

FÁBIO LUIZ SILVA PINA

**PRESERVAÇÃO DE CÓRNEAS DE FELINOS DOMÉSTICOS
(*Felis catus* – Linnaeus, 1758) EM CONSERVANTE UTILIZANDO A ÁGUA
DE COCO COMO MEIO NUTRITIVO**

RECIFE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

FÁBIO LUIZ SILVA PINA

PRESERVAÇÃO DE CÓRNEAS DE FELINOS DOMÉSTICOS
(*Felis catus* – Linnaeus, 1758) EM CONSERVANTE UTILIZANDO A ÁGUA
DE COCO COMO MEIO NUTRITIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:
Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

RECIFE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

PRESERVAÇÃO DE CÓRNEAS DE FELINOS DOMÉSTICOS
(*Felis catus* – Linnaeus, 1758) EM CONSERVANTE UTILIZANDO A ÁGUA
DE COCO COMO MEIO NUTRITIVO

Dissertação de Mestrado elaborada por

FÁBIO LUIZ SILVA PINA

Aprovado em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. FABRÍCIO BEZERRA DE SÁ
Orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. FÁBIO LUIZ DA CUNHA BRITO
Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns

Prof. Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. MARCOS JOSÉ CORREIA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. MARCELO WEINSTEIN TEIXEIRA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Histórico da preservação de córneas.....	14
2.2 Métodos de preservação de córneas.....	16
2.2.1 Meios líquidos à 4°.....	16
2.2.2 Organoculturas.....	17
2.2.3 Criopreservação.....	17
2.3 Prevenção de contaminação do meio de preservação.....	18
2.4 Novos meios de preservação de córneas e perspectivas futuras.....	19
3 REFERÊNCIAS.....	22
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	29
4.1 Preservação de córneas de felinos domésticos (<i>Felis catus</i> – Linnaeus, 1758) em conservante utilizando a água de coco como meio nutritivo.....	30
5 RESUMO.....	30
6 INTRODUÇÃO.....	30
7 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
8 RESULTADOS.....	36
9 DISCUSSÃO.....	42
10 REFERÊNCIAS.....	48

Dedico este trabalho à minha mãe,
Glória; meu irmão, Eduardo; minha
avó, Noemi; meu avô, José Heleno
(em memória); e a minha esposa,
Nilma.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde, paz, força, e oportunidades que me oferece a cada dia;

À minha Mãe, pelo exemplo de pessoa, de luta, e de honestidade;

À minha esposa pela paciência e incentivo durante meu mestrado e todos os dias;

À todos os meus parentes e familiares, por acreditarem em mim, e pelo incentivo;

Ao professor Fabrício Bezerra de Sá, pela amizade, orientação e paciência;

Aos que fazem a diretoria da Clínica Veterinária Harmonia, Dra. Cíntia Valadares e Dra. Juliana D. Teixeira, por acreditarem em mim, e permitirem minha ausência no trabalho;

Ao professor Dr. Marcelo W. Teixeira, pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade, e por ter acreditado no meu potencial, me oferecendo várias oportunidades;

Aos que fazem a Clínica Veterinária Harmonia, veterinários e funcionários, pela amizade de todos esses anos;

Ao professor Dr. Marcos José Correia, pela paciência e importante ajuda ao meu experimento;

À Bruno O. F. Souza, bolsista de PIBIC do DMFA, pela paciência e importante ajuda ao meu experimento;

Ao Professor Rafael Tassitano (LAPEL/ESEF/UPE), pela paciência e importante ajuda na análise estatística;

Aos meus novos amigos, Rinaldo Ferri, Bruno Souza, Taciana Spinelli e Edmilson, pela amizade, incentivo e ajuda durante o mestrado;

Aos meus amigos, Amaro Fábio, Ílvio Vidal, Elayne Cristine, Thiago Silva, Marco Granja, Rita de Cássia, Paola Teles, pelos momentos divertidos na clínica e pelo incentivo durante o mestrado;

A minha tia Argélia, por sempre me motivar à pesquisa.

“O sofrimento é passageiro. Desistir é para sempre.”
Autor desconhecido

Preservação de córneas de felinos domésticos (*Felis catus* – Linnaeus, 1758) em conservante utilizando a água de coco como meio nutritivo

RESUMO

As células do endotélio corneal apresentam a importante função de bomba osmótica e barreira, mantendo assim a córnea transparente. A perda destas células, seja por qualquer motivo, tornam a córnea opaca, influenciando negativamente na capacidade visual do indivíduo. Por este fato, a conservação de córneas para fins de transplante tem evoluído bastante ao longo dos anos. Devido às características físico-químicas desejáveis e ao baixo custo da água de coco, o objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade do uso da água de coco como meio nutritivo em conservantes de córnea. Um total de 9 gatos, sem nenhuma patologia corneal em curso, foram eutanasiados. Uma córnea de cada par foi avaliada imediatamente, sendo a outra avaliada após a preservação no meio com água de coco nos dias 3, 7 e 14. As córneas foram processadas para microscopia óptica. As córneas tornaram-se inviáveis a partir do dia 3 de conservação, apresentando alterações morfológicas, sinais de morte celular e espessura estromal aumentada, indicando edema importante. Concluiu-se que a água de coco não serviu como meio nutritivo para conservantes de córneas de felinos domésticos, porém as córneas, devido à ausência de contaminação do meio, podem ser utilizadas em transplantes tectônicos e ceratoplastias lamelares.

Palavras-chave: endotélio corneal, água de coco, gato, preservação de córnea

Domestic felines (*Felis catus* – Linnaeus, 1758) corneal preservation in preservative using coconut water as nutritious medium

ABSTRACT

Corneal endothelium cells present the important function of osmotic pump and barrier, thus keeping it transparent. The loss of these cells, either by any reason, becomes the cornea cloudy, influencing negatively in the visual capacity of the individual. For this fact, the conservation of corneas for transplant ends has evolved sufficiently to the long one of the years. Had to the characteristics desirable physicist-chemistries and the low cost of the coconut water, the aim of this work was to investigate the possibility of the use of the coconut water as nutritious medium in corneal preservation medium. A total of 9 cats, without no corneal pathology in course, had been sacrificed. One cornea of each pair was evaluated immediately, being the other evaluated after preservation on the medium with coconut on days 3, 7 and 14. The corneas had been processed for optic microscopy. The corneas had become impracticable since day 3 of conservation, having presented morphologic alterations, signals of cellular death and estromal thickness increased, indicating important edema. We conclude that the coconut water did not serve as nutritious medium for corneal storage medium of domestic felines, however the corneas, due to absence of contamination of the medium, can be used in tectonic transplants and lamellar keratoplasty.

Key Words: corneal endothelium, coconut water, cat, corneal preservation

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 0 (grupo controle), evidenciando epitélio (Ep) e estroma (Es) corneal. FbXAt. 20X.	36
Figura 2 – Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 0 (grupo controle), evidenciando endotélio (En) e estroma (Es) corneal. FbXAt. 100X.	37
Figura 3 – Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 3, evidenciando alterações epiteliais: cariorrexe e hidropsia. FbXAt. 100X em contraste de Fase 3	38
Figura 4 – Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 3, evidenciando alterações estromais: aumento da eosinofilia nos ceratócitos, irregularidade da matriz extracelular. . FbXAt. 100X .	38
Figura 5 – Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 3, evidenciando alterações na densidade endotelial com exposição da membrana de Descemet (A, FbXAt, 40X); células endoteliais com sinais de degeneração: picnose e degeneração hidrópica (B, FbXAt, 100X em contraste de Fase 3).	39
Figura 6 – Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 7, evidenciando alterações epiteliais com descamação das camadas superficial e intermediária, e basal com núcleos em picnose e cariorrexe. FbXAt. 100X em contraste de Fase 3.	40
Figura 7 – Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 14, evidenciando grandes áreas ausentes de endotélio, com exposição da membrana de Descemet (A), e degeneração hidrópica importante (B). FbXAt. 100X em contraste de Fase 3.	41
Figura 8 – Espessura estromal das córneas (μm) após preservação em conservante com água de coco	41
Figura 9 – Densidade de células endoteliais ($\text{céls}/\text{mm}^2$) após preservação em conservante com água de coco	42
Figura 10 – Espessura estromal (μm) x densidade de células endoteliais ($\text{céls}/\text{mm}^2$) após preservação em conservante com água de coco	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da água de coco analisada por espectrofotometria.....	34
Tabela 2 - Componentes do meio de conservação de córnea com água de coco.....	35

INTRODUÇÃO

A córnea é uma estrutura curvada e transparente que, junto com a esclera, compõe a túnica fibrosa do olho. Além de transparente, a córnea possui uma importante função refrativa, enquanto mantém uma barreira física, dura e impermeável entre o olho e o meio ambiente (WHITLEY & GILGER, 1998). O endotélio corneal é composto de uma camada única de células de formato hexagonal. Essa camada celular é relativamente permeável, permitindo a passagem de água e até mesmo moléculas, como glicose e outros nutrientes (ARNDT et al., 2001). Distúrbios na função endotelial permitem que a água penetre o estroma e rompa o arranjo paralelo das fibras colágenas, resultando em opacificação corneal (SLATTER & HAKANSON, 1998; WHITLEY & GILGER, 1998; ARNDT et al., 2001).

O olho *post mortem* passa por uma série de transformações. Neste estado, a bomba endotelial entra em falência e o equilíbrio de fluidos e íons com o humor aquoso fica comprometido, resultando na hidratação da córnea, em excesso, o que contribuirá para sua opacificação (ALVIM et al., 2003). O objetivo da conservação de córneas é preservar a integridade endotelial para fins de transplantes. A conservação da córnea, a longo prazo, não é um procedimento prático ou economicamente viável na rotina veterinária. O melhor tecido doador é aquele de animais jovens, devido à probabilidade de se obter células endoteliais saudáveis, porém o tempo entre a morte, a enucleação e o uso dos tecidos deve ser o mais curto possível (imediatamente após a morte ou dentro de seis horas) para minimizar qualquer dano no tecido doador (GILGER & WHITLEY, 1998). Este fato torna a ceratoplastia penetrante, muitas vezes, um procedimento de “emergência”, impedindo a realização de exames prévios (Ex.: microscopia especular e sorologia) que garantam a viabilidade das células endoteliais, e da córnea como um todo (ALVIM et al., 2003).

A maioria dos estudos experimentais sobre a preservação do tecido corneal para transplante tem usado coelhos, gatos, e outros animais. Há vários estudos sobre conservação e transplante de córneas a fresco em espécies animais, mas poucos utilizando córneas conservadas para realizar transplantes em seguida (ARNDT et al., 2001). Muitos são os meios de preservação da córnea doadora (Ex.: Optisol[®] GS, solução de Swinger-Kornmehl, Plasmasteril). Meios de preservação com tempo médio de duração são eficazes e atendem às necessidades existentes. Estes meios são de simples manuseio e conservam as córneas pelo tempo necessário para um bom planejamento cirúrgico, triagem sorológica nos doadores, transporte do enxerto e mobilização do receptor. No

entanto, os custos dos meios de conservação industrializados ainda são elevados, principalmente em nossa região (NOGUEIRA & VASCONCELOS, 2000) e na medicina veterinária.

Devido às características físico-químicas e ao baixo custo da água de coco, o objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade do uso da água de coco como meio nutritivo em conservantes de córnea.

REVISÃO DE LITERATURA

Doenças da córnea podem progredir ameaçando a integridade do bulbo ocular e da visão em humanos e animais de companhia. Apesar de alguns casos mais sérios possam responder a terapia médica, vários pacientes requerem intervenção cirúrgica. Há vários procedimentos cirúrgicos usando enxertos para preservar a integridade da córnea, manter a visão, ou salvar o globo com propósitos cosméticos (ANDREW et al., 1999; BUSSIERES et al., 2004). O transplante de córnea (ceratoplastia penetrante) é a forma mais comum e mais próspera entre os transplantes de tecidos sólidos (GABRIC et al., 1999), tornando-se a única forma de tratamento para doenças corneais que ensejam a cegueira (THIEL et al., 2003; GEORGE & LARKIN, 2004). Para os pacientes com córneas avasculares, e mesmo para aqueles não imunossuprimidos, o grau de sucesso é em torno dos 95% (GABRIC et al., 1999; THIEL et al., 2003). Muitas afecções corneais requerem transplante de córnea entre as espécies, incluindo opacificação corneal após cirurgia de catarata, traumas ou queimaduras corneais, ceratocone, degeneração e distrofia endotelial, abcesso estromal, ceratite superficial crônica, e carcinoma de células escamosas (ANDREW et al., 1999; ANDREW et al., 2002; CHAVES et al., 2002; GEORGE & LARKIN, 2004).

O endotélio corneal utiliza uma bomba fisiológica ativa para remover e transportar fluido para câmara anterior, e regula a hidratação da matriz colágena do estroma, a qual fornece resistência mecânica (WHITLEY & GILGER, 1998; SLATTER & HAKANSON, 1998; ANDREW et al., 1999). As células endoteliais tendem a ficar maiores, mais diminuem em número com a idade. No cão e no gato jovens, o número de células endoteliais é de 2.500 a 4.500 por mm^2 . Semelhante ao gato e primatas não-humanos, o cão tem uma habilidade limitada para a regeneração do endotélio corneal (BAHN et al., 1982; HUANG et al., 1989; BOURNE et al., 1994; ARNDT et al., 2001; ARMITAGE et al., 2003; GELATT, 2003). Ao contrário do epitélio corneal, que tem um notável poder de regeneração, o endotélio de uma córnea madura tem um baixíssimo poder de mitose, respondendo aos traumas primariamente com hipertrofia e migração celular. O aumento celular aparece como resultado da perda de células, que é compensada com hipertrofia celular. Distúrbios na função endotelial permitem que a água penetre o estroma e rompa o arranjo paralelo das fibras colágenas, resultando em opacificação corneal (BAHN et al., 1982; WHITLEY & GILGER, 1998; SLATTER & HAKANSON, 1998; KOH & WASCHEK, 2000; ARNDT et al., 2001; HUDDE et al., 2002).

O objetivo da preservação de córneas é preservar a integridade endotelial para fins de transplantes (GILGER & WHITLEY, 1998; ARNDT et al., 2001). A preservação da córnea, a longo prazo, não é um procedimento prático ou economicamente viável na rotina veterinária. O melhor tecido doador é aquele de animais jovens, devido à probabilidade de se obter células endoteliais saudáveis, porém o tempo entre a morte, a enucleação e o uso dos tecidos deve ser o mais curto possível (imediatamente após a morte ou dentro de seis horas) para minimizar qualquer dano no tecido doador (GILGER & WHITLEY, 1998). Este fato torna a ceratoplastia penetrante, muitas vezes, um procedimento de emergência, impedindo a realização de exames prévios (Ex.: microscopia especular e sorologia) que garantam a viabilidade das células endoteliais, e da córnea como um todo (ALBON et al., 2000; MOLLER-PEDERSEN et al., 2001; ALVIM et al., 2003).

Há diversos estudos sobre preservação e transplante de córneas a fresco em espécies animais, mas poucos utilizando córneas conservadas para realizar transplantes em seguida (ARNDT et al., 2001). A preservação de tecido corneal requer meio específico para maximizar a integridade da córnea doadora. Grande melhoria tem sido notada nos últimos dez anos no campo dos meios de preservação de córnea (SIMON et al., 2004).

Histórico da preservação de córneas

A restauração da visão através da troca de uma córnea opaca por um tecido transparente foi descrito há mais de 200 anos atrás na França por Pellier de Quengsy. Experimentos realizados com animais constataram a necessidade do uso de um material homólogo para obtenção de um enxerto transparente (EHLERS, 2002). Antes do advento da preservação de córneas para fins de transplante, as cirurgias eram realizadas utilizando-se córneas de olhos enucleados de doadores vivos. Em 1935, Filatov relatou o armazenamento bem sucedido de bulbos oculares inteiros em frascos de vidro dentro de uma caixa de gelo em 4°C por 20-56 h (EHLERS, 2002; JENG, 2006). Este era basicamente o princípio da câmara úmida, técnica esta utilizada há três décadas para o armazenamento de córneas até 48h (ANDREW et al., 1999; JENG, 2006). Esta técnica não necessitava de equipamentos, porém o tempo de armazenamento era tão curto que os enxertos tinham de ser utilizados praticamente de imediato, significando que o paciente deveria permanecer no hospital até a chegada da córnea (EHLERS, 2002).

Stocker, Levenson e Georgiade, em 1963, armazenaram córneas em soro de coelho a 4°C por duas e três semanas, obtendo córneas com endotélio saudável (McCAREY & KAUFMAN, 1974). Assim surgiram os meios a base de organoculturas, permitindo a preservação de córneas por períodos longos, a temperaturas de 31 a 37°C (EHLERS, 2002; JENG, 2006). Em 1965, Capella, Kaufman, e Robbins introduziram uma técnica para a preservação de córneas a longo prazo através da criopreservação, onde os transplantes poderiam ocorrer com sucesso mesmo após 422 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (McCAREY & KAUFMAN, 1974; EHLERS, 2002).

Em 1974 foi desenvolvido e introduzido o meio de conservação McCarey-Kaufman (MK) (McCAREY & KAUFMAN, 1974; PELS, 1997; ANDREW et al., 1999; NOGUEIRA & VASCONCELOS, 2000; WING CHU, 2000; YAMASAKI & INOUÉ, 2001; TRINDADE, 2004; JENG, 2006), permitindo o armazenamento de tecido doador por 3 a 4 dias à 4°C (McCAREY & KAUFMAN, 1974; JENG, 2006), onde o transplante de córnea deixou de ser considerado um procedimento de emergência (JENG, 2006). Esta formulação foi modificada em 1978, o que permitiu o armazenamento por mais de 4 dias (ANDREW et al., 1999).

Apesar deste novo passo, os bancos de córneas ainda exigiam melhor eficiência no sistema de distribuição das córneas em relação ao tempo entre o óbito do doador a cirurgia. Desta maneira as técnicas de preservação de córnea que permitissem um tempo de armazenamento maior foram desenvolvidas (WING CHU, 2000). Em 1985 foi elaborado o meio K-Sol, que introduziu os glicosaminoglicanos aos meios de conservação, permitindo o armazenamento de córneas por tempo intermediário (mais de duas semanas a 4°C) (KAUFMAN et al., 1985; WILSON & BOURNE, 1989; PELS, 1997; ANDREW et al., 1999; WING CHU, 2000; JENG, 2006). Um meio similar (Dexsol) surgiu no final dos anos 80 (ANDREW et al., 1999; JENG, 2006). Esses meios praticamente substituíram o meio MK (PELS, 1997).

Com o objetivo de aperfeiçoar a preservação de córneas foi introduzido no início dos anos 90 o Optisol, um híbrido do K-Sol e Dexsol, que com novos ingredientes ajudaram na sobrevivência do endotélio durante o armazenamento a 4°C. Com a adição da streptomina ao Optisol criou-se o Optisol-GS em 1998, tornando-se este o meio mais utilizado na atualidade (ANDREW et al., 1999; ARNDT et al., 2001; JENG, 2006).

Métodos de preservação de córneas

Meios líquidos a 4°C

Meios de preservação com tempo médio de duração são eficazes e atendem às necessidades existentes. Estes meios são de simples manuseio (NOGUEIRA & VASCONCELOS, 2000; RIECK et al., 2003b; JENG, 2006) e conservam as córneas pelo tempo necessário (6 a 14 dias) para um bom planejamento cirúrgico, triagem sorológica nos doadores, transporte do enxerto e mobilização do receptor. A conservação em meios líquidos a 4°C permite a sobrevivência celular mantendo uma atividade metabólica mínima (NOGUEIRA & VASCONCELOS, 2000; RIECK et al., 2003b), devido à redução na demanda de oxigênio e de outros metabólitos, além de conservar energia (YAMASAKI & INOUÉ, 2001).

Vários foram os meios criados para preservação de córneas a 4°C como: o McCarey-Kaufman (MK) (PELS, 1997; ANDREW et al., 1999; NOGUEIRA & VASCONCELOS, 2000; TRINDADE, 2004; YAMASAKI & INOUÉ, 2001), que consistiu de meio de cultura 199 (TCM-199), dextran, bicarbonato, e antibióticos. No MK-modificado a solução tampão de bicarbonato foi substituída pela solução tampão com 25mM HEPES, além do acréscimo de vermelho fenol como indicador de pH (ANDREW et al., 1999). O meio K-Sol consiste de sulfato de condroitina 2,5%, TCM-199, de solução tampão 25mM HEPES, e sulfato de gentamicina (PELS, 1997; ANDREW et al., 1999), e o Dexsol, de sulfato de condroitina 1,35% e dextran 1% (ANDREW et al., 1999). O Optisol-GS contém sulfato de condroitina 2,5% e dextran 1%, gentamicina (100µg/ml) e streptomina (200µg/ml), além de misturar meio de cultura TCM 199 com meio essencial mínimo (MEM). Este ainda apresenta uma mistura de soluções tampão (bicarbonato e HEPES), várias vitaminas e aminoácidos, vermelho fenol, antioxidantes e precursores da adenosina trifosfato (ARNDT et al., 2001).

O Optisol-GS é considerado atualmente o padrão ouro entre os meios de conservação de córnea, sendo atualmente utilizado pelos Estados Unidos e vários outros países (ANDREW et al., 1999; WING CHU, 2000; JENG, 2006), como no Brasil, onde é utilizado por 64% dos bancos de olhos (PEREIRA et al., 2002). Vários estudos o utilizaram com a finalidade de testá-lo em córneas de várias espécies animais (ARNDT et al., 2001), avaliar alterações que possivelmente levam a perda na qualidade e quantidade de células endoteliais após preservação (KOMURO et al., 1999), estudar a ativação e apoptose de células da córnea, avaliar a produção de peptídeos

intestinais vasoativos pelas células endoteliais e a eficácia da suplementação de enzimas para o combate a radicais livres (KOH & WASCHEK, 2000).

Organoculturas

A adição de soro fetal ou de recém-nascido (bovino) a meios de cultura de córnea (organoculturas) é um procedimento de rotina na maioria dos bancos de córnea na Europa, onde o tecido é mantido em temperaturas entre 31 e 37°C (PELS, 1997; GAIN et al.; MOLLER-PEDERSEN et al., 2001; RIECK et al., 2003a; THURET et al., 2004; JENG, 2006), permitindo armazenar as córneas por até 48 dias. Esta técnica apresenta a vantagem de preparar melhor do tecido doador, assim como a realização de exames que possam diagnosticar infecções antes do transplante (GAIN et al., 2001; MOLLER-PEDERSEN et al., 2001; JENG, 2006). Entretanto, devido à variação qualitativa destes soros (até entre os de grupo semelhante), a eficácia destes meios não está definida (MOLLER-PEDERSEN et al., 2001; JENG, 2006). Este fato conduz variações severas na preservação de córneas em relação à viabilidade endotelial. A teoria de que o soro homólogo, em relação ao heterólogo, apresenta uma menor chance de induzir alterações no enxerto ainda é estudada (GAIN et al., 2001; MOLLER-PEDERSEN et al., 2001; RIECK et al., 2003a).

Alguns autores (GAIN et al., 2001; MOLLER-PEDERSEN et al., 2001; RIECK et al., 2003a) ainda relatam o risco de contaminação por microorganismos patógenos provenientes da córnea doadora, e de transmissão da encefalopatia espongiforme bovina (“doença da vaca-louca”) (JENG, 2006). As substituições do soro por substâncias químicas de menor risco vêm sendo pesquisadas pelos bancos de olhos que trabalham com meios de cultura para preservação de córnea (PELS, 1997).

Criopreservação

A criopreservação tem provado ser um método eficaz em manter a viabilidade e função de vários tipos de tecido para transplante. Apesar de muitos tipos celulares em suspensão permitirem a criopreservação com alta taxa de recuperação da viabilidade e função, tem se demonstrado que isto não é verdade para maioria dos tecidos, e que células em monocamadas são mais susceptíveis a agressão decorrente desta técnica (EBERTZ & McGANN, 2004).

A preservação por períodos longos (criopreservação), além de alto custo, é mais complicada (NOGUEIRA & VASCONCELOS, 2000; YAMASAKI & IOUÉ, 2001) e com resultados inferiores aos demais. Torna-se, na maioria das vezes, desnecessária pela constante procura por doadores (NOGUEIRA & VASCONCELOS, 2000). Johnstone et al. (1992) afirmaram que o endotélio parece resistir aos processos de congelamento e descongelamento. Estes autores, junto a outros (YAMASAKI & IOUÉ, 2001), citam ainda que seja possível armazenar córneas a temperaturas de -196°C , apesar de alguns artigos (HALBERSTADT et al., 2003; EBERTZ & MCGANN, 2004) citarem que o tempo de congelamento ideal ainda precisa ser ajustado. Yamasaki e Inoué (2001) sugerem que órgãos devem ser conservados as mais baixas temperaturas possíveis, porém sem congelamento.

Em estudo realizado por Ebertz e McGann (2004), concluiu-se que a criopreservação de córneas humanas não é uma técnica simples e a utilização de crioprotetores, que contribuem com o sucesso do procedimento, quando não tóxicos ao endotélio celular, não é eficaz.

Prevenção de contaminação do meio de preservação

A endoftalmite é uma séria complicação da ceratoplastia penetrante (HASSAN & WILHELMUS, 2005; ZANETTI et al., 2005; WILHELMUS & HASSAN, 2007). A infecção pode ser causada pela contaminação pré-operatória da córnea doadora, condições inadequadas de assepsia durante a cirurgia e fatores ligados aos pacientes que recebem as córneas (EVERTS et al., 2001; REHANY et al., 2004). Apesar da transmissão esporádica de bactérias e fungos aos receptores de córnea, se tem demonstrado que os microorganismos causadores de endoftalmite geralmente derivam das córneas doadoras (WING CHU, 2000; EVERTS et al., 2001; ZANETTI et al., 2005; WILHELMUS & HASSAN, 2007), repercutindo de maneira negativa e grave na visão do receptor (WING CHU, 2000).

A ocorrência de crescimento bacteriano durante a preservação de córneas permite o descarte daquelas contaminadas. Entretanto, a presença de contaminação nem sempre é indicada por turbidez ou aparência amarelada do meio, sendo os procedimentos que evitam a contaminação um fator crítico da preservação de córneas (ZANETTI et al., 2005). Alguns cirurgiões realizam análise bacteriana da córnea doadora, porém em alguns casos observa-se a ocorrência de infecção pós-cirúrgica mesmo com o resultado negativo destas análises

(WILHELMUS & HASSAN, 2007). Os cocos gram-positivos têm sido os microorganismos mais comuns identificados (REHANY et al., 2004; KAPUR et al., 2006; RITTERBAND et al., 2006).

Nos últimos anos, o Optisol-GS, contendo gentamicina e streptomicina, tem sido o meio mais utilizado (JENG; KAPUR et al., 2006), devido o seu amplo espectro de ação contra bactérias causadoras de endoftalmite. Entretanto, em estudo realizado por Kapur et al. (2006), os antibióticos contidos no Optisol-GS apresentaram baixo poder bactericida quando armazenados aos 4°C em comparação a temperatura ambiente (TA). Jeng (2006) sugeriu a necessidade de manter a córnea e o meio em TA pelo menos 1 hora antes do armazenamento, e três horas antes do transplante, a fim de tornar mais eficaz os antibióticos contidos nos meios.

Infecções fúngicas pós-operatórias podem gerar conseqüências devastadoras para o olho afetado. Casos de infecção por *Candida albicans* após transplante penetrante de córnea foram relatados e a maior parte deles está relacionada à contaminação do botão doador (GODOY et al., 2004; HASSAN & WILHELMUS, 2005). Após a introdução do Optisol GS, a probabilidade de ocorrência de endoftalmite bacterianas reduziu bastante em comparação aquelas causadas por fungos, onde o risco de endoftalmite fúngica triplica quando as córneas são preservadas por mais de quatro dias (HASSAN & WILHELMUS, 2005). Estudos questionam a eficácia destes meios de conservação de córnea normalmente utilizados e sugerem a adição de antifúngicos à sua composição para a profilaxia de tal complicação (GODOY et al., 2004).

Novos meios de preservação de córneas e perspectivas futuras

Desde a introdução do Optisol GS nos Estados Unidos, poucas inovações na preservação de córneas (meios líquidos a 4°C) têm sido realizadas (JENG, 2006). Segundo Chen et al. (1999), apesar de vários meios apresentarem soluções com alta concentração de K⁺, e agentes como dextran, sulfato de condroitina entre outros, necessários para preservação do tecido, estes ainda não são os melhores meios para preservação de córneas. Chen et al. (1999) ainda afirmam que apesar do Optisol manter a córnea com espessura adequada por mais de 14 dias, a degeneração do endotélio se inicia nos dias três a cinco de preservação, e que a diminuição na densidade celular continua após o transplante.

O *Chen medium* mostrou-se como uma novidade interessante dentre os meios de preservação de córnea. Este meio apresenta TC 199 enriquecido com β-hidroxi-butarato. Este meio é considerado eficaz devido a sua habilidade em manter a atividade metabólica durante a

preservação, a capacidade de gerar altos níveis de ATP, enquanto diminui a formação e acúmulo de lactato, e de manter a espessura tecidual adequada sem a adição de agentes osmóticos (CHEN et al., 1999; JENG, 2006). Apesar dos argumentos de Chen et al. (1999), em estudo realizado por Nelson et al. (2000) não foi observado diferença na densidade celular durante a preservação em *Chen medium* e Optisol-GS.

O Eurosol se trata de uma organocultura, livre de soro (SFM), a 31°C. Quando comparado a organoculturas convencionais, suplementadas com 2% de soro bovino, não foram observadas diferenças significantes (WING CHU, 2000; JENG, 2006). Møller-Pedersen et al. (2001) avaliaram a capacidade de diferentes meios de cultura em preservar córneas de humanos durante três semanas a temperaturas de 31°C. Este estudo revelou que, dos meios em questão, o Endothelial SFM foi o meio onde houve menor perda de células endoteliais (14%). Rieck et al. (2003a) investigaram a ação protetora do fator de crescimento fibroblástico tipo 2 (FGF-2) em células endoteliais, de porcos e humanos, durante a preservação destas córneas em organoculturas SFM. Neste trabalho, concluiu-se que o FGF-2 reduz eficientemente os danos ao endotélio corneano humano durante a preservação em organocultura SFM, onde estes autores ainda citam que o efeito é verdadeiramente protetor, porque nenhuma atividade proliferativa e taxa diminuída de apoptose foram determinadas. Resultados similares foram encontrados por Rieck et al. (2003b), utilizando o FGF-2 em meio líquido (Optisol-GS) a 4°C. Estes artigos revelam a tendência, dos bancos de olhos europeus, em substituir o soro fetal bovino por organoculturas SFM, evitando assim a transmissão de doenças como a encefalopatia espongiiforme (PELS, 1997; WING CHU, 2000; MOLLER-PEDERSEN, 2001; RIECK et al., 2003a; JENG, 2006).

Em 2002, um estudo demonstrou que o óxido nítrico (NO) é produzido por córneas humanas em meios de preservação. Este fato foi confirmado devido à presença de níveis de nitrato/nitrito no Optisol-GS, onde as córneas foram armazenadas (JENG et al., 2002). Meisler et al. (2004) determinaram o índice de nitrato/nitrito em meios de preservação após a inibição da enzima óxido nítrico sintetase, adicionando-se N_G-monometil-L-arginina (LMMA) em Optisol GS. Estes autores afirmaram que o aumento progressivo no acúmulo de nitrato/nitrito nos meios de preservação de córneas pode ser interrompido pela adição de um inibidor da enzima óxido nítrico sintetase. Estes ainda concordam que dado as propriedades tóxicas do radical livre óxido nítrico, as córneas conservadas para fins de transplante podem beneficiar-se de tal inibidor, adicionando-se este aos meios de preservação.

Segundo Jeng (2006) o acúmulo de água na córnea (edema) secundário ao tempo de preservação, com posterior desidratação da córnea antes do transplante, tem sido uma desvantagem em relação ao uso das organoculturas, pois estes eventos levam ao aumento na perda das células endoteliais. A partir do princípio que o dextran (substância mais usada para prevenção do edema) possa ser tóxico para córnea, recentemente testou-se o HES 130 (hidroxietil amino). Este se trata de um colóide sintético que tem demonstrado bons resultados como inibidor do edema durante o armazenamento de córneas em organoculturas.

REFERÊNCIAS

ALBON, J., TULLO, A. B., AKTAR, S., BOULTON, M. E. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 10, p. 2887–2893, 2000.

ALVIM, H. S., DINIZ, C. M., TZELIKIS, P. F. M., GONSALVES, R. M. & MAIA, J. A. C. Técnica para preparação e conservação de olhos de porco para cirurgia experimental. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 627-630, 2003.

ANDREW, S. E., SAMUELSON, D. A., LEWIS, P. A. & KUBILIS, P. S. Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 155–161, 1999.

ANDREW, S. E.; CLIPPINGER, T. L.; BROOKS, D. E.; HELMICK, K. E. Penetrating keratoplasty for treatment of corneal protrusion in a great horned owl (*Bubo virginianus*). **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, n. 3, p. 201–205, 2002.

ARMITAGE, W. J., DICK, A. D. & BOURNE, W. M. Predicting Endothelial Cell Loss and Long-Term Corneal Graft Survival. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3326–3331, 2003.

ARNDT, C., REESE, S. & KÖSTLIN, R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol[®] GS. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n.3, p. 175– 82, 2001.

BAHN, C. F., MEYER, R. F., MacCALLUM, D. K., LILLIE, J. H., LOVETT, E. J., SUGAR, S. & MARTONYI, C. L. Penetrating keratoplasty in the cat: a clinically applicable model. **Ophthalmology**, v. 89, n. 6, p. 687–699, 1982.

BOURNE, W. M.; NELSON, L. R.; BULLER, C. R.; HUANG, P. T.; GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Long-term observation of morphologic and functional features of cat

corneal endothelium after wounding. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 35, n. 3, p. 891–899, 1994.

BUSSIERES, M., KROHNE, S. G., STILES, J. & TOWNSEND, W. M. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 352–359, 2004.

CHAVES, N. S. T.; BARROS, P. S. M.; EURIDES, D.; MARTINS, A. F.; ARAÚJO, L. F. Ceratoplastia penetrante, xenógena, homovital e experimental de porco (*Sus domesticus*) em cão (*Canis familiaris*) – técnica cirúrgica. **A Hora Veterinária**, v. 128, p. 33–35, 2002.

CHEN, C-H.; RAMA, P.; CHEN, A. H.; FRANCH, A.; SULEWSKI, M.; ORLIN, S.; CHEN, E. H.; TSENG, S-H.; LEE, H.; WANG, C-C.; HUNG, G-Y.; CHAN, M. Y.; HUANG, M-S.; CHEN, S. C. Efficacy of media enriched with nonlactate-generating substrate for organ preservation: in vitro and clinical studies using the cornea model. **Transplantation**, v. 67, p. 800–808, 1999.

EBERTZ, S. L. & MCGANN, L. E. Cryoinjury in endothelial cell monolayers. **Cryobiology**, v. 49, p. 37–44, 2004.

EHLERS, N. Corneal banking and grafting. The background to the Danish Eye Bank System, where corneas await their patients. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 80, p. 572–578, 2002.

EVERTS, R. J.; FOWLER, W. C.; CHANG, D. H.; RELLER, L. B. Corneoscleral rim cultures - lack of utility and implications for clinical decision-making and infection prevention in the care of patients undergoing corneal transplantation. **Cornea**, v. 20, n. 6, p. 586–589, 2001.

GABRIC, N., DEKARIS, I., SUMANA, L., KARAMAN, Z. & MRAVICIC, I. The influence of tissue culture on corneal immunogenicity. **Experimental Eye Research**, v. 68, p. 277–282, 1999.

GAIN, P., THURET, G., CHIQUET, C., VAUTRIN, A-C., CARRICAJÓ, A., ACQUART, S., MAUGERY, J. & AUBERT, G. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 1158–1162, 2001.

GELATT, K. N. Doenças e Cirurgia da Córnea e Esclera do Cão. In: GELATT, K. N. **Manual de Oftalmologia Veterinária**, São Paulo: Manole, 1ª ed., Cap. 07, p. 125–164, 2003.

GEORGE, A. J. T.; LARKIN, D. F. P. Corneal transplantation: the forgotten graft. **American Journal of Transplantation**, v. 4, p. 678–685, 2004.

GILGER, B. C. & WHITLEY, R. D. Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3ª ed., Cap. 20, p. 675–700, 1998.

GODOY, G.; WAHAB, S. A.; LIMA, A. L. H.; MOREIRA, H. Endoftalmite por *Candida albicans* após transplante penetrante de córnea – relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, p. 349–352, 2004.

HALBERSTADT, M., BOHNKE, M., ATHMANN, S. & HAGENAH, M. Cryopreservation of Human Donor Corneas with Dextran. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 12, p. 5110–5115, 2003.

HASSAN, S. S.; WILHELMUS, K. R. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 4, p. 685–690, 2005.

HUANG, P. T.; NELSON, L. R.; BOURNE, W. M. The morphologic and functional of healing cat corneal endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, p. 1794–1801, 1989.

HUDE, T., COMER, R. M., KINSELLA, M. T., BUTTERY, L., LUTHERT, P. J., POLAK, J. M., GEORGE, A. J. T. & LARKIN, D. F. P. Modulation of hydrogen peroxide induced injury to corneal endothelium by virus mediated catalase gene transfer. **British Journal of Ophthalmology**, v. 86, p. 1058–1062, 2002.

JENG, B. H. Preserving the cornea: corneal storage media. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 17, p. 332–337, 2006.

JOHNSTONE, E. W., WILLIAMS, K. A., LOVRIC, V. A., LUBECK, D., BARRAS, C. W. & COSTER, D. J. Cryopreservation of rabbit and cat corneas at -18 to -24 degrees C. **Cornea**, v. 11, n. 3, p. 211-220, 1992.

KAPUR, R.; TU, E. Y.; PENDLAND, S. L.; FISCELLE, R.; SUGAR, J. The effect of temperature on the antimicrobial activity of Optisol-GS. **Cornea**, v. 25, p. 319–324, 2006.

KAUFMAN, H. E., VARNELL E. D., KAUFMAN S., BEUERMAN R. W., BARRON, B.A. K-Sol corneal preservation. **American Journal of Ophthalmology**, v. 100, n. 2, p. 299–304, 1985.

KOH, S. M. & WASCHEK, J. A. Corneal Endothelial Cell Survival in Organ Cultures under Acute Oxidative Stress: Effect of VIP. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 13, p. 4085–4092, 2000.

KOMURO, A., HODGE, D. O., GORES, G. J., BOURNE, W. M. Cell death during corneal storage at 4° C. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, p. 2827–2832, 1999.

McCAREY, B. E. & KAUFMAN, H. E. Improved corneal storage. **Investigative Ophthalmology**, v. 13, p. 165–173, 1974.

MEISLER, D. M.; KOECK, T.; CONNOR, J. T.; AULAK, K. S.; JENG, B. H., HOLLYFIELD, J. G.; STUEHR, D. J.; SCHADRACH, K. G. Inhibition of nitric oxide synthesis in corneas in storage media. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 891–894, 2004.

MOLLER-PEDERSEN, T., HARTMANN, U., MOLLER, H. J., EHLERS, N., ENGELMANN, K. Evaluation of potential organ culture media for eye banking using human donor corneas. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 1075–1079, 2001.

NELSON, L. F.; HODGE, D. O.; BOURNE, W. M. In Vitro Comparison of Chen Medium and Optisol-GS Medium for Human Corneal Storage. **Córnea**, v. 19, p. 782–787, 2000.

NOGUEIRA, R. D. M. & VASCONCELOS, P. R. L. Água de coco como meio de cultura em conservante de córnea: estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 59, n. 6, p. 395–401, 2000.

PELS, L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. **British Journal Ophthalmology**, v. 81, p. 523–525, 1997.

PEREIRA, M. L. M.; SANTOS, A. M. C.; PASSOS, M. C.; PECEGO, J. G. Análise comparativa entre os bancos de olhos brasileiros: da preservação à distribuição da córnea doada. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 61, n. 3, p. 169–172, 2002.

REHANY, U.; BALUT, G.; LEFLER, E., RUMELT, S. The prevalence and risk factors for corneal donor button contamination and its association with ocular infection after transplantation. **Cornea**, v. 23, n. 7, p. 649–654, 2004.

RIECK, P. W.a, GIGON, M., JAROSZEWSKI, J., PLEYER, U. & HARTMANN, C. Increased Endothelial Survival of Organ-Cultured Corneas Stored in FGF-2 Supplemented Serum-Free Medium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 9, p. 3826–3832, 2003.

RIECK, P. W.b, von STOCKHAUSEN, R. M., METZNER, S., HARTMANN, C. & COURTOIS, Y. Fibroblast growth factor-2 protects endothelial cells from damage after corneal storage at 4°C **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 241, p. 757–764, 2003.

RITTERBAND, D. C.; SHAH, M. K.; MESKIN, S. W.; SHAPIRO, D. E.; SEEDOR, J. A.; KOPLIN, R. S.; HU, D. N.; SHAO, S.; DAHL, P.; MCCORMICK, S. Efficacy and safety of moxifloxacin as an additive in Optisol-GS a preservation medium for corneal donor tissue. **Cornea**, v. 25, n. 9, p. 1084–1089, 2006.

SIMON, M., FELLNER, P., EL-SHABRAWI, Y. & ARDJOMAND, N. Influence of donor storage time on corneal allograft survival. **Ophthalmology**, v. 111, n. 8, p. 1534-1538, 2004.

SLATTER, D. & HAKANSON, N. Córnea e Esclerótica. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais** São Paulo: Manole, 2^a ed., v. 2, Cap. 86, p. 1436–1461, 1998.

THIEL, M. A.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. The potential of antibody-based immunosuppressive agents for corneal transplantation. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, p. 93–105, 2003.

THURET, G., MANISSOLLE, C., HERRAG, S., DEB, N., CAMPOS–GUYOTAT, L., GAIN, P. & ACQUART, S. Controlled study of the influence of storage medium type on endothelial assessment during corneal organ culture. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, p. 579–581, 2004.

TRINDADE, F. C. Transplante de Córnea. In: PEREIRA, W. A. **Manual de Transplante de Órgãos e Tecidos**. São Paulo: Guanabara Koogan - MEDSI, 3^a ed., Cap. 18, p. 473–481, 2004.

WHITLEY, R. D. & GILGER, B. C. Diseases of the Canine Cornea and Sclera. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3^a ed., Cap. 19, p. 635–673, 1998.

WILHELMUS, K. R.; HASSAN, S. S. The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. **Ophthalmology**, v. 114, n. 3, p. 440–445, 2007.

WILSON, S. E., BOURNE, W. M. Corneal preservation. **Survey of Ophthalmology**, v. 33, p. 237–59, 1989.

WING CHU. The past twenty-five years in eye banking. **Cornea**, v. 19, p. 754–765, 2000.

YAMASAKI, K. & INOUÉ, T. Ultrastructural changes in rat corneal endothelium preserved at low temperature. **Yonago Acta Medica**, v. 44, p. 17–24, 2001.

ZANETTI, E.; BRUNI, A.; MUCIGNAT, G.; CAMPOSAMPIERO, D.; FRIGO, A. C.; PONZIN, D. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. **Córnea**, v. 24, n. 5, p. 603–607, 2005.

ARTIGO CIENTÍFICO

Preservação de córneas de felinos domésticos (*Felis catus* – Linnaeus, 1758) em conservante utilizando a água de coco como meio nutritivo

Fábio L. S. Pina,* Fabrício B. Sá,† Bruno O. F. Souza,* Taciana P. Spinelli, † Regina C. B. Q. Figueiredo, †† e Acácio A. S. L. Filho*†

*Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, Pernambuco, Brazil; †Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Recife, Pernambuco, Brazil; †† Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil; *† Departamento de Oftalmologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, São Paulo, Brazil.

Endereço para comunicação:
Fabrício B. Sá
Fone: +55 81 33206349
Fax: +55 81 33206391
e-mail: crleucas@yahoo.com

Resumo

As células do endotélio corneal apresentam a importante função de bomba e barreira osmótica, mantendo assim a córnea transparente. A perda destas células, seja por qualquer motivo, torna a córnea opaca, influenciando negativamente na capacidade visual do indivíduo. Por este fato, a conservação de córneas para fins de transplante tem evoluído bastante ao longo dos anos. Devido às características físico-químicas desejáveis e ao baixo custo da água de coco, o objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade do uso da água de coco como meio nutritivo em conservantes de córnea. Um total de nove gatos, sem nenhuma patologia corneal em curso, foi submetido à eutanásia. Uma das córneas de cada animal foi avaliada imediatamente, sendo a outra avaliada após a preservação no meio com água de coco nos dias 3, 7 e 14. As córneas foram processadas para microscopia óptica, revelando-se inviáveis a partir do 3º dia de conservação, apresentando alterações morfológicas, sinais de morte celular e espessura estromal aumentada, indicando edema importante. Concluiu-se que a água de coco não serviu como meio nutritivo para conservantes de córneas de felinos domésticos, porém as córneas, devido à ausência de contaminação do meio, podem ser utilizadas em transplantes tectônicos e ceratoplastias lamelares.

Palavras-chave: endotélio corneal, água de coco, gato, preservação

INTRODUÇÃO

A primeira ceratoplastia penetrante de sucesso realizada no homem aconteceu por volta de 1906 por Zirm. O tecido foi obtido do olho de um doador vivo que necessitou de enucleação. Muito tem mudado desde então,¹ pois o transplante a fresco tornava a ceratoplastia penetrante um procedimento de emergência, impedindo a realização de exames prévios (ex.: microscopia especular e sorologia) que garantissem a viabilidade das células endoteliais, e da córnea.^{2,3,4} O avanço de técnicas cirúrgicas, medicamentos, instrumentais e meios de conservação contribuiu com o alto grau de sucesso dos transplantes de córnea.¹ Para realização dos transplantes, no

entanto, se faz necessário um grande número de córneas a serem avaliadas. Por isso, estudos visando a melhoria da preservação de córneas são realizados até os dias atuais.⁵ Segundo Pels¹ e Andrew et al.⁶, um meio de conservação ideal tanto para cães e gatos como para seres humanos ainda precisa ser formulado.

Grande avanço tem sido notado nos últimos dez anos no campo dos meios de preservação de córnea,⁷ porém, desde 1994, poucas novidades têm surgido em relação aos meios de conservação.⁸ A preservação de tecido corneal requer meio específico para maximizar a integridade do botão doador, sendo o fator mais importante para o sucesso dos transplantes.^{7,8} Atualmente as córneas podem ser preservadas tanto em organoculturas a 34°C, método preferido dos bancos de olhos da Europa; ou conservação hipotérmica a 4°C, método este utilizado nos Estados Unidos da América e em vários outros países. A criopreservação tem um baixo índice de sucesso, além de demandar pessoal treinado e custo operacional elevado.^{8,9}

Dos meios utilizados para conservação hipotérmica da córnea, o Optisol-GS é considerado atualmente o padrão ouro, devido sua capacidade de manter viáveis as células endoteliais para fins de transplante, sendo atualmente utilizado pelos Estados Unidos e vários outros países,^{8,6,10} como no Brasil, onde é utilizado por 64% dos bancos de olhos.¹¹ Este contém sulfato de condroitina 2, 5% e dextran 1%, gentamicina (100 µg/ml) e streptomina (200 µg/ml), além de misturar meio de cultura TCM 199 com meio essencial mínimo (MEM). Ainda apresenta uma mistura de soluções tampão (bicarbonato e Hepes), várias vitaminas e aminoácidos, vermelho fenol, antioxidantes e precursores da adenosina trifosfato (ATP).¹²

O endotélio corneal é uma monocamada simples de células hexagonais, localizada na superfície posterior da córnea. Devido a grande quantidade de mitocôndrias, o endotélio corneal apresenta elevada atividade metabólica, neutralizando o edema corneal pela remoção de líquido em excesso do estroma através da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e da bicarbonato-dependente Mg²⁺-ATPase. Estas “bombas iônicas” ficam situadas principalmente na lateral da membrana plasmática. O endotélio também forma uma barreira entre o humor aquoso e o estroma corneal através de junções intercelulares. Desta maneira, através das funções de barreira e de bomba, as células endoteliais mantêm a transparência corneal.^{6,13-17}

Semelhante ao cão e primatas não-humanos, o gato tem uma habilidade limitada para a regeneração do endotélio corneal.^{18,19} Ao contrário do epitélio corneal, que tem um notável poder de regeneração, o endotélio de uma córnea madura tem baixíssimo poder de mitose, e responde a

traumas primariamente com hipertrofia e migração celular. O aumento celular aparece como resultado da perda de células, que é compensada com hipertrofia celular. Distúrbios na função endotelial permitem que a água penetre o estroma e rompa o arranjo paralelo das fibras colágenas, resultando em opacificação corneal.^{12,13,20-24}

A água de coco é um isotônico natural existente na cavidade da semente do coco, rica em nutrientes e de grande importância na germinação da semente e na sobrevivência da plântula. Começa a se formar mais ou menos um mês e meio após a polinização da flor feminina, e alcança seu volume máximo em torno de seis meses de idade. É exatamente nesse período que o fruto deve ser colhido para consumo *in natura*, ou para consumo agroindustrial, pois além da maior quantidade de água, ela é muito saborosa, rica em nutrientes e livre de gordura, o que a coloca em local de destaque para a saúde humana. A composição química média, no período ótimo de colheita do fruto, é a seguinte: pH: 4,8; calorias: 18,1; glicose: 4,4g/100ml; proteínas: 0,37mg; fósforo: 6,2mg/100ml; potássio: 175mg/100ml; cálcio: 17,5mg/100ml; magnésio: 8,5mg/100ml; sódio: 10,5mg/100ml; ferro: 0,06mg/100ml; vitamina C: 57mg/100g.²⁵⁻²⁸

A água de coco é utilizada em larga escala em áreas geográficas onde esta plantação ocupa vasta extensão, não só para o consumo diário, mas, também, como solução de hidratação oral, pois seu uso rotineiro faz parte dos hábitos alimentares de populações dessas áreas.^{28,29} Ela é capaz de manter a longevidade de células, culturas de tecidos, meios de cultura para vírus e bactérias, e para obtenção de vacinas contra febre aftosa, raiva e leishmaniose.²⁵

Campbell-Falck et al.³⁰ publicaram um relato de caso onde a água de coco foi utilizada com sucesso como fluido de hidratação intravenosa. Após este artigo, Pummer et al.³¹ analisaram a influência da água de coco na homeostase sanguínea, e não observaram diferenças em comparação com a solução salina fisiológica. Costa et al.³² investigou a eficiência da água de coco na preservação de folículos pré-antrais de cabras, obtendo bons resultados, principalmente quando da preservação deste em altas temperaturas. Silva et al.³³ obtiveram crescimento de folículos primordiais após cultura *in vitro* em meio contendo água de coco. Cardoso et al.³⁴ utilizaram a água de coco para diluição de sêmen canino, obtendo resultados semelhantes aos diluidores já utilizados. Devido a estes resultados positivos, somado ao fato deste líquido ter um baixo custo e qualidades químicas desejáveis, o objetivo deste estudo é verificar a eficácia da água de coco quando utilizada como meio nutritivo na composição de conservantes de córneas.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito córneas de 9 gatos sem raça definida, com sexo e idade variados foram utilizadas neste estudo. Os animais eram provenientes do Centro de Vigilância Ambiental (CVA) da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, sendo os mesmos utilizados de acordo com as normas da ARVO para utilização de animais em pesquisa. Os gatos eram considerados saudáveis a partir de exame físico, onde observou-se estado nutricional e hídrico, coloração de mucosas, temperatura retal e ausculta cardio-respiratória. Os mesmos eram considerados livres de afecções oculares através de exame oftálmico realizado imediatamente *post mortem*, em ambiente escuro. Para tal exame foram utilizados lente de magnificação (OptiVISIOR[®] Donegan Optical Company Inc., Lenexa, KS, U.S.A.) e lanterna clínica (Penlight Welch Allyn 76600, Skaneateles Falls, NY, U.S.A.), para inspeção dos anexos oculares; oftalmoscópio direto (oftalmoscópio direto Welch Allyn 11720, Skaneateles Falls, NY, U.S.A.), para examinar o segmento anterior; e oftalmoscópio binocular indireto (oftalmoscópio indireto HEINE SIGMA 150K, Kitchener, Ontário, Canadá) para fundoscopia. Animais com qualquer sinal de afecções oculares ou sistêmicas foram descartados do estudo.

Colírio contendo metilcelulose 2% foi instilado imediatamente após o exame oftálmico para prevenir ressecamento da córnea. A enucleação transconjuntival bilateral foi realizada dentro de 40 minutos após o óbito, sendo os pares de bulbos oculares colocados em sacos plásticos contendo solução de ringer lactato, e acondicionados em caixa isotérmica com gelo até o local da dissecação do anel córneo-escleral. Os bulbos oculares foram colocados por 3 minutos em solução de polivinilpovidona 3%, e depois lavados com solução de ringer lactato estéril. O anel córneo-escleral foi dissecado de maneira asséptica, incidindo a esclera aproximadamente a 1-2 mm do limbo, utilizando lâmina de bisturi nº 15. Esta incisão se estendeu ao redor de todo o limbo. Uma punção-incisão foi realizada no corpo ciliar com lâmina de bisturi nº 11, e a excisão final foi realizada com tesouras de córnea *Castroviejo* direita e esquerda. Todo este procedimento foi realizado dentro de 4 horas após o óbito dos animais. O tecido córneo-escleral foi lavado com solução de ringer lactato estéril para remover qualquer pequena partícula originada, por exemplo, da íris.

Para preparação do meio de preservação, foram selecionados dois cocos, da variedade anão verde, com idade entre 6 – 8 meses, coletados aleatoriamente na sede da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. Em um dos frutos foi

realizada análise físico-química (Tabela 1) através de espectrofotometria (espectrofotômetro Ultravioleta Digital Microprocessado, Q798U, QUIMIS, Brasil). Do outro fruto (mesmo cacho), foi extraído aproximadamente 250ml de água, onde esta foi filtrada em membrana de milipore (25microns). Em câmara de fluxo laminar, a água de coco foi adicionada em meio contendo sulfato de condroitina e dextran, HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2 etanesulfônico) e gentamicina.

Tabela 1. Composição da água de coco analisada por espectrofotometria.

Parâmetros	Expressão	Resultados
Cálcio	Ca	29,27 mg/100ml
Magnésio	Mg	7,87 mg/100ml
Sódio	Na	1,22 mg/100ml
Potássio	K	260,9 mg/100ml
Enxofre (Sulfato)	SO₄²⁻	Nd
Carbonato	CO₃²⁻	Ausente
Bicarbonato	HCO₃⁻	76,25 mg/100ml
Cloro (Cloreto)	Cl	62,1 mg/100ml
Ferro	Fe	0,037 mg/100ml
Manganês	Mn	0,092 mg/100ml
Molibdênio	Mo	0,0056 mg/100ml
Cobre	Cu	Ausente
Zinco	Zn	0,036 mg/100ml
Chumbo	Pb	Ausente
Glicose.....	C₆H₁₂O₆	3,04g/100ml
Índice pH	pH	4,6

nd: não determinado

Os anéis córneo-esclerais dos olhos esquerdos foram colocados em tubos *falcon* transparentes de 20ml, contendo o meio com água de coco (Tabela 2), e mantidos a 4±1°C para análise nos dias 3, 7 e 14 de conservação. Os anéis córneo-esclerais dos olhos direitos foram utilizados como grupo controle, e fixados (dia 0) em solução de McDowell,³⁵ para microscopia óptica.

Tabela 2. Componentes do meio de conservação de córnea com água de coco.

Meio base	água de coco
<i>Buffer</i>	HEPES
Gentamicina (mg/ml)	100
Sulfato de condroitina (%)	1,25
Dextran (%)	0,5
pH	6,5
Osmolaridade (mOsm/L)	305

HEPES: ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2 etanesulfônico

Para verificação de contaminação bacteriana, foi coletado 3ml do meio, de tubos *falcon* escolhidos aleatoriamente, nos dias 3, 7 e 14 para análise de bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Para minimizar os riscos de contaminação do meio, o pH foi mensurado nos dias 0 e 14 de conservação (medidor pH HI 9024, HANNA Instruments, EUA). A espessura do estroma corneal foi medida através do *software* Imagelab 2000[®], após captura da imagem microscópica utilizando câmara digital (KODAK C300, Recife, Pernambuco, Brasil), a fim de quantificar o edema.

Imediatamente após remoção do meio de preservação, os anéis córneo-esclerais foram imersos em solução fixadora. Os resultados da microscopia óptica de cada córnea dos olhos esquerdos foram comparados com os resultados das córneas dos olhos direitos. Para avaliação através da microscopia óptica, os fragmentos de córnea foram fixados em solução de McDowell, desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em historresina, cortado a 2 micrômetros (5 cortes para cada córnea), e corados com azul de toluidina (At) 0,1% e fucsina básica (Fb) 0,3%.³⁶ As lâminas com cortes histológicos foram examinados em objetiva de 40x, onde foram contados os núcleos das células endoteliais para análise quantitativa. O número de núcleos dentro de cinco cortes diferentes (campos 40x) foi contado, e a média por campo 40x calculada.³⁷ Para análise qualitativa, foi observada a integridade de todas as camadas corneais, assim como das respectivas células e espessura estromal, em objetivas de 20, 40 e 100x, e avaliação macroscópica da transparência corneal.

Para análise estatística foi realizado o teste t-Pareado, onde um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Dia 0:

As córneas apresentaram todas as camadas evidentes de um epitélio pavimentoso estratificado, com 5 a 6 camadas celulares bem definidas e orientadas perpendicularmente a espessura corneal (figura 1). Considerando as diferenças relativas entre as camadas do epitélio, todas as células apresentaram uniformidade de tamanho e morfologia nuclear e nucléolos. . O estroma continha número abundante de ceratócitos, com núcleos alongados e matriz extracelular (colágeno) regular. O endotélio se apresentou preservado como uma camada única, aderido à membrana de Descemet, com núcleos de formato achatados e próximos uns aos outros (figura 2). A espessura média do estroma foi de $587\mu\text{m}$ (figura 8). A densidade média, realizada através da contagem dos núcleos endoteliais foi de $3.123\text{cél}/\text{mm}^2$ (figura 9).

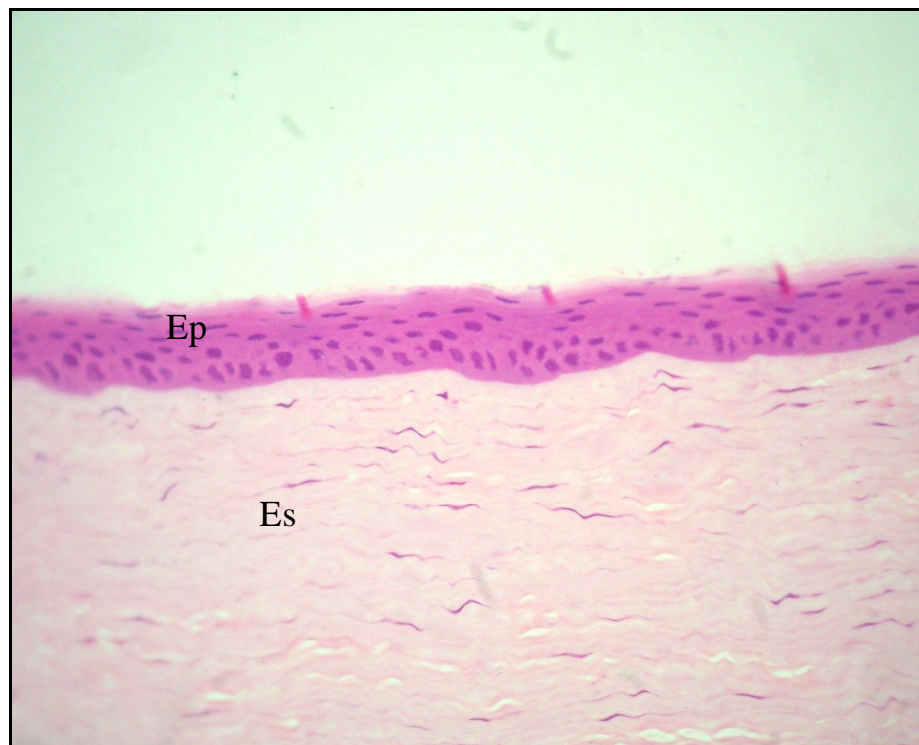


Figura 1. Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 0. Nota-se epitélio (Ep) e estroma (Es) corneal. FbXAt. 20X.

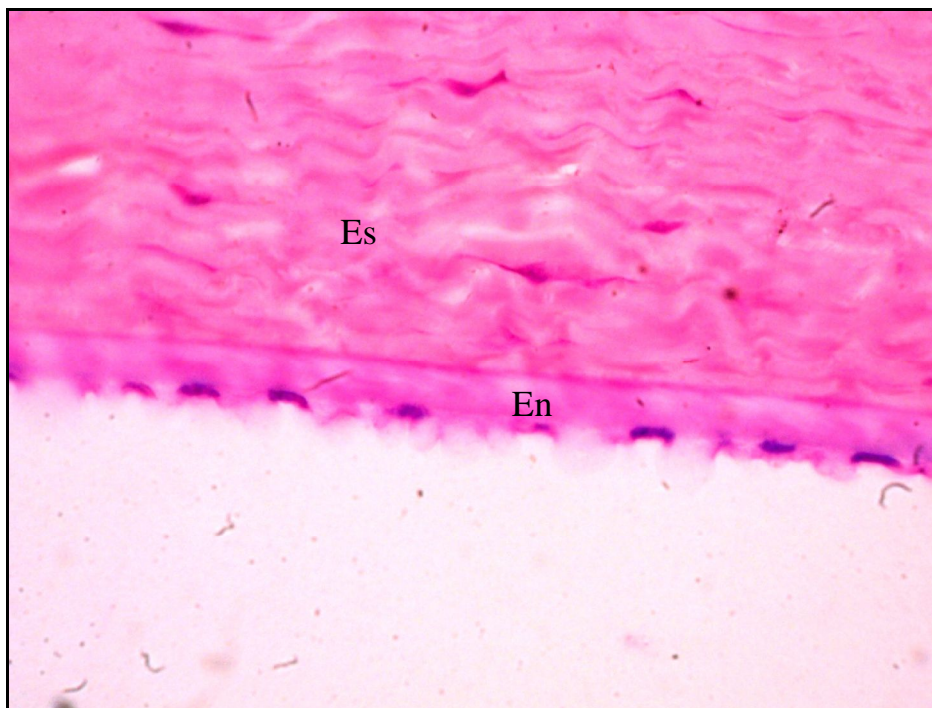


Figura 2. Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 0. Nota-se endotélio (En) e estroma (Es) corneal. FbXAt. 100X.

Dia 3:

As camadas superficial e intermediária do epitélio apresentaram irregularidades importantes quanto à forma e tamanho do núcleo, e citoplasma. As células basais mantiveram o formato colunar, porém seus núcleos apresentaram aspectos cariorréxicos, e alguns picnóticos. Em todas as camadas epiteliais várias células apresentaram tumefação celular (degeneração hidrópica ou vacuolar) (figura 3). O estroma apresentou núcleos dos ceratócitos de formato alongado e regular, porém com sinais de degeneração vacuolar, aumento da eosinofilia citoplasmática e irregularidade moderada da matriz extracelular (figura 4). O endotélio apresentou alguns núcleos picnóticos, outros de formato achatado, e algumas áreas com perda celular e exposição da membrana de Descemet. Também se evidenciou degeneração vacuolar (figura 5). Observou-se um aumento de 31,62% (904,11 μ m) na espessura média estromal (figura 8), em relação às córneas do dia 0, uma diminuição de 63,53% (1.139cél/mm²) na densidade das células endoteliais (figura 9), e transparência das córneas após preservação.



Figura 3. Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 3. Nota-se alterações epiteliais: cariorrexe (seta menor) e hidropsia (seta maior). FbXAt. 100X em contraste de Fase 3.

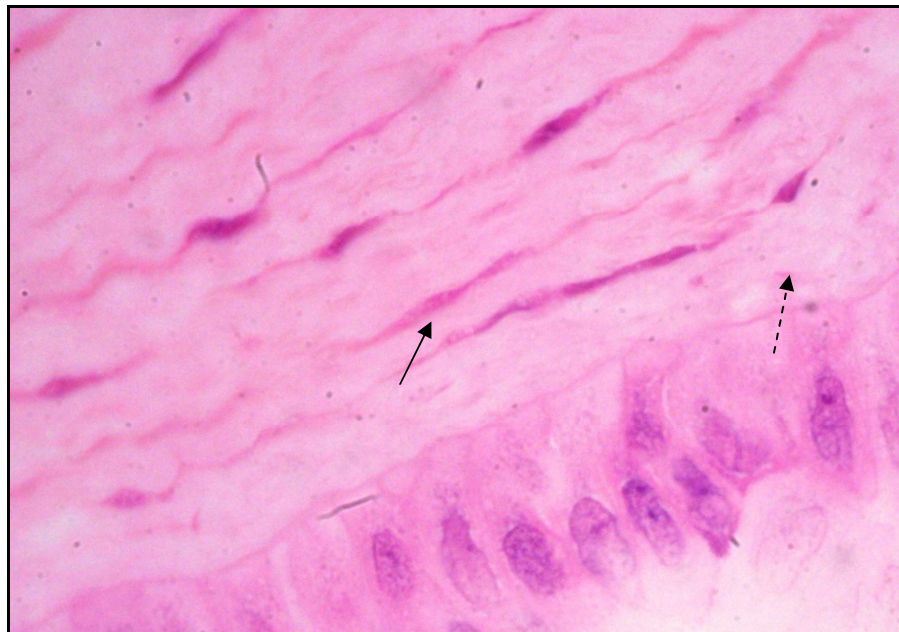


Figura 4. Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 3. Nota-se alterações estromais: aumento da eosinofilia nos ceratócitos (seta), irregularidade da matriz extracelular (seta trasejada). FbXAt. 100X .

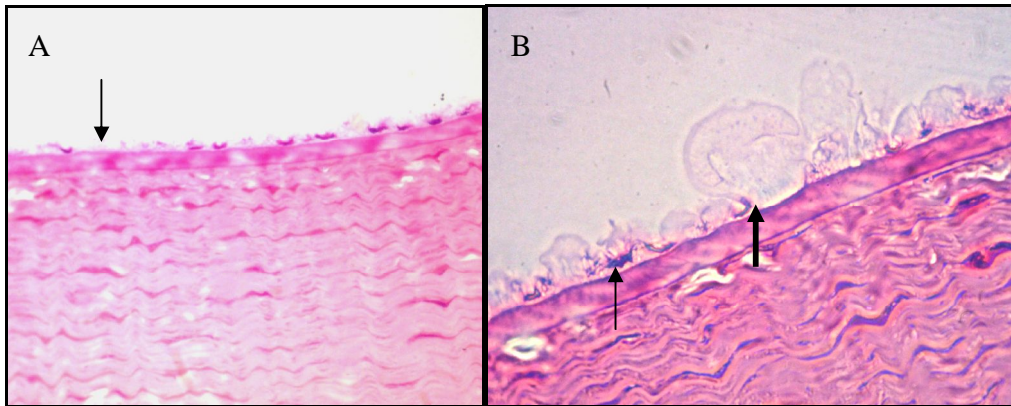


Figura 5. Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 3. Nota-se alterações na densidade endotelial com exposição da membrana de Descemet (seta) (A, FbXAt, 40X); células endoteliais com sinais de degeneração: picnose (seta menor) e degeneração hidrópica (seta maior) (B, FbXAt, 100X em contraste de Fase 3).

Dia 7:

O epitélio corneal apresentou camada superficial e intermediária em processo de descamação, e presença da camada basal com células apresentando irregularidade importante, e evidente hidropsia (figura 6). O estroma apresentou núcleos dos ceratócitos de formato alongado e regular, porém com sinais de degeneração vacuolar, e irregularidade de tecido extracelular importantes. Observaram-se perda do endotélio em algumas áreas da Descemet, apresentando este, vários núcleos de formato irregular, grandes espaços entre eles e sinais de degeneração vacuolar grave. Em comparação as córneas do dia 0 observou-se um aumento de 42,17% (1.088,23 μ m) na espessura estromal (figura 8), uma diminuição de 69,32% (958cél/mm²) na densidade das células endoteliais (figura 9), e perda parcial da transparência.

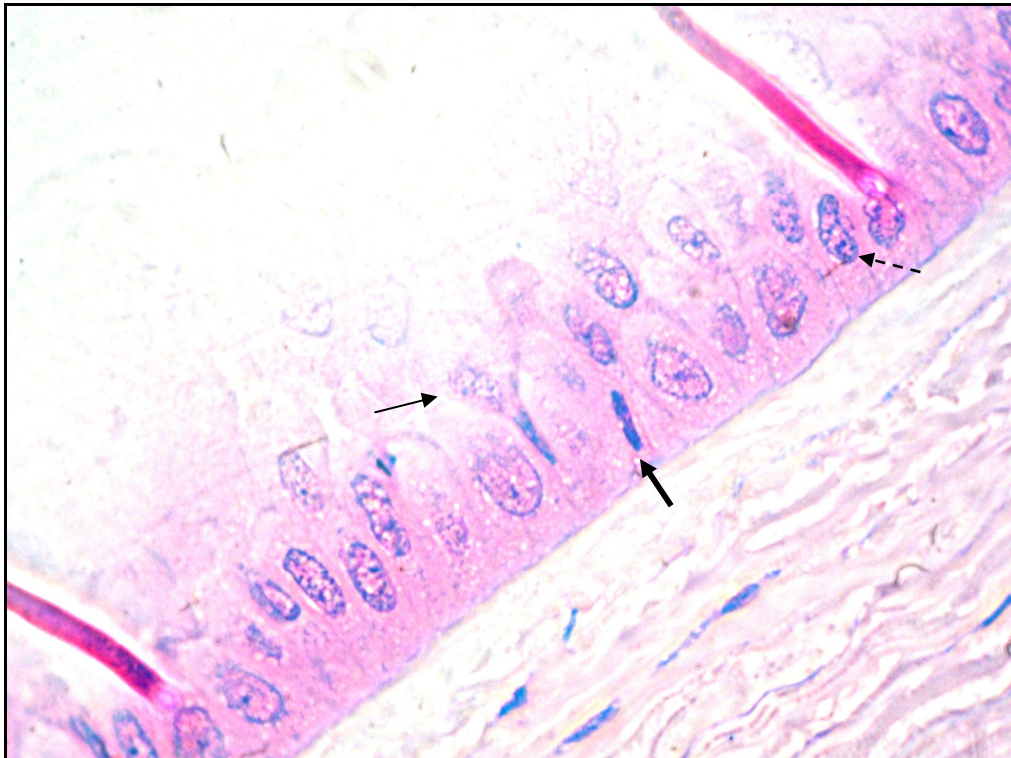


Figura 6. Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 7. Nota-se alterações epiteliais com descamação das camadas superficial e intermediária (seta menor), e basal com núcleos em picnose (seta maior) e cariorrexe (seta trasejada). FbXAt.100X em contraste de Fase 3.

Dia 14:

Através da microscopia óptica, não foram evidenciadas diferenças significativas na camada epitelial em relação ao dia 7. O estroma apresentou maior grau de irregularidade e número reduzido de ceratócitos, onde constatou-se vários ceratócitos de formato arredondado e irregularidade de matriz extracelular. Observou-se perda do endotélio em várias áreas ao longo da membrana de Descemet, com grande número de núcleos de formato irregular e sinais de degeneração vacuolar grave. A córnea como um todo se apresentou pouca corada (figura 7). Observaram-se um aumento importante de 59,37% (1.553,05 μ m) na espessura estromal (figura 8) em comparação ao grupo controle, e uma diminuição de 70,50% (921cél/mm²) na densidade das células endoteliais (figura 9). Em comparação com o dia 7, não foram observadas diferenças significativas, porém perda total da transparência corneal foi visibilizada.

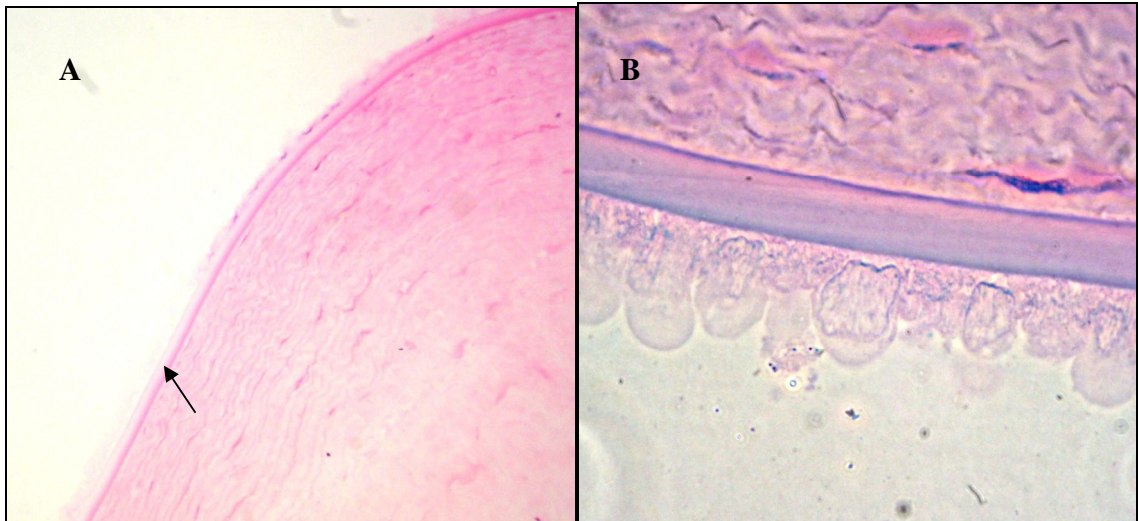


Figura 7. Fotomicrografia da córnea felina em corte transversal do dia 14. Nota-se grandes áreas ausentes de endotélio, com exposição da membrana de Descemet (seta) (A), e degeneração hidrópica importante (B). FbXAt. 100X em contraste de Fase 3.

O resultado das análises de bactérias aeróbicas e anaeróbicas foi negativo em todos os dias de conservação (dias 3, 7 e 14), e o valor inicial do pH (6,5) diminuiu para 5,6 no dia 14. Após análise do endotélio corneal, observou-se, desde o dia 3 de conservação, importante diminuição na densidade das células endoteliais em comparação as córneas do dia 0, inversamente proporcional a um aumento da espessura estromal, provavelmente secundário ao edema estromal (figura 10). Os resultados obtidos representaram uma redução significativa na população de células endoteliais, assim como um aumento significativo na espessura estromal ($P < 0,05$).

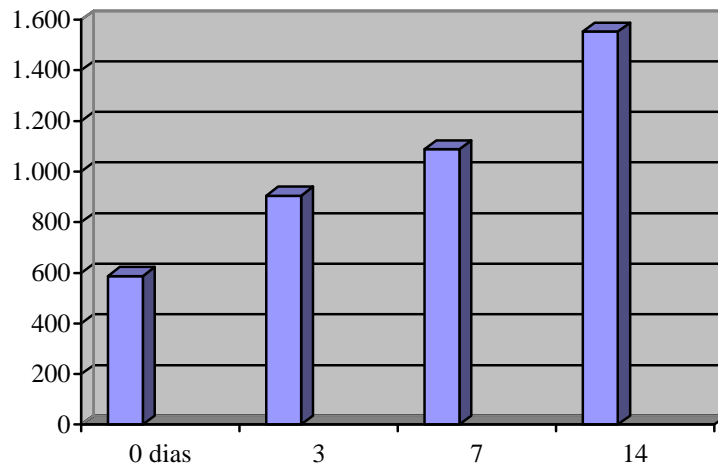


Figura 8. Espessura estromal das córneas (μm) após preservação em conservante com água de coco.

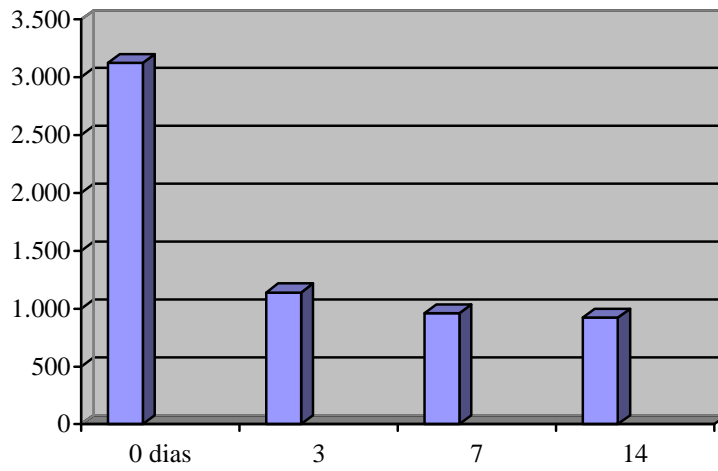


Figura 9. Densidade de células endoteliais (células/mm²) após preservação em conservante com água de coco.

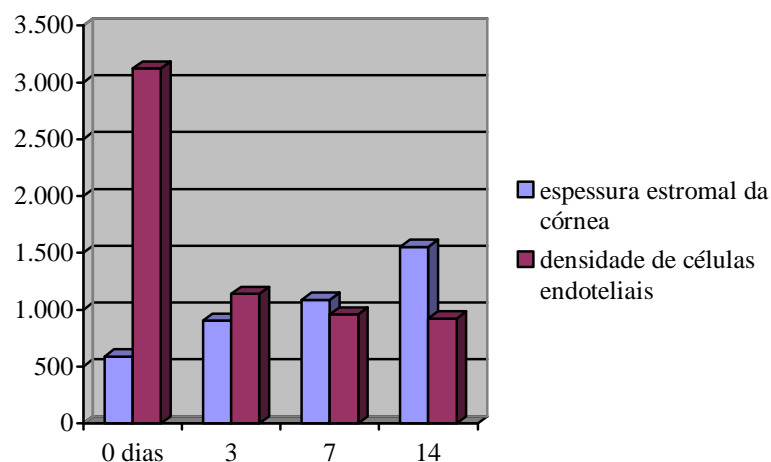


Figura 10. Espessura estromal (μm) x densidade de células endoteliais ($\text{cél}/\text{mm}^2$) após preservação em conservante com água de coco.

DISCUSSÃO

Vários autores³⁸⁻⁴³ têm utilizado coelhos para testar meios de conservação de córneas, porém neste estudo optou-se pela utilização de gatos domésticos, pois segundo Bahn et al.,²⁰ Hull et al.,⁴⁴ Matsuda et al.,⁴⁵ Geroski e Edelhouser⁴⁶ e Doughty,⁴⁷ infelizmente a grande capacidade de regeneração do endotélio corneal de coelhos transmite resultados que não são completamente análogos aqueles expressos pela córnea dos humanos e dos cães e gatos.

Atualmente, o Optisol[®] GS (Bausch & Lomb Surgical, Irvine, CA, U.S.A.) é o meio de conservação mais utilizado em vários países, incluindo o Brasil.^{8,6-11} Entretanto, devido ao custo elevado deste produto, e a necessidade de importação do mesmo, foi avaliado neste estudo os efeitos de um conservante, contendo água de coco, sobre a córnea de felinos domésticos. Optou-se pela água de coco como meio nutritivo do conservante em questão, pelo fato desta ser abundante em nossa região, além de apresentar características físico-químicas e custo satisfatório, corroborando com Aragão²⁵ que afirma que esta é capaz de manter a longevidade de células, podendo ser utilizada em culturas de tecidos.

Basicamente, toda a função corneal (estrutural e refrativa) depende do perfeito funcionamento do sistema de bombas de íons Na e K presentes no endotélio, garantindo a deturdecência e conseqüentemente a transparência corneal. Há estudos experimentais que

mostraram um aumento de 200 e 500% da espessura corneal após a retirada do epitélio e do endotélio, respectivamente.⁴⁸

O meio testado apresentou a maioria dos componentes importantes para formulação de um conservante de córnea. Foram utilizados sulfato de condroitina e dextran, com o objetivo de se evitar o edema corneal; gentamicina, para prevenir contaminação; HEPES, para ajuste do pH da solução; e a água de coco como meio nutritivo. Apesar desses constituintes, neste estudo não foi possível manter as células endoteliais viáveis como demonstrado pela microscopia óptica desde o dia 3 de conservação.

A concentração do sulfato de condroitina utilizada no meio testado foi de 1,25%, diferente da utilizada no Optisol-GS, por exemplo, que é de 2,5%. Estudo comparando a função corneal após conservação em Dexsol (sulfato de condroitina 1,35%) x Optisol (sulfato de condroitina 2,5%) revelou que este último possui melhor capacidade de prevenir o edema corneal durante a conservação.⁴² A baixa concentração da condroitina, associada também à baixa concentração de dextran 40 (0,5%), pode ser um dos motivos do insucesso do meio testado, uma vez que o dextran 40 nos meios já descritos encontra-se a 1%.^{6,12,42,49,50} Segundo Tachibana e Sawa,⁵⁰ o dextran, dependendo da concentração e do tempo de conservação, torna-se tóxico para o endotélio, resultando em edema corneal pós-operatório. Halberstadt et al.⁵¹ citam que o armazenamento em meios contendo dextran, por mais de 4 dias, é prejudicial às córneas, devido ao efeito tóxico do mesmo. De acordo com Jones et al.,⁵² agentes químicos exógenos induzem lesão e morte celular por dois métodos: ligação direta destes agentes as organelas celulares, lesionando-as ou interferindo na geração do ATP e energia necessária a homeostase e funcionamento normal celular; ou pela transformação química para metabólitos mais reativos que causam lesão permanente às membranas e morte celular. Tachibana e Sawa⁵⁰ referem à formulação de dois meios, onde um continha sulfato de condroitina 2,5% e o outro não possuía nenhuma substância coloidal. Nenhum dos dois tinha dextran em sua composição. O meio com a condroitina apresentou resultados tão bons quanto o Optisol, ao contrário do meio sem a condroitina.

Os Cocos gram-positivos são os contaminantes mais identificados nos tecidos corneais utilizados para transplante, sendo o *Streptococcus sp.* a espécie mais encontrada nos casos de endoftalmite pós-operatória.⁵³ Com a adição da streptomomicina ao Optisol, criou-se o Optisol-GS, apresentando este uma melhor cobertura antibiótica, assim prevenindo contra o desenvolvimento

das endoftalmites.^{8,12} Ainda segundo Kapur et al.,⁵³ a atividade antimicrobiana do Optisol-GS é reduzida em temperaturas de refrigeração, e aumentada em temperatura ambiente. Nossos resultados não corroboram com o exposto, pois, apesar de apresentar apenas gentamicina em sua composição, e o meio testado está sob refrigeração, este não apresentou crescimento bacteriano em nenhum dos dias de conservação. A ausência de contaminantes neste estudo deve-se também ao uso de práticas assépticas de preparação do tecido doador. Dentre estas, foi utilizado iodopovidona para imergir os bulbos oculares por três minutos antes da coleta do anel córneo-escleral, corroborando com Pels e Vrensen,⁵⁴ que afirma que esta solução é a mais utilizada, devido ao seu amplo espectro incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, protozoários e vírus.

Em todos os dias de conservação analisados observou-se perda progressiva das camadas superficial e intermediária do epitélio, com sinais de degeneração vacuolar das células epiteliais, indicando uma possível falha do meio testado em manter a integridade desta camada. Após eutanásia, em todos os animais foi colocado metilcelulose 2% a fim de evitar o ressecamento do epitélio, e todas as córneas foram acondicionadas em até 4 horas no meio de conservação, corroborando com Thoft e Friend,⁵⁵ Andrew et al.⁶ e Van Meter et al.,⁵⁶ onde estes afirmam que as córneas devem ser conservadas dentro de 5 a 6 horas do óbito do doador para não comprometer a integridade epitelial. Em estudo realizado por Wagoner e Gonnah,⁵⁷ um grande número de transplantes, onde as córneas foram preservadas em meios líquidos a 4°C por mais de 7 dias, apresentaram falhas epiteliais no primeiro dia do pós-operatório. Greenbaum et al.⁵⁸ observaram a perda de todas as células do epitélio corneal após quatro dias de conservação, com exceção da camada basal, corroborando com nosso estudo, onde também foi evidenciada apenas a presença da camada basal. Jeng⁸ ainda reforça que um epitélio intacto se torna essencial para sobrevivência do enxerto após o transplante, pois um defeito epitelial pós-operatório pode demorar a cicatrizar, permitindo o surgimento de infecções, cicatrizes, afinamento do estroma, e perfuração corneal, contribuindo desta maneira para o insucesso da cirurgia (falha do enxerto).

Após preservação no meio com água de coco, a densidade de células endoteliais obtida nos dias 3, 7 e 14 foram 1.139, 958 e 921 céls/mm² respectivamente. Segundo estudo realizado por Patel et al.,⁵⁹ córneas apresentando densidade ≥ 2.500 céls/mm² foram aprovadas para transplantes, enquanto que aquelas com densidade inferior a 2.500 céls/mm² não foram transplantadas. Ao contrário do exposto, Arndt et al.¹² e Ehlers⁶⁰ citaram que córneas com

densidade inferior a 2.000 céls/mm² já foram utilizadas com sucesso nos transplantes, indicando que as córneas do dia 3 do nosso experimento poderiam ser utilizadas para transplante, uma vez que estas ainda demonstraram transparência após o período de conservação. Entretanto, Thuret et al.⁶¹ citam que os bancos de córneas geralmente não aprovam estas, pois a perda das células endoteliais ocorre desde a captação dos botões doadores até anos após o transplante, apresentando estas córneas um alto risco de não permanecerem transparentes.

Pelo exposto, vários fatores podem ter contribuído para o meio testado com água de coco não ter mantido a integridade das células epiteliais e endoteliais. Nogueira e Vasconcelos⁶² utilizaram a água de coco como meio de cultura em conservantes de córneas em um estudo experimental em coelhos. Estes autores sugeriram que a água de coco, *in vitro*, tem propriedades para manter a deturpecência e conservação do epitélio e endotélio corneal. Costa et al.³² afirmaram que os bons resultados obtidos na conservação de folículos ovarianos de caprinos com a água de coco ocorreram provavelmente pela presença dos nutrientes contidos nesta solução, como proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento e hormônio vegetais. Estes mesmos autores, em concordância com Komuro et al.⁶³ e Ehlers,⁶⁰ citam que a baixas temperaturas, o metabolismo celular é reduzido, minimizando assim a necessidade metabólica das células, e tornando estas mais resistentes à baixa concentração de oxigênio e nutrientes durante a preservação, sugerindo que os resultados possam ter sido favoráveis por este fato.

Segundo Pels¹ os meios líquidos hipotérmicos não conseguem preservar o endotélio corneal devido à ausência de substâncias fundamentais como soro fetal bovino, encontrado nas organoculturas. Neste estudo, a microscopia óptica sugeriu que estes tecidos não estão adequados para transplante, e que o meio testado não desempenhou o papel importante de preservar o epitélio e endotélio corneal. Pelo exposto, a ausência de ATP e de outras substâncias suficientes para manter as células viáveis pode ter contribuído com estes resultados, corroborando com Silva et al.³³ que observaram maior grau de degeneração celular quando apenas água de coco foi utilizada para preservar folículos ovarianos caprinos. Estes mesmos autores ainda sugerem melhora na preservação celular a partir da suplementação da água de coco com piruvato, glutamina e hipoxantina. Em estudo realizado por Chen et al.,⁶⁴ Nelson et al.⁶⁵ e Jeng,⁸ constatou-se que a suplementação com β-hidroxiacetato, um corpo cetônico, permite manter a atividade metabólica durante a preservação, gera altos níveis de ATP, enquanto diminui a formação e acúmulo de lactato, mantendo assim a espessura tecidual e integridade celular.

Recentemente, um artigo publicado por Rauen et al.⁹ demonstrou que o endotélio é muito sensível a baixas temperaturas e que, em meios líquidos à 4°C, possa ocorrer a formação de radicais livres (dependentes de ferro), induzindo assim a apoptose celular. Meisler et al.⁶⁶ demonstraram que há formação óxido nítrico em meios de preservação de córneas, onde estes também atuam como radicais livres, prejudicando a integridade celular. Estes podem ser fatores que tornaram as córneas inviáveis após preservação no meio testado, provavelmente devido ao meio não apresentar concentrações satisfatórias de substâncias antioxidantes, e apresentar ferro em sua composição. Entretanto, neste artigo não tivemos subsídios suficiente para quantificar e afirmar até que ponto tais substâncias seriam responsáveis pela morte celular ocorrida. Segundo Rubowitz et al.,⁶⁷ Meisler et al.⁶⁶ e Rauen et al.,⁹ a adição de substâncias como: quelantes de ferro, inibidores da oxido nítrico sintetase e glutathione podem ter efeitos benéficos na redução da perda celular.

Em relação ao pH, o meio testado foi ajustado em 6,5. Tachibana e Sawa⁵⁰ citam que o endotélio corneal tolera uma variação de pH entre 6,5 a 8,5, e que meios formulados com pH dentro desta faixa são aceitáveis. Apesar da utilização de HEPES, com o objetivo de manter o pH aceitável pela córnea, observou-se aos 14 dias de conservação uma diminuição importante para 5,6. Segundo Chen et al.⁶⁴ e Moller-Pedersen et al.,³ a diminuição do pH pode ter ocorrido pela glicólise no meio, levando ao aumento na concentração de lactato, e tornando o meio ácido. Jones et al.⁵² citam que em casos de hipóxia o funcionamento das mitocôndrias fica comprometido, reduzindo a disponibilidade de ATP, sem o qual as bombas iônicas deixam de funcionar. Temporariamente, a via glicolítica anaeróbica fornece ATP, mas a liberação de ácido láctico e de outros ácidos orgânicos, e a queda no pH intracelular, reduz ainda mais a produção do ATP. Como desde o dia três de conservação já existiam alterações morfológicas, indicando a inviabilidade das córneas, acredita-se que o pH não tenha influenciado nestes resultados, corroborando com Chen et al.⁶⁴ e Moller-Pedersen et al.,³ onde os mesmos sugeriram que o pH extracelular, neste valor, não interfere no pH intracelular. Entretanto, o estresse metabólico no tecido pode aumentar.

A osmolaridade do meio com água de coco foi de 305mOsm/L, mais baixa que Optisol-GS que é de 351mOsm/L. Segundo Nelson et al.⁶⁵ e Tachibana e Sawa,⁵⁰ a capacidade do Optisol-GS em manter a transparência e evitar o edema estromal ocorre devido a esta “alta” osmolaridade. Talvez esta osmolaridade mais baixa apresentada pelo meio em teste, possa ter

influenciado no aumento do edema estromal observado, uma vez que o endotélio corneal suporta valores de osmolaridade entre 200 - 400mOsm/L.

Os resultados obtidos com este estudo indicam que a água de coco não serviu como meio nutritivo para córneas de gatos domésticos, devido às alterações morfológicas observadas no epitélio e endotélio corneais através da microscopia óptica. O fato do meio não ter apresentado contaminação bacteriana torna possível o uso das córneas em transplantes tectônicos e ceratoplastias lamelares, onde o enxerto corneal servirá como proteção a integridade do bulbo ocular, livrará a córnea de infecções, em casos de *melting* corneal, tendo em vista a capacidade do mesmo em promover suporte a epitelização e substrato estromal.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Gonzaga (IPA), a Ophthalmos Indústria Farmacêutica Ltda, e a VETNIL, pelo apoio técnico; e a CAPES, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Pels L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. *British Journal of Ophthalmology* 1997; 81: 523 – 525.
2. Albon J, Tullo AB, Aktar S *et al.* Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000; 41: 2887 – 2893.
3. Moller-Pedersen T, Hartmann U, Moller HJ *et al.* Evaluation of potential organ culture media for eye banking using human donor corneas. *British Journal of Ophthalmology* 2001; 85: 1075 – 1079.
4. Alvim HS, Diniz CM, Tzelikis PFM *et al.* Técnica para preparação e conservação de olhos de porco para cirurgia experimental. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2003; 66: 627 – 30.
5. Koniarek JP, Lee H-B, Rosskorhen HD *et al.* Use of Transendothelial Electrical Potential Difference to Assess the Chondroitin Sulfate Effect in Corneal Preservation Media. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1988; 29: 657 – 660.
6. Andrew SE, Samuelson DA, Lewis PA *et al.* Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. *Veterinary Ophthalmology* 1999; 2: 155 – 161.

7. Simon M, Fellner P, El-Shabrawi Y *et al.* Influence of donor storage time on corneal allograft survival. *Ophthalmology* 2004; 111: 1534 – 1538.
8. Jeng BH. Preserving the cornea: corneal storage media. *Current Opinion in Ophthalmology* 2006; 17: 332 – 337.
9. Rauen U, Kerkweg U, Wusteman MC *et al.* Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron - implications for corneal preservation. *Cornea* 2006; 25: 68 – 77.
10. Wing Chu. The past twenty-five years in eye banking. *Cornea* 2000; 19: 754 – 765.
11. Pereira MLM, Santos AMC, Passos MC *et al.* Análise comparativa entre os bancos de olhos brasileiros: da preservação à distribuição da córnea doada. *Revista Brasileira de Oftalmologia* 2002; 61: 169 – 172.
12. Arndt C, Reese S, Köstlin R. Preservation of canine and feline corneoscleral tissue in Optisol® GS. *Veterinary Ophthalmology* 2001; 4: 175 – 182.
13. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003; 22: 359 – 389.
14. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004; 45: 1743 – 1751.
15. Konomi K, Zhu C, Harris D *et al.* Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2005; 46: 4086 - 4091.
16. Gomes P, Srinivas SP, Vereecke J *et al.* Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research* 2006; 83: 1225 – 1237.
17. Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9: 101 – 107.
18. Armitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Predicting Endothelial Cell Loss and Long-Term Corneal Graft Survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003; 44: 3326 – 3331.
19. Gelatt KN. Doenças e cirurgia da córnea e esclera do cão. In: *Manual de Oftalmologia Veterinária* 1st edn (ed. Gelatt KN) Manole, São Paulo, 2003; 125 – 164.
20. Bahn CF, Meyer RF, MacCallum DK *et al.* Penetrating keratoplasty in the cat: a clinically applicable model. *Ophthalmology* 1982; 89: 687 – 699.

21. Slatter D, Hakanson N. Córnea e esclerótica. In: *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais* 2nd edn (ed Slatter D.) Manole, São Paulo, 1998; 1436 – 1461.
22. Whitley RD, Gilger BC. Diseases of the canine cornea and sclera. In: *Veterinary Ophthalmology* 3rd edn (ed. Gelatt KN) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1998; 635 – 673.
23. Koh SM, Waschek JA. Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000; 41: 4085 – 4092.
24. Hudde T, Comer RM, Kinsella MT *et al.* Modulation of hydrogen peroxide induced injury to corneal endothelium by virus mediated catalase gene transfer. *British Journal of Ophthalmology* 2002; 86: 1058 – 1062.
25. Aragão WM. A importância do coqueiro-anão verde. In: <http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos/2000/artigo.2004-12>. Acesso em: 20 jul. 2005.
26. Aragão WM, Cruz EMO, Helvécio JS. Caracterização morfológica do fruto e química da água de coco em cultivares de coqueiro anão. *Agrotrópica* 2001; 13: 49 – 58.
27. Costa JMC, Alves MCS, Clemente E *et al.* Características físico-químicas e minerais de água de coco de frutos da variedade anã amarelo em diferentes períodos de maturação. *Acta Science Agronomia* 2006; 28: 173 – 177.
28. Vigliar R, Sdepanian VL, Fagundes-Neto U. Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in na inland region. *Jornal de Pediatria* 2006; 82: 308 – 312.
29. Camargo AAP, Neto UF. Transporte transepitelial de água, sódio e glicose da “água” de coco, em alças jejunais de ratos submetidos à perfusão “in vivo”, nos diferentes estágios do processo de maturação do fruto. *Jornal de Pediatria* 1994; 70: 100 – 104.
30. Campbell-Falk D, Thomas T, Falck TM *et al.* The intravenous use of coconut water. *American Journal of Emergency Medicine* 2000; 18: 108 – 111.
31. Pummer S, Heil P, Maleck W *et al.* Influence of coconut water on hemostasis. *American Journal of Emergency Medicine* 2001; 19: 287 – 289.
32. Costa SHF, Santos RR, Ferreira MAL *et al.* Preservation of goat preantral follicles in saline or coconut water solution. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2002; 39: 324 – 330.

33. Silva JRV, van den Hurk R, Costa SHF *et al.* Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science* 2004; 81: 273 – 286.
34. Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Animal Reproduction Science* 2006; 92: 384 – 391.
35. McDowell EM, Trump BF. Histologic fixative suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 1976; 100: 405 – 414.
36. Junqueira LCU. Histology revised-technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. **Ciência e Cultura** 1995; 47: 92 - 95.
37. Williams KK, Noe RL, Grossniklaus HE, Drews-Botsch C, Edelhauser HF. Correlation of histologic corneal endothelial cell counts with specular microscopic cell density. *Archives of Ophthalmology* 1992; 110: 1146 – 1149.
38. McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Investigative Ophthalmology* 1974; 13: 165 – 173.
39. Sakimoto T, Valenti J, Itoi M *et al.* Intermediate-term corneal storage. *Investigative Ophthalmology* 1974; 219 – 228.
40. Hull DS, Green K, Bowman K. Corneal water and electrolyte content following storage in moist chamber and MK medium. *Investigative Ophthalmology* 1976; 778 – 781.
41. Hull DS, Berdecia R, Green K. Corneal storage in MK Medium and K-Sol. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1987; 28: 2088 – 2091.
42. Walkenbach RJ, Corwin G, Ye G-S. Corneal function after storage in commercial eye bank media. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1991; 32: 1551 - 1557.
43. Sandboe FD, Medin W, Frosliø KF. Influence of temperature on corneas stored in culture medium. A comparative study using functional and morphological methods. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2003; 81: 54 – 59.
44. Hull DS, Green K, Thomas L *et al.* Hydrogen peroxide-mediated corneal endothelial damage induction by oxygen free radical. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1984; 25: 1246 – 1253.
45. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF *et al.* Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1985; 26: 443 – 449.

46. Geroski DH, Edelhauser HF. Morphometric analysis of the corneal endothelium specular microscopy vs. Alizarin red staining. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1989; 30: 254 – 259.
47. Doughty MJ. Subjective vs. objective analysis of the corneal endothelial cells in the rabbit cornea by scanning electron microscopy – a comparison of two different methods of corneal fixation. *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9: 127 – 135.
48. Samuelson DA. Ophthalmic Anatomy. In: *Veterinary Ophthalmology* 3rd edn (ed. Gelatt K.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1991: 31 – 150.
49. Walkenbach RJ, Boney F, Ye G-S. Corneal function after storage in Dextsol or Optisol. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1992; 33: 2454 – 2458.
50. Tachibana A, Sawa M. Development of novel corneal storage medium: first report. Examination of rabbit cornea. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2002; 46: 377 – 383.
51. Jones TC, Hunt RD, King NW. Células: morte das células e dos tecidos. In: *Patologia Veterinária* 6th edn (eds. Jones TC, Hunt RD, King NW.) Manole, São Paulo, 2000: 1 – 25.
52. Halberstadt M, Bohnke M, Athmann S, Hagenah M. Cryopreservation of Human Donor Corneas with Dextran. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003; 44: 5110 – 5115.
53. Kapur R, Tu EY, Pendlan SL, Fiscelle R, Sugar J. The effect of temperature on the antimicrobial activity of Optisol-GS. *Cornea* 2006; 25: 319 – 324.
54. Pels E, Vrensen GFJM. Microbial decontamination of human donor eyes with povidone-iodine: penetration, toxicity, and effectiveness. *British Journal of Ophthalmology* 1999; 83:1019 - 1026.
55. Thoft RA, Friend J. Corneal epithelial changes during midterm storage. *Investigative Ophthalmology* 1976; 15: 82 – 88.
56. Van Meter WS, Katz DG, White H *et al.* Effect of to death-to-preservation time on donor corneal epithelium. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 2005; 103: 209 – 224.
57. Wagoner MD, Gonnah E. Corneal graft survival after prolonged storage in Optisol-GS. *Cornea* 2005; 24: 976 – 979.
58. Greenbaum A, Hasany SM, Rootman D. Optisol vs Dextsol as storage media for preservation of human corneal epithelium. *Eye* 2004; 18: 519 – 524.

59. Patel HY, Brookes NH, Moffatt L *et al.* The New Zealand National Eye Bank Study 1991–2003 a review of the source and management of corneal tissue. *Cornea* 2005; 24: 576 – 582.
60. Ehlers, N. Corneal banking and grafting. The background to the Danish Eye Bank System, where corneas await their patients. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2002; 80: 572 – 578.
61. Thuret G, Manissolle C, Acquart S *et al.* Urgent need for normalization of corneal graft quality controls in french eye banks. *Transplantation* 2004; 78: 1299 – 1302.
62. Nogueira RDM, Vasconcelos PRL. Água de coco como meio de cultura em conservante de córnea: estudo experimental em coelhos. *Revista Brasileira de Oftalmologia* 2000; 59: 395 – 401.
63. Komuro A, Hodge DO, Gores GJ, Bourne WM. Cell death during corneal storage at 4° C. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1999; 40: 2827 – 2832.
64. Chen C-H, Rama P, Chen AH *et al.* Efficacy of media enriched with nonlactate-generating substrate for organ preservation: in vitro and clinical studies using the cornea model. *Transplantation* 1999; 67: 800 – 808.
65. Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. In vitro comparison of Chen medium and Optisol-GS medium for human corneal storage. *Cornea* 2000; 19: 782 – 787.
66. Meisler DM, Koeck T, Connor JT *et al.* Inhibition of nitric oxide synthesis in corneas in storage media. *Experimental Eye Research* 2004; 78: 891 – 894.
67. Rubowitz A, Assia EI, Rosner M *et al.* Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2003; 44: 1866 – 1870.