

## Aspectos clínicos de implantes de membrana amniótica no reparo da córnea em cães com úlceras complicadas

Clinical Aspects of Amniotic Membrane Implants in Corneal Repair in Dogs with Complicated Ulcers

Adriano Rozin<sup>1</sup>, Karla Menezes Cardoso<sup>2,4</sup> & Tarcísio Guerra Guimarães<sup>2,3,4,5</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Among numerous disorders treated by veterinary ophthalmology, therapies employed to solve corneal ulcers stand out. Amniotic membrane transplantation is an effective surgical technique for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog, with highly satisfactory visual and cosmetic outcomes. However, in veterinary ophthalmology, reports on the use of the amniotic membrane and its corneal reconstructive potential are scarce. The objective of this work was to evaluate, for 21 days, the clinical aspects and the effectiveness of transplantation of canine amniotic membrane for corneal healing in two cases of complicated ulcers in dogs.

**Cases:** Two Shih-Tzu dogs were diagnosed with complicated corneal ulcer. They underwent surgical treatment with the use of a glycerin-preserved canine amniotic membrane implant, which was secured on the cornea or the limbus. A surgical microscope at a magnification of 16x was used. The devitalized tissues at the periphery of the ulcer were excised, and multiple layers of amniotic membranes were sutured onto the cornea and near the limbus with interrupted absorbable suture. Protection of the canine amniotic membrane implants was performed with a scarified third eyelid flap, which was attached to the upper eyelid, and maintained for 14 days. During the first 14 days after the procedure, topical treatment with antibiotic eye drops was administered; protease inhibitors were also used. Antibiotics were used systemically for 10 days. Between days 14 and 21 after the transplantation procedure, protease inhibitors, corticosteroids, and lubricant were administered topically. Healing and clinical aspects were evaluated on days 0, 14, and 21. The parameters evaluated were blepharospasm, dazzle and direct pupillary reflexes, and consensual and threat responses. Corneal vascularization, hypopyon, synechia, opacity, and fluorescein dye penetration into the cornea were evaluated. The patient whose membrane was attached to the cornea was named COr, and the animal whose membrane was attached to the corneal limbus was named PLi. Blepharospasm and positive fluorescein test were detected only on the first day of the experiment; whereas, the dazzle and pupillary reflexes, as well as the consensual response, were present in both animals at all evaluated time points. Only COr exhibited hypopyon on day 0. Synechia was not observed in any of the animals at any of the time points. On the 21<sup>st</sup> day, COr exhibited deep vascularization and an opaque scar, while PLi exhibited only discrete vessels without blood perfusion, secondary to corneal repair.

**Discussion:** A smooth operation of the central and peripheral ophthalmic system was maintained at all periods evaluated. The protection provided by the membrane contributed to corneal healing by reducing stimulation of nerve endings on the epithelium and stroma, and suppressing the blepharospasm reflex. The amniotic membrane used as an adjuvant has antimicrobial and anti-inflammatory properties, inhibits proteinases and mediators of inflammation, and exerts a mechanically protective effect. The corneal vascularization observed in both animals is related to the healing processes stimulated by filling the deep corneal lesions with the membrane. When used in addition to drug therapy, the amniotic membrane can inhibit postinflammatory neovascularization, fibroblast activity, collagen deposition, scarring, and opacifications. Accurate diagnosis, and correct therapeutic and surgical management, is fundamental for the successful treatment of corneal ulcers. In this work, canine amniotic membrane preserved in glycerin was used for the surgical treatment of complicated ulcers in dogs along with adequate clinical therapy. This was effective independent of the different anchorage techniques used, and led to satisfactory clinical results and short-term corneal healing.

**Keywords:** transplantation, canine, glycerin, cornea, limbus

**Descritores:** transplante, canina, glicerina, córnea, limbo.

DOI: 10.22456/1679-9216.101085

Received: 4 March 2020

Accepted: 20 August 2020

Published: 28 September 2020

<sup>1</sup>Cão Q Mia, Clínica Médica e Oftalmologia Veterinária, Marau, RS, Brazil. <sup>2</sup>Instituto de Investigação e Formação Avançada (IIFA) & <sup>3</sup>Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Portugal. <sup>4</sup>Instituto de Biofísica & <sup>5</sup>Instituto de Investigação Clínica e Biomédica (iCBR), área de Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal. CORRESPONDENCE: A. Rozin [rozin@brturbo.com.br]. Cão Q Mia, Clínica Médica e Oftalmologia Veterinária. Rua Ângelo Mistura n. 41. CEP 99150-000 Marau, RS, Brazil.

## INTRODUÇÃO

A ceratite ulcerativa é um distúrbio ocular comum em cães [9], frequentemente com perda completa do estroma e exposição à membrana de Descemet [10]. Recomenda-se tratamento cirúrgico, devido ao risco de perfuração ocular, perda irreversível da visão e comprometimento das estruturas oculares [10,17]. As membranas amnióticas são empregadas para fins de reconstrução ocular, auxiliando na epitelização devido às suas propriedades anti-inflamatórias e fatores de crescimento [2,4,17]. Promovendo também a redução de infecções, dor, cicatrizes e ação anti-proteinase [3]. Na oftalmologia veterinária, relatórios sobre o uso da membrana amniótica e seu potencial reconstrutivo da córnea, são escassos [3]. Dessa forma objetivou-se relatar e avaliar, por 21 dias, os aspectos clínicos e a eficácia na cicatrização da córnea de dois cães da raça Shih-Tzu com úlceras complicadas, reparadas com o implante membrana amniótica canina, fixadas em córnea e limbo.

## CASOS

Após os procedimentos cirúrgicos, os registros hospitalares dos cães submetidos ao implante de membrana amniótica canina fixadas na córnea e próxima ao limbo, foram analisados nos dias 0, 14 e 21 pós-cirurgia.

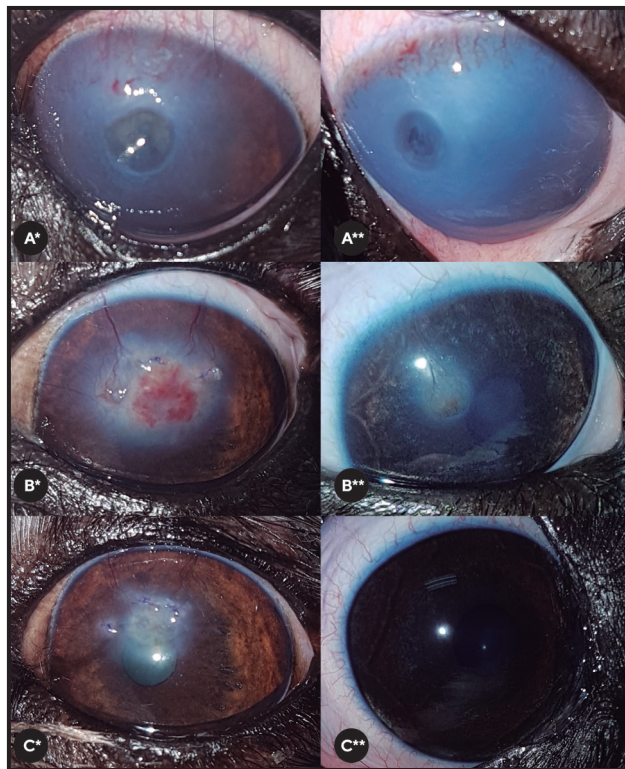
As membranas amnióticas foram obtidas de cadelas hígidas, submetidas ao procedimento de cesariana por alterações anatômicas. Após a obtenção de forma asséptica, procedeu-se tripla lavagem com solução fisiológica 0,9%, retirado qualquer outra estrutura remanescente e secção em frações. Tripla lavagem com solução de 5,5 mg/mL de cloranfenicol (Arifenicol<sup>®</sup>)<sup>1</sup> sendo a última lavagem permanecendo por 5 min. A conservação foi realizada em recipiente estéril contendo glicerina 100%, e mantidas sob refrigeração a temperatura entre 2-8°C até a data de sua utilização. A restauração da membrana amniótica foi realizada minutos antes do implante em solução fisiológica 0,9% e posteriormente mantida em solução de cloranfenicol em frasco estéril até a sua aplicação.

Os cães da raça Shih-Tzu, macho, com idade de 8 e 30 meses, foram submetidos a avaliação oftalmológica e procedimentos cirúrgicos realizadas pelo mesmo oftalmologista veterinário. Ambos os animais apresentavam úlcera complicada unilateral (Figura 1A), de causas variadas e de tamanho próximo

a 3 mm. Além disso os animais foram submetidos a análises hematológicas, urinárias e avaliação cardíacas. Sendo classificados como ASA I pela American Society of Anesthesiologists.

Os animais foram pré-medicados com 0,1 mg/kg de acepromazina (Acepran<sup>®</sup>)<sup>2</sup> e 2 mg/kg de cloridrato de petidina (Dolosal<sup>®</sup>)<sup>3</sup> por via intramuscular. Indução com 0,5 mg/kg de maleato de midazolam (Dormonid<sup>®</sup>)<sup>4</sup> e 3 mg/kg de propofol (Propovan<sup>®</sup>)<sup>3</sup>, por via intravenosa. Os animais foram mantidos sob anestesia com isoflurano (Vetflurano<sup>®</sup>)<sup>5</sup> diluído em oxigênio. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal com a cabeça apoiada sobre um travesseiro moldável. A antisepsia foi realizada com colírio de solução de iodo-povidona (PVPI) 5% (Ophthalmos<sup>®</sup>)<sup>6</sup>; uma gota de colírio de tropicamida (Mydriacyl 1%<sup>®</sup>)<sup>7</sup> e cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon<sup>®</sup>)<sup>7</sup> foram aplicadas.

A magnificação ocorreu com auxílio do microscópio cirúrgico (Topcon<sup>®</sup>)<sup>8</sup>, com aumento de 16 x. Foi realizado a exérese dos tecidos desvitalizados da periferia da úlcera, em ato contínuo iniciou o transplante de múltiplas camadas de membranas amnióticas, suturadas na córnea e próxima ao limbo com fio absorvível de poliglactina 910, 8-0 (Vicryl<sup>®</sup>)<sup>9</sup> com



**Figura 1.** Acompanhamento e avaliação oftalmológica. A- Dia 0: aspectos clínicos da úlcera complicada. B- Dia 14: presença de vascularização e reparo da córnea. C- Dia 21: aspecto da opacificação cicatricial da córnea. \*Animal Cor; \*\* Animal PLi.

pontos isolados simples. A proteção dos implantes de membrana amniótica canina foi realizada com o flap de terceira pálpebra escarificado e fixado com fio de seda 3-0 (Sertix®)<sup>10</sup> em pálpebra superior, mantidos por 14 dias.

Os cuidados no pós-operatório, dia 0 ao 14, utilizou uma gota de cloridrato de moxifloxacino (Vigamox®)<sup>7</sup> - conforme cultura e teste de susceptibilidade antimicrobiana, uma gota de EDTA 0,35% (Ophthalmos®<sup>6</sup> prescritas a cada 6 h); uma gota de colírio de tropicamida (Mydriacyl 1%®<sup>7</sup> a cada 12 h, durante 5 dias); Doxiciclina (Doxifin®<sup>11</sup> - 5 mg/kg via oral a cada 12 h, durante 10 dias); uso constante do colar protetor do tipo elisabetano. Do dia 14 ao 21, uma gota de EDTA 0,35% (Ophthalmos®)<sup>6</sup>; um centímetro de dexametasona (Maxidex®)<sup>7</sup>; uma gota de Hialuronato de sódio (Hyabak®<sup>12</sup> a cada 12 h).

Os olhos submetidos ao implante de membrana amniótica foram nomeados de acordo com o local da sutura: córnea (CO<sub>r</sub>) ou limbo (PLi). Para acompanhamento e avaliação oftalmológica, nos dias 0, 14 e 21 (Figura 1); foi utilizado a presença ou ausência de blefarospasmo, resposta de ameaça, ofuscamento, reflexo pupilar direto e consensual, hipópio, sinéquia, penetração de fluoresceína, vascularização e opacificação cicatricial da córnea. O edema de córnea não foi avaliado, devido ao local e material de sutura influenciar na avaliação.

Os animais CO<sub>r</sub> e PLi, manifestaram blefarospasmo somente no dia 0. Estavam presentes a resposta de ameaça, ofuscamento, reflexo pupilar direto e consensual nos dois animais, em todos períodos avaliados. No dia 0, observou no animal CO<sub>r</sub> e PLi, a redução no diâmetro da pupila, quando comparados ao olho contralateral; contudo não interferiu com os exames e avaliações. Houve presença de discreto hipópio apenas no animal CO<sub>r</sub>, no dia 0; apresentando-se ausente nas demais avaliações. Sinéquia estavam ausentes em todos os períodos avaliados.

Vascularização superficial da córnea, estava presente no animal CO<sub>r</sub> e PLi, no dia 0. No dia 14, vasos superficiais e profundos foram observados em ambos os animais (Figura 1B); observou ainda no animal CO<sub>r</sub>, o preenchimento do local do ferimento com intensa invasão de vasos, formando tecido de granulação. No dia 21, persistiu a vascularização profunda no animal CO<sub>r</sub> e no animal PLi vasos fantasmas estavam presente no estroma corneano.

Discreta opacificação cicatricial, estava presente no animal PLi, no dia 14. Nos dias 14 e 21, intensa opacidade corneana cicatricial estava presente no animal CO<sub>r</sub> e ausente no animal PLi (Figura 1C). Dia 0, presente a penetração e retenção de fluoresceína na periferia da úlcera, não ocorrendo a penetração aos 14 e 21 dias, nos animais CO<sub>r</sub> e PLi.

## DISCUSSÃO

O bom funcionamento do sistema oftálmico central e periférico foram avaliados pela resposta de ameaça, ofuscamento, reflexo pupilar direto e consensual [10], presentes em todos os dias avaliados em ambos os animais.

Os animais PLi e CO<sub>r</sub>, com idade respectiva de 8 e 30 meses, somente apresentaram blefarospasmo previamente ao procedimento cirúrgico (Dia 0). A proteção da membrana, promove e a cicatrização da córnea, reduzindo o estímulo das terminações nervosas do epitélio e estroma, suprimindo o reflexo de blefarospasmo [1].

A redução do diâmetro pupilar no dia 0 foi esperada; devido a indução do reflexo axonal e aumento vascular da íris, resultando em miose [10]. A presença de prostaglandinas, particularmente a PGF2 e outros mediadores inflamatórios, agem diretamente no músculo esfíncter da íris induzindo ainda espasmos ciliares dolorosos [10].

Processos inflamatório e infeccioso podem originar a presença de hipópio [10]; presente no dia 0 de forma discreta, no animal CO<sub>r</sub>. É fundamental a identificação dos agentes infecciosos em úlceras complicadas, direcionando a terapia antimicrobiana adequada [10]. Adjuvante a membrana amniótica promove atividade antimicrobiana e ação anti-inflamatória, atuando como fator mecânico, inibidor de proteinase e mediadores da inflamação [12-14], reduzindo o risco de infecção pós-operatória [14]. Sinéquias não foram observadas em nenhum período avaliados em ambos os animais, embora sejam sequelas comuns nas inflamações oculares [10].

Vascularização da córnea, está relacionado a processos cicatriciais com preenchimento de lesões corneanas profundas; e eventualmente, após a cicatrização da córnea esses vasos sanguíneos deixam de ser perfundidos, dando o aspecto de vasos fantasmas [10]. Sendo a presença de neovascularização e reações inflamatórias, podem originar opacificações e comprometer a transparência da córnea [11].

Diferentes intensidades de opacificação cicatríciais da córnea, foram observadas entre o dia 14 e 21. Em ambos os animais, o emprego de corticosteroides foi benéfico após cicatrização da córnea; inibindo a neovascularização pós-inflamatória, atividade fibroblástica e colágena [7,10]. Além das propriedades anti-inflamatórias e na redução da angiogênese proporcionada pela membrana amniótica [6,8,11,12].

O uso de multicamadas de membrana amniótica foi realizado nos dois cães. Multicamadas de membrana amniótica é usada na medicina humana para reconstrução da superfície ocular com úlceras profundas e perfurações [5,15,16]. A reconstrução e integridade da córnea foi observada no dia 14 e 21 nos dois animais pelo teste de fluoresceína. O epitélio corneano quando integro possui a característica hidrofóbica não permitindo a coloração da fluoresceína no estroma da córnea [10].

A membrana amniótica canina preservada em glicerina, empregada na reparação cirúrgica de úlceras complicadas nos dois cães, associada à adequada terapia clínica; mostrou-se eficaz na em ambas as técnicas

de ancoragem da membrana amniótica, levando a resultados satisfatórios nos aspectos clínicos e cicatrização da córnea em curto período de tempo.

#### MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Blau Farmacêutica S.A. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>5</sup>Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>6</sup>Ophthalmos S/A. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>7</sup>Novartis Biociências S.A. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>8</sup>Topcon Corporation. Tokyo, Japan.

<sup>9</sup>Ethicon Inc/Johnson & Johnson. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>10</sup>Shalon Fios Cirúrgicos. Goiania, GO, Brazil.

<sup>11</sup>Ouro Fino Saúde Animal Ltda. Cravinhos, SP, Brazil.

<sup>12</sup>União Química Farmacêutica Nacional S/A. São Paulo, SP, Brazil.

**Acknowledgements.** Os autores agradecem o Programa do Instituto Qualittas de Pós-Graduação em Oftalmologia Veterinária e Micro Cirurgia Ocular e Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal (SFRH/BD/139319/2018).

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### REFERENCES

- 1 **Barbosa A., Barros P.S.M., Guerra J.L. & Otsuki D.A. 2013.** Ceratoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica equina. Estudo clínico e morfológico. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 50(3): 211-219.
- 2 **Barros P.S., Safatle A.M., Godoy C.A., Souza M.S., Barros L.F. & Brooks D.E. 2005.** Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. *Veterinary Ophthalmology*. 8(3): 189-192.
- 3 **Costa D., Leiva M., Sanz F., Espejo V., Esteban J., Vergara J., Díaz C., Huguet E., Cairó M., Ríos J. & Peña M.T. 2019.** A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. *Veterinary Ophthalmology*. 22(5): 695-702.
- 4 **Cremonini D.N., Ranzani J.J.T., Marques M.E.A., Rodrigues G.N. & Brandão C.V.S. 2007.** Transplante de membrana amniótica canina criopreservada para cicatrização de córnea com deficiência de células límbicas em coelhos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(6): 1462-1467.
- 5 **Hanada K., Shimazaki J., Shimmura S. & Tsubota K. 2001.** Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *American Journal of Ophthalmology*. 131(3): 324-331.
- 6 **Hao Y., Ma D.H.K., Hwang D.G., Kim W.S. & Zhang F. 2000.** Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 19(3): 348-352.
- 7 **Huang J., Wang W., Yu J., Yu X., Zheng Q., Peng F., He Z., Zhao W., Zhang Z., Li X. & Wang Q. 2017.** Combination of dexamethasone and Avastin® by supramolecular hydrogel attenuates the inflammatory corneal neovascularization in rat alkali burn model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 159: 241-250.
- 8 **Jirsova K. & Jones G.L. 2017.** Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review. *Cell and Tissue Banking*. 18(2): 193-204.
- 9 **Kim J.Y., Won H.J. & Jeong S.W. 2009.** A retrospective study of ulcerative keratitis in 32 dogs. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 7(1/2): 27-31.
- 10 **Maggs D. 2018.** Diseases of the cornea and sclera. In: Maggs D., Miller P. & Ofri R. (Eds). *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 6th edn. St. Louis: Elsevier, pp.231-250.

- 11 Mobaraki M.M., Abbasi R., Vandchali S.O., Ghaffari M., Moztarzadeh F. & Mozafari M. 2019. Corneal repair and regeneration: Current concepts and future directions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7: 135.
- 12 O'leary L., Specht A., Isaza N., Kallberg M., Barrie K., Cottrell D. & Plummer C. 2018. Amniotic membrane transplantation for ligneous conjunctivitis in a doberman. *Veterinary Ophthalmology*. 21(6): 652-660.
- 13 Oliveira V.A.D. & Alvarenga J.D. 1998. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de eqüinos. *Ciência Rural*. 28(4): 623-628.
- 14 Pontes K.C.S., Borges A.P.B., Eleotério R.B., Favarato L.S.C. & Duarte T.S. 2011. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. *Ciência Rural*. 41(12): 2120-2127.
- 15 Rodríguez-Ares M.T., Touriño R., López-Valladares M.J. & Gude F. 2004. Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations. *Cornea*. 23(6): 577-583.
- 16 Solomon A., Meller D., Prabhasawat P., John T., Espana E.M., Steuhl K.P. & Tseng S.C. 2002. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocèles, and deep ulcers. *Ophthalmology*. 109(4): 694-703.
- 17 Wichayacoop T., Briksawan P., Tuntivanich P. & Yibchok-anun S. 2009. Anti-inflammatory effects of topical supernatant from human amniotic membrane cell culture on canine deep corneal ulcer after human amniotic membrane transplantation. *Veterinary Ophthalmology*. 12(1): 28-35.