



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Diego Nery Benevides Gadelha

Efeito terapêutico do *cross-linking* corneal em portadores de ceratopatia bolhosa sintomática

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

Orientador Interno
Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt
Prof. Titular do Depto. de Cirurgia, CCS, UFPE

Gadelha, Diego Nery Benevides

Efeito terapêutico do *cross-linking* corneal em portadores de ceratopatia bolhosa sintomática / Diego Nery Benevides Gadelha. – Recife: O Autor, 2010.

xiv + 61 folhas: il., fig., gráf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Córnea. 2. *cross-linking*. 3. Ceratopatia bolhosa. 4. Descompensação endotelial. I. Título.

617.713-002
617.719

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-078

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

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. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

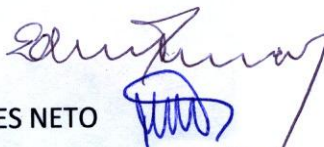
Prof. Sílvio Caldas Neto

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

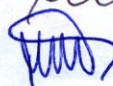
Relatório da Defesa de Dissertação do Dr. Diego Nery Benevides Gadelha, Aluno de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Às oito horas do dia sete de abril do ano de dois mil e dez no Auditório Joana Araújo da Rocha Barros do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de Dissertação do Dr. Diego Nery Benevides Gadelha, para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. EDMUNDO MACHADO FERRAZ, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr^a. LIANA MARIA VIEIRA DE OLIVEIRA VENTURA, Doutora da FUNDAÇÃO ALTINO VENTURA; Dr. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; tendo, como orientador interno, o Dr. CARLOS TEIXEIRA BRANDT, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A dissertação apresentada pelo Dr. Diego Nery Benevides Gadelha versou sobre **“EFEITO TERAPÊUTICO DO CROSS-LINKING EM CORNEAL EM PORTADORES DE CERATOPATIA BOLHOSA SINTOMÁTICA”**. Após, a explanação de 30(Trinta) minutos pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com data show, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. DR. EDMUNDO MACHADO FERRAZ; Prof. DR. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO; e Prof^a. DR^a. LIANA MARIA VIEIRA DE OLIVEIRA VENTURA. Todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. EDMUNDO MACHADO FERRAZ, menção “Aprovado”, Prof. DR. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO, menção “Aprovado”, Prof. Dr^a. LIANA MARIA VIEIRA DE OLIVEIRA VENTURA, menção “Aprovado”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos e, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Isabela Nogueira Pimentel, Técnica em assuntos Educacionais, assinado depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 07 de abril de 2010.

Prof. EDMUNDO MACHADO FERRAZ



Prof. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO



Prof^a. LIANA MARIA VIEIRA DE OLIVEIRA VENTURA



ISABELA NOGUEIRA PIMENTEL



Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). disponível no endereço eletrônico <http://www.icmje.org>. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, Updated October 2009.

Dedicatória

Aos meus pais, *Dalton* e *Gisele*, que desde cedo me ensinaram com lições e exemplos a importância da educação. Sou fruto dos seus valores, dedicação e amor. Tenho certeza de que a sensação de dever cumprido está muito mais presente em vocês do que em mim.

Às minhas irmãs, *Carol* e *Bibi*, por terem sempre compreendido os momentos de ausência e incentivado a concretização de meus sonhos.

À *Neylane*, minha noiva e futura esposa, pelo apoio, carinho e companheirismo em todos os momentos. Sua participação foi essencial nesta conquista.

Agradecimentos

Ao *Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt*, meu orientador. Serei sempre grato pelos ensinamentos éticos e científicos que recebi, e pelo carinho e amizade com que sempre fui tratado. Espero com essa dissertação estar contribuindo com sua eterna missão de formar formadores.

Aos *pacientes* que, confiaram em nossa pesquisa e voluntariamente dispuseram-se a participar do estudo. São para eles todos os esforços na realização deste trabalho.

À *Dra. Liana Ventura*, por ter acreditado no potencial e ter incentivado meu desenvolvimento científico desde o início da formação em oftalmologia na Fundação Altino Ventura.

Ao *Dr. Marcelo Ventura*, pelo apoio total a esta pesquisa e por ter permitido liberação das atividades de residente na Fundação Altino Ventura excepcionalmente para freqüentar as aulas do programa de pós-graduação.

Ao Departamento de Córnea e Doenças Externas da Fundação Altino Ventura e Hospital de Olhos de Pernambuco, nominalmente ao *Dr. Ronald Cavalcanti* e aos colegas *Ana Cecília Escarião*, *Roberta Ventura*, *Bernardo Cavalcanti* e *Vasco Bravo*, pelo apoio técnico e viabilização da realização deste trabalho.



À *Neylane Coelho*, agora não mais como noiva, mas como colega oftalmologista, pela inestimável ajuda na realização da revisão da literatura, coleta dos dados e infinitas idas à secretaria da pós-graduação, ajudando-me a cumprir todos os prazos estipulados pelo curso de mestrado.

À *Dra. Daniele Toledo*, minha prima, e ao *Prof. Dr. Marco Antonio Mattos*, diretor geral do Instituto Nacional de Cardiologia do Rio de Janeiro, por terem sido meus verdadeiros padrinhos na vida acadêmica.

Aos amigos e colegas de mestrado, *Silvio de Biase*, *Verônica Santiago*, *Sergio* e *Pedro Pita*, por terem tornado mais agradáveis os momentos em sala de aula.

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

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

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

Sumário

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Apresentação do problema.....	02
1.2 Justificativa.....	03
1.3 Objetivos.....	03
1.3.1 Geral.....	03
1.3.2 Específico.....	03
2. LITERATURA.....	04
2.1 Córnea e a importância de sua transparência.....	05
2.2 Ceratopatia bolhosa.....	10
2.3 Reticulação polimérica (<i>cross-linking</i>).....	14
2.3.1. <i>Cross-linking</i> do colágeno corneal.....	16
2.3.2. Difusão da riboflavina no olho.....	17
2.3.3. Indução de <i>cross-linking</i> corneal no tratamento da descompensação endotelial.....	19
3. MÉTODOS.....	21
3.1 Local de estudo.....	22
3.2 Tipo de estudo.....	22
3.3 Seleção.....	22

3.3.1 Critérios de Inclusão.....	22
3.3.2 Critérios de Exclusão.....	22
3.4 Procedimentos.....	23
3.4.1 Procedimentos técnicos.....	23
3.4.1.1 Exame oftalmológico.....	23
3.4.1.2 Cross-linking do colágeno corneal.....	23
3.4.2 Procedimentos analíticos.....	24
3.4.3 Procedimentos éticos.....	25
 4. RESULTADOS.....	 26
 5. DISCUSSÃO.....	 32
 6. CONCLUSÃO.....	 38
 REFERÊNCIAS.....	 40
 ANEXOS.....	 49
Anexo 1. Protocolo de pesquisa.....	50
Anexo 2. Comitê de Ética em Pesquisa.....	52
Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	53
Anexo 4. Trabalho publicado com resultados preliminares pelo autor e que deu origem a esta dissertação.....	56
Anexo 5. Certificado de apresentação do trabalho no congresso da Associação Pan-Americana de oftalmologia.....	61

Lista de Siglas e Abreviaturas

ALDH	aldehyde dehydrogenase
AVL	acuidade visual de alto
BMP	<i>basic metabolic panel</i>
CB	ceratopatia bolhosa
CCL	<i>cross-linking</i> corneal
EUA	Estados Unidos da América
EVA	escala visual analógica numérica
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
LASIK	<i>laser in situ keratomileusis</i>
PTK	fototerapêutica por excimer laser
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
UVA	ultravioleta A

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultado da análise da evolução da EVA no período de avaliação.....	27
Tabela 2	Resultado das comparações múltiplas para EVA.....	28
Tabela 3	Resultado da análise da evolução da espessura central corneal no período de avaliação.....	30
Tabela 4	Resultado da análise da evolução da acuidade visual (AVL) no período de avaliação.....	31

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Box-Plot dos valores da Escala Visual Analógica Numérica – EVA para os períodos pré, 7, 30 ,60, 180 e 365 dias após o tratamento.....	29
Gráfico 2	Box-Plot dos valores da espessura central da córnea medida pela paquimetria para os períodos pré, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento.....	30
Gráfico 3	Box-Plot dos valores da Acuidade Visual (AVL) para os períodos pré, 7, 30, 60,180 e 365 dias após o tratamento.....	31

Lista de Figuras

Figura 1	Desenho esquemático de corte longitudinal do globo ocular evidenciando a córnea.....	05
Figura 2	Corte histológico demonstrando as camadas da córnea.....	06
Figura 3	Edema Corneal com diminuição da transparência.....	10
Figura 4	(a) Histologia de córnea guttata mostrando excrecências irregulares da membrana de descemet; (b) córnea guttata vista na reflexão especular; (c) endotélio em metal batido; (d) ceratopatia bolhosa; (e) histologia de ceratopatia bolhosa mostrando grande edema epitelial e bolhas superficiais ⁽⁴⁷⁾	13
Figura 5	Processo de hidroxilação por radicais livres e ligações covalentes entre fibrilas colágenas.....	16
Figura 6	Modelo teórico da dinâmica da difusão da riboflavina no estroma corneal. A partir da difusão constante da fluoresceína no estroma corneal, a concentração local é determinada em função do tempo. Após aproximadamente 30 minutos, concentração de 0,04% é atingida na profundidade estromal de 400µm.....	18
Figura 7	Gradiente de concentração da riboflavina no estroma corneal durante diferentes períodos após a aplicação de riboflavina na superfície. Coeficiente de difusão de $D = 6,5 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$	18

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito do *cross-linking* corneal (CCL) nos portadores de ceratopatia bolhosa sintomática, e seu impacto na acuidade visual, espessura corneal e sintomatologia dolorosa. **Métodos:** Doze pacientes com ceratopatia bolhosa sintomática foram incluídos. Exame clínico com questionário específico para a pesquisa com escala de dor (escala visual analógica numérica), acuidade visual e mensuração da espessura corneal foi realizada pré CCL, 7, 30, 60, 180 e 365 dias após. Em todos os pacientes o tratamento com UVA-crosslinking foi realizado após abrasão do epitélio corneal em lâmpada de fenda e instilação de solução de riboflavina 0,1% a cada cinco minutos por 30 minutos. Após esse período, o paciente foi submetido à exposição à luz UVA, utilizando riboflavina e anestesia tópica a cada cinco minutos por 30 minutos. Os pacientes utilizaram colírios de ofloxacina 0,3% e lágrima artificial até completa reepitelização. O teste de Friedman foi usado para comparar as médias das frequências da acuidade visual, sintomatologia dolorosa e espessura central da córnea. $p < 0.05$ foi utilizado para rejeitar a hipótese nula. **Resultados:** Doze olhos de 12 pacientes com erosões epiteliais recorrentes foram tratados. O tempo de seguimento foi de um ano. Foi observada redução significativa da dor ($p < 0,001$). As medidas de espessura corneal e da acuidade visual não sofreram alterações estatisticamente significantes. **Conclusão:** Foi constatado o potencial de aplicação do *cross-linking* corneal no tratamento de pacientes com dor causada por ceratopatia bolhosa.

Descritores: Córnea; *Cross-linking*; Ceratopatia bolhosa; Dor; Descompensação endotelial.

Abstract

Purpose: To evaluate the corneal cross-linking (CCL) effect on the symptomatic bullous keratopathy, and its impact on the visual acuity, corneal thickness and pain symptomatology. **Methods:** Twelve patients with symptomatic bullous keratopathy were included. A clinical examination with a specific questionnaire (pain scale - visual numeric analog scale), visual acuity, and corneal thickness measures were done pre CCL, 7, 30, 60, 189 and 365 days after the procedure. In all patients, the treatment with the UVA-crosslinking was done after the abrasion of the cornea on the slit-lamp and instillation of 0.1% riboflavin in saline for every five minutes, lasting 30 minutes. After this time, the patient underwent the UVA light exposure, using riboflavin and topical anesthesia, every five minutes lasting 30 minutes. The patient received ofloxacin 0.3% drops, and artificial tears until complete reepithelization. The Friedman test was used to compare the means measurements of: visual acuity, pain symptoms and corneal thickness. $p < 0.05$ was used for rejecting the null hypothesis. **Results:** Twelve eyes from 12 patients with recurrent epithelium erosions were treated. The mean follow-up visits were one year. Significant pain reduction was observed ($p < 0.001$). The corneal thickness measurement and visual acuity presented with no significant difference. **Conclusion:** The potential use of cross-linking in the treatment of bullous keratopathy pain was proved to be likely.

Keywords: Cornea; Cross-linking; Bullous keratopathy; Pain; Endothelial decompensation.

Introdução



1.1 Apresentação do problema

A transparência da córnea é mantida pela bomba iônica no seu endotélio, responsável pela deturgescência e desidratação estromal¹. A ceratopatia bolhosa (CB) é uma desordem causada pela falha desse mecanismo, resultando em edema estromal e, invariavelmente, aparecimento de bolhas epiteliais ou subepiteliais⁽¹⁻⁴⁾. As causas mais comuns de CB são os procedimentos cirúrgicos intra-oculares incluindo facectomia e ceratoplastia penetrante, distrofia endotelial de Fuchs, trauma e glaucoma refratário⁽¹⁻⁴⁾. A CB produz, freqüentemente, sintomas, como diminuição da acuidade visual, dor, fotofobia e epífora⁽²⁾.

Transplante de córnea é o método mais efetivo para alívio dos sintomas e recuperação visual em portadores de CB^(2,3). Quando este tratamento é inviável do ponto de vista clínico ou não está disponível, métodos conservadores podem ser usados. Dor ocular e defeitos epiteliais podem ser tratados com administração tópica de antiinflamatórios, lubrificantes e soluções hipertônicas^(5,6), além do uso de lente de contato terapêutica⁽⁷⁾. Alternativamente, vários tratamentos cirúrgicos têm sido utilizados na CB, incluindo punção do estroma anterior, criopexia (cauterização), recobrimento conjuntival, transplante de membrana amniótica, ceratectomia fototerapêutica por excimer laser (PTK) e ceratoplastia lamelar posterior⁽³⁾.

O *cross-linking* do colágeno corneal com a riboflavina (vitamina B2) é uma técnica inovadora com o objetivo de enrijecer o tecido corneal^(8,9). A luz ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina cria novas ligações entre as moléculas de colágenos adjacentes, produzindo aumento da espessura da córnea bem como diminuindo sua

maleabilidade⁽¹⁰⁾. A irradiação por meio da UVA faz com que ocorra perda do equilíbrio interno das moléculas de riboflavina, que atua como um fotomediador, criando radicais livres que induzem novas ligações entre fibrilas de colágeno⁽¹¹⁾. Esta reestruturação das fibras de colágeno ocasiona aumento da força biomecânica da córnea^(10,11).

1.2 Justificativa

A indicação clínica do *cross-linking* corneal está limitada aos casos de *melting* corneal, degeneração marginal pelúcida, ceratocone e ectasias iatrogênicas após cirurgias refrativas com *laser in situ keratomileusis* (LASIK)^(12,13). Publicações que tenham analisado os efeitos terapêuticos do *cross-linking* corneal na ceratopatia bolhosa são escassas e metodologicamente incompletas⁽¹³⁾.

1.3. Objetivos

1.3.1 Geral

Avaliar o efeito terapêutico do *cross-linking* corneal induzido por UVA/riboflavina em portadores de ceratopatia bolhosa.

1.3.2 Específico

- ❖ Investigar a viabilidade deste tratamento e sua influência na acuidade visual, espessura corneal e sintomatologia dolorosa.

Literatura

2.1. Córnea e a importância de sua transparência

A visão é um sentido primordial e tem sido um fator de grande importância na seleção natural e evolução das espécies. Para este fim é fundamentalmente necessária a manutenção da transparência da córnea ⁽¹⁴⁾. As funções fisiológicas primárias da córnea são a transmissão dos raios luminosos incidentes, refração e proteção das estruturas intraoculares contra trauma e agentes patogênicos ⁽¹⁵⁾. Mais de 60% do poder refrativo total do olho é atribuído à córnea, tornando vital sua função para a focalização da luz na retina e início do processo visual ⁽¹⁵⁾.

A córnea é um tecido transparente, avascular, medindo horizontalmente 11 a 12 mm e verticalmente 9 a 11 mm, na superfície anterior (Figura - 1) ⁽¹⁶⁾.

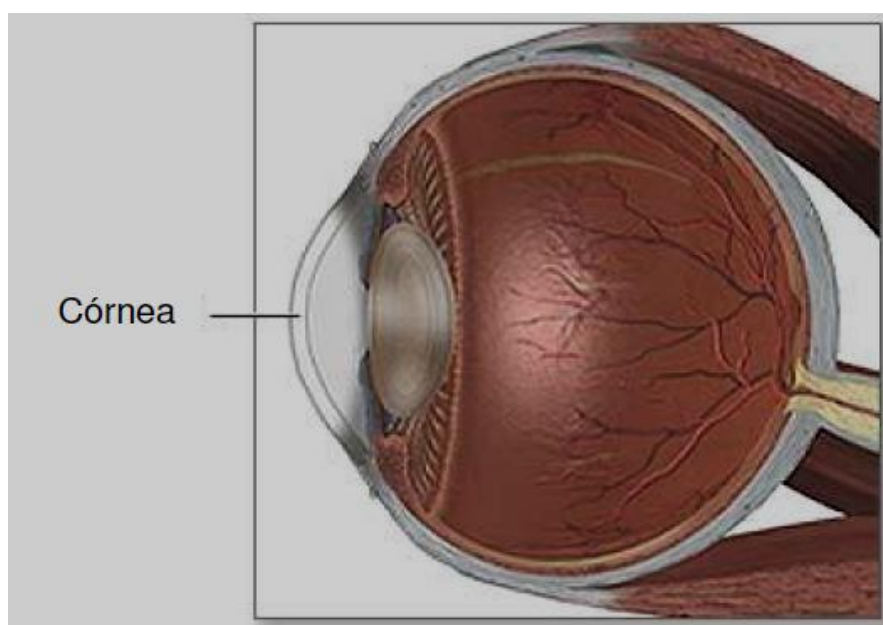


Figura 1: Desenho esquemático de corte longitudinal do globo ocular evidenciando a córnea¹⁶.

A espessura da córnea humana é de aproximadamente 540 μ m⁽¹⁷⁾ e é composta principalmente do estroma que situa-se entre a camada de Bowman anteriormente e a membrana de Descemet posteriormente. (Figura – 2) O epitélio corneal forma a porção superficial da córnea, o endotélio corresponde a mais profunda e está em íntimo contato com o humor aquoso da câmara anterior. O epitélio e o endotélio desempenham papel importante na manutenção da transparência da córnea servindo como uma barreira mecânica à difusão do fluido e por meio da criação de um gradiente osmótico que permite o transporte de líquido para fora do estroma⁽¹⁸⁾.

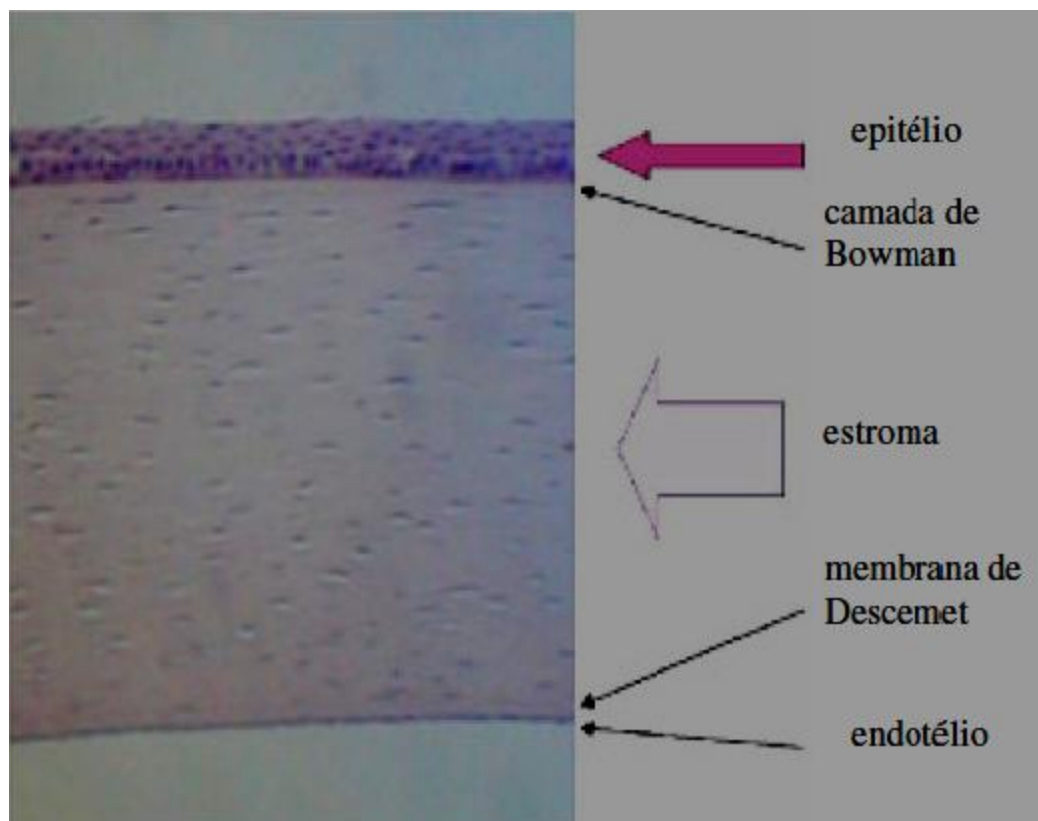


Figura 2: Corte histológico demonstrando as camadas da córnea⁽¹⁸⁾.



O estroma é composto de queratócitos situados entre lamelas de feixes de colágeno. Colágeno tipo I e V são as formas predominantemente encontradas nas córneas dos mamíferos⁽¹⁷⁾. O colágeno tipo IV é o principal constituinte da membrana de Descemet⁽¹⁹⁻²¹⁾. Estas fibrilas de colágeno têm diâmetro de cerca de 10-20nm, enquanto o comprimento de onda da luz é de 500nm ⁽²²⁾. Cada fibrila de colágeno está há uma distância fixa da outra (20nm) e há aumento progressivo da densidade das lamelas de colágeno entre o centro e a periferia do estroma ^(23,24).

A matriz extracelular se encontra entre os feixes de colágeno e queratócitos e é composta predominantemente por água, proteoglicanos, glicoproteínas e sais inorgânicos. Proteoglicanos são formados por um núcleo protéico ligados a um número variável de cadeias laterais de glicosaminoglicanos com grupos sulfatados. Ao interagir com fibras de colágeno, proteoglicanos determinam tanto a arquitetura da matriz corneal como suas propriedades de retenção de água ⁽²⁵⁾.

O índice de refração muda de 1,38 para 1,373 durante o percurso antero-posterior da luz no estroma, além disso, a quantidade total de luz espalhada nesse sistema é estimado em menos de 1% ⁽²⁶⁾. Acredita-se que a distância relativamente minúscula entre as fibrilas de colágeno em relação ao comprimento de onda da luz minimiza a possibilidade de dispersão, independentemente do arranjo das fibrilas ^(27,28).

Outra adaptação estrutural que pode minimizar a dispersão luminosa é a expressão de cristalinas corneais nos queratócitos ⁽²⁹⁾. Os queratócitos situam-se entre as lamelas estromais e possuem densidade de 23.000 células/mm³. A microscopia confocal in vivo revela que enquanto a dispersão luminosa é máxima na superfície



do epitélio e endotélio, é restrita aos núcleos dos queratócitos no estroma da córnea⁽²⁹⁾.

Inicialmente foram descobertas proteínas solúveis em água em queratócitos de coelhos, que são idênticas as cristalinas do cristalino, por exemplo, aldeído desidrogenase 1A1, que é homóloga à neu-cristalina ⁽³⁰⁾. Outras cristalinas corneais, como aldeído desidrogenase 3A1, tem sido identificadas na maioria das espécies de mamíferos e acredita-se que atuam absorvendo diretamente a luz UV e protegendo contra o dano enzimático induzido pela luz UV ⁽³¹⁾. O papel das cristalinas corneais na redução da dispersão luminosa tem sido demonstrado pelo uso da microscopia confocal ⁽²⁹⁾.

O estroma da córnea é cuidadosamente estruturado para minimizar a dispersão luminosa com importantes contribuições da matriz extracelular com seus proteoglicanos, fibras colágenas especialmente espaçadas e expressão de cristalinas em queratócitos. Disfunção em qualquer um desses componentes pode causar perda de transparência e perda crucial da função corneal^(30,31).

O endotélio é constituído por uma única camada de células com aproximadamente 4 a 6µm de espessura. Está aderido à membrana de Descemet e é banhado posteriormente por humor aquoso. Essas células são basicamente hexagonais, com cerca de 20µm de diâmetro, possuem um grande núcleo, muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático bem desenvolvido e aparelho de Golgi, o que demonstra uma grande atividade metabólica ⁽³²⁾.

As células do endotélio estão ligadas por interdigitações, zônula de oclusão, zônula de adesão e junções do tipo *gap*, o que faz com que haja grande comunicação



intercelular. O estroma tende a absorver água devido à pressão osmótica e às cargas iônicas das células. A função do epitélio e do endotélio é formar uma barreira para evitar a entrada de água através de suas junções íntimas e junções do tipo *gap* intercelulares ⁽³²⁾.

O endotélio é responsável pela retirada de excesso de água e pela atividade da bomba de sódio e potássio (enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$). A manutenção da transparência corneal se dá ativamente através da passagem de sódio das células endoteliais para o ambiente extracelular, com concomitante transferência de um íon potássio no sentido inverso. Outro fator de controle da hidratação é a evaporação de água, que se dá no filme lacrimal ^(19, 20, 32). Esse mecanismo é de extrema importância para se manter a córnea sadia e funcionante, uma vez que o edema resultante de excesso de líquido leva à perda da transparência e das funções celulares ⁽³²⁾.

O pH também tem importância no controle da hidratação. O pH médio da córnea é 7,5, e substâncias com pH menor que 6,8 ou maior que 8,2 causam danos às membranas celulares, podendo gerar edema por ruptura do endotélio ⁽¹⁹⁾.

Tanto o humor aquoso, de um lado, quanto à lágrima, do outro, são ligeiramente hipertônicos, ajudando a manter a córnea em estado de moderada desidratação ⁽²⁴⁾.

Devido à estrutura mecânica das fibras corneais, uma quebra na integridade da barreira epitelial resulta em modesto aumento da espessura da córnea: valores acima de 0,6mm são raros. Em contrapartida, descompensação endotelial é seguida de abundante hidratação estromal, com espessura entre 0,8-1,0mm³³.

2.2. Ceratopatia bolhosa

A ceratopatia bolhosa (CB) caracteriza-se pelo edema corneal estromal acompanhado de bolhas epiteliais e subepiteliais devido à perda de células e/ou disfunção da função endotelial. Nos casos mais avançados, ocorre espessamento do estroma acima de 650 μm e presença de fibrose subepitelial, podendo formar uma camada de colágeno retrolental ou membrana fibrótica retrolental e vascularização corneal. Induz baixa de acuidade visual devido à diminuição da transparência e pode ser acompanhada de sensação de corpo estranho, lacrimejamento e dor devido às alterações epiteliais como a presença de bolhas íntegras ou rotas (Figura - 3) ⁽³⁴⁻³⁹⁾.

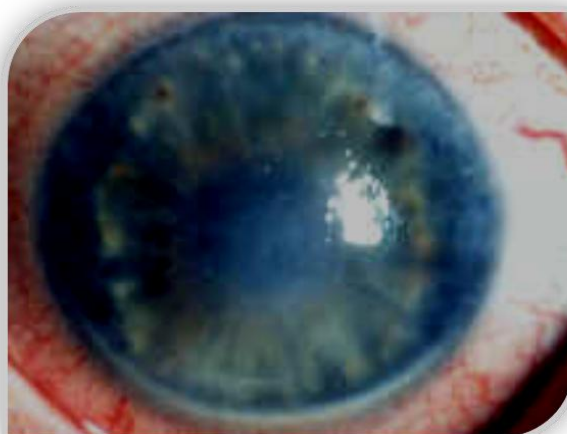


Figura 3: Edema Corneal com diminuição da transparência (Fonte: foto do autor)

Apesar destes conceitos serem bem estabelecidos, estudos imuno-histoquímicos mostram que ainda se tem muitas dúvidas em relação à etiopatogênese da CB. As causas mais comuns de CB são os procedimentos cirúrgicos intra-oculares incluindo facectomia e ceratoplastia penetrante, distrofia endotelial de Fuchs, trauma e glaucoma refratário⁽¹⁻⁴⁾.



Os pacientes com CB com ou sem prognóstico de visão, sintomáticos, apresentam muitas limitações em suas atividades diárias, devido a dor, e fotofobia, mesmo apresentando acuidade visual boa no olho contralateral. Evitam a exposição ao sol, ficando limitados ao ambiente doméstico e muitas vezes apresentam insônia devido à dor. Estão sempre sinalizando seu desconforto intenso nas frequentes visitas ao consultório. Existem várias propostas para o seu tratamento, que é inicialmente feito com uso de agentes hipertônicos, lentes de contato terapêuticas, e posteriormente com tratamentos cirúrgicos como punções estromais, membrana amniótica, ceratectomia lamelar. Tratamentos estes realizados para a melhora da dor enquanto o paciente espera o transplante de córnea, o qual pode demorar em muitos locais em torno de dois anos ou mais. A CB é uma das principais causas de transplante de córnea em diferentes regiões e países^(34,39-46).

Em córneas que apresentam o endotélio afetado por essas doenças, observa-se matriz extracelular alterada, alterações dos componentes da membrana basal, depósitos de fibrinogênio e roturas da membrana de Bowman, com eventual perda de glicosaminoglicanos no estroma ^(34,37).

Uma das principais causas de ceratopatia bolhosa é a distrofia endotelial de Fuchs. Doença bilateral, caracterizada por diminuição progressiva da densidade celular endotelial e conseqüentemente de sua transparência e regularidade. Por sua característica de progressão em três estágios que podem ser bem delimitados, é considerado um protótipo para fins didáticos para as alterações progressivas decorrentes de descompensação endotelial, desde (I) diminuição do número de

células endoteliais - “córnea guttata”, (II) aspecto de endotélio em “metal batido” até (III) o estágio de ceratopatia bolhosa (Figura 4) .⁽⁴⁷⁾

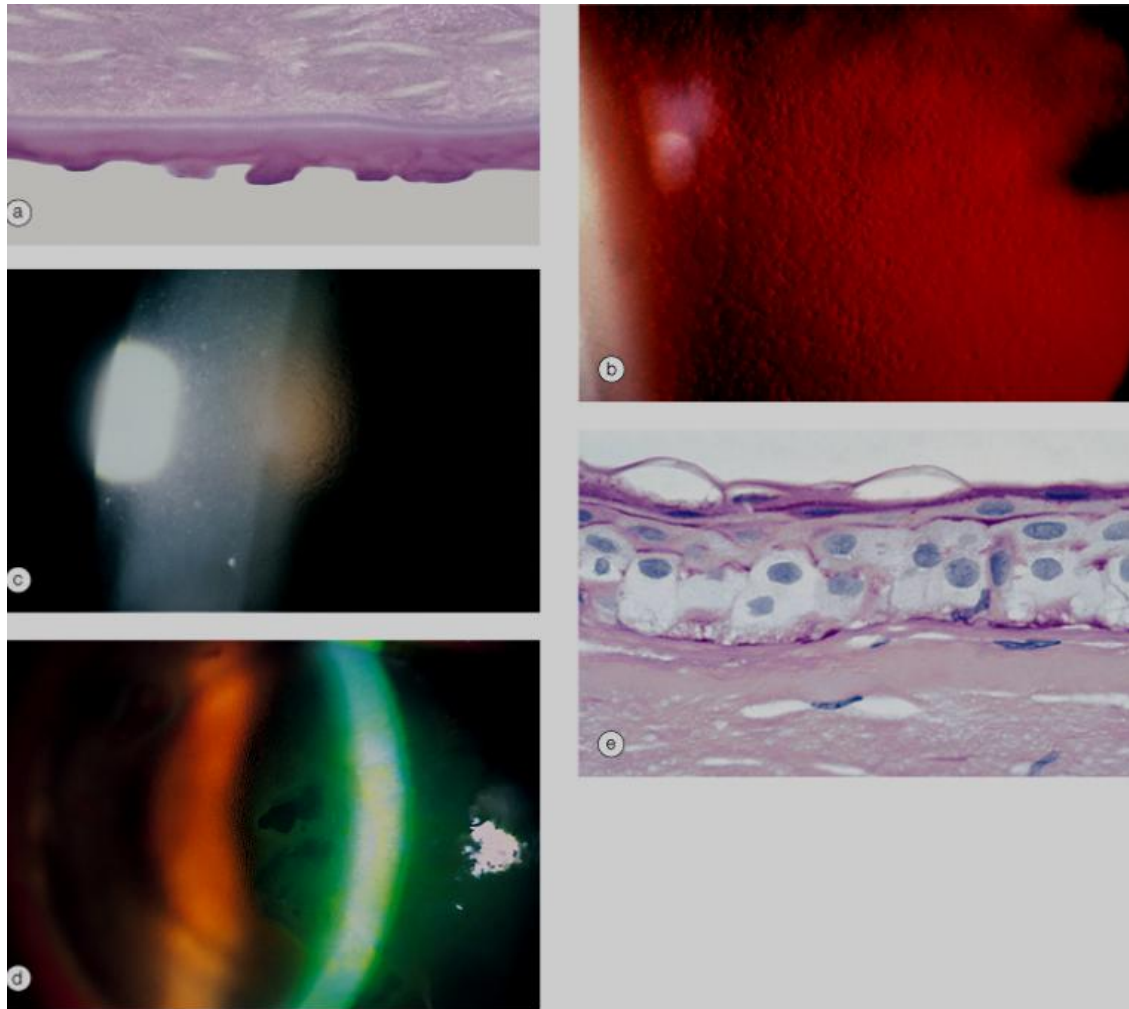


Figura 4 – (a) Histologia de córnea guttata mostrando excrescências irregulares da membrana de descemet; **(b)** córnea guttata vista na reflexão especular; **(c)** endotélio em metal batido; **(d)** ceratopatia bolhosa; **(e)** histologia de ceratopatia bolhosa mostrando grande edema epitelial e bolhas superficiais⁽⁴⁷⁾.

Estudos imunohistoquímicos mostram depósitos de componentes específicos da matriz extracelular, como tenascina-C e fibrilina-1, em pacientes com ceratopatia bolhosa ⁽⁴⁸⁾.



A tenascina-C é uma glicoproteína que possui grande importância na cicatrização. Atua remodelando, reparando e no desenvolvimento ou formação de tecidos. Está normalmente ausente na córnea central, mas é encontrada na camada de colágeno posterior e áreas fibróticas subepiteliais de córneas com ceratopatia bolhosa. Aparece na lágrima de humanos após ceratectomia fototerapêutica (PTK) e em cicatrizes corneanas após muitos anos da incisão e em córneas inflamadas ^(48,49).

A fibrilina-1 pertence à família de proteínas da matriz extracelular associada a microfibrilas elásticas ⁽⁴⁸⁾.

Nas córneas com ceratopatia bolhosa, há uma supra-regulação de fibrilina-1, que está depositada na face endotelial da membrana de Descemet e na camada de colágeno posterior. Também possuem metaloproteinase-2 no local da fibrose subepitelial e acúmulo de células inflamatórias, mas sem a participação de miofibroblastos ⁽⁵⁰⁾.

Estes não são requeridos para fibrose corneal, nem para remodelação e são raros na ceratopatia bolhosa ⁽⁴⁸⁾.

Sabe-se que fatores de crescimento e citocinas influenciam a proliferação e diferenciação celular, inflamação, cicatrização e fibrose. Foram encontrados níveis aumentados de interleucina-8 (IL-8), interleucina-2 (IL-2), fator de crescimento transformador ($\text{TGF-}\beta$), fator de crescimento similar à insulina-1 (IGF-1) e fator medular ósseo-4 (BMP-4) em córneas com ceratopatia bolhosa. O $\text{TGF-}\beta$ promove fibrose e depósitos na matriz extracelular, sem promover proteólise. Embora IGF-1 e $\text{TGF-}\beta$ estejam aumentados na matriz extracelular corneana, eles são mais comumente encontrados nas áreas de fibrose de córneas com ceratopatia bolhosa.



Estas interações entre os fatores de crescimento, matriz extracelular e metaloproteínas degradadoras da matriz são importantes, podendo ser um mecanismo para a perda de transparência corneal encontrada em córneas com ceratopatia bolhosa ^(35,48).

A córnea absorve os raios ultravioletas (UV) que entram no olho, e provavelmente, é susceptível a dano oxigênio-reativo. Apresenta mecanismos de proteção, como a presença da ALDH3, que é uma isoenzima aldeído dehidrogenase que absorve os raios UV e remove aldeídos citotóxicos produzidos pela peroxidação lipídica causada pela radiação UV. A córnea é rica em enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, as quais removem radicais livres e espécies oxigênio-reativas geradas pelo UV ⁽³⁸⁾.

Em córneas com ceratopatia bolhosa foi observada a presença de malondialdeído, que é um bioproduto tóxico da peroxidação lipídica, no epitélio e principalmente em áreas com fibrose subepitelial e camadas posteriores. Em 2/3 das córneas com DEF foi encontrado o bioproduto no epitélio, mas este estava ausente nas camadas corneais posteriores ⁽³⁸⁾.

2.3. Reticulação polimérica (*cross-linking*)

A reticulação polimérica é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por pontes de ligações formando uma rede polimérica tridimensional, processo também conhecido como *cross-linking* (formação de ligações cruzadas) ⁽⁵¹⁻²⁾.



A reticulação pode ser de natureza química, formada por ligações covalentes irreversíveis, ou reticulação física, formada por várias ligações reversíveis (ligações iônicas). De uma maneira geral, com o aumento da reticulação, as estruturas tendem a perder sua fluidez e se tornam mais rígidas. O colágeno é um polímero natural, suas fibras são formadas por fibrilas que por sua vez originam-se de ligações covalentes entre moléculas de tropocolágeno ⁽⁵³⁾.

Sabe-se que o processo de envelhecimento da pele humana está intimamente relacionado à reticulação do colágeno ⁽⁵⁴⁾, principalmente nas áreas mais expostas à luz solar. Um dos primeiros inventores a encontrar utilidade na indução de ligações cruzadas entre polímeros foi Charles Goodyear, que em 1839, ao derramar acidentalmente sobre uma chapa quente, parte da mistura de látex e enxofre que carregava, observou a formação de uma borracha mais resistente, que chamou de vulcanizada. Considerada uma das maiores descobertas acidentais da história, a borracha vulcanizada é produzida a partir da formação de pontes de ligação entre cadeias de poliisopreno (látex) ⁽⁵⁵⁾.

Na medicina, foi proposto no final dos anos 60 o uso do glutaraldeído como agente químico capaz de promover a reticulação do colágeno existente nos tecidos utilizados para confecção de próteses valvulares cardíacas ⁽⁵⁶⁾. Com esse tratamento foi possível retardar a degradação dos tecidos colágenos e prolongar a vida útil das biopróteses. Na oftalmologia, a primeira aplicação foi a de provocar a reticulação do colágeno em biomateriais para utilização em epiceratoplastias sintéticas ⁽⁵⁷⁾. A reticulação fotoquímica de polímeros teve seu primeiro processo patenteado nos Estados Unidos em 1966⁽⁵⁸⁾.

No final da década de 90, foi proposto o uso de luz ultravioleta associada a um agente fotossensibilizante (riboflavina) para indução da reticulação do colágeno corneal (CCL). A técnica demonstrou ser capaz de enrijecer a córnea e apresentou-se como uma opção de tratamento conservador para as ectasias corneais⁽⁵⁹⁾.

2.3.1. *Cross-linking* do colágeno corneal

O *cross-linking* do colágeno corneal induzido por riboflavina e radiação UVA é um método relativamente novo que tem como objetivo aumentar a estabilidade biomecânica da córnea, por meio da indução de ligações cruzadas adicionais entre as fibras de colágeno da córnea ⁽¹¹⁾. A riboflavina é uma substância fotossensível que ao ser irradiada libera radicais livres, aumentando o número de ligações covalentes entre as fibrilas colágenas, promovendo uma maior resistência mecânica na córnea e por sua vez uma menor propensão a alterações de estrutura e curvatura (Figura - 5)⁽¹¹⁾.

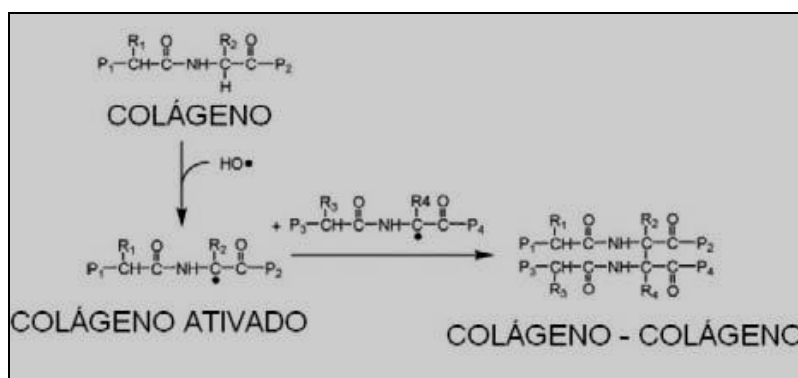


Figura 5: Processo de hidroxilação por radicais livres e ligações covalentes entre fibrilas colágenas⁽¹¹⁾

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 370nm. ⁽¹⁰⁾

2.3.2. Difusão da riboflavina no olho

O tempo do processo de difusão e a concentração da solução de riboflavina aplicada superficialmente são relevantes para a absorção da riboflavina na córnea⁽⁶⁰⁾.

A riboflavina aplicada pode difundir no interior do estroma, e este processo requer certo tempo. O epitélio intacto é uma barreira que retarda a absorção da riboflavina (peso molecular, 376,37g/mol) no interior da córnea. Dessa forma há uma penetração demorada e incompleta. Para 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 estromal ⁽⁶⁰⁾.

O processo de difusão de riboflavina 0,1% no estroma pode teoricamente ser descrito por uma equação linear, assumindo um coeficiente de difusão $D = 6,5 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ ⁽⁶¹⁾. Como substâncias apolares com o mesmo peso molecular têm o mesmo coeficiente de difusão, o conhecido coeficiente de difusão da fluoresceína sódica (peso molecular 376g/mol) foi usado. A concentração de riboflavina pode ser calculada para cada profundidade, pois depende do tempo decorrido (Figura - 6)⁽¹⁰⁾.

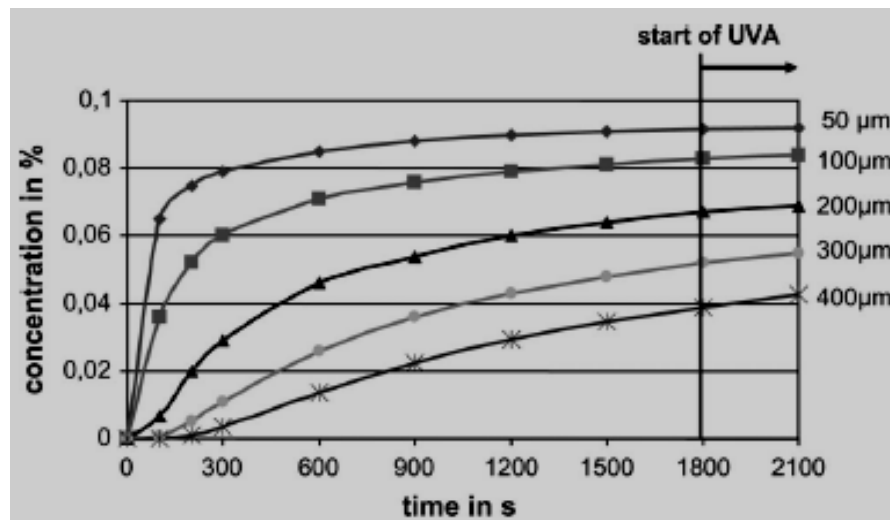


Figura 6: Modelo teórico da dinâmica da difusão da riboflavina no estroma corneal. A partir da difusão constante da fluoresceína no estroma corneal, a concentração local é determinada em função do tempo. Após aproximadamente 30 minutos, concentração de 0,04% é atingida na profundidade estromal de 400 μm⁽¹⁰⁾.

Obviamente a riboflavina necessita de certo tempo até chegar à porção posterior da córnea. A concentração intra-estromal e sua variação em relação à profundidade e tempo é mostrada na Figura 7⁽¹⁰⁾.

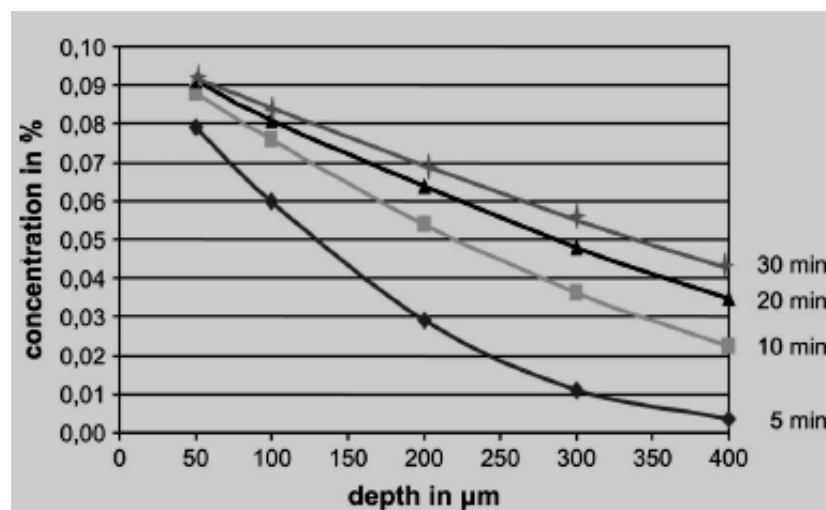


Figura 7: Gradiente de concentração da riboflavina no estroma corneal durante diferentes períodos após a aplicação de riboflavina na superfície. Coeficiente de difusão de $D = 6,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.⁽¹⁰⁾



Depois que a riboflavina atravessa a córnea, penetra na câmara anterior. É desconhecido se o endotélio representa uma barreira à difusão; entretanto, muito provavelmente isso não acontece, pois o endotélio possui junções *gap* que permitem boa penetração da maioria das drogas ⁽⁶²⁾.

Devido à baixa concentração de riboflavina o seu efeito protetor na câmara anterior não é significativo. A coloração amarela na câmara anterior serve mais como um recurso de segurança, indicando que a riboflavina penetrou na córnea e que o estroma está completamente saturado⁽¹⁰⁾.

2.3.3. Indução de cross-linking corneal no tratamento da descompensação endotelial

Durante alguns experimentos iniciais em animais, emergiu a idéia de que a indução de novas ligações entre as fibras de colágeno do estroma por meio do *cross-linking* poderia ser uma opção para a redução da tendência de influxo de líquido para o estroma e conseqüentemente reduzir o edema e a espessura corneal, incrementando a transparência óptica por diminuir a distância entre as fibrilas de colágeno ⁽³³⁾.

Em estudo preliminar foi demonstrado significância estatística na redução da sintomatologia dolorosa na primeira semana após a realização do tratamento, com manutenção desta redução para o período de seguimento de três meses após o tratamento⁽¹³⁾.



Em outra série de casos três pacientes com ceratopatia bolhosa sintomática foram submetidos ao tratamento com indução de *cross-linking corneal* e obtiveram melhora dos sintomas no período de seguimento de 8 meses⁽⁶³⁾.

Métodos



3.1 Local de estudo

O estudo foi realizado na Fundação Altino Ventura e no Hospital de olhos de Pernambuco, no período de março de 2008 a dezembro de 2009.

3.2 Tipo de estudo

Realizou-se estudo prospectivo, de intervenção, longitudinal e analítico.

3.3 Seleção

3.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo 12 portadores de CB sintomáticos por um período igual ou maior que 12 meses, resistente ao tratamento clínico conservador, que não possuíam indicação para transplante penetrante de córnea, ou estivessem na fila de espera para a realização do transplante.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos todos os pacientes que possuíam espessura central da córnea menor que 400 μ m; antecedente de herpes ocular ou ao redor dos olhos; portador de outras doenças ou cicatrizes corneais; antecedente de displasia corneal; lesões tumorais conjuntivais; período de gravidez ou amamentação; antecedente de má cicatrização corneal e alergia à riboflavina.



3.4 Procedimentos

3.4.1 Procedimentos técnicos

3.4.1.1 Exame oftalmológico

Os pacientes foram avaliados, previamente ao tratamento, 7, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento, com questionário estruturado, avaliando sintomatologia dolorosa através da escala visual analógica numérica (EVA)⁽⁶⁴⁾ (Anexo 1.) Além do questionário, foi realizada avaliação oftalmológica completa, que incluiu: acuidade visual de alto contraste não-corrigida (AVL), utilizando a tabela *ETDRS*TM (Lighthouse Inc., Nova Iorque, EUA); biomicroscopia detalhada, na qual foi observada a superfície da córnea com e sem instilação de fluoresceína, vascularização superficial e profunda; representação gráfica detalhada do quadro; paquimetria ultra-sônica (paquímetro Ultrasonic Pachometer Model 850, Humphrey instruments, Inc).

3.4.1.2 Cross-linking do colágeno corneal

Abrasão do epitélio da córnea medindo 9 mm de diâmetro foi realizada com lâmina de bisturi número 11 (Figura - 8), gotas da solução de riboflavina 0,1% foram instiladas a cada 5 minutos intercaladas com colírio anestésico, em um período de 30 minutos antes do procedimento e durante a aplicação da radiação. A córnea foi exposta à luz UVA com comprimento de onda de $370 \pm 5\text{nm}$ e uma irradiância de 3mW/cm^2 por um período total de 30 minutos, correspondendo a uma dose total de

3,4J ou a uma exposição de radiação de 5,4J/cm² de córnea (Figura - 9). Foi utilizado para esta exposição o aparelho *X-Link, Corneal Crosslink System*, Opto Global Pty Ltd. Ao final, colocada uma lente de contato terapêutica e prescrito colírio antibiótico (ofloxacino 0,3%) até recuperação epitelial.



Figura 8: Abrasão do epitélio da córnea



Figura 9: Exposição à luz UVA

3.4.2 Procedimentos analíticos

Para a avaliação da evolução das medidas EVA, AVL e espessura central da córnea nos períodos pré, 7, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento, foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman⁽⁶⁵⁾, que é aplicado no caso de medidas pareadas com mais de dois períodos de avaliação. No caso onde houve significância estatística, foi aplicado o teste de comparações múltiplas com a finalidade de determinar onde se encontra a diferença estatística. Optou-se por utilizar metodologia não paramétrica devido ao número pequeno de observações.



Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05. O software utilizado na execução dos cálculos estatísticos foi o SPSS versão 12.0.

3.4.3 Procedimentos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Altino Ventura (Anexo 2). 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 3).

Resultados

Dos 12 pacientes incluídos no estudo, seis (50,0%) eram do sexo masculino e seis (50,0%) do feminino. A idade média foi de 66 anos ($\pm 11,4$ anos). As causas de ceratopatia bolhosa foram: pós-facectomia (cinco pacientes), trauma (dois pacientes), falência secundária de transplante de córnea (um paciente), falência secundária de transplante de córnea em olho pseudofácico (dois pacientes), distrofia endotelial de Fuchs (dois pacientes).

Nenhum caso de infecção corneal ou inflamação intra-ocular foi relatado. Uma paciente apresentou retardo no tempo de reepitelização (15 dias).

Dois pacientes submeteram-se ao transplante de córnea (8 e 11 meses após o procedimento), dessa maneira, fica prejudicada a mensuração e análise dos dados destes pacientes para o período de um ano.

A sintomatologia dolorosa foi avaliada através da escala visual analógica numérica (EVA), na qual zero significa ausência total de dor e 10 o nível de dor máxima suportável pelo paciente – Tabela 1.

Tabela 1: Resultado da análise da evolução da EVA no período de avaliação.

	n	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
EVA pré	12	8,58	9,00	1,51	7	10
EVA 7 dias	12	3,75	2,00	3,14	0	10
EVA 30 dias	12	4,50	4,00	3,18	1	10
EVA 60 dias	12	4,25	3,50	2,99	1	10
EVA 6 meses	12	5,08	6,00	3,34	0	10
EVA 1 ano	10	5,10	5,50	3,48	1	10

p-valor =0,01



Tabela 2: Resultado das comparações múltiplas para EVA

Comparações - EVA	p-valor
Pré x 7 dias	0,007*
Pré x 30 dias	0,008*
Pré x 60 dias	0,005*
Pré x 6 Meses	0,011*
Pré x 1 ano	0,034*
7 dias x 30 dias	0,262
7 dias x 60 dias	0,629
7 dias x 6 meses	0,235
7 dias x 1 ano	0,246
30 dias x 60 dias	0,332
30 dias x 6 meses	0,512
30 dias x 1 ano	0,832
60 dias x 6 meses	0,321
60 dias x 1 ano	0,608
6 meses x 1 ano	0,893

* estatisticamente significante

Existe redução significativa ($p < 0,05$) dos valores da EVA do período pré em relação aos momentos pós tratamento, já verificando melhora após 7 dias. Depois do tratamento não existiu diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$) entre os momentos avaliados (7, 30, 60, 180 e 365 dias) – Tabela 2. Esses resultados podem ser observados no gráfico 1.

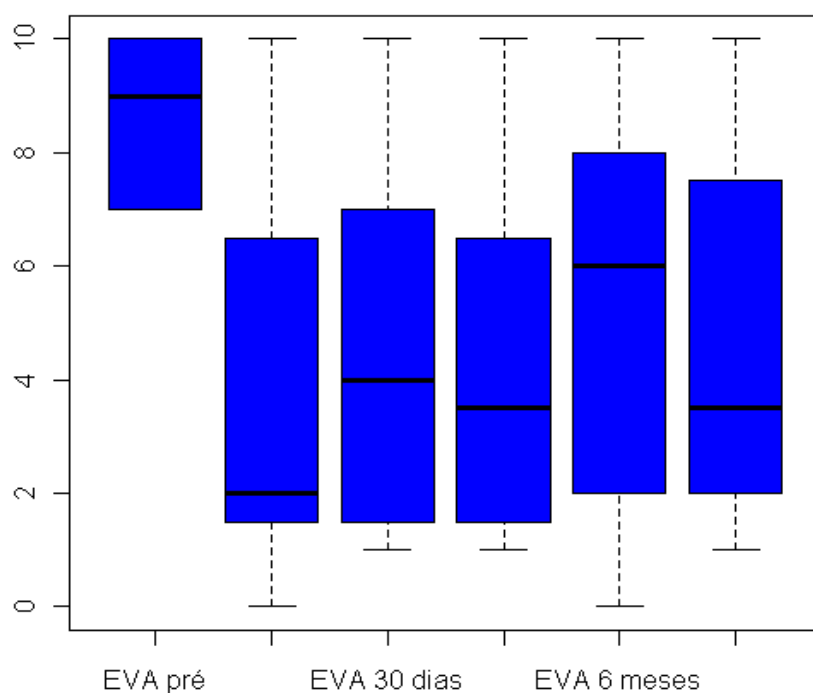


Gráfico 1: Box-Plot dos valores da Escala Visual Analógica Numérica - EVA para os períodos pré, 7, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento.

Analisando a espessura central da córnea através da paquimetria, houve tendência para a diminuição da espessura corneal central - Gráfico 2, entretanto, pode-se afirmar que não existe uma diferença estatisticamente significativa dos valores entre os períodos pré, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento ($p>0,05$) - Tabela 3.

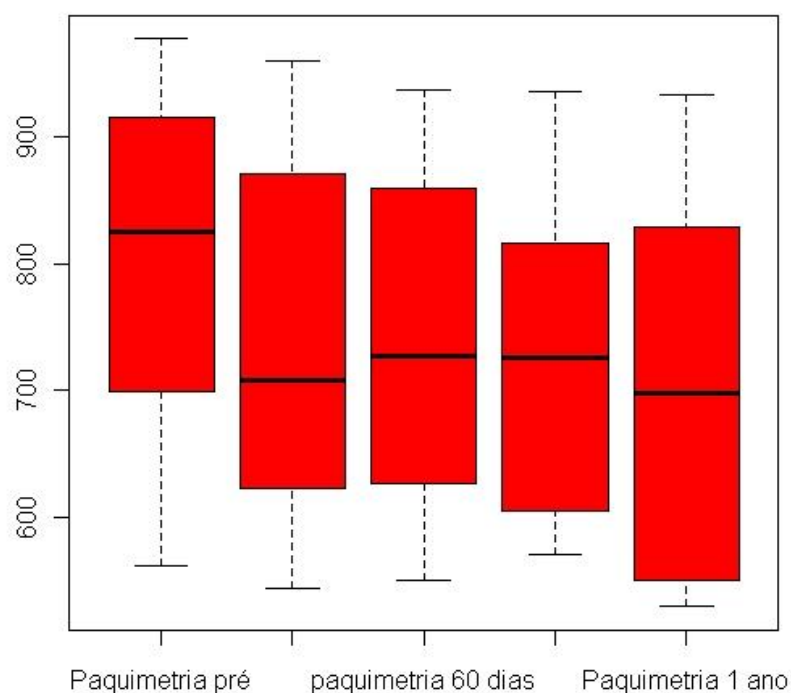


Gráfico 2: Box-Plot dos valores da espessura central da córnea medida pela paquimetria para os períodos pré, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento

Tabela 3: Resultado da análise da evolução da espessura central corneal no período de avaliação.

	n	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Paquimetria Pré	12	803,00	826,00	137,97	561	978
Paquimetria 30 dias	12	735,50	708,50	149,15	544	960
Paquimetria 60 dias	12	737,75	727,50	133,56	550	938
Paquimetria 6 meses	12	728,25	726,00	124,88	570	936
Paquimetria 1 ano	10	734,30	785,0	152,42	529	934

p-valor = 0,500

Pode-se afirmar que para a amostra não existe diferença estatisticamente significativa dos valores da acuidade visual de alto contraste não corrigida (AVL) no período estudado. ($p > 0,05$) – Tabela 4 e gráfico 3 .

Tabela 4: Resultado da análise da evolução da acuidade visual (AVL) no período de avaliação.

	n	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
AVL Pré	12	0,022	0,010	0,037	0,00	0,13
AVL 7 dias	12	0,024	0,010	0,036	0,00	0,10
AVL 30 dias	12	0,024	0,015	0,036	0,00	0,13
AVL 60 dias	12	0,024	0,015	0,036	0,00	0,13
AVL 6 meses	12	0,020	0,010	0,036	0,00	0,13
AVL 1 ano	10	0,006	0,006	0,007	0,00	0,02

p-valor = 0,087

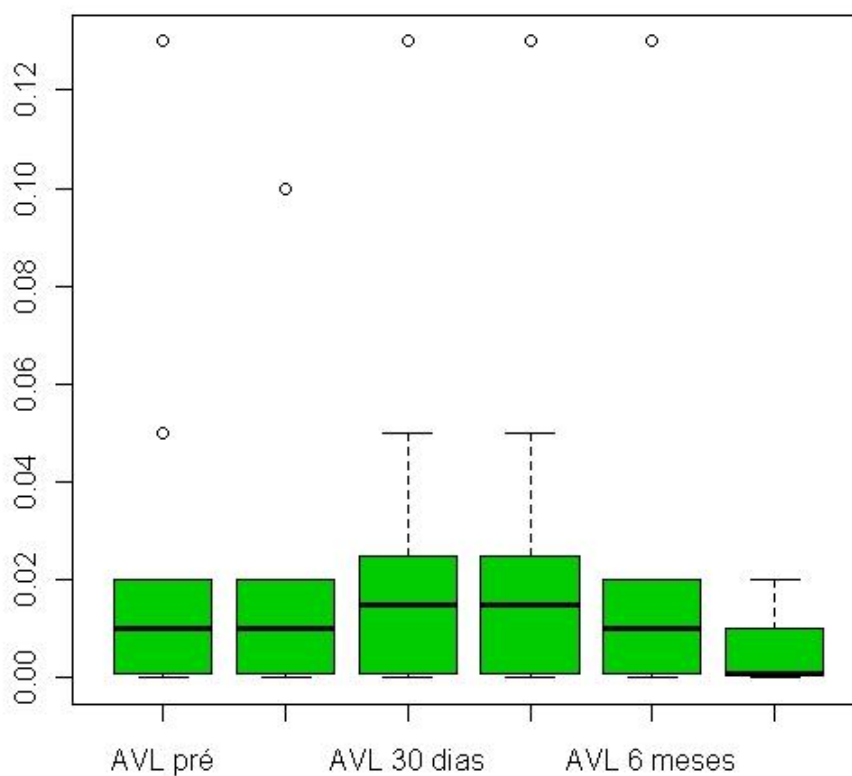


Gráfico 3: Box-Plot dos valores da Acuidade Visual (AVL) para os períodos pré, 7, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento.

Discussão



A ceratopatia bolhosa é causada pela falha da capacidade do endotélio corneal em manter o estado fisiológico de desidratação e transparência da córnea⁽¹⁶⁾. Devido à estrutura mecânica das fibras da córnea, uma quebra na integridade da barreira epitelial resulta em modesto aumento da espessura corneal: valores acima de 0,6mm são raros. Em contrapartida, descompensação endotelial é seguida de abundante hidratação estromal, com espessura entre 0,8-1,0mm ⁽⁶⁶⁾. O edema estromal e a ruptura de bolhas epiteliais e sub-epiteliais irritam as terminações nervosas da córnea, produzindo dor e desconforto na superfície ocular ⁽⁶⁷⁾.

A utilização do *cross-linking* do colágeno corneal estava limitada ao tratamento de ectasias da córnea, particularmente do ceratocone^(10, 12, 67). Estudo experimental aventou a possibilidade de utilização desta terapêutica para a ceratopatia bolhosa ⁽⁶⁸⁾. Em virtude dos bons resultados nos pacientes com ceratocone e o baixo índice de complicações atribuídas à técnica cirúrgica, foi realizado estudo pioneiro em seres humanos, publicado com resultados preliminares pelo autor e que deu origem a esta dissertação (Anexo 4 e 5)⁽¹³⁾.

Todos os pacientes do estudo apresentavam dor de importante intensidade antes da aplicação de UVA/riboflavina, com média na escala visual analógica numérica de $8,58 \pm 1,51$. Após a realização do procedimento observou-se considerável redução da dor já na primeira semana, com manutenção estatisticamente significativa em todo o período de seguimento.

O tratamento afeta a inervação da córnea. A desepitelização mecânica remove as fibras nervosas intra-epiteliais e causa dano às fibras sub-epiteliais. O



efeito sinérgico entre abrasão mecânica e exposição à UVA/riboflavina (induzindo foto-necrose e apoptose) promovem perda de fibras nervosas estromais anteriores e sub-epiteliais⁽⁶⁷⁾. A combinação desses efeitos com o aumento da rigidez corneal induzido pelo *cross-linking* são provavelmente responsáveis pela melhora da dor nos pacientes da amostra.

Utilizou-se, para a análise estatística o teste não paramétrico de Friedman, adequado para o caso de medidas pareadas com mais de dois períodos de avaliação. A utilização de metodologia não paramétrica deveu-se ao fato de existir um número pequeno de observações. Uma implicação desta metodologia é a baixa capacidade de generalização das conclusões obtidas para esse conjunto de mensurações.

O epitélio intacto é uma barreira que retarda a absorção da riboflavina no interior da córnea. Dessa forma há necessidade da realização do debridamento do epitélio na área de intenção do tratamento para que haja saturação estromal adequada ⁽⁶⁰⁾. A realização desta abrasão pode ser considerada uma limitação da técnica, uma vez que a perda da integridade tecidual pode precipitar aparecimento de infecção corneal secundária, além de gerar desconforto durante o período de cicatrização.

A desepitelização mecânica e instilação de gotas da solução de riboflavina continuam a ser o padrão ouro para a realização do *cross-linking*, entretanto para minimizar esta condição adversa, estudos têm demonstrado viabilidade na aplicação intra-estromal da solução de riboflavina, por meio de confecção de lamela de tecido corneal utilizando *laser* de femtosegundo e injeção direta da solução no estroma ⁽⁶⁹⁾.



Em relação à análise da paquimetria não foi observada alteração estatisticamente significativa na espessura corneal no período estudado, porém houve tendência para diminuição da espessura nos períodos pós-tratamento quando comparados com o período prévio, com redução de cerca de 9% no valor de espessura da córnea ao final do período de seguimento. Estudo experimental realizado em olhos de porcos demonstrou decréscimo maior que 10% na espessura da córnea com a realização do *cross-linking* do colágeno corneal⁽⁶⁸⁾. Este fato pode ser explicado pelas mudanças arquitetônicas nas fibrilas de colágeno geradas pela exposição à UVA/riboflavina, que aumenta as pontes entre fibrilas, diminui os espaços vazios entre o colágeno e torna mais difícil o influxo de líquido no estroma.

Outra possibilidade seria de que as diferenças entre as séries resultassem apenas de bases de tamanho amostral. O aumento do número de indivíduos da amostra poderia ser um fator decisivo para a confirmação estatística da tendência clínica de redução do edema corneal.

A melhora da acuidade visual nos pacientes com CB está intimamente relacionada à redução do edema e aumento da transparência corneal. De fato, houve tendência para redução de edema e diminuição da espessura da córnea. Porém, o fato de os pacientes serem sintomáticos com mais de um ano de evolução e possuírem córneas inicialmente bastante edemaciadas (espessura média prévia de 803 μm) justifica que não tenha ocorrido melhora da AVL e incremento nas linhas de visão desses pacientes. Possivelmente a córnea dos pacientes apresentava supra-regulação de glicoproteínas, proteínas da matriz extracelular, acúmulo de células inflamatórias e ação de citocinas com proliferação de fibroblastos, neovascularização,



remodelamento e fibrose estromal. Apesar da redução do edema, o processo cicatricial isoladamente é fator determinante para a opacidade da córnea e baixa acuidade visual⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

Com base no que foi exposto é possível sugerir que a promoção de *cross-linking* do colágeno corneal em indivíduos com espessura central da córnea compatível com ceratopatia bolhosa em estágio inicial e melhor prognóstico visual, pode obter resultados ainda mais satisfatórios, na medida em que pode retardar a evolução para fases mais avançadas da doença, estabilizar por mais tempo transparência corneal e manter níveis satisfatórios de acuidade visual. A realização de estudos longitudinais com tal abordagem é factível para comprovar essa tendência teórica e pode inaugurar uma nova era no tratamento da ceratopatia bolhosa a partir da instituição de intervenção precoce como forma de inibir progressão da doença.

Outros tratamentos utilizados para CB como punção de estroma anterior, recobrimento conjuntival e transplante de membrana amniótica podem ocasionar decréscimo da acuidade visual. A punção do estroma anterior tem como objetivo provocar cicatrização e fibrose de tal intensidade que iniba o influxo de líquido no interior do estroma ⁽⁴⁾. A fibrose invariavelmente causa opacidade e redução da AVL. Recobrimento conjuntival e transplante de membrana amniótica baseiam-se no recobrimento do epitélio da córnea para o tratamento dos defeitos epiteliais recorrentes ^(2,3). A anteposição de conjuntiva ou membrana amniótica na superfície da córnea adiciona anteparo à propagação dos raios luminosos o que gera diminuição da percepção luminosa e baixa AVL. A lente de contato terapêutica



mostra-se eficaz para o tratamento da irregularidade epitelial e possui a vantagem de não minimizar o potencial visual, porém, além da necessidade de trocas freqüentes, está associada ao aumento da vascularização e do risco de infecção quando utilizada por tempo prolongado⁽²⁾.

Em relação às possíveis complicações decorrentes da técnica utilizada um paciente apresentou retardo no tempo de reepitelização corneal. Neste caso havia grande irregularidade epitelial prévia ao tratamento o que pode explicar a maior dificuldade de cicatrização. Apesar do retardo, a recuperação do epitélio foi completa no 15º dia pós-operatório. Nos demais pacientes nenhum efeito adverso relacionado ao procedimento ou ao período de recuperação foram relatados.

Conclusão



A análise dos resultados permite concluir que a indução de *cross-linking* corneal através da aplicação de UVA/riboflavina mostrou-se eficaz no controle da sintomatologia dolorosa da ceratopatia bolhosa, apresentando ainda manutenção da espessura corneal e da acuidade visual no período estudado.

Referências



1. Georgiadis NS, Ziakas NG, Boboridis KG, Terzidou C, Mikropoulos DG. Cryopreserved amniotic membrane transplantation for the management of symptomatic bullous keratopathy. *Clin Exp Ophthalmol*. 2008;36(2):130-5.
2. Haraguchi DKM, Gomes JAP, Sato EH, Novo NF, Freitas D. Uso de transplante de membrana amniótica no tratamento da ceratopatia bolhosa. *Arq Bras Oftalmol*. 2003;66(2):121-4.
3. Castellano AGD, Bardal AMC, Lago C, Moreira LB, Moreira H. Transplante de membrana amniótica na ceratopatia bolhosa. *Arq Bras Oftalmol*. 2004;67(6):855-8.
4. Cormier G, Brunette I, Boisjoly HM, LeFrançois M, Shi ZH, Guertin MC. Anterior stromal punctures for bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol*. 1996;114(6):654-8.
5. Foulks GN. Treatment of recurrent corneal erosion and corneal edema with topical osmotic colloidal solution. *Ophthalmology*. 1981;88(8):801-3.
6. Luxenberg MN, Green K. Reduction of corneal edema with topical hypertonic agents. *Am J Ophthalmol*. 1971;72(4):847-53.
7. Plotnik RD, Mannis MJ, Schwab IR. Therapeutic contact lenses. *Int Ophthalmol Clin*. 1991;31(2):35-52.
8. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97-103.
9. Spoerl E, Seiler T. Techniques for stiffening the cornea. *J Refract Surg*. 1999;15(6):711-3.
10. 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.



11. Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea*. 2008;27(3):353-6.
12. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(5):620-7.
13. Gadelha DNB, Cavalcanti BM, Bravo Filho V, Andrade Júnior N, Batista NNC, Escarião ACSL, Urbano RV. Efeito terapêutico do "cross-linking" corneano na ceratopatia bolhosa sintomática. *Arq Bras Oftalmol*. 2009;72(4):462-6.
14. Price NC, Cheng H. Contact and non-contact specular microscopy. *Br J Ophthalmol*. 1981;65(8):568-74.
15. Doughty MJ. Concerning the symmetry of the "hexagonal" cells of the corneum endothelium. *Exp Eye Res*. 1992;55(1):145-54.
16. Nishida T. Cornea. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. London: Elsevier Mosby; 2005.p. 261-281.
17. Quantock AJ, Young RD. Development of the corneal stroma, and the collagen-proteoglycan associations that help define its structure and function. *Dev Dyn*. 2008;237(10):2607-21.
18. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the proctor lecture. *Invest Ophthalmol. Vis Sci*. 2006;47(5):1754-67.
19. BenEzra D, Foidart JM. Collagens and non collagenous proteins in the human eye. I. Corneal stroma in vivo and keratocyte production in vitro. *Curr Eye Res*. 1981;1(2):101-10.



20. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, Jones JC, Kenney MC, Koch M, Ninomiya Y, Patton BL, Paulsson M, Sado Y, Sage EH, Sasaki T, Sorokin LM, Steiner-Champlaud MF, Sun TT, Sundarraj N, Timpl R, Virtanen I, Ljubimov AV. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(11):4989-99.
21. Sundarraj N, Willson J. Monoclonal antibody to human basement membrane collagen type IV. *Immunology*. 1982;47(1):133-40.
22. Ihanamaki T, Pelliniemi LJ, Vuorio E. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(4):403-34.
23. Boote C, Dennis S, Meek K. Spatial mapping of collagen fibril organisation in primate cornea-an X-ray diffraction investigation. *J Struct Biol*. 2004;146(3):359-67.
24. Muller LJ, Pels E, Schurmans LR, Vrensen GF. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):493-501.
25. Borcharding MS, Blacik LJ, Sittig RA, Bizzell JW, Breen M, Weinstein HG. Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. *Exp Eye Res*. 1975;21(1):59-70.
26. Jalbert I, Stapleton F. The corneal stroma during contact lenswear. *Cont Lens Anterior Eye*. 2005;28:3-12.
27. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*. 1957;136:263-86.



28. Goldman JN, Benedek GB. The relationship between morphology and transparency in the nonswelling corneal stroma of the shark. *Invest Ophthalmol.* 1967;6:574-600.
29. Jester JV, Budge A, Fisher S, Huang J. Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro lightscattering, *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2369-78.
30. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavangh HD, Petroll WM, Piatigorsky J. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci.* 1999;112:613-22.
31. Estey T, Cantore M, Weston PA, Carpenter JF, Petrash JM, Vasiliou V. Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystallin ALDH3A1. *J Biol Chem.* 2007;282:4382-92.
32. Putz C. Oftalmologia: Ciências básicas. In: Putz C. Rio de Janeiro: Cultura médica; 2001.p. 124-126.
33. Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol.* 2008;86(5):549-51.
34. 1. Ljubimov AV, Atilano SR, Garner MH, Maguen E, Nesburn AB, Kenney MC. Extracellular matrix and Na⁺, K⁺-ATPase in human corneas following cataract surgery: comparison with bullous keratopathy and Fuchs' dystrophy corneas. *Cornea.* 2002;21(1):74-80.
35. Spirin KS, Ljubimov AV, Castellon R, Wiedoeft O, Marano M, Sheppard D et al. Analysis of gene expression in human bullous keratopathy corneas containing limiting amounts of RNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(13):3108-15.



36. Gomes JA, Haraguchi DZ, Zambrano DU, Villavicencio LI, Cunha MC, de Freitas D. Punções do estroma anterior no tratamento da ceratopatia bolhosa. *Arq Bras Oftalmol.* 2000;63(2):133-7.
37. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P, Puangsricharern V, Maskin SL, Kim JC et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol.* 1999;117(10):1291-7.
38. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(3):341-51.
39. Uchino Y, Goto E, Takano Y, Dogru M, Shinozaki N, Shimmura S et al. Long-standing bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency. *Ophthalmology.* 2006;113(7):1098-101.
40. Nguyen NX, Langenbucher A, Seitz B, Kuchle M, Naumann GO. Impact of increased intraocular pressure on long-term corneal endothelial cell density after penetrating keratoplasty. *Ophthalmologica.* 2002;216(1):40-4.
41. Cosar CB, Sridhar MS, Cohen EJ, Held EL, Alvim Pde T, Rapuano CJ et al. Indications for penetrating keratoplasty and associated procedures, 1996-2000. *Cornea.* 2002;21(2):148-51.
42. Mkanganwi N, Nondo SI, Guramatunhu S. Indications for corneal grafting in Zimbabwe. *Cent Afr J Med.* 2000;46(11):300-2.
43. Maeno A, Naor J, Lee HM, Hunter WS, Rootman DS. Three decades of corneal transplantation: indications and patient characteristics. *Cornea.* 2000;19(1):7-11.



44. Dobbins KR, Price FW Jr, Whitson WE. Trends in the indications for penetrating keratoplasty in the midwestern United States. *Cornea*. 2000;19(6):813-6.
45. Calix Netto MJ, Giustina ED, Ramos GZ, Peccini RF, Sobrinho M, de Souza LB. Principais indicações de transplante penetrante de córnea em um serviço de referência no interior de São Paulo (Sorocaba-SP, Brasil). *Arq Bras Oftalmol*. 2006;69(5):661-4.
46. Chen WL, Hu FR, Wang IJ. Changing indications for penetrating keratoplasty in Taiwan from 1987 to 1999. *Cornea*. 2001;20(2):141-4.
47. Kanski JK. *Clinical ophthalmology*. 6 ed. London: Elsevier Mosby; 2009. p. 250-252.
48. Maseruka H, Ataullah SM, Zardi L, Tullo AB, Ridgway AE, Bonshek RE. Tenascin-cytotactin (TN-C) variants in pseudophakic/aphakic bullous keratopathy corneas. *Eye*. 1998;12(Pt 4):729-34.
49. Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ et al. Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Exp Eye Res*. 2001;73(2):179-89.
50. Akhtar S, Bron AJ, Hawksworth NR, Bonshek RE, Meek KM. Ultrastructural morphology and expression of proteoglycans, betaig-h3, tenascin-C, fibrillin-1, and fibronectin in bullous keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(6):720-31.
51. Mano EB, Mendes LC. *Introdução a polímeros*. 2a ed. São Paulo: Blücher; 1999.
52. Andrade CT, Coutinho FMB, Dias ML, Lucas EF, Oliveira CMF, Tabak D. *Dicionário de polímeros*. Rio de Janeiro: Interciência; 2001.



53. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med*. 1979;301(1):13-23.
54. Yamauchi M, Woodley DT, Mechanic GL. Aging and crosslinking of skin collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;152(2):898-903.
55. Costa HM, Visconte LLY, Nunes RCR, Furtado CRG. Aspectos históricos da vulcanização. *Polímeros*. 2003; 13(2):125-9.
56. Carpentier A. From valvular xenograft to valvular bioprosthesis (1965-1977). *Med Instrum*. 1977;11(2):98-101.
57. Harner CH, McCarey BE, Rao PR, Chow AA. In vivo evaluation of biomaterials for synthetic epikeratoplasty [abstract]. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1996;37: S68.
58. Leopold LU, Jan CA, Albert DG, inventors. Photochemical cross-linking of polymers [Internet]. United States patent US 3278305. 1966. Available from: www.freepatentsonline.com/3278305.html
59. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97-103.
60. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J PharmSci*. 1998;87:1479-88.
61. Spoerl E, Matthaus W, Koza KD, et al. Calculation of non-stationary temperature fields in tissue in the application of cryotherapy—a contribution to therapy planning. *Int J Refrig*. 1991;14:368-71.
62. Forrester JV, Dick AD, McMenemy P, et al. *The Eye*. London: WB Saunders; 1996.



63. Wollensack G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham DT. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res.* 2009;41(2):114-7.
64. Carvalho DS, Kowacs PA. Avaliação da intensidade de dor. *Rev Migrêneas Cefaléias.* 2006;9(4):164-8.
65. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics.* 2 ed. New York: John Wiley & Sons; 1980.
66. Krachmer JH, Mannis JM, Holland EJ, editors. *Cornea: fundamentals diagnosis and management.* 2 ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2006.
67. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Sergio P, Caporossi T, Caporossi A. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-uva-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation. *Eur J Ophthalmol.* 2006;16(4):530-5.
68. Wollensack G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(3):516-21.
69. Krueger RR, Ramos-Esteban JC, Kanellopoulos AJ. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case. *J Cataract Refract Surg.* 2008;24(7):S730-6.

Anexos



Anexo 1

Protocolo da Pesquisa

Efeito terapêutico do cross-linking corneal em portadores de ceratopatia bolhosa sintomática.

Data: paciente n°

Nome:

Data de nascimento: idade:

Sexo 1 masculino 2 feminino

Raça 1 branca 2 negra 3 parda 4 amarela

Procedência:

Endereço:

Telefones:

História:

Antecedentes pessoais

1 Hipertensão arterial 2 Diabetes 3 Neoplasias 4 Reumáticos 5 Alérgicos

6 Outros Qual?

Medicação sistêmica:

Antecedentes Oftalmológicos

1 Catarata 2 Glaucoma 3 Ceratopatia 4 Retinopatia 5 Cirurgias prévias

6 Outros Qual?

Medicação Tópica:

Antecedentes familiares

EXAME OFTALMOLÓGICO

Olho acometido 1 OD 2 OE

Acuidade visual: OD:

OE:

Refração:

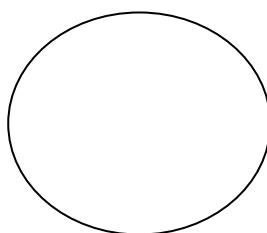
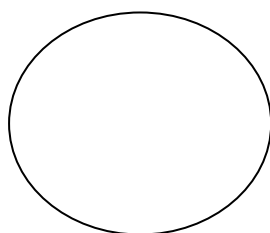
OD

AV

OE

AV

Biomicroscopia



Edema (grau de opacificação da Córnea)

0 - Dificuldade de observação da íris



1 (discreto) – Borramento dos detalhes da íris

2 (moderado) – Dificuldade de definir detalhes da íris

3 (severa) – Impossibilidade de observar a íris

Tonometria: OD OE

Paquimetria Ultra-sônica central: OD OE

Pré:

7° PO

30° PO

60° PO

180° PO

365° PO

AVALIAÇÃO DA DOR

Período:

() Pré-op () 7° PO () 30° PO () 60° PO () 180° PO () 365° PO

1. Assinale de 0 a 10, a intensidade da dor que você sentiu no último mês.

Na qual: 1 = dor mínima

10 = dor insuportável

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----



Anexo 2



Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Altino Ventura

Recife, 12 setembro de 2008.

CARTA DE APROVAÇÃO N.º 004/08

REGISTRO CEP-FAV N.º 035/08

Ilmo. Dr.

Diego Nery Benevides Gadelha (Pesquisador)

Instituição: Fundação Altino Ventura

Disciplina/Departamento: Oftalmologia

Ref.: Projeto de Pesquisa

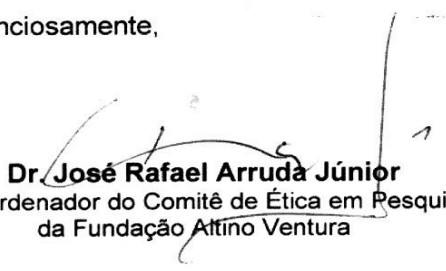
Tema: **Efeito terapêutico do cross-linking coreano na ceratopatia bolhosa sintomática.**

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.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em: 60 dias

Atenciosamente,


Dr. José Rafael Arruda Júnior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
da Fundação Altino Ventura


20/09/08.



Anexo 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocolo

Paciente n.º _____

Iniciais do paciente: _____

Título do Estudo: EFEITO TERAPÊUTICO DO CROSS-LINKING CORNEAL EM PORTADORES DE CERATOPATIA BOLHOSA SINTOMÁTICA

Centro de Estudo: Fundação Altino Ventura e Hospital de Olhos de Pernambuco.

1. Explicação do estudo:

A ceratopatia Bolhosa é uma condição ocular causada pela incapacidade do endotélio da córnea em manter seu estado de desidratação e transparência. Ocorre acúmulo de líquido (edema) no interior da córnea que leva à formação de bolhas epiteliais (superficiais) que ao eclodirem expõem terminações nervosas e geram dor, fotofobia e lacrimejamento. O *cross-linking* do colágeno corneal com a riboflavina (vitamina B2) é uma técnica inovadora com o objetivo de enrijecer o tecido da córnea. A luz ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina cria novas ligações entre as moléculas de colágenos adjacentes, produzindo aumento da espessura da córnea bem como diminuindo sua maleabilidade. Esta reestruturação das fibras de colágeno ocasiona aumento da força biomecânica da córnea. Este estudo tem por finalidade Avaliar o efeito terapêutico do *cross-linking* corneal induzido por UVA/Riboflavina em portadores de ceratopatia bolhosa, investigando a viabilidade deste tratamento e sua influência na acuidade visual, espessura corneal e sintomatologia dolorosa. A aplicação do *cross-linking* em portadores de ceratopatia bolhosa é uma alternativa paliativa para a diminuição da dor nos pacientes com essa enfermidade. Não é objetivo desse estudo restaurar a visão dos pacientes, apenas tentar aliviar os sintomas (dor, fotofobia e lacrimejamento) ocasionados pela ceratopatia bolhosa.

2. Participação no Estudo:

Sua participação consistirá em permitir realização de avaliação previamente ao tratamento, 7, 30, 60, 180 e 365 dias após o tratamento, com questionário estruturado, avaliando sintomatologia e dor. Além do questionário, será realizada avaliação oftalmológica completa, que incluirá: acuidade visual de alto contraste não-corrigida, biomicroscopia e paquimetria ultra-sônica, indolor, que não emite nenhum tipo de radiação e não provoca nenhum mal estar. Submeter-se ao tratamento com o *cross-linking* induzido por radiação UVA e riboflavina. Após aplicação de colírio anestésico



será realizado abrasão do epitélio da córnea com lâmina de bisturi número 11, gotas da solução de riboflavina 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. A córnea será exposta à luz UVA por um período total de 30 minutos. Ao final, colocada uma lente de contato terapêutica e prescrito colírio antibiótico (ofloxacino 0,3%) até recuperação epitelial. A abrasão do epitélio apesar de ser realizada com anestesia tópica pode ocasionar desconforto ocular e mesmo dor. Apesar de raro há o risco de infecção ocular (úlceras de córnea), evolução para endoftalmite (infecção no interior do olho) e perda da visão em casos extremos. 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 o de aliviar a dor ocasionado pela ceratopatia bolhosa, propiciando o desenvolvimento de uma alternativa para o tratamento dos sintomas originados pela doença.

Você não terá custo algum para a realização dos exames, bem como para a realização do procedimento do *cross-linking*. Receberá, além disso, o colírio antibiótico e a lente de contato gratuitamente durante a duração desta pesquisa.

Durante o estudo, caso ocorra qualquer complicação decorrente do tratamento utilizado, você receberá tratamento oftalmológico adequado, será indicada a alteração do colírio e instituído tratamento para a condição específica. Caso seja descoberta alguma outra alteração no olho, mesmo que não tenha relação com a pesquisa, será garantido acesso ao oftalmologista.

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 Dr. Diego Gadelha, que pode ser encontrado no endereço da Rua da Soledade, n.º 170, bairro- Boa Vista (Fundação Altino Ventura) e pelo telefone (81) 9666-1512. 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 4

Efeito terapêutico do “cross-linking” corneano na ceratopatia bolhosa sintomática

Therapeutic effect of corneal cross-linking on symptomatic bullous keratopathy

Diego Nery Benevides Gadelha¹
Bernardo Menelau Cavalcanti²
Vasco Bravo Filho³
Newton Andrade Júnior⁴
Neylane Nyéria Coelho Batista⁵
Ana Cecília de Sousa Leão Escarião⁶
Roberta Ventura Urbano⁷

Trabalho realizado na Fundação Altino Ventura (FAV) - Recife (PE) - Brasil.

¹ Médico, Aluno do segundo ano do Curso de Especialização em Oftalmologia da Fundação Altino Ventura (FAV) - Recife (PE) - Brasil.

² Médico, Aluno do segundo ano do Curso de Especialização em Oftalmologia da FAV - Recife (PE) - Brasil.

³ Médico, Aluno do segundo ano do Curso de Especialização em Oftalmologia da FAV - Recife (PE) - Brasil.

⁴ Médico, Aluno do segundo ano do Curso de Especialização em Oftalmologia da FAV - Recife (PE) - Brasil.

⁵ Médica, Aluna do primeiro ano do Curso de Especialização em Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Recife (PE) - Brasil.

⁶ Médica, Staff do Departamento de Córnea e Doenças Externas da FAV e Hospital de Olhos de Pernambuco (HOPE) - Recife (PE) - Brasil.

⁷ Diploma em Saúde Comunitária Ocular pela London School of Hygiene and Tropical Medicine.

Endereço para correspondência: Fundação Altino Ventura (FAV). Rua da Soledade, 170 - Recife (PE) CEP 50070-040

E-mail: fav@fundacaoaltinoventura.org.br

Recebido para publicação em 19.01.2009
Aprovação em 07.06.2009

Nota Editorial: Depois de concluída a análise do artigo sob sigilo editorial e com a anuência da Dra. Myrna Serapião dos Santos sobre a divulgação de seu nome como revisora, agradecemos sua participação neste processo.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do “cross-linking” corneano na ceratopatia bolhosa sintomática e seu impacto na acuidade visual, espessura corneana e sintomatologia dolorosa. **Métodos:** Doze pacientes com ceratopatia bolhosa sintomática foram incluídos. Exame clínico com questionário específico para a pesquisa com escala de dor (escala visual analógica numérica), acuidade visual e mensuração da espessura corneana foi realizada pré “cross-linking” corneano, 7, 30 e 60 dias após. Em todos os pacientes o tratamento com UVA-crosslinking foi realizado após abração do epitélio corneano na lâmpada de fenda e instilação de solução de riboflavina 0,1% a cada 5 minutos por 30 minutos. Após esse período o paciente foi submetido à exposição à luz ultravioleta A (UVA), utilizando riboflavina e anestesia tópica a cada 5 minutos por 30 minutos. O paciente utilizou colírios de ofloxacina 0,3% e lágrima artificial até completa reepitelização. O teste de Friedman foi usado para comparar as médias das frequências da acuidade visual, sintomatologia dolorosa e espessura central da córnea. Os valores de “p” menor que 0,05 foram considerados como estatisticamente significantes. **Resultados:** Doze olhos de 12 pacientes com erosões epiteliais recorrentes foram tratados. O tempo de seguimento foi de dois meses. Foi observada redução significativa da dor ($p < 0,001$). As medidas da espessura corneana e da acuidade visual não sofreram alterações estatisticamente significantes. **Conclusão:** Foi constatado o potencial de aplicação do “cross-linking” corneano no tratamento de pacientes com dor causada por ceratopatia bolhosa. É necessário maior seguimento para confirmar se os resultados podem ser reproduzidos em longo prazo.

Descritores: Córnea; Topografia da córnea; Reagentes para ligações cruzadas; Transplante de córnea; Dor; Agentes fotossensibilizantes/uso terapêutico; Riboflavina/uso terapêutico; Raios ultravioleta; Acuidade visual

INTRODUÇÃO

A transparência da córnea é mantida pela bomba iônica no seu endotélio, responsável pela deturgescência e desidratação estromal⁽¹⁾. A ceratopatia bolhosa (CB) é uma desordem causada pela falha desse mecanismo, resultando em edema estromal e, invariavelmente, aparecimento de bolhas epiteliais ou subepiteliais⁽¹⁻⁴⁾. As causas mais comuns de CB são os procedimentos cirúrgicos intraoculares incluindo facectomia e ceratoplastia penetrante, distrofia endotelial de Fuchs, trauma e glaucoma refratário⁽¹⁻⁴⁾. A CB produz, frequentemente, sintomas, como diminuição da acuidade visual, dor, fotofobia e epífora⁽²⁾.



Transplante de córnea é o método mais efetivo para alívio dos sintomas e recuperação visual^(2,3). Quando este tratamento é inviável do ponto de vista clínico ou não está disponível, métodos conservadores podem ser usados. Dor ocular e defeitos epiteliais podem ser tratados com administração tópica de anti-inflamatórios, lubrificantes e soluções hipertônicas^(5,6), além do uso de lente de contato terapêutica⁽⁷⁾. Alternativamente, vários tratamentos cirúrgicos têm sido utilizados na CB, incluindo punção do estroma anterior, criopexia (cauterização), recobrimento conjuntival, transplante de membrana amniótica, ceratectomia fototerapêutica por excimer laser (PTK) e ceratoplastia lamelar posterior⁽³⁾.

O "cross-linking" do colágeno corneano com a riboflavina (vitamina B2) é uma técnica inovadora com o objetivo de enrijecer o tecido corneano⁽⁸⁻⁹⁾. A luz ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina cria novas ligações entre as moléculas de colágenos adjacentes, produzindo aumento da espessura da córnea bem como diminuindo sua maleabilidade⁽¹⁰⁾. A irradiação por meio da UVA faz com que ocorra perda do equilíbrio interno das moléculas de riboflavina, que atua como um fotomediador, criando radicais livres que induzem novas ligações entre fibrilas de colágeno⁽¹¹⁾. Esta reestruturação das fibras de colágeno ocasiona aumento da força biomecânica da córnea⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

A indicação clínica do "cross-linking" corneano está limitada aos casos de "melting" corneano, degeneração marginal pelúcida, ceratocone e ectasias iatrogênicas após cirurgias refrativas com laser in situ keratomileusis (LASIK)⁽¹²⁻¹³⁾. Publicações que tenham analisado os efeitos terapêuticos do "cross-linking" corneano na ceratopatia bolhosa são escassas e metodologicamente incompletas.

O objetivo do estudo é analisar o efeito terapêutico do "cross-linking" corneano induzido por UVA/riboflavina na ceratopatia bolhosa sintomática, demonstrando a viabilidade deste tratamento e sua influência na acuidade visual, espessura corneana e sintomatologia dolorosa.

MÉTODOS

Foram incluídos no estudo 12 portadores de CB sintomática por um período igual ou maior que 12 meses, resistente ao tratamento clínico conservador, que não possuíam indicação para transplante penetrante de córnea, ou estivessem na fila de espera para a realização do transplante.

Foram excluídos todos os pacientes que possuíam espessura central da córnea menor que 400 micra; antecedente de herpes ocular ou ao redor dos olhos; portador de outras doenças ou cicatrizes corneanas; antecedente de displasia corneana; lesões tumorais conjuntivais; período de gravidez ou amamentação; antecedente de má cicatrização corneana e alergia à riboflavina.

Os pacientes foram avaliados, previamente ao tratamento e no 7^o, 30^o e 60^o dias após o tratamento, com questionário estruturado para o estudo, avaliando sintomatologia e dor

através da escala visual analógica numérica (EVA)⁽¹⁴⁾. Além do questionário, foi realizada avaliação oftalmológica completa, que incluiu: acuidade visual de alto contraste não corrigida (AVL), utilizando a tabela ETDRSTM (Lighthouse Inc., Nova Iorque, EUA); biomicroscopia detalhada, na qual foi observada a superfície da córnea com e sem instilação de fluoresceína, vascularização superficial e profunda; representação gráfica detalhada do quadro; paquimetria ultrassônica (Ultrasonic Pachymeter Model 850, Humphrey Instruments, Inc).

Abrasão do epitélio da córnea medindo 9 mm de diâmetro foi realizada com lâmina de bisturi número 11, gotas da solução de riboflavina 0,1% foram instiladas a cada 5 minutos intercaladas com colírio anestésico, em um período de 30 minutos antes do procedimento e durante a aplicação da radiação. A córnea foi exposta a luz UVA com comprimento de onda de 370 ± 5 nm e uma irradiância de 3 mW/cm² por um período total de 30 minutos, correspondendo a uma dose total de 3,4 J ou a uma exposição de radiação de 5,4 J/cm² de córnea. Foi utilizado para esta exposição o aparelho X-Link (Corneal Crosslink System, Opto Global Pty Ltd). Ao final, colocada uma lente de contato terapêutica e prescrito colírio antibiótico (ofloxacino 0,3%) até recuperação epitelial.

Para a avaliação da evolução das medidas EVA, AVL e paquimetria nos períodos pré, 7, 30 e 60 dias após o tratamento, foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman⁽¹⁵⁾ que é aplicado no caso de medidas pareadas com mais de dois períodos de avaliação. No caso onde houve significância estatística, foi aplicado o teste de comparações múltiplas com a finalidade de determinar onde se encontra a diferença estatística. Optou-se por utilizar metodologia não paramétrica devido ao número pequeno de observações.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05. O software utilizado na execução dos cálculos estatísticos foi o SPSS versão 12.0.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Altino Ventura. Todos os indivíduos que participaram do estudo foram esclarecidos quanto à investigação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

RESULTADOS

Dos 12 pacientes incluídos no estudo, 6 (50,0%) eram do sexo masculino e 6 (50,0%) do feminino. A idade média foi de 66 anos (variando entre 49 e 85 anos). As principais causas de ceratopatia bolhosa foram: pós-facectomia (5 pacientes), trauma (2 pacientes), falência secundária de transplante de córnea (1 paciente), falência secundária de transplante de córnea em olho pseudofácico (2 pacientes), distrofia endotelial de Fuchs (2 pacientes).

Nenhum caso de infecção corneana ou inflamação intra-ocular foi relatado. Apenas uma paciente apresentou retardo no tempo de reepitelização (15 dias).



464 Efeito terapêutico do "cross-linking" corneano na ceratopatia bolhosa sintomática

A sintomatologia dolorosa foi avaliada por meio da escala visual analógica numérica (EVA), onde zero significa ausência total de dor e 10 o nível de dor máxima suportável pelo paciente - tabela 1.

Através dos resultados obtidos acima, pode-se afirmar que existe uma redução significativa ($p < 0,05$) dos valores da EVA do período pré em relação aos momentos pós-tratamento, já verificando uma melhora após 7 dias. Depois do tratamento não existe diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os momentos avaliados (7, 30 e 60 dias) - tabela 2. Esses resultados podem ser melhor visualizados no gráfico 1.

Analisando a paquimetria, houve uma tendência discreta para a diminuição da espessura corneana central, entretanto, pode-se afirmar que para a amostra estudada não existe uma diferença estatisticamente significativa dos valores entre os períodos pré, 30 e 60 dias após o tratamento ($p > 0,05$) - tabela 3.

Através dos resultados obtidos na análise da acuidade visual de alto contraste não corrigida (AVL), pode-se afirmar que para a amostra estudada não existe diferença estatisticamente significativa dos valores da AVL entre os períodos pré, 7, 30 e 60 dias após o tratamento ($p > 0,05$) - tabela 4.

DISCUSSÃO

A ceratopatia bolhosa é causada pela falha da capacidade do endotélio corneano em manter o estado fisiológico de desidratação e transparência da córnea⁽¹⁶⁾. Devido à estrutura mecânica das fibras corneanas, uma quebra na integridade da barreira epitelial resulta em um modesto aumento da espessura corneana: valores acima de 0,6 mm são raros. Em contrapartida, descompensação endotelial é seguida de abundante hidratação estromal, com espessura entre 0,8-1,0 mm⁽¹⁷⁾. O ede-

ma estromal e a ruptura de bolhas epiteliais e subepiteliais irritam as terminações nervosas corneanas, produzindo dor e desconforto na superfície ocular⁽¹⁸⁾.

Todos os pacientes do estudo apresentavam dor de importante intensidade antes da aplicação de UVA/riboflavina, com média na escala visual analógica numérica de 8,58 ($\pm 1,51$). Após a realização do procedimento observou-se uma considerável redução da dor já na primeira semana, com manutenção estatisticamente significativa em 30 e 60 dias.

O tratamento afeta a inervação corneana. A desepitelização mecânica remove as fibras nervosas intraepiteliais e causa dano às fibras subepiteliais⁽¹⁹⁾. O efeito sinérgico entre abrasão mecânica e exposição à UVA/riboflavina (induzindo fotonecrose e apoptose) promovem perda de fibras nervosas estromais anteriores e subepiteliais⁽¹⁸⁾. A combinação desses efeitos com o aumento da rigidez corneana induzido pelo "cross-linking" são provavelmente responsáveis pela melhora da dor nos pacientes da amostra.

Em relação à análise da paquimetria não foi observada alteração significativa na espessura corneana no período estudado. Estudos prévios demonstraram um decréscimo maior que 10% na espessura da córnea, isso pode ser explicado pelas mudanças arquitetônicas nas fibrilas de colágeno geradas pela exposição à UVA/riboflavina, que aumenta as pontes entre fibrilas e torna mais difícil o influxo de líquido no estroma⁽¹⁹⁾. Outra possibilidade seria de que as diferenças entre as séries resultassem apenas de bases de tamanho amostral.

A melhora da acuidade visual nos pacientes com CB está intimamente relacionada à redução do edema e aumento da transparência corneana. Como não houve alterações nessas

EVA	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Pré	12	8,58	9,00	1,51	7	10
7 dias	12	3,75	2,00	3,14	0	10
30 dias	12	4,50	4,00	3,18	1	10
60 dias	12	4,25	3,50	2,99	1	10

EVA= escala visual analógica numérica; p-valor < 0,001

Comparações - EVA	p-valor
Pré x 7 dias	0,001*
Pré x 30 dias	0,001*
Pré x 60 dias	0,001*
7 dias x 30 dias	0,267
7 dias x 60 dias	0,455
30 dias x 60 dias	0,491

EVA= escala visual analógica numérica; *= estatisticamente significante

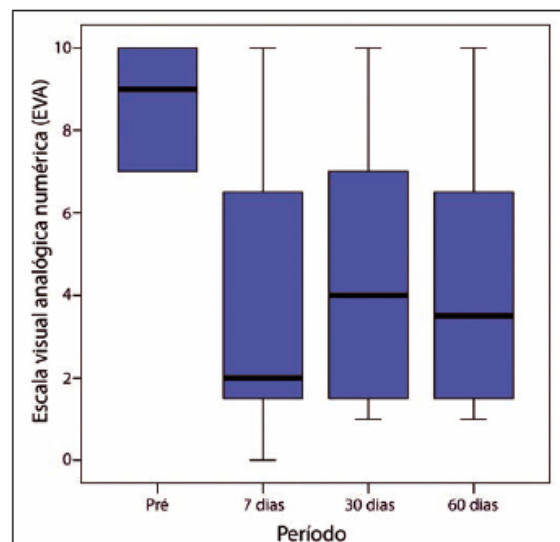


Gráfico 1 - Box-Plot dos valores da escala visual analógica numérica (EVA) para os períodos pré, 7, 30 e 60 dias após o tratamento



Tabela 3. Resultado da análise da evolução da paquimetria no período de avaliação

Paquimetria (μm)	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Pré	12	803,00	826,00	137,97	561	978
30 dias	12	735,50	708,50	149,15	544	960
60 dias	12	737,75	727,50	133,56	550	938

p-valor = 0,338

Tabela 4. Resultado da análise da evolução da AVL no período de avaliação

AVL	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Pré	12	0,022	0,010	0,037	0,00	0,13
7 dias	12	0,024	0,010	0,036	0,00	0,10
30 dias	12	0,024	0,015	0,036	0,00	0,13
60 dias	12	0,024	0,015	0,036	0,00	0,13

AVL= acuidade visual de alto contraste não corrigida; p-valor = 0,190

variáveis é esperado que não haja incremento de linhas de visão nesses pacientes.

Outros tratamentos utilizados para CB como punção de estroma anterior, recobrimento conjuntival e transplante de membrana amniótica podem levar ao decréscimo da acuidade visual. A lente de contato terapêutica mostra-se eficaz, porém, além da necessidade de trocas frequentes, está associada ao aumento da vascularização e do risco de infecção quando utilizada por tempo prolongado⁽²⁾.

Apenas um paciente apresentou retardo no tempo de reepitelização corneana. Nos demais nenhum efeito adverso relacionado ao procedimento ou ao período de recuperação foram relatados. É necessário um tempo maior de seguimento para confirmar se esses resultados podem ser reproduzidos em longo prazo.

CONCLUSÃO

A indução de "cross-linking" corneano através da aplicação de UVA/riboflavina mostrou-se eficaz no controle da sintomatologia dolorosa da ceratopatia bolhosa. Apresentou ainda manutenção da espessura corneana e da acuidade visual. Um tempo maior de seguimento é necessário para avaliar se os resultados são reprodutíveis em longo prazo.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the corneal cross-linking (CXL) effect on symptomatic bullous keratopathy, and its impact on the visual acuity, corneal thickness and pain symptomatology. **Methods:** Twelve patients with symptomatic bullous keratopathy were included. A clinical examination with a specific questionnaire (pain scale - visual numeric analog scale), visual acuity, and corneal thickness measures was performed before corneal cross-linking and 7, 30 and 60 days after the procedure. In all

patients, the treatment with the UVA-crosslinking was done after corneal abrasion on the slit-lamp and instillation of 0.1% riboflavin in saline for every five minutes, lasting 30 minutes. Subsequently, the patient underwent the UVA light exposure, using riboflavin and topical anesthesia, every five minutes lasting 30 minutes. The patient received 0.3% ofloxacin drops, and artificial tears until complete reepithelization. The Friedman test was used to compare the means of frequencies of visual acuity, pain symptoms and corneal thickness. A "p" value <0.05 was considered for rejecting the null hypothesis. **Results:** Twelve eyes from 12 patients with recurrent epithelium erosions were treated. The mean follow-up was two months. Significant pain reduction was observed (p<0.001). Corneal thickness and visual acuity measurements presented with no significant difference. **Conclusion:** The potential use of cross-linking in the treatment of bullous keratopathy pain was proved to be likely. A longer follow-up to confirm whether these results can be reproduced in the long term is necessary.

Keywords: Cornea; Corneal topography; Cross-linking reagents; Corneal transplantation; Pain; Endothelium, corneal; Photosensitizing agents/therapeutic use; Riboflavin/therapeutic use; Ultraviolet rays; Visual acuity

REFERÊNCIAS

- Georgiadis NS, Ziakas NG, Boboridis KG, Terzidou C, Mikropoulos DG. Cryopreserved amniotic membrane transplantation for the management of symptomatic bullous keratopathy. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2008;36(2):130-5.
- Haraguchi DK, Gomes JA, Sato EH, Novo NF. Uso de transplante de membrana amniótica no tratamento da ceratopatia bolhosa. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 66(1):121-4.
- Castellano AG, Bardal AM, Lago C, Moreira LB, Moreira H. Transplante de membrana amniótica na ceratopatia bolhosa. *Arq Bras Oftalmol*. 2004;67(6): 855-8.
- Comier G, Brunette I, Boisjoly HM, Le François M, Shi ZH, Guertin MC. Anterior stromal punctures for bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114(6):654-8.



466 Efeito terapêutico do "cross-linking" corneano na ceratopatia bolhosa sintomática

5. Foulks GN. Treatment of recurrent corneal erosion and corneal edema with topical osmotic colloidal solution. *Ophthalmology*. 1981;88(8):801-3.
6. Luxenberg MN, Green K. Reduction of corneal edema with topical hypertonic agents. *Am J Ophthalmol*. 1971;71(4):847-53.
7. Plotnik RD, Mannis MJ, Schwab IR. Therapeutic contact lenses. *Int Ophthalmol Clin*. 1991;31(2):35-52.
8. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97-103.
9. Spoerl E, Seiler T. Techniques for stiffening the cornea. *J Refract Surg*. 1999;15(6):711-13.
10. 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.
11. Wollensak G, Redl B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea*. 2008;27(3):353-6.
12. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(5):620-7.
13. Schnitzler E, Spoerl E, Seiler T. [Irradiation of cornea with ultraviolet light and riboflavin administration as a new treatment for erosive corneal process, preliminary results in four patients]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 2000;217(3):190-3. German.
14. Carvalho DS, Kowacs PA. Avaliação da intensidade de dor. *Migrâneas e Cefaléias*. 2006;9(4):164-8.
15. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics*. 2nd ed. New York. John Wiley & Sons; 1980.
16. Krachmer JH, Mannis JM, Holland EJ. *Cornea: fundamentals diagnosis and management*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2006.
17. Ehlers N, Hjortdal J. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol*. 2008;86(5):549-51.
18. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Sergio P, Caporossi T, Caporossi A. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: quantitative investigation of corneal epithelium and subepithelial nerve plexus regeneration by in vivo HRT II system confocal microscopy in humans. *Eur J Ophthalmol*. 2006;16(4):530-5.
19. Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg*. 2007;33(3):516-21. Comment in: *J Cataract Refract Surg*. 2007;33(9):503; *J Cataract Refract Surg*. 2008;34(6):879-80.



Anexo 5

Certificado de apresentação do trabalho no congresso da
Associação Pan-Americana de oftalmologia