

Transplante de membrana amniótica canina criopreservada para cicatrização de córnea com deficiência de células límbicas em coelhos

[*Transplantation of cryopreserved canine amniotic membrane for cicatrization in cornea with limbal stem cells deficiency in rabbits*]

D.N. Cremonini¹, J.J.T. Ranzani², M.E.A. Marques³, G.N. Rodrigues², C.V.S. Brandão²

¹Aluna de pós-graduação - FMVZ-UNESP – Botucatu, SP

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu, SP
Caixa Postal 560

18618-000 – Botucatu, SP

³Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP – Botucatu, SP

RESUMO

Avaliaram-se as alterações relacionadas à deficiência das células límbicas precursoras do epitélio corneano de coelhos e o efeito da membrana amniótica sobre sua cicatrização. A lesão, induzida com n-heptanol associado à peritomia conjuntival em 360°, foi recoberta com membrana amniótica canina, suturada à episclera perilímbica, criopreservada em meio para congelamento de embrião ou em meio próprio, ambos com glicerol a 50% e mantida a -80°C. O grupo-controle não foi tratado com a membrana. As avaliações histológicas foram realizadas aos sétimo, 15° e 30° dias. Todos desenvolveram deficiência de células germinativas do limbo, denominada conjuntivalização, com presença de neovascularização, inflamação e defeitos epiteliais recorrentes, caracterizada na histopatologia pela presença de neovasos, edema, leucócitos e células caliciformes. O transplante de membrana amniótica não foi eficiente para o tratamento desta deficiência, entretanto auxiliou o processo de cicatrização da córnea.

Palavras-chave: coelho, córnea, criopreservação, membrana amniótica

ABSTRACT

Changes related to limbal stem cells deficiency in corneal epithelium in rabbits, as well as the results of amniotic membrane transplant on the cicatrization were evaluated. The ulcer was induced with n-heptanol associated to 360° conjunctival peritomy; the corneal surface was covered with canine amniotic membrane, sutured to perilimbal episclera, cryopreserved in embryo solution or own medium, both with 50% glycerol and stored at -80°C. The control group was not treated with membrane. Histological evaluations were performed at seven, 15, and 30 days. All of them developed limbal stem cells deficiency, named conjunctivalization, with neovascularization, inflammation and recurrent epithelial defects, observed in histopathology by the occurrence of neovascularization, edema, leukocytes and goblet cells. Thus amniotic membrane transplantation was not efficient in the treatment of limbal stem cells deficiency, however it helped in the process of cicatrization.

Keywords: rabbit, cornea, cryopreservation, amniotic membrane

INTRODUÇÃO

A região anterior do olho está em constante contato com o ambiente externo, sendo assim mais susceptível a traumas e agressões. Devido à sua estrutura relativamente simples, a resposta a qualquer insulto é limitada e muitas afecções

podem causar opacificação e perda da visão (Gomes et al., 2002). Em face da necessidade de manutenção da transparência, buscam-se métodos que reduzam a formação cicatricial. Dentre estes, a membrana amniótica tem apresentado resultados satisfatórios diante de diversas condições.

Recebido em 10 de maio de 2006

Aceito em 19 de setembro de 2007

E-mail: danidelete@yahoo.com.br

A superfície ocular é composta pelos epitélios da córnea, limbo e conjuntiva. O revestimento do epitélio da córnea é contínuo com o epitélio conjuntival bulbar e a transição entre eles é denominada limbo. Os três epitélios apresentam características comuns, porém diferenciam-se tanto fenotípica quanto funcionalmente. Além das células epiteliais, o limbo contém melanócitos, células de Langerhans e células precursoras do epitélio corneano, ou *stem cells* e a conjuntiva bulbar contém células caliciformes secretoras de mucina (células *goblet*), linfócitos, melanócitos e células de Langerhans. Externamente, encontram-se revestidos pelo filme lacrimal, apresentando uma íntima relação metabólica (Gomes et al., 2002).

Lesões corneanas recompõem-se por migração, mitose e adesão epitelial. As células epiteliais basais são o pivô do processo de mitose e o epitélio basal do limbo é o reservatório das células germinativas epiteliais da córnea (Dua e Azuara-Blanco, 2000). Essas lesões estimulam a resposta proliferativa da conjuntiva perilímbica, porém em condições normais, o epitélio límbico exerce estímulo inibitório à migração do epitélio conjuntival sobre a córnea. Quando uma lesão envolve áreas extensas do limbo, a barreira é removida e o epitélio conjuntival invade a córnea, acompanhado de neovascularização e células caliciformes, processo denominado conjuntivalização.

Dentre os procedimentos cirúrgicos realizados na superfície corneana, as membranas biológicas, frescas ou conservadas em glicerina, são descritas para proteção mecânica de lesões profundas ou progressivas; dentre estas, há diversos relatos da utilização de peritônio canino (Garcia et al., 1996), pericárdio equino (Barros et al., 1997), membrana amniótica (Barros et al., 1998; Sampaio et al., 2006) e cápsula renal equina (Andrade et al., 1999).

A membrana amniótica é composta por uma camada de epitélio cúbico simples e uma membrana basal espessa, formada basicamente de colágeno tipo IV e laminina, além de uma matriz estromal avascular, composta por tecido conectivo frouxo e por fibroblastos (Wynn e Corbett, 1969). Além da proteção mecânica, a membrana amniótica auxilia no processo de reparação, servindo como uma “membrana basal transplantada”, que age como substrato para a epitelização. Ela apresenta várias propriedades, como efeito antiadesivo da conjuntiva, proteção da ferida, adesão e migração das células epiteliais basais, redução de fibrose, prevenção da apoptose e restauração do fenótipo epitelial corneano (Kim e Tseng, 1995). Possui

ação antibacteriana (Kjaergaard et al., 2001), antiinflamatória (Shimmura et al., 2001), inibidora de proteinases (Kim et al., 2000), além de conter diversos fatores de crescimento, como EGF, TGF- β , HGF, que estimulam a reepitelização (Sato et al., 1998). Outra propriedade atribuída a ela é de não induzir a rejeição após o transplante, pelo fato de não expressar a maioria dos antígenos de histocompatibilidade HLA, causando mínima ou nenhuma resposta inflamatória (Houlihan et al., 1995).

Na medicina veterinária, a membrana amniótica conservada em glicerina foi descrita para ceratoplastia experimental em cães (Barros et al., 1998) e após ceratectomia para excisão de seqüestro corneano em felinos (Kavinski et al., 2002).

Em casos onde se detecta deficiência parcial ou total de células límbicas, o transplante de membrana amniótica associado ao transplante de limbo, autógeno ou alógeno, mostrou-se eficiente para a restauração da população de células germinativas (Shimazaki et al., 1997; Shimazaki et al., 1998).

Quanto à preservação da membrana amniótica, têm-se descrito vários métodos, dentre eles, solução fisiológica para utilização fresca (Mejia et al., 2000), glicerina (Kim e Tseng, 1995; Sampaio et al., 2006) e meios de criopreservação, como Eagle modificado de Dulbecco (Lee e Tseng, 1997), utilizado para transplante de córnea e DMSO 12% enriquecido (Shimazaki et al., 1997), ambos congelados a -80°C . Entretanto, não há relatos do meio ideal de conservação, visando a preservar a sua estrutura celular e, conseqüentemente, as propriedades relacionadas a ela.

Avaliou-se, neste experimento, por análise clínica e histológica, a reparação corneana em coelhos com deficiência de células germinativas límbicas, induzida por n-heptanol, com transplante de membrana amniótica preservada em meio de congelamento de embrião³ ou em meio próprio para membrana amniótica, ambos com glicerol a 50% e mantida congelada a -80°C .

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os critérios utilizados seguiram as normas para experimentação animal segundo a Association

for Research in Vision and Ophthalmology¹. Utilizou-se o olho direito de 63 coelhos, distribuídos em três grupos, sendo o primeiro referente ao grupo-controle (GI), não tratado com a membrana amniótica, o segundo, tratado com a membrana amniótica preservada em meio próprio para conservação² (GII) e o terceiro, com a membrana preservada em meio para conservação de embrião³ (GIII). Após avaliação diária, foram eutanasiados, com injeção intravenosa de cloreto de potássio⁴, sete animais de cada grupo, aos sete, 15 e 30 dias pós-cirúrgicos, para análise histológica do tecido corneano.

Utilizaram-se dois métodos de preservação, um próprio para membrana amniótica e outro para congelamento de embrião, composto por albumina bovina enriquecida, propondo-se a comparar a sua efetividade para outros materiais biológicos. Optou-se pelo método de criopreservação, ao invés de conservação em glicerina, para que fossem mantidas as características morfológicas da membrana amniótica e, conseqüentemente, as suas funções, como antibiótico, antiinflamatório e inibidor de proteinases (Kruse et al., 2000).

A placenta foi coletada em centro cirúrgico, durante cesariana de cadela a termo e lavada com solução fisiológica 0,9%, contendo 1g de cefalotina sódica⁵. Ânion e córion foram separados por descolamento e a membrana amniótica foi aderida em papel filtro de nitrocelulose estéril⁶, com a face epitelial para cima e recortada em quadrados de 4 x 4cm os quais foram acondicionados em recipiente estéril que continha um dos meios e mantidos em freezer a - 80°C, por período mínimo de 15 dias e máximo de quatro meses.

Todos os coelhos foram tranqüilizados com acepromazina⁷ e anestesiados com a combinação de tiletamina e zolazepam⁸. Procedeu-se à anti-sepsia da superfície ocular com solução de iodo-povidine a 5%, em solução fisiológica. A córnea foi anestesiada com colírio de proparacaína⁹. Sob observação em microscópio estereoscópico

cirúrgico¹⁰, utilizou-se haste de algodão embebida em solução de n-heptanol¹¹, sobre a córnea, incluindo 2 a 4 mm do limbo do olho direito, de forma centripeta, durante três minutos. A remoção do epitélio foi complementada por debridamento mecânico com bisturi e, em seguida, com haste de algodão seca. A superfície ocular foi imediatamente lavada com 60 ml de solução fisiológica a 0,9% estéril. Em seguida, procedeu-se à peritomia, em 360°, da conjuntiva límbica e peribulbar até 4mm do limbo. Após prévia reidratação da membrana amniótica em solução fisiológica, durante 15 minutos, esta foi posicionada sobre a córnea, com a face epitelial para cima, e suturada à conjuntiva e à episclera perilímbicas, com náilon 9-0 em oito pontos simples separados, recobrando toda a superfície corneana, à exceção dos animais do grupo-controle. Todos os animais foram mantidos com colar do tipo elizabetano, na tentativa de se evitar qualquer trauma ocular ou a remoção da membrana amniótica. Enquanto havia sinais de desepitelização corneana, instilou-se colírio de ciprofloxacina¹², três vezes ao dia, para fins profiláticos.

Ao final de cada período de observação, os animais foram novamente anestesiados, com o mesmo protocolo utilizado anteriormente e sacrificados com injeção de solução de cloreto de potássio, via intravenosa. O tecido corneano foi fixado e corado pelos métodos de hematoxilina/eosina (HE) e *periodic acid-Schiff* (PAS) com diástase.

Os animais foram avaliados diariamente, por iluminação direta com lanterna¹³, quanto à evolução dos sinais de fotofobia, blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival, opacidade, neovascularização e conjuntivalização. Essas alterações foram quantificadas de forma subjetiva em: 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – intenso (Munger, 2002). O tempo de permanência da membrana amniótica e da reepitelização corneana foram analisados com a instilação de colírio de fluoresceína¹².

Ao exame microscópico de luz, foram avaliados parâmetros referentes ao número de camadas e maturidade das células epiteliais, espessura da membrana basal, edema, neoformação vascular, presença e tipo de infiltrado inflamatório e presença de células calciformes no epitélio corneano (Spencer, 1985; Margo e Grossniklaus, 1991).

¹Aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – UNESP – Botucatu, SP

²Meio para conservação de membrana amniótica – Ophthalmos – São Paulo, Brasil.

³Emcare® – ICP Biotechnology Ltd. – Auckland, Nova Zelândia.

⁴Cloreto de potássio 19,1% – Hypofarma – Ribeirão das Neves, Brasil.

⁵Cefalotina sódica – Novafarma – Anápolis, Brasil.

⁶Membrana HA – Millipore – São Paulo, Brasil.

⁷Acepran – Univet – São Paulo, Brasil.

⁸Telazol - Fort Dodge – Fort Dodge, EUA.

⁹Anestalcon - Alcon Lab. do Brasil – São Paulo, Brasil.

¹⁰SOM 62 Standard – Karl Kaps – Tuttlingen, Alemanha.

¹¹Merck – Rio de Janeiro, Brasil.

¹²Allergan-Frumtost – Brasil.

¹³Halogen PenLite – Welch Allin – CA, EUA.

Avaliou-se, também, a presença ou não da membrana amniótica. Esses parâmetros morfológicos foram quantificados sob o mesmo padrão utilizado para os sinais clínicos. A análise dos cortes histológicos foi realizada sem o conhecimento do grupo ao qual pertenciam os olhos.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por testes não paramétricos (Zar, 1996) visando à comparação de efeito nos momentos em cada grupo, pelo teste Friedman e do efeito nos grupos em cada momento, pelo teste Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de fotofobia, blefarospasmo e secreção ocular mucóide foi observada de forma mais intensa nos grupos tratados, porém regrediram até o quarto dia de pós-operatório, quando esses sintomas se tornaram ausentes em todos os animais. No grupo-controle, a conjuntiva apresentou-se hiperêmica durante três a quatro dias pós-operatórios e nos grupos tratados, até o sétimo dia. Esses sinais apresentaram-se em grau e tempo maiores nos grupos tratados, provavelmente devido à presença do fio de sutura, que induziu ao estímulo dos nervos sensoriais.

Devido à presença da membrana amniótica, a opacidade corneana pôde ser avaliada apenas após sua eliminação. Tal evento esteve presente de forma intensa, inicialmente, em todos os animais, mas regrediu a partir do oitavo dia, estando praticamente ausente após o 15º dia. A intensidade e o tempo de permanência foram maiores no grupo tratado com membrana conservada em meio próprio (GII). À histologia, observou-se a presença de espongiose (edema intraepitelial) em maior intensidade aos sete dias. Entre os grupos, ele esteve reduzido no GIII, comparado ao GII, em todos os momentos e foi menor aos sete dias se comparado ao GI. O edema estromal foi observado apenas nas camadas anterior e média e apresentou-se mais intenso no primeiro momento, evoluindo para leve a moderado nos demais; houve diferença aos sete dias, de GII, que foi mais intenso se comparado ao GI e GIII. Entretanto, não houve diferença estatística, aos 30 dias, entre os grupos.

A presença de vascularização corneana foi observada, no grupo-controle, a partir do quarto dia e progrediu a partir do limbo, em direção ao centro da córnea. Nos grupos tratados, a avaliação inicial

foi prejudicada pela presença da membrana. À histologia, neovasos foram observados na região superficial e média do estroma, sendo mais intensos nos grupos tratados aos sete dias e menos aos 30 dias, em relação aos animais do controle. Entretanto não houve diferença estatística entre grupos ou momentos, corroborando os achados de Monteiro et al. (2000), que não observaram a ação de proteínas antineovascularização, conforme descrito por Hao et al. (2000).

Verificou-se a presença de úlcera, pelo teste de fluoresceína, até o 10º dia no GI, 13º dia no GII e oitavo dia no GIII. A observação da lesão mostrou-se prejudicada nos primeiros dias dos grupos tratados devido à presença da membrana amniótica, porém o teste foi realizado mesmo nestas condições, pois auxiliou na avaliação desta. Sete animais referentes ao GI, cinco ao GII e seis ao GIII desenvolveram defeitos epiteliais recorrentes, entre 15 e 30 dias. Quanto à membrana amniótica, esta se mostrou parcialmente transparente nos primeiros dias, em ambos os grupos, tornando-se opaca por volta do quarto dia, quando começou a se desintegrar e a se desprender. Esteve presente até no máximo 11 dias no GII e nove dias no GIII (Fig. 1 e 2).

Na histologia observou-se um epitélio com células jovens aos sete dias, sendo que o número de camadas epiteliais foi maior na periferia. Não se verificou diferença significativa em relação ao número de camadas epiteliais. A membrana basal pôde ser avaliada pela coloração de PAS, e não foi observada alteração em sua espessura. Células calciformes foram detectadas a partir dos sete dias nos grupos tratados e a partir dos 15 dias no grupo-controle; aos 30 dias não houve diferença entre grupos (Fig. 3).



Figura 1. Imagem fotográfica do olho direito de animal tratado com membrana amniótica pertencente ao grupo III aos cinco dias. Observa-se presença de opacidade corneana e hiperemia conjuntival.

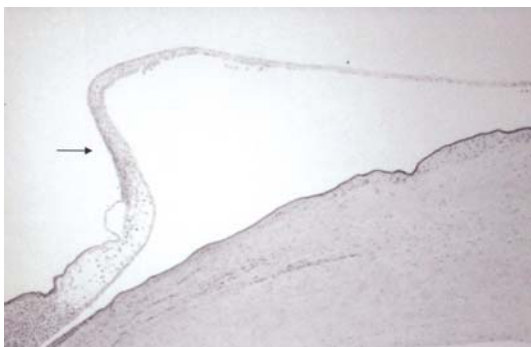


Figura 2. Fotomicrografia da córnea de animal do grupo II aos sete dias, apresentando a membrana amniótica aderida ao epitélio límbico, recobrendo a superfície corneana, que se apresenta com quantidade reduzida de camadas de células epiteliais e grande quantidade de leucócitos no estroma (HE. 10x).



Figura 3. Fotomicrografia da córnea de animal do grupo II aos 30 dias, apresentando células caliciformes e redução do número de camadas de células epiteliais. Presença de neovascularização e polimorfonucleares na camada estromal (PAS. 40x).

Leucócitos mono e polimorfonucleares estiveram presentes em todos os momentos de cada grupo, porém em quantidades e tipos predominantes distintos em cada momento. Apresentaram-se em quantidade aos sete dias, regredindo gradativamente nos demais períodos. Entre os três grupos, o GII foi o que apresentou maior número de células inflamatórias aos sete e 30 dias, comparado aos outros grupos. O infiltrado inflamatório apresentou-se semelhante entre os três grupos ao término do experimento, ou seja, não ocorreu supressão da reação inflamatória pela membrana. Quanto ao tipo celular, observou-se presença de neutrófilos, histiócitos (macrófagos), linfócitos, eosinófilos e plasmócitos, em todos os momentos. Houve predomínio de neutrófilos aos sete dias, neutrófilos e eosinófilos aos 15 dias e eosinófilos e histiócitos

aos 30 dias, característica esta observada em todos os grupos. Quanto ao tipo celular leucocitário, a reação inflamatória predominou com presença de polimorfonucleares. Linfócitos e plasmócitos estão relacionados com a resposta imune específica e com reações de hipersensibilidade, que caracterizam rejeição a transplantes (Spencer, 1985). Considerando-se que a presença dessas células em quantidades menores, comparativamente aos demais tipos, tanto no grupo-controle como nos tratados, pode-se afirmar que não houve sinais de rejeição ao implante neste experimento (Kubo et al., 2001). Nenhuma alteração foi detectada em relação à camada estromal profunda, à membrana de Descemet e ao endotélio, em todos os grupos e momentos.

Em todos os animais apresentaram-se sinais de deficiência de células límbicas, com neovascularização, opacidade e defeitos epiteliais recorrentes, tanto nos grupos tratados como no grupo-controle, indicando que a membrana não foi eficiente para correção desta alteração (Ávila et al., 2001), discordando dos achados de Kim e Tseng (1995) que afirmaram terem obtido sucesso na correção desta deficiência. A presença de células caliciformes na superfície corneana é a maior indicação de deficiência límbica, pois caracteriza o crescimento do epitélio conjuntival sobre a córnea, denominado conjuntivalização. Neste estudo, essas células foram observadas próximas ao limbo, em alguns animais dos grupos tratados, já aos sete dias, intensificando-se nos momentos seguintes, em todos os grupos.

CONCLUSÕES

O transplante de membrana amniótica xenóloga não foi eficiente para o tratamento da deficiência total de células germinativas. O tempo de reparação epitelial, entretanto, foi menor no grupo tratado com membrana conservada em meio para embrião.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a este trabalho. Ao Prof. Ass. Dr. Adalberto J. Crocci do Departamento de Bioestatística – IB-UNESP, Botucatu, pela análise estatística deste trabalho. Ao Prof. Dr. Sony D. Bicudo do Departamento de Radiologia e Reprodução Animal – FMVZ-UNESP, Botucatu, pelo exame ultra-sonográfico das cadelas gestantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A.L.; LAUS, J.L.; FIGUEIREDO-FLORENCIO, B.C.M. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. *Vet. Ophthalmol.*, v.2, p.79-82, 1999.
- AVILA, M.; ESPANA, E.M.; MORENO, C. et al. Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in a rabbit model. *Cornea*, v.20, p.414-420, 2001.
- BARROS, P.S.M.; GARCIA, J.A.; LAUS, J.L. et al. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. *Vet. Ophthalmol.*, v.1, p.119-123, 1998.
- BARROS, P.S.M.; SAFATLE, A.M.V.; RIGUEIRO, M. Uso do pericárdio equino conservado em glicerina como enxerto penetrante da córnea em cães. Estudo experimental. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.34, p.138-141, 1997.
- DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv. Ophthalmol.*, v.44, p.415-425, 2000.
- GARCIA, J.A.; BARROS, P.S.M.; LAUS, J.L. et al. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.33, p.290-294, 1996.
- GOMES, J.A.P.; PIRES, R.T.F.; ALVES, M.R. et al. (Eds). *Doenças da superfície ocular: diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002. 130p.
- HAO, Y.X.; MA, D.H.K.; KIM, W.S. Identification of anti-neovascularization proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, v.19, p.348-352, 2000.
- HOULIHAN, J.M.; BIRO, P.A.; HARPER, H.M. et al. The human amnion is a site of MHC class Ib expression evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J. Immunol.*, v.154, p.5665-5674, 1995.
- KAVINSKI, L.C.; TEIXEIRA, R.B.; PRESOTTO, E.J. Transplante de membrana amniótica para reconstrução da superfície corneal pós-ceratectomia em gatos com seqüestro corneal. Florianópolis: CRMVSC, 2002. Disponível em <<http://www.crmvsc.org.br/cientifico.htm>>. Acessado em 19 nov. 2002.
- KIM, J.C.; TSENG, S.C.G. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J. Ophthalmol.*, v.9, p.32-46, 1995.
- KIM, J.S.; KIM, J.C.; NA, B.K. et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp. Eye Res.*, v.70, p.329-337, 2000.
- KJAERGAARD, N.; HEIN, M.; HYTTEL, L. et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, v.94, p.224-229, 2001.
- KRUSE, F.E.; JOUSSEN, A.M.; ROHRSCHEIDER, K. et al. Criopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefe Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v.238, p.68-75, 2000.
- KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R. et al. Immunogenicity of amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.42, p.1539-1546, 2001.
- LEE, S.; TSENG, S.C.G. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am. J. Ophthalmol.*, v.123, p.303-312, 1997.
- MARGO, C.E.; GROSSNIKLAUS, H.E. *Ocular histopathology: a guide to differential diagnosis*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. 340p.
- MEJÍA, L.F.; ACOSTA, C.; SANTAMARÍA, J.P. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea*, v.19, p.288-291, 2000.
- MONTEIRO, E.C.L.; SCHELLINI, S.A.; MARQUES, M.E.A. et al. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.63, p.33-37, 2000.
- MUNGER, R.J. Veterinary ophthalmology in laboratory animal studies. *Vet. Ophthalmol.*, v.5, p.167-175, 2002.
- PRABHASAWAT, P.; TSENG, S.C.G. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch. Ophthalmol.*, v.115, p.1360-1367, 1997.
- SATO, H.; SHIMAZAKI, J.; SHIMAZAKI, N. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.39, p.S428, 1998.
- SAMPAIO, R.L.; RANZANI, J.J.T.; RODRIGUES JUNIOR, V. et al. Aspectos clínicos e imunopatológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.1077-1085, 2006.
- SHIMAZAKI, J.; YANG, H.; TSUBOTA, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology*, v.104, p.2068-2076, 1997.
- SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br. J. Ophthalmol.*, v.82, p.235-240, 1998.
- SHIMMURA, S.; SHIMAZAKI, J.; OHASHI, Y. et al. Anti-inflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*, v.20, p.408-413, 2001.
- SPENCER, W.H. (Ed.). *Ophthalmic pathology: an atlas and textbook*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1985. v.1, 547p.
- WYNN, R.M.; CORBETT, J.R. Ultrastructure of the canine placenta and amnion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.103, p.878-887, 1969.
- ZAR, J.H. (Ed.). *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 718p.