Sharma N, Vajpayee RB, Ray M. Therapeutic keratoplasty for infectious keratitis: a review of the literature. *CLAO J*. 2002;28(3):111-8.
89. Dhaliwal JS, Kaufman SC. Corneal collagen cross-linking: a confocal, electron, and light microscopy study of eye bank corneas. *Cornea*. 2009;28(1):62-7.
90. Samaras KE, Lake DB. Corneal Collagen Cross Linking (CXL): A Review. *Int Ophthalmol Clin*. 2010;50(3):89-100.
91. Tomkins O, Garzosi HJ. Collagen cross-linking: Strengthening the unstable cornea. *Clin Ophthalmol*. 2008;2(4):863-7.
92. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97-103.
93. Carpentier A. From valvular xenograft to valvular bioprosthesis (1965-1977). *Med Instrum*. 1977;11(2):98-101.
94. Harner CH, Mccarey BE, Rao PR, Chaw A. A. In vivo evaluation of biomaterials for synthetic epikeratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:S.68.
95. Derakhshan A, Shandiz JH, Ahadi M, Daneshvar R, Esmaily H. Short-term Outcomes of Collagen Crosslinking for Early Keratoconus. *J Ophthalmic Vis Res*. 2011;6(3):155-9.
96. Asri D, Touboul D, Fournié P, Malet F, Garra C, Gallois A, Malecaze F, Colin JJ. Corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: multicenter results

- from the French National Reference Center for Keratoconus. *Cataract Refract Surg.* 2011;37(12):2137-43.
97. Kolli S, Aslanides IM. Safety and efficacy of collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Expert Opin Drug Saf.* 2010;9(6):949-57.
98. Corneal collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet-A light for keratoconus: one-year analysis using Scheimpflug imaging. Grewal DS, Brar GS, Jain R, Sood V, Singla M, Grewal SP. *J Cataract Refract Surg.* 2009 Mar;35(3):425-32.
99. Li G, Fan ZJ, Peng XJ. Corneal collagen crosslinking for corneal ectasia of post-LASIK: one-year results. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(2):190-5.
100. Spoerl E, Huhle M, Kasper M, Seiler T. Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking. *Ophthalmologe.* 1997;94(12):902-6.
101. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion.* 2004;44(6):877-85.
102. Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang.* 2000;78 Suppl 2:211-5.
103. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea.* 2007;26(4):385-9.
104. Jankov MR, Hafezi F, Beko M, Ignjatovic Z, Djurovic B, Markovic V, Schor P. Ultra B2-Promoção de ligações covalentes do colágeno corneal (Corneal cross-linking) no tratamento de ceratocone: resultados preliminares. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71(6):813-8.
105. Holladay JT. Proper method for calculating average visual acuity. *J Refract Surg.* 1997 Jul-Aug;13(4):388-91.
106. Bertino JS. Impacto f antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role f current and future antibiotics.
107. Betanos-Cabrera G, Juarez -Verdayes MA, Gonzales-GonzalesG, Gatifloxacin, moxifloxacin and balofloxacin resistance due to mutations in the gryA and parC genes os *Staphylococcus apidermidis* strains isolated from patients with endophthalmitis, corneal ulcer and conjunctivitis. *Ophthalmic Res* 42:43-48.

- 108.Ramos-Esteban JC, Bamba S, Jeng BH. Treatment of multidrug-resistant *Flavobacterium indologenes* keratitis with trimetoprim-sulfamethoxazole. *Cornea* 2008; 27:1074-6.
- 109.Moshir M, Meyer J, Espandar L. Fourth-generation fluoroquinolone-resistant mycobacterial keratitis after laser in situ keratomileusis. *J cataract Refract Surg.* 2007; 33:1978-81.
- 110.Tsugita A, Okada Y, Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin. *Biochim Biophys Acta.* 1965;103(2):360-3.
- 111.Sauer A, Letscher-Bru V, Speeg-Schatz C, Touboul D, Colin J, Candolfi E, Bourcier T. In vitro efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Aug;51(8):3950-3.
- 112.Makdoui K, Bäckman A, Mortensen J, Crafoord S. Evaluation of antibacterial efficacy of photo-activated riboflavin using ultraviolet light (UVA). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010;248(2):207-12.
- 113.Galperin G, Berra M, Tau J, Boscaro G, Zarate J, Berra A. Treatment of fungal keratitis from *Fusarium* infection by corneal cross-linking. *Cornea.* 2012;31(2):176-80.
- 114.Tschopp M, Stry J, Frueh BE, Thormann W, De Smet J, Van Boclaer J, Tappeiner C. Impact of corneal cross-linking on drug penetration in an ex vivo porcine eye model. *Cornea.* 2012;31(3):222-6.



Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocolo

Paciente n.º _____

Iniciais do paciente: _____

Título do Estudo: EFEITO TERAPÊUTICO DO CROSSLINKING CORNEANO NA CERATITE INFECCIOSA

Centro de Estudo: Fundação Altino Ventura

1. Explicação do estudo:

As ceratites infecciosas constituem causa importante de baixa visual, associando-se frequentemente a alterações nos mecanismos de defesa corneal. Diagnóstico e tratamento precoces podem limitar a perda de tecido, minimizar a cicatrização e reduzir a necessidade de cirurgia futura. O tratamento das ceratites bacterianas consiste no emprego de antibióticos tópicos após a coleta de material para citologia e cultura. A terapêutica inicial deve ser modificada baseando-se na identificação do organismo ou se há progressão da infecção combinada com resistência demonstrada do micro-organismo aos antibióticos empregados. Mesmo com a utilização correta da antibioticoterapia, instituída no tempo apropriado, o processo inflamatório pode progredir com piora da ulceração, desenvolvimento de *melting* corneal e perfuração ocular. Quando ocorre falha no tratamento clínico, procedimentos cirúrgicos com recobrimento conjuntival ou transplante de córnea podem ser utilizados.

O *crosslinking* do colágeno corneal com a riboflavina (vitamina B2) é uma técnica que tem como objetivo enrijecer o tecido corneal. A luz ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina cria novas ligações entre as moléculas de colágeno adjacentes, produzindo aumento da espessura corneal, bem como diminuindo sua maleabilidade. A irradiação por meio da UVA acarreta perda do equilíbrio interno das moléculas de riboflavina, que atua como um fotomediador, criando radicais livres que induzem novas ligações entre fibrilas de colágeno. Esta reestruturação das fibras de colágeno provoca um aumento da força biomecânica da córnea. Além do mais, a luz ultravioleta e os radicais de oxigênio pode ter um efeito antimicrobiano porque os radicais de oxigênio interfere na integridade membrana celular. Assim, a combinação da luz ultravioleta e os radicais de oxigênio induzido pelo *crosslinking*

podem agir de forma sinérgica para o tratamento de úlceras corneais tanto pela ação antimicrobiana como pela proteção do colágeno contra a degradação de enzimas proteolíticas.

2. Participação no Estudo:

Sua participação consistirá em submeter-se ao tratamento da ceratite infecciosa com *crosslinking* corneal, que consiste na realização de uma abrasão do epitélio da córnea do tamanho do processo infeccioso, aplicação de gotas da solução de riboflavina 0,1% e dextrano 20 % serão instiladas a cada 5 minutos intercaladas com colírio anestésico, em um período de 30 minutos antes do procedimento e durante a aplicação da radiação. Ao final será mantido o tratamento clínico com antibióticos. Você deverá se submeter-se à avaliação oftalmológica diariamente até resolução por completo do processo infeccioso.

Caso aceite participar desta pesquisa, está garantindo que poderá desistir a qualquer momento, bastando para isso, informar a sua decisão de desistência, da maneira mais conveniente. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Instituição. Você poderá sair do estudo no momento que lhe for conveniente.

3. Benefícios:

O benefício potencial desta pesquisa é de você contribuir para um maior conhecimento dos efeitos procedimento de *crosslinking* corneal para tratamento de ceratites infecciosas. Você receberá os colírios gratuitamente durante a duração desta pesquisa.

4. Confidencialidade

Os resultados do estudo poderão ser publicados, porém seu nome e sua identidade nunca serão revelados, de forma que você não poderá ser identificado e sua identidade será mantida em sigilo.

Sua participação é voluntária. As informações obtidas serão analisadas sem divulgação ou identificação dos participantes. As informações obtidas serão utilizadas apenas nessa pesquisa. Caso esses dados interessem a alguma outra pesquisa você será consultado e os dados só serão fornecidos com a sua autorização.

5. Garantia de acesso:

Você terá a garantia de que, em qualquer etapa do estudo, terá acesso ao pesquisador responsável, para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra Ana Cecília de Souza Leão Escarião, que pode ser encontrado no endereço da Rua da Soledade, n.º 170, bairro- Boa Vista (Fundação Altino Ventura) e pelo telefone (81) 9656-0000. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, (CEP) – Rua da Soledade 170,

Boa Vista, CEP: 50070-040, fone (81) 3302-4300, FAX: (81) 3302-4322, email:
fav@fundacaoaltinoventura.org.br.

Consentimento

Eu entendi a descrição do estudo e aceito livremente participar deste estudo como voluntário. Eu tive a oportunidade de perguntar ao meu entrevistador as minhas dúvidas e recebi respostas satisfatórias.

Nome (sujeito da pesquisa)

Assinatura

Data da assinatura

Nome (testemunha)

Assinatura

Data da assinatura

Nome (pesquisador)

Assinatura

Data da assinatura.....



Anexo A



Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Altino Ventura

Recife, 26 de agosto de 2011.

CARTA DE APROVAÇÃO CEP N.º 048/2011

Ilma. Sra.

Ana Cecília de Souza Leão Escarião (Pesquisadora)

Instituição: **Fundação Altino Ventura**

Ref.: Projeto de Pesquisa

Tema: **Efeito terapêutico do Cross-Linking corneano na ceratite infecciosa bacteriana.**

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou e aprovou o projeto acima mencionado, bem como a documentação constituída pelo projeto de pesquisa, ficha de encaminhamento, folha de rosto, termo de consentimento livre e esclarecido, formulário de pesquisa e planilha de custos.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. 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 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,

Vasco Bravo Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
da Fundação Altino Ventura