

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**NOVO MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA QUÍMICA ALCALINA, DA
SUPERFÍCIE OCULAR**

FRANCISCO JOSÉ DE LIMA BOCACCIO

**Orientador: Prof. Dr. Jacó Lavinsky
Co-Orientador: Prof. Dr. Samuel Rymer**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**NOVO MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA QUÍMICA ALCALINA, DA
SUPERFÍCIE OCULAR**

FRANCISCO JOSÉ DE LIMA BOCACCIO

**Orientador: Prof. Dr. Jacó Lavinsky
Co-Orientador: Prof. Dr. Samuel Rymer**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2006

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da Severidade das Queimaduras da Superfície Ocular por Roper-Hall.....	20
Tabela 2: Nova classificação de queimaduras da superfície ocular de Dua <i>et al.</i> (2001).....	21

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

Tabela 1: Comparação da evolução pós-queimadura do grau de severidade da queimadura nos diferentes tempos (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a semanas pós queimadura) de avaliação nos olhos dos coelhos Nova Zelândia e nos olhos dos coelhos Chinchila	41 / 70
Tabela 2: Comparação da evolução do grau de vascularização, nos diferentes tempos pós-queimadura, nos olhos dos coelhos Nova Zelândia	42 / 70
Tabela 3: Resultados da avaliação do grau severidade da queimadura e da vascularização ocular utilizando o modelo de queimadura química proposta	43 / 71
Tabela 4: Apresenta o número de olhos e percentuais das lesões em relação a classificação de DUA para as duas raças. NZ = Nova Zelândia ; CH = Chinchila.....	44 / 71
Tabela 5: Apresenta o número de olhos e percentuais das lesões em relação a classificação de DUA para os olhos das duas raças separadamente. NZ = Nova Zelândia ; CH = Chinchila.....	45 / 73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	6
2.1 ALGUNS ASPECTOS RELEVANTES DA ANATOMIA DO SEGMENTO ANTERIOR DO OLHO DO COELHO	6
2.2 FISIOPATOLOGIA DA QUEIMADURA	9
2.2.1 Modelos de Queimadura e Classificação de Hughes	15
2.2.2 Modelo de Vascularização e Classificação de Thoft	18
2.2.3 Classificação das Queimaduras da Superfície Ocular de Dua..	20
3 JUSTIFICATIVA.....	22
4 OBJETIVOS.....	23
4.1 OBJETIVO GERAL.....	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
REFERÊNCIAS.....	24
ARTIGO EM INGLÊS.....	28
ARTIGO EM PORTUGUÊS	56
ANEXO A - MOSTRA OS RESULTADOS DOS EXAMES DOS OLHOS LESADO.....	86
ANEXO B – FOTOS DOS OLHOS	88

1 INTRODUÇÃO

As queimaduras oculares constituem verdadeiras emergências. Tanto queimaduras térmicas quanto químicas representam traumas oculares potencialmente causadores de cegueira. As queimaduras térmicas resultam de acidentes associados a explosões de fogos de artifício, vapor, água fervente ou metal derretido (geralmente alumínio). As queimaduras químicas podem ser causadas tanto por agentes alcalinos quanto por agentes acidíferos. Agentes alcalinos comuns incluem o hidróxido de amônio, utilizado na produção de fertilizantes, o hidróxido de sódio (soda cáustica), utilizado para a limpeza de canos e esgotos, e o hidróxido de cálcio, encontrado em gesso, cal e cimento. Os agentes alcalinos são particularmente danosos, pois possuem tanto propriedades hidrófilas quanto lipofílicas, que lhes permitem penetrar rapidamente nas membranas celulares e entrar na câmara anterior. O dano alcalino resulta da interação dos íons hidroxílicos causadores da saponificação das membranas celulares e da morte celular junto com a destruição da matriz extracelular. Os agentes acidíferos comuns causadores de trauma incluem o ácido sulfúrico, encontrado na bateria de automóveis, o ácido sulfuroso, encontrado em alguns alvejantes, e o ácido clorídrico, utilizado em piscinas. Os ácidos tendem a causar menos trauma do que os álcalis, pois muitas das proteínas córneas ligam-se ao ácido e agem como um tampão químico. Além disso, o tecido coagulado age como uma barreira à maior penetração do ácido. O ácido se liga ao colágeno e causa o encurtamento das fibrilas¹

As queimaduras químicas por álcalis revestem-se de particular importância por seu alto poder e velocidade de penetração nas estruturas oculares, comprometendo o prognóstico visual²

As lesões por álcali diferenciam-se de outras agressões químicas da córnea pela gravidade e rapidez com que provocam danos e pelas complicações tardias que determinam. A gravidade de uma queimadura química depende do ânion ou cátion, de sua concentração e volume, da duração do contato, do pH e da toxicidade inerente ao agente químico³.

O hidróxido de sódio está entre os agentes químicos mais utilizados^{4,2,5,6,7,8}

Com o propósito de estudar a ação de drogas medicamentosas^{2,9,5,10}, (a reepitelização da córnea¹¹; as alterações encontradas na superfície ocular (opacidades, vascularização) e estroma⁸ e para avaliar o resultado de tratamentos cirúrgicos, provocam-se, experimentalmente, injúrias na superfície ocular com agentes químicos e ou traumas mecânicos^{12,2,13,14,5,11}.

Os coelhos, apesar de apresentarem importantes diferenças orbitárias em relação aos demais animais domésticos, são usados freqüentemente nas pesquisas oftalmológicas¹⁵. Eles são utilizados como modelos experimentais para avaliação de lesões da superfície ocular decorrentes de queimadura por álcali. Os agentes provocadores de queimaduras mais comumente utilizados são o ácido n-heptanol e o hidróxido de sódio (NaOH), variando-se tanto suas concentrações como a forma e o tempo de exposição das estruturas oculares a estes agentes químicos. Os modelos empregados são de execução minuciosa, demorada e trabalhosa^{12,13,14,2,9,5,11,16,17,18,19,20,21,22}.

Em face destas considerações, produziu-se um experimento de rápida e fácil execução, avaliado em duas raças de coelhos: um modelo simulacro de um acidente de trabalho que garantisse lesões representativas e características das classificações usuais de queimaduras químicas.

2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

Há muito tempo coelhos são utilizados em pesquisas experimentais. A raça mais utilizada é a Nova Zelândia. Há, em menor número, trabalhos envolvendo a raça Chinchila^{23,24,25,26,27}.

As diferenças entre os olhos dos coelhos e dos humanos são significantes, apesar disso, coelhos são utilizados para modelos experimentais por terem olhos grandes, fáceis de manejar e por serem economicamente acessíveis.

Existem vários modelos de queimadura química^{4,2,5,11,9,28,29,6}. Os agentes provocadores de queimaduras mais comumente utilizados são ácido n-heptanol^{11,10} e hidróxido de sódio (NaOH)^{4,2,5,6,7,8}, variando-se suas concentrações, o diâmetro do disco de papel filtro embebido na substância em uso e o tempo de exposição das estruturas oculares a este agente químico, bem como o tempo de irrigação e a substância utilizada na remoção do álcali^{12,13,14,2,9,5,11,16,17,18,19,20,21,22}.

2.1 ALGUNS ASPECTOS RELEVANTES DA ANATOMIA DO SEGMENTO ANTERIOR DO OLHO DO COELHO

Globo Ocular

O olho do coelho mostra várias diferenças em relação ao olho humano ou ao de outros animais. O globo ocular é relativamente grande e bastante proeminente, às vezes, se projeta da órbita por uma extensão de 5 milímetros além do arco zigomático e 12 milímetros além do arco frontal. A dimensão antero-posterior é de 16 a 19 milímetros, a vertical é de 17 milímetros e a horizontal varia de 18 a 20 milímetros (estas são medidas médias)¹⁵.

Esclera

A esclera, também chamada esclerótica, tem considerável variação de espessura sobre toda sua área. Anteriormente, adjacente ao limbo, sua média é 0,5 milímetros, mas, posteriormente, é de 0,4 milímetros. Perto do nervo óptico, ela é gradualmente fina. No equador, a espessura é de 0,25 milímetros e, inferiormente, é só de 0,2 milímetros. No pólo posterior, a média da espessura é de 0,18 milímetros. Apesar da vascularização excessivamente rica da órbita como um todo, há um suprimento vascular limitado para a esclera. O grau de pigmentação na esclera depende inteiramente daquele do coelho como um todo ¹⁵.

Conjuntiva

A conjuntiva palpebral encontra a pele além da margem tarsal posterior, tornando-se espessada ao redor das glândulas de Meibomio. A conjuntiva possui numerosos nódulos linfáticos e muitas glândulas intraepiteliais. A carúncula tem base ampla, cerca de cinco milímetros de largura, mas, da base ao ápice, ela tem somente dois milímetros. Ela funde-se com ambas as pálpebras. A conjuntiva é plenamente suprida por células caliciformes, as quais são mais numerosas nos fórnices. No tecido entre a conjuntiva e a lâmina de tecido conectivo (tarso no homem), ao redor das glândulas de meibomio, existem pequenas glândulas lacrimais acessórias, as chamadas glândulas de Wolfring ¹⁵.

Córnea

A córnea e a esclera podem ter ou não pequenas diferenças na curvatura e portanto não tem sulco córneo-escleral marcado. O raio de curvatura da córnea é de aproximadamente 7,3 milímetros com eixo horizontal maior, formando uma figura elíptica. O diâmetro horizontal é de aproximadamente 15,0 milímetros e o vertical,

de 13, 8 milímetros. A córnea tem espessura proporcionalmente uniforme. Algumas vezes, tem um pequeno afinamento central, (aproximadamente 0, 37 milímetros), embora no limbo este afinamento seja de 0, 45 milímetros ¹⁵.

A camada epitelial da superfície ocular do coelho é dez vezes mais permeável às substâncias hidrofílicas do que no olho humano. A membrana de Bowman é seis vezes mais fina. O epitélio da córnea humana desenvolve vacúolos em resposta a algumas substâncias tóxicas, o epitélio da córnea do coelho não. A córnea do coelho é menos espessa, 0, 37 mm contra 0, 51mm da córnea humana. Coelho é mais suscetível a substâncias alcalinas porque o pH do seu humor aquoso é 0, 82 e o do homem é 0, 71- 0, 73. A córnea representa 25% da área da superfície ocular do olho do coelho, mas somente 7% da área da superfície ocular do olho humano.

Epitélio da Córnea

O epitélio da córnea consiste de uma camada de células colunares e três a cinco camadas de células poliédricas e escamosas. A totalidade das camadas tem uma espessura menor que 30 a 40 micra. A substância própria nunca é menor do que 0, 24 milímetros de espessura e a membrana de Descemet tem 7 ou 8 micra.

Membrana de Bowman na Córnea

É uma membrana muito fina, abaixo do epitélio, com espessura maior que duas micras, sendo difícil visualizá-la.

Inervação da Córnea

São cerca de 50 terminações nervosas no epitélio e substância própria. O feixe nervoso derivado dos nervos ciliares transita adiante para o corpo ciliar; a maioria deles continua para o limbo, entre a esclera e a coróide, permanecendo poucos que passam pela própria esclera. Aqueles que continuam direto para a

córnea desviam daqueles direcionados ao corpo ciliar e íris terminando na junção córneo-escleral. A córnea do coelho apresenta cerca de 80 terminações nervosas¹⁵.

Limbo Corneoescleral

O limbo é uma ampla zona própria, em forma de cunha, situado obliquamente à junção corneoescleral. Um anel pigmentado superficial marca o aspecto anterior do limbo. A pigmentação deste anel é tão mais densa quanto mais varia a pigmentação geral do coelho¹⁵.

Vascularização

No limbo do coelho da raça Nova Zelândia, branco, há um sistema muito extenso de vasos sanguíneos, ao todo cerca de oito vasos principais, alguns deles se prolongam em direção à córnea. O plexo venoso escleral é limitado a poucos pequenos vasos os quais conectam a malha trabecular com as veias perilimbares.

Membrana Nictante

O coelho tem membrana nictante (terceira pálpebra) cuja função, não muito clara, seria eliminar materiais estranhos.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA QUEIMADURA

As queimaduras químicas por álcalis revestem-se de particular importância pelo seu alto poder e velocidade de penetração nas estruturas oculares, comprometendo o prognóstico². O Hidróxido de Sódio (NaOH) está entre os agentes químicos mais comuns^{4,2,5,6,7,8}. A queimadura química da córnea difere substancialmente de lesões oculares perfurantes ou bruscas em que o olho retém suas relações anatômicas normais, mas há vasta morte celular e desnaturação

protéica (especialmente de colágeno), no segmento anterior, provocando uma reação inflamatória. Ácidos fracos precipitam proteínas no epitélio, que diluem rapidamente sua força e providenciam uma barreira parcial ao ácido residual no olho externo, diminuindo, desta forma, seu poder de penetração. Os álcalis saponificam as membranas das células, desnaturam o colágeno e penetram profundamente no olho para lesar íris, corpo ciliar e cristalino³.

A severidade de uma queimadura química é dependente do ânion ou cátion – sua concentração, seu volume, duração do contato e toxicidade inerente ao agente químico. Pode originar dor severa pela estimulação de terminações nervosas na córnea, na conjuntiva e na pele. Essa dor pode aumentar e se prolongar por uma pressão intraocular dramática, que se origina da retração do colágeno na membrana fibrosa do olho (córnea e esclera) e liberação intraocular de prostaglandinas. O dano aos vasos sanguíneos causa uma resposta exsudativa, fibrinosa, no olho externo, que pode originar simbléfaro ou sinéquias anteriores ou posteriores. O dano ao corpo ciliar pode ser tão extenso que induza a *phthisis bulbi*³.

A presença do íon hidroxila (OH), na injúria alcalina, eleva o pH, havendo a saponificação das gorduras da membrana celular, resultando na ruptura e morte da célula³⁰. Dependendo da profundidade de penetração, ocorre destruição da membrana celular e morte do epitélio da conjuntiva e córnea, queratócitos do estroma, terminações nervosas estromais, endotélio da córnea e epitélio do cristalino e ainda epitélio e endotélio vascular da íris e corpo ciliar. O pH do humor aquoso aumenta dentro de 3 a 5 minutos depois da queimadura por hidróxido de sódio, retornando ao normal no período compreendido entre 30 minutos e três horas³¹.

Ácidos fracos precipitam proteínas no epitélio, diluindo rapidamente sua força e assim providenciando uma barreira parcial ao ácido residual no olho externo,

diminuindo, desta forma, seu poder de penetração.

Epitélio da Superfície Ocular – Córnea e Conjuntiva

No epitélio corneal e conjuntival, a morte instantânea da célula provoca defeito epitelial, cujo tamanho revela a extensão total de exposição ao álcali. Este defeito epitelial compromete:

- a) A produção de citocina, responsável pela inibição da produção de colagenase pelo fibroblasto corneal^{32,33}.
- b) A produção de dismutase superoxide;
- c) A produção dos anti-radicais livres.

O estroma da córnea, na presença do defeito do epitélio, perde estes três mecanismos de defesa citados, podendo apresentar úlceras estéreis e microbianas^{32,33}.

O reparo da superfície ocular lesada é um processo de dois estágios envolvendo, inicialmente, a reepitelização e, posteriormente, a diferenciação celular³⁴.

A reepitelização ocorre com movimento centrípeto, tanto das células epiteliais corneais como conjuntivais remanescentes, em direção à região de perda celular³⁵. A velocidade de reepitelização é influenciada pela origem do epitélio migrante. Esta reepitelização é mais rápida quando corrigida por células epiteliais da córnea ou limbares, do que quando providenciada pelo epitélio conjuntival não limbar. A reepitelização é mais demorada se a morte celular induzida pelo álcali resultou em necrose conjuntival, envolvendo mais do que a metade do limbo³⁴.

Em queimaduras severas, porém, o epitélio superficial conserva suas

características conjuntivais, com resultante vascularização corneal, formação de *pannus* e perda da transparência ³⁶. Apesar de lacrimejamento excessivo, anormalidades das células caliciformes podem resultar em instabilidade do filme lacrimal, com alterações crônicas da superfície ocular ³⁴.

Estroma da Córnea

A severidade da lesão estromal está relacionada com a profundidade de penetração, a qual, por sua vez, está relacionada com o cátion do álcali ³⁰. A malha trabecular está alterada, produzindo aumento precoce da pressão intraocular. A hidratação estromal resulta em diminuição da transparência corneal. O dano às terminações nervosas estromais pode causar absoluta ou relativa anestesia corneal. Queratócitos podem ser completamente destruídos nas áreas de significativa penetração alcalina. O repovoamento de queratócitos do estroma injuriado inicia precocemente no processo reparativo. Em caso de destruição incompleta da população de queratócitos, a proliferação provavelmente decorre das regiões adjacentes. O repovoamento de queratócitos é um evento necessário porque estas células pluripotenciais possuem a habilidade única para remodelar o dano estromal, sendo capazes de secretar colagenase ^{32,33,37}.

Vários mecanismos podem inibir a proliferação do queratócito e a síntese do novo colágeno. Devido ao fato de o ascorbato ser essencial para a síntese do colágeno, o estado escorbútico da câmara anterior pode resultar em depressão dos níveis intracelulares de ascorbato e diminuir a síntese do colágeno. Neovascularização do estroma corneal, se for induzida por inflamação persistente ou iatrogenicamente por adesivos teciduais, detém o favorecimento da colagenólise ³⁴.

Endotélio da Córnea

O álcali que penetra profundamente o estroma pode danificar severamente o endotélio corneal. Um edema corneal permanente ou transitório pode ocorrer conseqüentemente e a proliferação da membrana de Descemet e das membranas retrocorneais pode ocorrer nos casos mais severos³⁴.

Limbo Córneoescleral

Ocorre, inicialmente, hiperemia ou isquemia, podendo haver até necrose da conjuntiva limbar.

Câmara Anterior e Cristalino do Olho

A injúria na íris e no corpo ciliar produz inflamação intraocular, diminuição da produção do humor aquoso e, secundariamente, diminuição no escoamento, através da malha trabecular. Isto causa, usualmente, aumento da pressão intraocular, embora possa ocorrer hipotonia, especialmente nos traumas severos. A cápsula e o epitélio do cristalino podem ser danificados, resultando em formação de catarata precoce ou tardiamente³⁴.

A progressão natural das queimaduras alcalinas severas nos olhos e a freqüência de complicações secundárias são bem conhecidas⁴.

Álcalis saponificam as membranas das células, desnaturam o colágeno e penetram profundamente no olho para lesar a íris, corpo ciliar e cristalino³.

Exceto por diferenças mínimas na taxa de penetração e na intensidade da opacificação, a evolução clínica das queimaduras produzidas por uma variedade de álcalis é marcadamente semelhante. A alcalinidade da solução é, provavelmente, o mais importante fator determinante da gravidade da lesão⁴.

A maioria destes modelos compromete somente a zona central ou até 8 mm de diâmetro corneal, não havendo comprometimento limbar, com pouca ou nenhuma repercussão na superfície ocular, ou seja, provoca-se dano epitelial somente na córnea, sem produzir-se isquemia limbar e vascularização corneal (Paterson *et al.*, 1994; Haddox *et al.*, 1996). Um outro modelo provoca a queimadura do limbo corneano, tendo o autor usado um papel filtro em anel, objetivando lesar também o limbo e a conjuntiva limbar³⁸.

Obenberger (1975) foi quem primeiro descreveu o uso de papel filtro embebido de agente químico alcali, para obter um ferimento por álcali.

McCulley (1987) dividiu o curso clínico das queimaduras químicas em quatro fases:

- a) Imediata;
- b) Aguda (minutos a uma semana);
- c) Reparadora precoce (de uma a três semanas);
- d) Reparadora tardia (mais que três semanas).

Todos os achados clínicos presentes imediatamente depois da queimadura química são relacionados com área de envolvimento, profundidade de penetração e relativa toxicidade da substância. Um exame pormenorizado deve esperar até estar completa a irrigação copiosa, mas os achados iniciais fornecem informações importantes em relação ao prognóstico final. Um exame pormenorizado testará a acuidade visual, a pressão intraocular, a presença de partículas, a extensão da perda de células epiteliais da conjuntiva e da córnea, a presença e extensão da necrose isquêmica conjuntival, a transparência corneal, a inflamação da câmara anterior e a transparência do cristalino³⁴.

2.2.1 Modelos de Queimadura e Classificação de Hughes

Hughes, em 1946, produziu queimadura em olhos de coelho por hidróxido de sódio (NaOH).

No primeiro modelo, produziu uma queimadura moderadamente severa e irrigou metade da córnea do coelho, por três minutos, com hidróxido de sódio a 0, 2% normal isotônico pela adição de cloreto de sódio. Acompanhou o curso da queimadura.

No segundo modelo, Hughes irrigou o olho do coelho com NaOH a 0, 2% por trinta segundos ou menos sem lavagem subsequente, produziu uma queimadura relativamente moderada. Quando comparado com aquele descrito anteriormente, os sintomas conjuntivais agudos (ex: edema, necrose de vasos limbares e hemorragias petequiais) foram menos pronunciados; a opacificação corneal foi menos densa, a ulceração raramente se aprofundou além do epitélio, a vascularização corneal ficou usualmente limitada a poucas ramificações de vasos superficiais com desaparecimento dentro de uma a duas semanas, infiltrações tardias da córnea foram raras e a irite foi moderada.

No terceiro modelo, toda a córnea do olho do coelho foi irrigada durante três minutos com uma solução de NaOH a 0, 2%, produzindo lesões devastadoras observadas ao longo do curso clínico.

Hughes identificou:

- Necrose da conjuntiva com descamação de tecidos;
- Pérolas brancas;
- Necrose isquêmica de vasos sanguíneos limbares acompanhadas de

hemorragias;

- Opacificação quase completa da córnea, com desepitelização quase total;
- Infiltração purulenta da córnea dentro de uma semana a dez dias, associada com úlcera profunda e perfuração;
- Congestão intensa e espessamento da íris, freqüentemente associados com hipópio e catarata capsular, visíveis após algumas poucas horas.

A membrana de Descemet foi marcadamente resistente ao álcali, muitas vezes permanecendo clara e intacta, porém a superfície corneal tornou-se opaca e com mau prognóstico. Praticamente nunca ocorreu simbléfaro no coelho. A necrose dos vasos limbares usualmente foi completa, não ocorrendo vascularização superficial, porém vasos profundos subiram a partir de porções limbares menos severamente queimadas. A regeneração da conjuntiva pode invadir a córnea ulcerada, podendo ocorrer o aparecimento de espesso pterígio, fato raro em coelhos.

Hughes (1946) cita também os estágios do curso clínico dessas queimaduras. As alterações, naturalmente, caem em três estágios:

- a) Estágio agudo, consistindo de necrose isquêmica e edema conjuntival, *sloughing* do epitélio corneano, opacificação e edema da substância própria da córnea e irite;
- b) Estágio de reparação, incluindo a diminuição do edema corneal e conjuntival, regeneração do epitélio, vascularização da córnea com diminuição da evidência da opacificação e desaparecimento da irite;
- c) Estágio de complicações tardias, as quais podem incluir simbléfaro e crescimento sobre a córnea com uma membrana vascularizada,

infiltrações corneais tardias, úlcera de córnea recorrente ou persistente, opacificação corneal persistente, estafiloma corneal, irite exsudativa ou persistente, glaucoma secundário e catarata.

A classificação de HUGHES é a mais amplamente usada no prognóstico a longo prazo. Ela divide as queimaduras em quatro grupos.

GRAU I: G1 bom prognóstico;

dano epitelial corneal superficial sem alterar a visibilidade da íris;
sem isquemia limbar.

GRAU II: G2 bom prognóstico;

- Opacidade corneal, enxergando-se pormenores da íris;
- Isquemia menor do que 1/3 do limbo.

GRAU III: G3 prognóstico reservado;

- Perda total do epitélio corneal;
- Opacidade estromal obscurecendo pormenores da íris;
- Isquemia de 1/3 a metade do limbo.

GRAU IV: G4 mau prognóstico;

- Córnea opaca, não se enxergando íris ou pupila;
- Isquemia de mais da metade do limbo.

No que se refere à vascularização da córnea, Hughes (1946) identifica que ela ocorre, após sete dias, proveniente dos vasos limbares. Na maioria das vezes, os vasos foram localizados livres, fora do tecido danificado do terço anterior do estroma, mas eles podem ficar profundos dentro da córnea se os vasos limbares

superficiais foram trombosados ou se a queimadura da córnea foi severa.

2.2.2 Modelo de Vascularização e Classificação de Thoft³⁶

A vascularização corneal tem sido objeto de muitos estudos. Muitos métodos têm sido usados para induzir vascularização, mas infelizmente muitos dos modelos experimentais tem produzido resultados variáveis em termos de regularidade e de grau de crescimento dos vasos. Em adição, métodos prévios geralmente não têm duplicado a vascularização superficial, característica de um número significativo de doenças corneais sérias.

Thoft apresenta a técnica encontrada para causar vascularização da córnea, quando o epitélio foi removido. A proliferação dos vasos sanguíneos é produzida criando-se um ferimento penetrante em uma córnea coberta pela superfície ocular, regenerada por um epitélio de origem conjuntival ao invés de corneal.

No modelo de Thoft, foi removido o epitélio corneal mais um anel de um a dois milímetros de epitélio conjuntival limbar ou uma área de 9 milímetros de diâmetro de epitélio corneal central, por debridamento com iodo, seguido por neutralização com cocaína, por lavagem com heptanol ou por escarificação. No caso de remoção epitelial total, o epitélio regenerado originou-se na conjuntiva. No caso da remoção epitelial central, o epitélio regenerou-se das células corneais remanescentes.

Dez dias, três semanas, seis semanas e três meses depois da remoção do epitélio, quando o epitélio regenerado de origem corneal ou conjuntival tinha cicatrizado sobre a córnea, foi feito um ferimento penetrante.

Foram usados dois tipos de ferimentos penetrantes: linear e por trepanação.

Depois da anestesia, foi feito através do estroma, no eixo visual, um ferimento penetrante de 8 milímetros, deixando dois a três milímetros entre o término do ferimento e o limbo. Duas suturas com mononylon 10-0 foram colocadas distantes cinco milímetros para segurar o ferimento. Os olhos foram examinados três a cinco vezes por semana. Ferimentos lineares foram feitos em setenta e quatro olhos.

Um trépano foi usado para produzir um ferimento penetrante de dois milímetros de diâmetro, localizado centralmente. Os animais foram examinados três a cinco vezes por semana, num total de oitenta e oito olhos.

Foi realizada, cuidadosamente, a remoção endotelial, com raspagem, através de incisão limbar de um milímetro na córnea. Trinta e dois olhos com epitélio regenerado de origem conjuntival ou corneal que cicatrizaram por um dia e quatro olhos com epitélio normal tiveram o endotélio raspado. Dezesesseis outros olhos, com epitélio regenerado derivado da conjuntiva ou da córnea, e quatro olhos com epitélio normal tiveram o endotélio removido com cloreto de benzalcônio como descrito por Maurice e Perlman.

Os animais foram examinados três a cinco vezes semanalmente, com uma luz, e, no mínimo uma vez por semana, na lâmpada de fenda. O aparecimento dos vasos sanguíneos e as anormalidades do epitélio foram anotadas em detalhes.

De um a dois milímetros da orla ocorreram freqüentemente vasos, para o limbo, nos olhos com regeneração epitelial de origem conjuntival com ferimentos penetrantes prévios.

Thoft *et al.* (1979) graduou a vascularização de acordo com a seguinte escala:

0 = córneas sem infiltração vascular;

1+ = córneas com vasos a mais de dois milímetros do limbo;

2+ = córneas com vasos a mais de quatro milímetros do limbo;

3+ = córneas com vasos a mais de seis milímetros do limbo;

4+ = córneas com vasos no eixo visual ou no ferimento central.

2.2.3 Classificação das Queimaduras da Superfície Ocular¹

A Tabela 1 apresenta a classificação da severidade das queimaduras da superfície ocular modificada por Roper-Hall em 1965.

Tabela 1: Classificação da Severidade das Queimaduras da Superfície Ocular por Roper-Hall

Grau	Prognóstico	Córnea	Conjuntiva/Limbo
I	Bom	Dano epitelial corneano	Sem isquemia límbica
II	Bom	Opacificação (“haze”) corneana, detalhes da íris visíveis	< 1/3 de isquemia límbica
III	Reservado	Perda epitelial total, opacificação (“haze”) estromal, detalhes da íris obscurecidos	1/3 – 1/2 de isquemia límbica
IV	Ruim	Córnea opaca, íris e pupila obscurecidas	> 1/2 de isquemia límbica

Fonte:

Dua propõe “uma importante modificação à classificação de Roper-Hall para levar em conta a extensão do envolvimento do limbo em horas de um relógio e a porcentagem de envolvimento conjuntival. As horas de um relógio foram determinadas ao se dividir o limbo nas doze horas da face de um relógio. O termo ‘envolvimento do limbo’ é preferido ao termo ‘isquemia do limbo’ porque é mais amplo em sua conotação e não exclui áreas do limbo onde uma perda de espessura completa ou grande do epitélio do limbo tenha ocorrido sem uma isquemia significativa. A perda total do epitélio do limbo (incluindo as células-tronco) pode ocorrer apesar da presença de pouca isquemia, mas tem potencialmente as mesmas conseqüências”¹.

O envolvimento conjuntival foi estimado ao se dividir a conjuntiva bulbar e o

fórnice em quadrantes e ao se determinar a área envolvida.

Tabela 2: Nova classificação de queimaduras da superfície ocular de Dua *et al.* (2001)

Grau	Prognóstico	Achados clínicos	Envolvimento conjuntival	Escala análoga (*)
I	Muito bom	0 horas de envolvimento límbico	0%	0/0%
II	Bom	< ou = 3 a horas de envolvimento límbico	< ou = 30%	0, 1-3/1-29, 9%
III	Bom	> 3 – 6 horas de envolvimento límbico	< 30 – 50%	3, 1-6/31-50%
IV	Bom a reservado	> 6 – 9 horas de envolvimento límbico	> 50 – 75%	6, 1-9/51-75%
V	Reservado a ruim	> 9 – < 12 horas de envolvimento límbico	> 75 - < 100%	9, 1-11. 9/75, 1-99, 9%
VI	Muito ruim	Envolvimento límbico total (12 horas)	Envolvimento total da conjuntiva (100%)	12/100%

(*) A escala análoga registra de forma precisa o envolvimento límbico em horas de limbo afetado / porcentagem de envolvimento conjuntival. Ao se calcular a porcentagem de envolvimento conjuntival, é considerado desde somente o envolvimento da conjuntiva bulbar até e incluindo os fórnices conjuntivais.

Fonte: ¹

3 JUSTIFICATIVA

Os modelos de queimaduras da superfície ocular existentes e muito utilizados para produzir lesões na superfície ocular são padronizados e uniformes. Eles são de execução trabalhosa, demorada e excessivamente pormenorizada.

A intenção é produzir um modelo de queimadura que comprometa amplamente superfície ocular, córnea, limbo e conjuntiva limbar. O modelo deve provocar, mais especificamente, dano ao epitélio da córnea, diminuição da sua transparência e indução de neovascularização corneal. Ele deve gerar isquemia no limbo córneo-conjuntival e isquemia com necrose da conjuntiva bulbar e do fórnice.

O modelo é aplicável em projetos de pesquisa para tratamentos cirúrgicos experimentais de queimaduras da superfície ocular.

O modelo é de execução prática, fácil, objetiva e rápida e simula um acidente de trabalho.

Foram utilizadas duas raças distintas para observar a evolução das lesões provocadas pelas queimaduras produzidas pelo modelo proposto.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um modelo experimental de queimadura alcalina da superfície ocular em coelhos, simulando uma queimadura provocada em acidente de trabalho.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a eficácia do modelo de queimadura;
- 2) Avaliar a evolução das lesões da superfície ocular em três momentos distintos quanto a:
 - a) Alterações da córnea: defeito epitelial, diminuição da transparência e indução de vascularização;
 - b) Alterações da conjuntiva limbar, bulbar e fórnice: hiperemia ou isquemia, edema e necrose;
 - c) Envolvimento do limbo: isquemia, hiperemia.

REFERÊNCIAS

1. DUA, H. S.; KING, A. J.; JOSEPH, A. A new classification of ocular surface burns. **Br J Ophthalmol**, 85:1379-1383, nov. 2001.
2. BECHARA, S. J.; GARCIA, I. A.; KOBIMGER, E. Uso simultâneo de acetil-cisteína e vitamina "C" na terapêutica das queimaduras corneanas por álcali. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 49(4):109-11, 1986.
3. PFISTER, R. R. Chemical corneal burs. **International Ophthalmol Clinics**, 24:157-68, 1984.
4. HUGHES, W. F. Alkalis burns of the cornea II. Clinical and pathologic course. **Arch Ophthalmol**, 36:189-214, 1946.
5. MORI, K.; BARROS, P. S. M.; TAKAHASHI, A. H. S. Fibronectina tópica no tratamento de úlcera de córnea de coelho após queimadura por álcali. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 56(5):254-57, 1993.
6. GIESSLER, S.; STRUCK, H. G.; GIESSLER, C. Consensual inflammatory reaction in chemical eye burn of the rabbit eye. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, 208:235-8, 1996.
7. BECKER, J.; SALLA, S.; WERRY, C.; OPPERMAN, K.; MEYER, J. Expert assessment of initial surgical management after experimental chemical eye burn. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, 209:138-43, 1996
8. YAN, Z. G.; GE, R. C.; ZHANG, L. Z. Na ultrastructure and proteoglycan study of experimental alkali burned cornea of the rabbit. **Chung Hua Yen Ko Tsa Chih**, 30:305-7, 1994.
9. CHUNG, J.; FAGERHOLM, P.; LINDSTRON, B. The behaviour of corneal epithelium following a standardized alkali wound. **Acta Ophthalmol**, 65:529-37, 1987.
10. ASARI, A.; MOTTA, M.; SEKIGUHI, T.; OKAMURA, K.; HORIG, K.; MIYAU CHI, S. Hyaluronan, CD44 and fibronectin in rabbit corneal epithelial wound healing, **Jpn J Ophthalmol**, 40:18-25, 1996.

11. ALVES, M. R.; MATTAR, D. B.; MILANI, J. A. A. Estudo comparativo da reparação do epitélio corneano após trauma planejado, em coelhas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 57(2):134-36, 1994.
12. LEVINSON, R. A.; PATERSON, C. A.; PFISTER, R. R. Ascorbate acid prevents corneal ulceration and perforation following experimental alkali burns. **Invest Ophthalmol**, 15: 986-993, 1976.
13. HUANG, Y. F.; SONG, C.; LY, Y. Q. The changes of hydroxyproline content in the cornea after alkali burns and the treatment effects. **Chin Ophthalmic Res**, 7:135-9, 1989.
14. BURNS, F. R.; GRAY, R. D.; PATERSON, C. A. Inhibition of alkali, induced corneal ulceration and perforation by a thio peptide. **Invest Ophthalmol**, Vis. Sci. 31:107-14, 1990.
15. PRINCE, J. H.; DIESEN, C. D.; EGLITIS, I.; RUSKELL, G. J. **The Rabbit Anatomy and Histology of the Eye and Orbit in Domestic Animals**. Springfield: Charles C. Thomas Publisher, 13:260-297, 1968.
16. PFISTER, R. R.; HADDOX, J. L.; YUILLE-BARR, D. The Combined effect of citrate/ascorbate treatment in alkali – injured rabbit eyes. **Cornea**, 10:100-104, 1991.
17. FAGERHOLM, P.; FITZSIMMONS, T.; HÄRFSTRAND, A.; SCHENHOLM, M. Reactive formation of hyaluronic acid in the rabbit corneal alkali burn. **Acta Ophthalmol Suppl**, 202:67-72, 1992.
18. PERRY, H. D.; HODES, I. W.; SEEDOR, J. A. *et al.* Effect of doxycycline hyclate on corneal epithelial wound healing in the rabbit alkali-burn model. Preliminary observations. **Cornea**, 12:379-382, 1993.
19. CONNERS, M. S.; URBANO, F., VAFEAS, C.; STOLTZ, R. A.; DUNN M. W.; SCHWARTZMAN, M. L. Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. **Invest Ophthalmol**, Vis Sci:38(10) 1963-71, sep. 1997.
20. VON FISCHERN, T.; LORENZ, U.; BURCHARD, W. G.; REIM, M.; SCHRAGE, N. F. Changes in mineral composition of rabbit corneas after alkali burn. **Graefe, s Arch Clin Exp Ophthalmol**; 236:553-558, 1998.
21. RYMER, S.; BURNIER, M.; MARINHO, D.; KWITKO, S.; BELFORT JR, R.; ROHE, D. Estudo Comparativo entre Transplante autólogo de limbo conjuntival e de limbo córneo-conjuntival no tratamento das queimaduras químicas oculares em coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol**, 65 (2) 161-170, 2002.

22. MARINHO, D, HOLFLING-LIMA, A.L., KWITKO, S., TSENG, S. C. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation? **Cornea**, 22(4): 338-342, 2003.
23. NAJAC, H.; COOPER, B., JACOBSON, J. H., SHAMOS, M., BREITFELLER, M. Direct thermocouple measurements of temperature rise and heat conduction in the rabbit retina. **Investigative Ophthalmology**, 2(1):32-36, 1963.
24. KOVALCHUK, L. V., KHOROSHILOVA-MASLOVA, I. P.; GANKOVSKAYA, L. V.; KRAINOVA, T. A.; GUNDOROVA, R. A.; ILATOVSKAYA, L. A.; MARLEVSHEV, A. V., TUMNOV, A. V. Natural Complex of cytokines is a potent stimulant to posttraumatic regeneration in rabbit cornea. **J Ocul Pharmacol Ther**, 12(3): 271-9, 1996.
25. KOSÁK, I., TRBOLOVA, A.; KOLODZIEYSKI, L.; JUHAS, T., LEDECKY, V. Experimental anterior lens capsule transplantation for chronic corneal ulcers-Bowman, s layer replacement? **Cornea**, 22(4); 359-62, 2003.
26. LAUBE, T.; BROCKMANN, C.; BUB, R.; LAU, C.; HÖCK, K.; STAWSKI, N.; STIEGLIZ, T.; RICHTER, H. A.; SCHILLING, H. Optical energy transfer for intraocular Microsystems studied in rabbits. **Graef, s Arch Clin Exp. Ophthalmol** 242:661-667, 2004.
27. FRAME, C.; FLUCKE, B.; BIRNGRUBER, R. Comparison of reduced and standard light application in photodynamic therapy of the eye in two rabbit models. **Graef, s Arch Clin Exp Ophthalmol**, 244:773-781, 2006
28. CHUNG, J. H.; KIN, H. J.; FAGERHOLMB, P. Effect of topically applied N-hyaluronan on experimental corneal alkali wound healing. **Korean J. Ophthalmol**, 10:68-75, 1996..
29. PATERSON, C. A.; WELLS, J. G.; KOKLITIS, P. A. Recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 suppresses alkali-burns-induced corneal ulceration in rabbits. **Invest ophthalmol Vis Sci**; 35(2):677-84, 1994.
30. MC CULLEY, J. P. Chemical injuries. Smolin G and Thoft RA, editors. **The cornea: scientific foundations and clinical practice**, 527-42. Boston: Little Brown, 1987.
31. PATERSON, C. A.; PFISTER, R. R.; LEVINSON, R. A. Aqueous humor pH changes after experimental alkali burns. **Am. J. Ophthalmol**, 79:414-19, 1975.31.

32. JOHNSOS-MULLER, B.; GROSS, J. Regulation of corneal collagenase production: epithelial-stromal cell interactions. **Proc Natl Acad Sci**, 75:4417-21, 1978.
33. JOHNSON-WINT, B. Autocrine regulation of collagenase production by passad corneal stromal cells in vitro. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 28(suppl):230, 1987.
34. WAGONER, M. D.; KENYON, K. R. Chemical Injuries. In: SHINGLETON, B. J.; HERS, P. S.; KENYON, K. R. **Eye trauma**. 1.ed. p.79-94. St. Louis: Mosby, 1991.
35. SHAPIRO, M. S.; FRIEND, J.; THOFT, R. A. Corneal reepitelization from the conjunctiva. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 21:135-142, 1981.
36. THOFT, R. A.; FRIEND, J.; MURPHY, H. S. Ocular surface epithelium and corneal vascularization in rabbits. I. The role of wounding. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 18(1):85-92, 1979.
37. NEWSOME, D. A.; GROSS, J. Regulation of corneal collagenase production: stimulation of serially passaged stromal cells by blood mononuclear cells. **Cell**, 16:895-900, 1979.
38. HADDOX, J. L.; PFISTER, R. R.; SLAUGHIER, S. G. Na excess of topical calcium and magnesium reverses the therapeutic effect of citrate on the development of corneal ulcers after alkali injury. **Cornea**, 15(2):191-5, 1996.
39. OBENBERGER, J. Paper strips and rings as simple tools for standardization of experimental eye injuries. **Ophthalmic Res**; 7:363-367, 1975.



A Novel Experimental Model of Alkaline Chemical Burn of the Ocular Surface

Bocaccio, Francisco José de Lima, MD

Professor at the Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology at the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

Ophthalmology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil

Corresponding author:

Francisco José de Lima Bocaccio

Rua Mostardeiro 291 sala 304

Porto Alegre – RS – Brasil

90430-001

Phone: +55 51 32 22 05 26

Fax: +55 51 32 19 46 43

E-mail: fjlb@terra.com.br

Running Title: Experimental Model of Ocular Surface Burn

ABSTRACT

INTRODUCTION

Rabbits are frequently used as an experimental model for assessment of corneal lesion due to burn caused by alkaline agents. The most commonly used agents to cause burns are n-heptanol acid and sodium hydroxide (NaOH), which are used in various concentrations, ways and time of exposure to ocular structures.

The present study aimed at developing an experimental model of ocular burn in rabbits, a model with characteristics different from those of existing models whose execution is lengthy, arduous and detailed.

This study was conducted at the Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology of the School of Medicine at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), at the Ophthalmology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and at the Biotery of the State Health Research and Production Foundation of Rio Grande do Sul (FEPPS).

OBJECTIVES

GENERAL

To produce an experimental model of alkaline ocular surface burn in rabbits, simulating a burn caused by a work accident.

SPECIFIC

1. To evaluate the efficacy of the model of burn;

2. To assess the evolution of ocular surface lesions in three different moments as to:
 - A. Corneal alterations: epithelial damage, decrease in transparency, and induction of vascularization
 - B. Limbal, bulbar, and forniceal conjunctival alterations: hyperaemia or ischemia, edema, and necrosis;
 - C. Limbal involvement: ischemia, hyperaemia.

MATERIAL AND METHODS

Forty-five eyes of New Zealand (NZ) and Chinchilla (CH) rabbits were damaged by ocular surface burn and were assessed as follows: first, 12 eyes (4 NZ and 8 CH) in the first week; second, 15 eyes (5 NZ and 10 CH) in the second week; third, 13 eyes (5 NZ and 8 CH) in the third week.

RESULTS

The severity of the burn reached grades 3 and 4 in 12 eyes of New Zealand rabbits (85.7%) and in 21 eyes (80.7%) of Chinchilla rabbits. As to the degree of severity of vascularization: 5 eyes of New Zealand rabbits (35.7%) and 13 eyes of Chinchilla rabbits (50%) reached grades 3 and 4 of Thoft's classification. The eyes of the two breeds of rabbits classified as G3 and G4 totaled 33 of all burned eyes (82.5%). As to vascularization, results were the following: 4 eyes (10%) were classified as grade 0 of vascularization; 8 eyes (20%) as grade 1; 9 eyes (23%) as grade 2; 5 eyes (13%) as grade 3, and 14 eyes (34%) as grade 4. As to limbal involvement and involvement of bulbar and do forniceal conjunctivas, 95% of all eyes

were damaged.

CONCLUSION

Lesions caused by the model developed herein reached degrees of severity of burn and vascularization in line with those of the three classifications referred (Thoft's, Hughes', and Dua's). The model proposed reproduced G3 and G4 lesions according to Hughes' classification in 82.5% of the eyes, created corneal vascularization in 70% of the eyes, and resulted in limbal involvement and bulbar and forniceal conjunctiva in 95% of the eyes, meeting the requirements of Dua's classification.

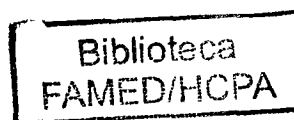
Keywords: Experimental model in rabbits; burn; alkali; ocular surface; cornea; limbus; conjunctiva.

INTRODUCTION

There are several models of chemical burn^{1,2,3,4,5,6,7}. Frequently, rabbits are used as experimental models to evaluate corneal lesion due to burn caused by alkaline agents. The most commonly used agents to cause burns are n-heptanol and sodium hydroxide (NaOH), which are used in various concentrations, ways and time of exposure of ocular structures. Obenberg¹⁹ was the first of many authors to describe the use of paper disks with variable diameters and/or rings soaked in an alkaline agent^{8,9,10,2,3,4,12,13,14,15,16,17,18}.

The objective of the present study was to develop an experimental model of ocular burn in rabbits, a model with characteristics different from those of existing models, whose execution is lengthy, arduous and detailed. The model proposes a burn that compromises the set cornea–limbus–conjunctiva with the alterations characteristic of grades 3 and 4 of Hughes' classification. The model should produce lesions in the conjunctivas, both bulbar and forniceal, which characterize grades III, IV, V, and VI of Dua's classification²⁰, and should be of fast, practical and objective execution, simulating a burn resulting from a work accident.

MATERIAL AND METHODS



STUDY DESIGN

The present was a randomized experimental study; study factor was the efficacy of the method of burn, and outcomes were the morphological alterations on the ocular surface due to burn.

POPULATION

Two breeds of rabbits were used: *Oryctolagus cuniculus*, the albino New Zealand (NZ) breed (Figure 1), and Chinchilla (CH) (Figure 2). Fifteen rabbits of each breed were used, totaling 30 rabbits or 60 eyes; all rabbits were male, aged between 4 and 6 months, and weighed between 2,000 and 2,500 grams. The model was executed in two breeds both to test the evolution of lesions caused by the burns and to enable the performance of surgical treatment (autologous and allogeneic transplant) in a future experimental study. As a result, the 15 right eyes of the NZ rabbits were not burned since they were the donors of limbal conjunctiva for the surgical treatment to be administered.

Forty-five eyes suffered an alkaline burn and were distributed as follows: 15 left eyes of NZ rabbits and 30 eyes of CH rabbits.

LOCATION

This study was conducted at the Department of Ophthalmology and

Otorhinolaryngology of the School of Medicine at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), at the Ophthalmology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and at the Biotery of the State Health Research and Production Foundation of Rio Grande do Sul (FEPPS).

LOGISTICS

The rabbits were divided in pairs and numerically identified; each pair of rabbits was composed of a rabbit of each breed, (NZ/CH), in a total of 15 pairs; the pairs were placed in separate cages suspended approximately 1 meter from the floor. Their food consisted of standard feed (Purina), vegetables, and water.

There was daily veterinary supervision throughout the entire time of the experiment.

All procedures – burns and revisions – were performed under general anesthesia using Zoletil^R 50 (Tiletamine chloridrate 125mg + Zolazepam chloridrate 125mg) 0.4 mg/kg intramuscular (IM). Ten minutes prior to the anesthesia 0.5ml/kg of atropine was injected IM. During the procedure, topic anesthesia was used with two anesthetic eyedrops: a drop of Visonest® (proxymetacaine) and one drop of Anestésico® (tetracaine chloridrate + phenylephrine chloridrate + boric acid).

Alkalyne burns were caused by a 1 normal solution of sodium hydroxide (NaOH) applied in the left eye of New Zealand (NZ) rabbits, totaling 15 eyes, and in both eyes of Chinchilla (CH) rabbits, totaling 30 eyes. Animal suffering and pain were avoided using general and topic anesthesia²¹.

1N SOLUTION OF SODIUM HYDROXIDE

The 1N NaOH solution is obtained by the dilution of 40g of NaOH in 1000ml of water, with pH 13.6²².

MODEL OF ALKALINE CHEMICAL BURN

The execution time of the model to produce the intended burn was 3 minutes, as follows:

1. One minute to apply the 2 anesthetic eye drops at an interval of 30 seconds;
2. One minute for the 2 drops of alkaline 1N NaOH to stay in contact with the ocular surface, and
3. One minute of irrigation with 1000ml of physiological saline solution at 0.9%.

The chemical burn was realized using a pipette which instilled 2 drops of the 1N NaOH solution on the ocular surface (cornea and conjunctiva). After one minute of contact between the solution and the eye, the eye was washed with running physiological saline solution for 1 minute, corresponding to approximately 1,000 milliliters. Twenty-four hours after the burn, the eyes received clinical treatment, as follows:

1. Eye drop of ofloxacin (Oflox[®]), 1 drop every 8 hours;
2. Eye drop of prednisone (Predfort[®]) 1 drop every 8 hours for 10 days.

During the 3 weeks following the burn, the use of the antibiotic eyedrop was maintained at the same dosage.

The objective of the treatment is to stabilize the ocular surface, allowing for the performance of surgical treatment, when indicated, and to control the inflammatory process caused by the burn as a prophylaxis for a secondary infection.

PROCEDURE AND EVALUATION OF RESULTS

Forty-five eyes were submitted to the action of the chemical agent, all on the same day, according to the model proposed. Five eyes were lost in the process. The 40 damaged eyes were assessed after the burn in 3 different moments: (i) 12 eyes (4 NZ and 8 CH) in the first week; 15 eyes (5 NZ and 10 CH) in the second week; 13 eyes (5 NZ and 8 CH) in the third week.

In each of the 3 post-burn weeks, the damaged eyes were examined and assessed under a microscope with and without fluorescein dye; the animals were under general and local anesthesia at these moments. The following were assessed at the examination: The clinical signs and the extension of the lesions (hyperaemia and/or ischemia and edema of the bulbal, limbal and forniceal conjunctiva), limbal involvement, as well as corneal disepithelialization, opacity, and vascularization. The degree of severity of burn and the degree of vascularization were classified according to the extension and severity of the lesions.

Biopsy and/or histopathologic examination were not performed because the clinical picture determines the diagnosis and classification of the burn.

Both the procedure and the evaluation of the results, which considered the classifications of HUGHES¹ and THOFT²³, were done under a surgical microscope, using fluorescein dye and cobalt light, by a single observer, who counted with the assistance of another ophthalmologist.

The equipment (trademark DF Vasconcellos, manufactured in Brazil, model with hot illumination and no zoom) had a split lamp (trademark DF Vasconcellos) and a camcorder (trademark 1CCD Iris model 107), which allowed for the video

documentation, in real time, of all post-burn evaluations of all the cases.

VARIABLES STUDIED

The 40 damaged eyes were randomized divided in 3 groups and assessed in 3 different moments: (i) 12 eyes (4 NZ and 8 CH) in the first week, (ii) 15 eyes (5 NZ and 10 CH) in the second week, and 13 eyes (5 NZ and 8CH) in the third week, respectively the seventh, fourteenth, and twentieth days of post-burn.

DEPENDENT VARIABLES

The ocular surface lesions characterized by the following alterations were identified as dependent variables:

A. Corneal alterations: epithelial defect, decrease in transparency, and induction of vascularization;

B. Limbal, bulbar and forniceal conjunctiva alterations: hyperaemia or ischemia, edema and necrosis;

C. Limbal involvement: ischemia, hyperaemia.

INDEPENDENT VARIABLES

The following were the independent variables:

A. The burning agent: 1N Sodium hydroxide (NaOH);

B. The breeds of rabbits used: New Zealand (NZ) and Chinchilla (CH).

SAMPLE CALCULATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Sample calculation

This study compared variables that expressed the extension of the ocular surface lesions in the burned eyes over time; each burn was evaluated at one, two, and three weeks post-burn. Considering grade 3.0 as the estimated mean of the degree of severity of burns, according to Hughes' classification, as well as an alpha of 5% and a power of 80%, it was estimated that 13 rabbits of each breed would be needed to meet the study objectives, thus totaling 26 rabbits or 52 eyes.

Statistical analysis

Data were stored in a databank using the Statistical Package for Social Science (SPSS) program, version 10.0, and were analyzed using the same program.

The analysis was descriptive, and the study population was characterized by means of graphs, tables, and figures.

For the analysis of results at the three times (first week, second week, and third week post-burn), the non-parametric test of Kruskal-Wallis was used because the values observed did not have a normal distribution. Values $p < 0.05$ were considered statistically significant.

ETHICAL CONSIDERATIONS

This study was conducted using the smallest number of animals needed to observe and analyze the results obtained. International guidelines for biomedical research involving animals were followed²⁴. All procedures were done using topic and general anesthesia, thus avoiding animal suffering or pain²¹; the rabbits were sacrificed at the end of the study.

RESULTS

Five eyes were lost during the experiment as follows: One left eye of a NZ rabbit and 4 eyes of 2 CH rabbits. As a result, the total was: 14 damaged eyes of NZ rabbits and 26 damaged eyes of CH rabbits. The 40 damaged eyes were randomized divided in 3 groups and assessed at 3 different moments: first, 12 eyes (4 NZ and 8 CH) on the 7th day of the 1st week; second, 15 eyes (5 NZ and 10 CH) on the 14th day of the second week, and third, 13 eyes (5 NZ e 8 CH) on the 21st day of the third week.

DEGREE OF SEVERITY OF BURN AT THE THREE MOMENTS

A careful exam of each eye under the microscope showed the following: Corneal erosion and/or ulcer stained with fluorescein in various extensions; limbal hyperaemia and/or ischemia occupying between 30 and 360 degrees; hyperaemia, ischemia, and even necrosis of the bulbar and forniceal conjunctiva; presence of

muco-purulent secretion on the edges of the eyelashes, which many times were coalescent, and eyelid hyperaemia.

Table 1 shows the results of the comparison of the degree of severity of burn (Hughes' Classification) at the 3 different times between the burned eyes of NZ rabbits and between the burned eyes of CH rabbits. There was no statistically significant difference between the first, second, and third weeks of post-burn in the 2 breeds, ($p = 0.30$) and ($p = 0.28$), respectively.

Table 1 Comparison of post-burn evolution of degree of severity of burn at the different times (1st, 2nd and 3rd post-burn weeks) the eyes of NZ and CH rabbits were assessed

Breeds	Degree of severity of burn according to Hughes' classification (mean/median)			P Value*
	1 st week	2 nd week	3 rd week	
	Times of post-burn assessment			
	1 st week	2 nd week	3 rd week	
New Zealand	4.0/4.0	4.0/4.0	3.5/3.0	0.30
Chinchilla	3.1/4.0	3.0/3.5	3.5/4.0	0.28

*Kruskal-Wallis

DEGREE OF VASCULARIZATION

Table 2 shows the comparison of the degree of vascularization (Thoft's Classification) in the assessment of post-burns at the different times of the eyes of NZ and CH rabbits. No statistically significant difference was found in the degree of severity of vascularization for eyes of NZ rabbits ($p = 0.36$). A statistically significant

different was found in the degree of severity of vascularization for the eyes of CH rabbits ($p < 0.001$).

Table 2 Comparison of evolution of degree of vascularization at the different times post-burn for the eyes of NZ rabbits

Breeds	Degree of severity of vascularization according to Thoff's classification (mean/median)			P Value*
	1 st week	2 nd week	3 rd week	
New Zealand	2.25/2.0	2.6/2.0	3.25/3.5	0.36
Chinchilla	0.8/0.0	2.6/2.5	3.6/4.0	<0.001

*Kruskal-Walys

Table 3 shows the results of the assessment of the degree of severity of burn and ocular vascularization using the proposed chemical burn model.

In the sample used there is a percentage of G3 burns with a reserved prognosis (27.5%) and of G4 with a poor prognosis (55.0%), as well as percentage of G1 (5%) and G2 (12.5%) with good prognosis (Hughes, 1946). The ratio test showed that 82.5% of grades 3 and 4 burns were statistically higher than the 17.5% of grades 1 and 2 burns (Table 3).

Table 3 also shows the gradual and late increase in the degree of vascularization¹.

Table 3 Results of assessment of degree of severity of burn and ocular vascularization using the proposed chemical burn model

Variable	N	%	% cumulative p	
Degree of burn				
1	2	5.00	50	<0.001*
2	5	12.5	17.5	
3	11	27.5	45.0	
4	22	55.0	100.0	
Total	40	100.0	100.0	
Degree of vascularization				
0	4	10.0		<0.0008**
1	8	20.0	10.0	
2	9	22.5	30.0	
3	5	12.5	52.5	
4	14	35.0	65.0	
Total	40	100.0	100.0	

* P value for the comparison of grade 3 and 4 versus 1 and 2;

** P value for the comparison of degree of vascularization 2, 3 and 4 versus 0 and 1; Z test (comparison between ratios)

Table 4 shows the number of eyes and percentages of degrees of severity of lesions as to limbal and conjunctival involvement in all eyes according to Dua's classification²⁰.

Table 4 Number of eyes and percentages of lesions according to Dua's classification for the two breeds

Grade	Prognosis	Clinical findings Limbal involvement	Conjunctival involvement
I	Very good	2 eyes (5%) of all eyes	No
II	Good	No	No
III	Good	16 eyes (40%) of all eyes	2 eyes (5%) of all eyes
IV	Good to reserved	No	3 eyes (7.5%) of all eyes
V	Reserved to poor	No	9 eyes (22.5%) of all eyes
VI	Very poor	22 eyes (55%) of all eyes	26 eyes (65%) of all eyes

As to limbal involvement, the analysis showed the following: 16 eyes (40%) were classified as grade III; 22 eyes (55%) were grade VI, and no eye was grade II, IV, or V. Only 2 eyes (5%) were classified as grade I.

As to conjunctival involvement, the analysis of results showed the following: 2 eyes (5%) of all burned eyes were classified as grade III; 3 eyes of all eyes (7.5%) were grade IV; 9 eyes (22.5%) of all eyes were grade V, and 26 eyes (65%) of all eyes were grade VI.

Table 5 shows the number of eyes and percentage of lesions according to Dua's classification for the eyes of each breed (NZ = New Zealand; CH = Chinchilla).

Table 5 Number of eyes and percentage of lesions according to Dua's classification for the eyes of each breed (NZ = New Zealand; CH = Chinchilla)

Grade	Prognosis	Clinical findings and limbal involvement	Conjunctival involvement
I	Very good	2 eyes CH (7.6% CH)	No
II	Good	No	No
III	Good	4 eyes NZ (28.6% NZ) 12 eyes CH (46.2% CH)	2 eyes CH (7.7% CH)
IV	Good to reserved	No	3 eyes CH (11.5% CH)
V	Reserved to poor	No	4 eyes NZ (28,5% NZ) 5 eyes CH(19,2% CH)
VI	Very poor	10 eyes NZ (71.4% NZ) 12 eyes CH (46.2% CH)	10 eyes NZ (71.4% NZ) 16 eyes CH (61.5% CH)

As to limbal involvement, the analysis showed the following: 2 eyes (7.6%) of CH rabbits were classified as grade I; 4 eyes (28.6%) of NZ rabbits and 12 eyes (46,2%) of CH rabbits were grade III, and 10 eyes (71.4%) of NZ rabbits and 12 eyes (46.2%) of CH rabbits were grade VI.

As to conjunctival involvement, the analysis showed the following: 2 burned eyes (7.7%) both of CH rabbits were classified as grade III; 3 eyes of CH rabbits (11.5%) were classified as grade IV; 4 eyes (28.5%) of NZ rabbits and 5 eyes

(19.2%) of CH rabbits were grade, and 10 eyes (71.4%) of NZ rabbits and 16 eyes (61.5%) of CH rabbits were grade VI.

DISCUSSION

The different types of chemical burn models reported herein presented specific characteristics that did not meet the needs of the present study^{2,3,4,5,6,25,26}. Kompa²⁶ irrigated with 30 drops (1.5 ml) of NaOH 2N for 60 seconds the ocular surface of the eyes of NZ rabbits in order to study pH alterations in eyes with no previous ocular lesion. Other models presented variations of the concentrations of the chemical being used (NaOH), different diameters of the filter-paper disk soaked in the chemical as well as different times of exposure of the ocular structures to the chemical agent. Time of irrigation and the chemical used for the removal of the alkali were also variables^{8,9,10,2,3,4,12,13,14,15,16,17,18,27,28,29,30}. These factors result in models whose execution is lengthy, arduous and extremely detailed.

Although there are several models, the present study developed a novel model of burn which would also compromise the set cornea – limbus – conjunctiva with the alterations that are characteristic of grades 3 and 4 of Hughes' classification. This novel model should cause damage to the epithelium, decrease in corneal transparency, and induce corneal vascularization. It would also have the objective of generating ischemia in the corneal-conjunctival limbus, and ischemia with necrosis of the bulbal and forniceal conjunctiva. The execution of the model should be practical, objective, and fast, in other words, it should reproduce a work accident.

Consequently, a very specific model was proposed; this model produced the

lesions characteristic of Grade 3 and Grade 4 of Hughes' classification¹ as well as a well-evidenced clinical picture in 82.5% of the burned eyes.

The model described herein is convenient due to its rapid execution, since it may be realized in 3 minutes. It was tested in 2 breeds of rabbits, which allowed for the follow-up of the evolution of the degree of severity of lesions in both breeds, testing, therefore, its efficacy.

At the clinical exam under a microscope, the eyes of the rabbits showed the following: Broad epithelial damage with an opacity that hindered the visualization of the details of the iris; ischemia between 180 and 360 degrees of the limbus; conjunctival edema and hemorrhage, with variable corneal vascularization in 82.5% of all the eyes, and severe lesions which produced conjunctival adherences and one case of palpebral seclusion. In fact, this model represented what happens with people who manipulate the chemical used herein without wearing the adequate safety equipment (goggles). In case of an accident, this agent contacts the eyes and causes ocular burns, which reaches various degrees of severity depending on the concentration and amount of the agent in contact with the ocular surface. Despite emergence treatments, chemical agents remain on the ocular surface prolongating their action and the ocular damage.

The present model was devised with specific objectives, aiming to reproduce the anatomic alterations resulting from chemical burns and to allow for the clinical assessment of their effects, similarly to what happens in patients, at the 3 times programmed (first, second, and third weeks of post-burn) to assess the evolution of the burn and the best time for surgical treatment. The latter will be the subject of a future experiment. The early repair stage of the burn starts between the first and third weeks after the McCulley lesion is caused³¹.

The present model achieved the objectives defined previously.

ON THE BURN



It was necessary for the burn to damage the bulbal, perilimbal and forniceal conjunctiva, limbus and cornea, in an extension and amount that met the parameters for grades 3 and 4 of Hughes' classification¹. As a result, the amount of 1N NAOH (2 drops) used, its permanence time on the ocular surface (1 minute), and amount of physiological saline solution (1,000 ml) were established, as well as the duration of washing off (1 minute) for removal of the alkaline agent. This strategy resulted in a model that caused a burn with a clinical picture similar to the findings seen in 82.5% of the burned eyes.

The model was statistically significant ($p < 0.001$) with an efficacy of 82.5% of the burned eyes (considering the eyes classified as grade 3 and grade 4) compared to 17.5% of the eyes with grade 1 and grade 2. The degree of vascularization reached 70% of the burned eyes, 35% in grade 4, and 35% when grades 2 and 3 of Thoft's classification²³ were added, also showing statistic significance ($p = 0.008$).

Table 1 shows the results of the comparison of the degree of severity of burn (Hughes' classification), at the 3 different times, between the eyes of the NZ rabbits. No statistically significant difference ($p = 0.30$) was found between the assessments of lesions in the first, second, and third post-burn weeks, in other words, on the 7th, 14th and 21st days after the injury.

As to the fact that the mean degree of severity of burn was maintained in grades 3 and 4, one may say that the clinical exam performed under the microscope showed a decrease in the inflammatory reaction. This evidence supports McCulley's

statement³¹, which says that the early repair stage is between the first and third weeks.

The degree of severity of burn for the damaged eyes of CH rabbits is showed in the same table. No statistically significant difference ($p = 0.28$) was seen between the 3 post-burn times in any of the assessment periods. Lesions kept the characteristics of reserved to poor prognosis; however, in the third week (21 days) they presented with clinical signs of a more stable picture.

ON THE VASCULARIZATION

Vascularization gradually intensified as of the second week, as described in Thoft's classification²³. Therefore, it confirmed the findings of other models mentioned herein and the efficacy of the burn, which in the third week (21 days post-burn) showed extensive corneal vascularization in over 50% of the eyes and was absent in only 4 of the remaining burned eyes.

In the eyes of NZ rabbits, neo-vascularization occurred earlier, as early as in the first week, and there was a gradual and progressive increase in vascularization (Table 2).

In the eyes of CH rabbits, it was verified that the clinic is supported by the statistically significant difference seen in the vascular evolution. The eyes of CH rabbits showed much more vascular growth in the third week.

Findings related to the comparison of the degree of vascularization (Thoft's classification²³) in the post-burn assessments at the different times for the eyes of CH rabbits are shown in Table 2. There was a statistically significant difference seen in the degree of vascularization ($p < 0.001$).

In the third week, 10 of the 14 eyes with vascularization grade 4 confirm and support the fact that vascularization is more accentuated later; this is accordance with the literature²³.

Dua's classification²⁰ for ocular surface burns values the extension of the burn in the bulbal and forniceal conjunctiva. Findings such as the conjunctival fornice and bulbal conjunctiva found in this experiment support the efficacy of the model proposed. In the present experiment, the model of burn produced limbal involvement in 95% of the eyes when grades III and VI were considered. The involvement of bulbar e forniceal conjunctivas occurred in 100% of the eyes, all in grades III, IV, V, and VI, 87.5% of them being in grades V and VI, that is, with reserved to poor and very poor prognosis according to Dua's classification²⁰.

It was verified in the present study that indifferent from the breeds used, lesions were reproduced with similar characteristics and showed a less intense inflammatory clinical picture in the eyes of CH rabbits; this finding suggests that Chinchilla would be a more resistant breed.

The studies reporting experiments with CH rabbits are fewer in the literature when compared to the studies that used eyes of New Zealand rabbits^{32,33,34,35,36}.

It was verified that vascularization extended ($p < 0.001$) in the eyes of CH rabbits in the group assessed in the third week. In the eyes of the NZ rabbits, vascularization started earlier and increased in the third week, showing no statistical significance.

Assymetric corneal neo-vascularization is reported by several authors^{37,23}.

Pfister tried to "simplify the classification" by presenting a group of drawings to classify the severity of involvement into normal, mild, moderate, moderate to severe, severe, and very severe.

The new model proposed herein is different from the other models because it causes a burn similar to that seen in the daily clinical practice. All experimental models described in the literature may show more uniformity in the lesions since they use rings that delimit and circumscribe these lesions to the corneal surface and to the corneo-conjunctival limbus with more or less diameter but without compromising the bulbar conjunctiva let alone the fornix. Lesions of goblet cells cause alterations in the lacrimal film and, consequently, "dry eye", reflecting in the clinical and visual prognosis^{27,28,29,30}.

The present model is easily performed and simulates well a work accident. Moreover, it produces and reproduces the degree of severity of burns which have reserved or poor prognosis and which require, besides the clinical, adjuvant treatment, a surgical treatment that becomes essential for the improvement of the ocular and visual prognosis of these cases.

CONCLUSION

The execution of the novel model proposed herein is easy and fast. The model is reproducible. It damaged 82.5% of the eyes submitted to the chemical agent, which is in line with the lesions found in the models described in the literature. Considering the limbal involvement and the involvement of the bulbar and forniceal conjunctiva, the model damaged respectively 95% and 100% of the eyes burned. Finally, the model simulates well a burn caused by a work accident.

References

- 1) HUGHES, W. F. Alkalis burns of the cornea II. Clinical and pathologic course. **Arch Ophthalmol**, 36:189-214, 1946.
- 2) BECHARA, S. J.; GARCIA, I. A.; KOBINGER, E. Uso simultâneo de acetilcisteína e vitamina "C" na terapêutica das queimaduras corneanas por álcali. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 49(4):109-11, 1986.
- 3) MORI, K.; BARROS, P. S. M.; TAKAHASHI, A. H. S. Fibronectina tópica no tratamento de úlcera de córnea de coelho após queimadura por álcali. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 56(5):254-57, 1993.
- 4) ALVES, M. R.; MATTAR, D. B.; MILANI, J. A. A. Estudo comparativo da reparação do epitélio corneano após trauma planejado, em coelhas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 57(2):134-36, 1994.
- 5) CHUNG, J. H.; KIN, H. J.; FAGERHOLMB, P. Effect of topically applied N-hiluronan on experimental corneal alkali wound healing. **Korean J. Ophthalmol**, 10:68-75, 1996.
- 6) PATERSON, C. A.; WELLS, J. G.; KOKLITIS, P. A. Recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 suppresses alkali-burns-induced corneal ulceration in rabbits. **Invest ophthalmol Vis Sci**; 35(2):677-84, 1994.
- 7) GIESSLER, S.; STRUCK, H. G.; GIESSLER, C. Consensual inflammatory reaction in chemical eye burn of the rabbit eye. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, 208:235-8, 1996.
- 8) LEVINSON, R. A.; PATERSON, C. A.; PFISTER, R. R. Ascorbate acid prevents corneal ulceration and perforation following experinmental alkali burns. **Invest Ophthalmol**, 15: 986-993, 1976.
- 9) HUANG, Y. F.; SONG, C. The changes of hydroxyproline content in the cornea after alkali burns and the treatment effects. **Chin. Ophthalmic Res**, 7:135-9, 1989.
- 10) BURNS, F. R., GRAY, R. D.; PATERSON, C. A. Inhibition of alkali, induced corneal ulceration and perforation by a thio peptide. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci**, 31:107-14, 1990.
- 11) CHUNG, J.; FAGERHOLM, P.; LINDSTRON, B. The behaviour of corneal epithelium following a standardized alkali wound. **Acta Ophthalmol**, 65:529-37,

1987.

- 12) PFISTER, R. R.; HADDOX, J. L.; YUILLE-BARR, D. The Combined effect of citrate/ascorbate treatment in alkali – injured rabbit eyes. **Cornea**, 10:100-104, 1991.
- 13) FAGERHOLM, P.; FITZSIMMONS, T.; HÄRFSTRAND, A.; SCHENHOLM, M. Reactive formation of hyaluronic acid in the rabbit corneal alkali burn. **Acta Ophthalmol Suppl**, 202:67-72, 1992.
- 14) PERRY, H. D.; HODES; L. W.; SEEDOR, J. A. *et al.* Effect of doxycycline hyclate on corneal epithelial wound healing in the rabbit alkali-burn model. Preliminary observations. **Cornea**, 12:379-382, 1993.
- 15) CONNERS, M. S.; URBANO, F.; VAFEAS, C.; STOLTZ, R. A.; DUNN, M. W.; SCHWARTZMAN, M. L.; Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 38(10) 1963-71, sep.1997.
- 16) VON FISCHERN; T.; LORENZ, U.; BURCHARD, W. G.; REIM, M.; SCHRAGE, N. F. Changes in mineral composition of rabbit corneas after alkali burn. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 236:553-558, 1998.
- 17) RYMER, S.; BURNIER, M.; MARINHO, D.; KWITKO, S.; BELFORT JR, R.; ROHE, D. Estudo Comparativo entre Transplante autólogo de limbo conjuntival e de limbo córneo-conjuntival no tratamento das queimaduras químicas oculares em coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 65 (2) 161-170, 2002.
- 18) MARINHO, D.; HOLFLING-LIMA, A. L.; KWITKO, S.; TSENG, S. C. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation? **Cornea**, 22(4): 338-342, 2003.
- 19) OBENBERGER, J. Paper strips and rings as simple tools for standardization of experimental eye injuries. **Ophthalmic Res**, 7:363-367, 1975.
- 20) DUA, H. S.; KING, A. J.; JOSEPH, A. A new classification of ocular surface burns. **Br J Ophthalmol**, 85:1379-1383, Nov. 1976.
- 21) GOLDIN, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28p.
- 22) CHUNG, J. H. Experimental corneal alkali wound healing. **Acta Ophthalmologica Supplement**, 187 v.66, 1-34, 1988.

- 23)THOFT, R. A.; FRIEND, J.; MURPHY, H. S. Ocular surface epithelium and corneal vascularization in rabbits. I.The role of wounding. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 18(1):85-92, 1979.
- 24)CONNOR, S. S.; FUEZALINDA-PUELMA, H. L. **Bioethicis**: issues and perspectives. Washington DC: Paho, 226-229, 1990.
- 25)HADDOX, J. L.; PFISTER, R. R.; SLAUGHIER, S. G. Na excess of topical calcium and magnesium reverses the terapeutic effect of citrate on the development of corneal ulcers after alkali injury. **Cornea**, 15(2):191-5, 1996.
- 26)KOMPA, S.; REDBRAKE, C.; HILGERS, C.;WÜSTEMEYER, H.; SCHRAGE, N.; REMKY, A. Effect of different irrigating solutions on aqueous humor pH changes, intraocular pressure and histological findings after induced alkali burns. **Acta Ophthalmol. Scand.**, 83: 467-470, 2005.
- 27)FRANZCO, L. W. H.; SUMMERS, P. M.; FANZCA, D. G.; BANCROFT, J. ; FRANZCO, G. R. L. Controled trial of hyperbaric oxygen treatment for alkali corneal burn in the rabbit. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, 32:67-70, 2004.

- 28) LISHA, G., FAGERHOLM, P.; PALMBLAD, J. Expression of basic fibroblast growth factor in rabbit corneal alkali wounds in the presence and absence of granulocytes. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.83, issue 3, pp 374-378, 2005.
- 29) KATO, T.; SAIKA, S.; OHNISHI, Y. Effects of the Matrix Metalloproteinase Inhibitor GM6001 on the Destruction and Alteration of Epithelial Basement Membrane During the Healing of Post-alkali Burn in Rabbit Cornea. **Jpn J Ophthalmol**, 50: 90-95, 2006.
- 30) HE, JIUCHENG; BAZAN, NICOLAS G.; BAZAN, H. E. Alkali-Induced Corneal Stromal Melting Prevention by a Novel Platelet - Activating Factor Receptor Antagonist. **Arch Ophthalmol**, v.124(1), 70-78, jan. 2006.
- 31) MC CULLEY, J. P. Chemical injuries. Smolin G and Thoft RA. **The cornea: scientific foundations and clinical practice**. 2.ed., 527-42. Boston: Little Brown, 1987.
- 32) NAJAC, H.; COOPER, B.; JACOBSON, J. H.; SHAMOS, M.; BREITFELLER, M. Direct thermocomple measurements of temperature rise and heat conduction in the rabbit retina. **Investigative Ophthalmology**, 2(1):32-36, 1963.
- 33) KOVALCHUK, L. V.; KHOROSHILOVA-MASLOVA, I. P.; GANKOVSKAYA, L. V.; KRAINOVA, T. A.; GUNDOROVA, R. A.; ILATOVSKAYA, L. A.; MARLEVSHEV, A. V.; TUMNOV, A. V. Natural Complex of cytokines is a potent stimulant to posttraumatic regeneration in rabbit cornea. **J Ocul Pharmacol Ther.**, 12(3): 271-9, 1996.
- 34) KOSÁK, I.; TRBOLOVA, A.; KOLODZIEYSKI, L.; JUHAS, T.; LEDECKY, V. Experimental anterior lens capsule transplantation for chronic corneal ulcers-Bowman,s layer replacement? **Cornea**, 22(4);359-62, 2003.
- 35) LAUBE, T.; BROCKMANN, C.; BUB, R.; LAU, C.; HÖCK, K.; STAWSKI, N.; STIEGLIZ, T.; RICHTER, H. A.; SCHILLING, H. Optical energy transfer for intraocular Microsystems studied in rabbits. **Graefes Arch Clin Exp. Ophthalmol**, 242:661-667, 2004.

36) FRAME, C.; FLUCKE, B.; BIRNGRUBER, R. Comparison of reduced and standard light application in photodynamic therapy of the eye in two rabbit models. **Graef,s Arch Clin Exp Ophthalmol**, 244:773-781, 2006.

37) CHEN, J.J., TSENG SC. Abnormal Corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 1991; 32:2219-33.



**Novo Modelo Experimental de Queimadura Química Alcalina, da Superfície
Ocular**

Bocaccio, FJL.

Prof. Departamento de Oftalmología e Otorrinolaringología da Faculdade
de Medicina da UFRGS

Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Autor para correspondência: Francisco José de Lima Bocaccio

Endereço: Mostardeiro 291 sala 304 Porto Alegre – RS- Brasil

CEP 90430-001

Fone: 55 51 32 22 05 26

Fax: 55 51 32 19 46 43

e-mail: fjlb@terra.com.br

Título Abreviado: Modelo Experimental de Queimadura da Superfície Ocular

RESUMO

INTRODUÇÃO

O presente estudo visa desenvolver um modelo experimental de queimadura ocular em coelhos com características diferentes dos modelos já existentes que determinam uma execução demorada, trabalhosa e pormenorizada. O modelo propõe uma queimadura que comprometa o conjunto córnea – limbo – conjuntiva com as alterações características dos graus 3 e 4 da classificação de Hughes. O modelo deve produzir lesões nas conjuntivas, bulbar e fórnice, que caracterizem os graus III, IV, V e VI da classificação de Dua e ainda ser de execução rápida, prática e objetiva, simulando uma queimadura conseqüente a um acidente de trabalho.

Freqüentemente coelhos são utilizados como modelo experimental para avaliação de lesão de córnea decorrente de queimadura por álcali. Os agentes provocadores de queimaduras mais comumente utilizados são o ácido n-heptanol e o hidróxido de sódio (NaOH), variando-se tanto suas concentrações como a forma e o tempo de exposição das estruturas oculares a estes agentes.

Este estudo foi realizado no Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e executado no Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Produzir um modelo experimental de queimadura alcalina da superfície ocular em coelhos, simulando uma queimadura provocada em acidente de trabalho.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a eficácia do modelo de queimadura;
- 2) Avaliar a evolução das lesões da superfície ocular em três momentos distintos quanto a:
 - a) Alterações da córnea: defeito epitelial, diminuição da transparência e indução de vascularização;
 - b) Alterações da conjuntiva limbar, bulbar e fórnice: hiperemia ou isquemia, edema e necrose;
 - c) Envolvimento do limbo: isquemia, hiperemia.

MATERIAL E MÉTODO

Os 45 olhos lesados através da queimadura foram avaliados em três momentos distintos: na primeira semana: 12 olhos (4 NZ e 8 CH); na segunda semana: 15 olhos (5NZ e 10 CH); na terceira semana: 13 olhos (NZ e 8CH).

RESULTADOS

A severidade da queimadura graus 3 e 4 atingiu 12 olhos (85,7%) nos coelhos Nova Zelândia e, 21 olhos (80,7%) na raça Chinchila. Quanto ao grau de severidade da vascularização, 5 olhos(35,7%) nos coelhos Nova Zelândia e 13 olhos (50%) nos coelhos Chinchila atingiram graus 3 e 4 da classificação de Thoft. A soma dos olhos das duas raças de coelhos classificados em G3 e G4 resultou em 33 olhos queimados (82,5%) de um total de 40 olhos. Quanto à vascularização, resultaram 4 olhos (10%), com grau 0 de vascularização; 8 olhos (20%) com grau 1; 9 olhos (23%) com grau 2; 5 olhos (13%) com grau 3; 14 olhos (34%) grau 4. Considerando o envolvimento do limbo, e das conjuntivas bulbar e do fórnice, 95% do total de olhos ficaram lesados.

CONCLUSÃO

As lesões provocadas pelo modelo desenvolvido atingiram graus de severidade de queimadura e vascularização que contemplaram as três classificações referidas. O modelo proposto reproduziu as lesões de G3 e G4, da classificação de Hughes em 82,5% dos olhos; criou vascularização corneal em 70% dos olhos conforme a classificação de Thoft; provocou alterações de envolvimento límbico em 95% dos olhos e conjuntiva bulbar e fórnice em 95% deles, preenchendo os quesitos necessários à classificação de Dua.

Palavras-Chave: Modelo experimental em coelhos, queimadura, álcali, superfície ocular, córnea, limbo e conjuntiva.

INTRODUÇÃO

Existem vários modelos de queimadura química^{1,2,3,4,5,6,7}. Frequentemente coelhos são utilizados como modelo experimental para avaliação de lesão de córnea decorrente de queimadura por álcali. Os agentes provocadores de queimaduras mais comumente utilizados são o ácido n-heptanol e o hidróxido de sódio (NaOH), variando-se as suas concentrações, bem como a forma e o tempo de exposição das estruturas oculares a estes agentes químicos. Alguns autores utilizam discos de papel filtro embebidos em álcali com diâmetros variáveis e ou anéis^{8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18}. Obenberg (1975)¹⁹ foi o primeiro a descrever o uso de anel para efetuar as queimaduras.

O presente estudo visa desenvolver um modelo experimental de queimadura ocular em coelhos com características diferentes dos modelos já existentes que determinam uma execução demorada, trabalhosa e pormenorizada. O modelo propõe uma queimadura que comprometa o conjunto córnea – limbo – conjuntiva com as alterações características dos graus 3 e 4 da classificação de Hughes¹. O modelo deve produzir lesões nas conjuntivas, bulbar e fórnice, que caracterizem os graus III, IV, V e VI da classificação de Dua²⁰ e ainda ser de execução rápida, prática e objetiva, simulando uma queimadura conseqüente a um acidente de trabalho.

MATERIAL E MÉTODO

DELINEAMENTO

Este é um estudo experimental, randomizado, no qual o fator em estudo é a eficácia do método de queimadura e o desfecho são as alterações morfológicas da superfície ocular decorrentes da queimadura.

POPULAÇÃO

Foram utilizadas duas raças de coelhos: a *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem Nova Zelândia (NZ), albinos (Figura 1) e a Chinchila (CH) (Figura 2). Utilizaram-se quinze coelhos de cada raça, num total de trinta animais – 60 olhos-, machos, entre quatro e seis meses de idade, pesando entre 2000 e 2500 gramas. O modelo foi executado em duas raças com o propósito de testá-lo, avaliando a evolução das lesões provocadas pelas queimaduras e também possibilitar a execução do tratamento cirúrgico (transplante autólogo e alogênico) em futuro estudo experimental. Assim sendo, os quinze olhos direitos dos coelhos NZ não foram queimados, pois foram os doadores de conjuntiva limbar, para o tratamento cirúrgico, no trabalho subsequente, citado.

Os quarenta e cinco olhos sofreram queimadura alcalina e foram assim distribuídos: quinze olhos esquerdos dos (NZ) e trinta olhos dos (CH).



LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e executado no Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS).

LOGÍSTICA

Os coelhos foram dispostos em pares, numericamente identificados, sendo cada par constituído por um coelho de cada raça, (NZ/CH), num total de quinze pares, alojados em gaiolas individuais suspensas a aproximadamente um metro do chão. A alimentação constou de ração padronizada (Purina), verduras e água.

Houve supervisão veterinária diuturna e cotidianamente, enquanto durou o experimento.

Todos os procedimentos - queimaduras, e revisões - foram realizados sob anestesia geral com Zoletil^R 50 (Cloridrato de tiletamina 125mg + Cloridrato de zolazepan 125mg), intra muscular (IM), 0,4 mg/kg. Dez minutos antes aplicou-se, via intra muscular, (IM) 0,5ml/kg de atropina. Durante o procedimento foi utilizado anestesia tópica com dois colírios anestésicos: uma gota de Visonest^R (cloridrato de proximetacaína) e uma gota de colírio Anestésico^R (cloridrato de tetracaína + cloridrato de fenilefrina + ác. bórico).

Provocaram-se queimaduras alcalinas com hidróxido de sódio (NaOH) solução 1 Normal, no olho esquerdo dos coelhos da raça Nova Zelândia (NZ) -

quinze olhos - e nos dois olhos dos coelhos da raça Chinchila (CH) - trinta olhos. Empregou-se anestesia tópica e geral, assim evitando sofrimento ou dor por parte do animal ²¹.

Da Substância Hidróxido de Sódio – Solução 1N

A solução de NaOH 1 N é obtida pela diluição de 40 g de NaOH em 1000ml de água, com pH em torno de 13,6 ²²

Modelo de Queimadura Química – ÁLCALI

O tempo de execução do modelo para produzir a queimadura pretendida foi de três minutos, a saber:

- 1) Um minuto para aplicar os dois colírios anestésicos, com intervalo de 30 segundos;
- 2) Um minuto, para permanência das duas gotas do álcali NaOH 1N com a superfície ocular;
- 3) Um minuto de irrigação com 1000ml de soro fisiológico 0,9%.

A queimadura química foi efetuada com conta-gotas, instilando-se duas gotas da solução de NaOH 1N na superfície ocular (córnea e conjuntiva). Após um minuto de contato da solução com o olho, efetuou-se a lavagem com soro fisiológico corrente por um minuto, correspondendo a, aproximadamente, 1000 mililitros. Vinte e quatro horas após a queimadura, os olhos receberam tratamento clínico, constituído por:

- 1) Colírio de ofloxacina (Oflox^R): uma gota, de 8/8 horas;
- 2) Colírio de prednisona, (Predfort): uma gota de 8/8 horas, por um período de dez dias.

Nas três semanas subseqüentes, o colírio de antibiótico foi mantido na mesma dosagem.

O tratamento tem como propósito estabilizar a superfície ocular, permitindo a execução de tratamento cirúrgico, quando indicado, e controlar o processo inflamatório provocado pela queimadura, profilaxia de uma infecção secundária.

Procedimento e Avaliação dos Resultados

Foram submetidos à ação do agente químico 45 olhos, todos no mesmo dia, conforme o modelo proposto. Os quarenta olhos lesados (houve perda de cinco olhos) foram avaliados após a queimadura em três momentos distintos: na primeira semana, 12 olhos (4 NZ e 8 CH); na segunda semana, 15 olhos (5 NZ e 10 CH); na terceira semana, 13 olhos (5 NZ e 8 CH).

Em cada período determinado, primeira, segunda e terceira semanas pós queimaduras, sob anestesia geral e local, os olhos lesados foram examinados e avaliados sob microscópico, sem e com o corante fluoresceína. Avaliaram-se os sinais clínicos e a extensão das lesões (hiperemia e ou isquemia e edema de conjuntiva bulbar, limbar e fórnice; o envolvimento do limbo; a desepitelização, opacidade e vascularização da córnea. Conforme o comprometimento, a extensão e a gravidade das lesões, classificou-se o grau de severidade da queimadura e da vascularização.

Biópsia e ou anátomo-patológico não foram realizados, pois, na prática, o quadro clínico é determinante para o diagnóstico e a classificação da queimadura.

O procedimento bem como as avaliações dos resultados, consideradas as classificações de Hughes¹ e de Thoft²³, foram realizados sob microscópio cirúrgico, com uso do corante fluoresceína e luz de cobalto, pelo mesmo observador e com a participação e auxílio de outro oftalmologista.

O equipamento, da marca DF Vasconcellos, de fabricação nacional, modelo com iluminação quente, sem zoom, estava provido com lâmpada de fenda DF Vasconcellos e filmadora marca 1CCD Íris modelo 107, permitindo a videodocumentação, em tempo real, de todas as avaliações pós queimaduras, em todos os casos.

VARIÁVEIS ESTUDADAS

Os 40 olhos lesados pela queimadura foram divididos em três grupos aleatórios, avaliados em três momentos distintos: na primeira semana, 12 olhos (4 NZ e 8 CH); na segunda semana, 15 olhos (5NZ e 10 CH); na terceira semana, 13 olhos (NZ e 8CH), respectivamente nos sétimo, décimo quarto e vigésimo dias pós queimaduras.

Variáveis Dependentes

Foram identificadas como variáveis dependentes as lesões da superfície

ocular caracterizadas pelas seguintes alterações:

- a) Alterações da córnea: defeito epitelial, diminuição da transparência e indução de vascularização;
- b) Alterações da conjuntiva limbar, bulbar e fórnice: hiperemia ou isquemia, edema e necrose;
- c) Envolvimento do limbo: isquemia, hiperemia.

Variáveis Independentes

O agente causal da queimadura foi o Hidróxido de sódio – NaOH 1N. As raças dos coelhos utilizadas foram Nova Zelândia (NZ) e Chinchila (CH).

CÁLCULO DA AMOSTRA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cálculo da Amostra

Neste estudo, foram comparadas variáveis que expressaram a extensão das lesões na superfície ocular nos olhos queimados, ao longo do tempo de evolução das queimaduras, as quais foram avaliadas em uma, duas e três semanas pós queimadura. Considerando-se uma média esperada das lesões de grau 3,0, para o grau de severidade da queimadura, pela classificação de Hughes; um alfa de 5% e um poder de 80%, estimou-se que, para atingir o objetivo proposto, seriam necessários treze coelhos de cada raça, num total vinte e seis coelhos (52 olhos).

Análise Estatística

Os dados foram armazenados em um banco de dados no programa *Statistical Package For Social Science* (SPSS), versão 10.0, e analisados através deste mesmo programa.

A análise foi descritiva, com caracterização da população estudada através de gráficos, tabelas e figuras.

Para a análise dos resultados nos três tempos (primeira semana, segunda semana e terceira semana pós queimadura), utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, pois os valores observados não possuíam uma distribuição normal. Consideraram-se estatisticamente significativos os achados com valor de $p < 0,05$.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi realizado utilizando o número mínimo de animais necessários para se observar e analisar os resultados obtidos. Foram obedecidos os princípios internacionais orientados para a pesquisa biomédica envolvendo animais²⁴. Todos os procedimentos foram feitos empregando- anestesia tópica e geral, assim evitando sofrimento ou dor por parte do animal²¹. Os coelhos foram sacrificados ao término do trabalho.

RESULTADOS

No decorrer do experimento, houve perda de cinco olhos: um olho esquerdo de um coelho NZ e quatro olhos de dois coelhos CH. Então se teve: 14 olhos lesados de coelhos Nova Zelândia e 26 olhos de coelhos Chinchila. Os 40 olhos lesados através da queimadura foram divididos aleatoriamente em três grupos e avaliados em três momentos distintos: no sétimo dia da primeira semana 12 olhos (4 NZ e 8 CH); no décimo quarto dia da segunda semana, 15 olhos (5NZ e 10 CH); no vigésimo primeiro dia da terceira semana, 13 olhos (5NZ e 8CH).

GRAU DE SEVERIDADE DA QUEIMADURA NOS TRÊS PERÍODOS

O exame meticoloso de cada olho, sob microscópio, revelou: erosão e ou úlcera de córnea corada com fluoresceína em extensões variadas; hiperemia e ou isquemia do limbo que ocupava de 30 a 360 graus; hiperemia, isquemia e até necrose da conjuntiva bulbar e do fórnice; presença de secreção muco-purulenta nas bordas dos cílios, muitas vezes coalescentes e com bordos palpebrais hiperemiados.

A Tabela 1 apresenta os resultados da comparação do grau de severidade da queimadura (Classificação de Hughes), nos três diferentes tempos, entre os olhos lesados dos coelhos Nova Zelândia e os olhos lesados dos coelhos Chinchila. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a primeira, segunda e a terceira semana pós queimadura nas duas raças, ($p = 0,30$) e ($p = 0,28$), respectivamente.

Tabela 1: Comparação da evolução pós-queimadura do grau de severidade da queimadura nos diferentes tempos (1^a, 2^a e 3^a semanas pós queimadura) de avaliação nos olhos dos coelhos Nova Zelândia e nos olhos dos coelhos Chinchila

Raças	Grau de severidade da queimadura, segundo a classificação de Hughes (média/mediana)			Valor de p*
	Tempos de avaliação Pós queimadura			
	1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	
Nova Zelândia	4,0/4,0	4,0/4,0	3,5/3,0	0,30
Chinchila	3,1/4,0	3,0/3,5	3,5/4,0	0,28

*Kruskal-Wallys

Fonte: Elaborado pelo autor

Figuras anexo B

Grau de Vascularização

A Tabela 2 revela a comparação do grau de vascularização (Classificação de Thoft) na avaliação pós queimaduras, nos diferentes tempos, nos olhos dos coelhos Nova Zelândia e Chinchila. Não houve diferença estatisticamente significativa no grau de severidade da vascularização dos olhos dos coelhos da raça Nova Zelândia, ($p = 0,36$). Nos olhos dos coelhos da raça Chinchila, houve diferença estatisticamente significativa no grau de severidade da vascularização, ($p < 0,001$).

Tabela 2: Comparação da evolução do grau de vascularização, nos diferentes tempos pós-queimadura, nos olhos dos coelhos Nova Zelândia

Raças	Grau severidade da vascularização, segundo a classificação de Thoft (média/mediana)			Valor de p*
	1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	
Nova Zelândia	2,25/2,0	2,6/2,0	3,25/3,5	0,36
Chinchila	0,8/0,0	2,6/2,5	3,6/4,0	<0,001

*Kruskal-Wallys

Fonte: Elaborado pelo autor

Figuras anexo B

A Tabela 3 apresenta os resultados da avaliação do grau de severidade da queimadura e da vascularização ocular obtidos, utilizando o modelo da queimadura

química proposto.

Na amostra utilizada, há um percentual de queimaduras de prognóstico reservado G3 (27,5%) e de mau prognóstico G4 (55,0%) e um percentual de bons prognósticos G1 (5%) e G2 (12,5%) (Hughes, 1946). O teste para proporções demonstra que 82,5% de queimados graus 3 e 4 é estatisticamente superior aos 17,5% de queimados graus 1 e 2. (Tabela 3)

A mesma Tabela demonstra o aumento gradual e tardio do grau de vascularização, confirmando os achados de Hughes⁴.

Tabela 3: Resultados da avaliação do grau severidade da queimadura e da vascularização ocular utilizando o modelo de queimadura química proposta

Variável	N	%	% cumulativo	p
Grau de queimadura				
1	2	5,00	50	<0,001*
2	5	12,5	17,5	
3	11	27,5	45,0	
4	22	55,0	100,0	
Total	40	100,0	100,0	
Grau de vascularização				
0	4	10,0		<0,0008**
1	8	20,0	10,0	
2	9	22,5	30,0	
3	5	12,5	52,5	
4	14	35,0	65,0	
Total	40	100,0	100,0	

*valor de p para a comparação do grau de queimadura 3 e 4 versus 1 e 2;

** valor de p para a comparação do grau de vascularização 2,3 e 4 versus 0,1; teste Z (comparação entre proporções)

Fonte: Elaborado pelo autor

A Tabela 4 apresenta o número de olhos e percentuais dos graus de severidade das lesões quanto aos envoltórios límbico e conjuntival resultante em todos os olhos em relação à Classificação de Dua¹.

Tabela 4: apresenta o número de olhos e percentuais das lesões em relação a classificação de DUA para as duas raças. NZ = Nova Zelândia ; CH = Chinchilla

Grau	Prognóstico	Achados clínicos Envolvimento límbico	Envolvimento conjuntival
I	Muito bom	2 olhos 5% de todos os olhos	Nenhum
II	Bom	Nenhum	Nenhum
III	Bom	16 olhos (40%) do total de olhos	2 olhos (5%) do total de olhos
IV	Bom a reservado	Nenhum	3 olhos (7,5%) do total de olhos
V	Reservado a ruim	Nenhum	9 olhos (22,5%) do total de olhos
VI	Muito ruim	22 olhos (55%) do total de olhos	26 olhos (65%) do total de olhos

Fonte: Elaborado pelo autor

Considerando-se o envolvimento límbico, a análise demonstrou que 16 olhos (40%) classificaram-se no grau III. No grau VI, foram 22 olhos (55%). Nos graus II, IV e V nenhum olho foi classificado. Classificaram-se, no grau I, somente dois olhos (5%).

Em relação ao envolvimento conjuntival, a análise dos resultados demonstrou que, do total dos olhos comprometidos das duas raças, 2 olhos (5%) classificaram-se no grau III; 3 olhos (7,5%), no grau IV; 9 olhos (22,5%), no grau V; 26 olhos (65%), no grau VI.

A tabela 5 mostra o número de olhos e percentuais das lesões em relação à classificação de DUA para os olhos das duas raças separadamente (Nova Zelândia; CH=Chinchila).

Tabela 5: apresenta o número de olhos e percentuais das lesões em relação a classificação de DUA para os olhos das duas raças separadamente. NZ = Nova Zelândia ; CH = Chinchila

Grau	Prognóstico	Achados clínicos Envolvimento límbico	Envolvimento conjuntival
I	Muito bom	2 olhos CH (7,6% CH)	Nenhum
II	Bom	Nenhum	Nenhum
III	Bom	4 olhos NZ (28,6% NZ) 12 olhos CH (46,2% CH)	2 olhos CH (7,7% CH)
IV	Bom a reservado	Nenhum	3 olhos CH (11,5% CH)
V	Reservado a ruim	Nenhum	4 olhos NZ (28,5% NZ) 5 olhos CH (19,2% CH)
VI	Muito ruim	10 olhos NZ (71,4% NZ) 12 olhos CH (46,2% CH)	10 olhos NZ (71,4% NZ) 16 olhos CH (61,5% CH)

Fonte: Elaborado pelo autor

Considerando-se o envolvimento límbico, a análise demonstrou que dois olhos dos coelhos Chinchila (7,6%) classificaram-se no grau I. No grau III, foram classificados 4 olhos da Nova Zelândia (28,6%) e 12 olhos da Chinchila (46,2%). No grau VI, classificaram-se 10 olhos (71,4%) dos coelhos Nova Zelândia e 12 olhos (46,2%) dos coelhos da raça Chinchila.

Em relação ao envolvimento conjuntival, 2 olhos comprometidos (7,7%) classificaram-se no grau III, ambos eram de coelhos Chinchila. Classificaram-se, no grau IV, 3 olhos (11,5%) que eram de coelhos Chinchila. No grau V, classificaram-se, 4 olhos (28,5%) de coelhos Nova Zelândia e 5 olhos (19,2%) de coelhos Chinchila. No grau VI, foram classificados 10 olhos (71,4%) de coelhos da raça Nova Zelândia e 16 olhos (61,5%) de coelhos da raça Chinchila.

DISCUSSÃO

Os diversos tipos de modelos de queimaduras químicas relatados apresentavam características peculiares que não correspondiam às necessidades deste estudo^{2,3,4,5,6,25,26} irrigaram com trinta gotas (1,5 ml) de NaOH 2N, por 60 segundos, a superfície ocular de olhos de coelhos Nova Zelândia para estudar a alteração do pH, sem nenhuma outra lesão ocular prévia. Outros modelos apresentavam variações das concentrações da substância em uso, NaOH; diferentes diâmetros do disco de papel filtro embebido nesta substância; distintos tempos de exposição das estruturas oculares ao agente químico. Eram também variáveis o tempo de irrigação e a substância utilizada na remoção do álcali^{8,9,10,11,3,4,12,13,14,15,16,17,18,27,28,29,30}. Este conjunto de fatores determina a estes modelos uma execução demorada, trabalhosa e excessivamente pormenorizada.

Embora existam muitos modelos, desenvolveu-se um novo modelo de queimadura que também comprometesse o conjunto córnea – limbo – conjuntiva com as alterações características dos graus 3 e 4; da classificação de Hughes. Ele deveria provocar dano ao epitélio, diminuição da transparência da córnea e induzir vascularização corneal e teria o propósito de gerar isquemia no limbo córneo-conjuntival e isquemia com necrose da conjuntiva bulbar e do fórnice. O modelo deveria ser de execução prática, objetiva e rápida, reproduzindo a situação de um acidente de trabalho.

Foi proposto um modelo, bem específico, que produziu as lesões características de Grau 3 e Grau 4 da classificação de Hughes¹, constituindo um quadro clínico bem evidenciado em 82,5% dos olhos lesados.

O modelo descrito é conveniente pela sua rápida execução, podendo ser

realizado em três minutos. Ele foi testado em duas raças de coelhos, o que permitiu o acompanhamento, em ambas, da evolução do grau de severidade das lesões e verificou sua eficácia.

Os olhos dos coelhos, ao exame clínico sob microscópio, apresentaram um dano epitelial extenso com opacidade que dificultava a visualização dos pormenores da íris, isquemia de 180 a 360 graus do limbo, edema e hemorragia conjuntival com vascularização variável da córnea em 82,5% do total de olhos. Apresentaram ainda lesões graves que produziram sinéquias conjuntivais e um caso com seclusão palpebral. Este modelo representou o ocorrido com pessoas que manipulam a substância química, em questão, sem o equipamento de proteção adequado (óculos) e recebem este agente nos olhos, com conseqüente queimadura. Esta queimadura atinge graus de severidade variados que dependem da concentração e da quantidade da substância que entra em contato com a superfície ocular. Apesar do tratamento emergencial, as substâncias químicas permanecem na superfície ocular lesada, prolongando, por sua ação química, o dano ocular.

Este modelo foi idealizado com objetivos específicos, visando reproduzir as alterações anatômicas e permitir avaliar clinicamente seus efeitos, de modo semelhante ao que acontece nos pacientes, nos três tempos programados – primeira, segunda e terceira semanas pós queimadura; para se avaliar a evolução da queimadura e o melhor tempo para o tratamento cirúrgico em um experimento a ser realizado posteriormente.

A fase reparadora precoce da queimadura inicia de uma a três semanas após provocada a lesão³¹.

Este modelo cumpriu os objetivos a que se propôs.

Da Queimadura

Era necessário que a queimadura lesasse conjuntiva bulbar, perilímbica e fórnice, limbo e córnea em extensão e quantidade que contemplassem os graus 3 e 4 da classificação de Hughes¹. Estabeleceu-se a quantidade da substância NaOH 1N (duas gotas) utilizada, seu tempo de permanência na superfície do olho (1 minuto) e a quantidade de soro fisiológico (1000ml), bem como o tempo de duração da lavagem (1minuto) para remoção da substância alcalina. Esta estratégia resultou em um modelo que provocou, em 82,5% dos olhos lesados, uma queimadura com quadro clínico bem característico e semelhante aos achados propostos.

O modelo foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$) com eficácia de 82,5% dos olhos queimados, somados os olhos classificados em grau 3 e grau 4, contra 17,5% dos olhos com grau 1 e grau 2. O grau de vascularização também teve significância estatística. ($p = 0,0008$), ele alcançou 70% dos olhos lesados, 35% no grau 4 e 35% somados nos graus 2 e 3 da classificação de Thoft²³.

A Tabela 1 apresenta os resultados da comparação do grau de severidade da queimadura (Classificação de Hughes)¹, nos três diferentes tempos, entre os olhos dos coelhos Nova Zelândia. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,30$) entre as avaliações das lesões na primeira, segunda e a terceira semanas pós queimadura, respectivamente no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias.

A despeito do grau de severidade médio da queimadura manter-se nos graus 3 e 4, o exame clínico realizado sob microscópio demonstrou diminuição da reação inflamatória, corroborando a afirmativa de McCulley³¹: a fase reparadora precoce se estende de uma a três semanas.

Quanto ao grau de severidade da queimadura para os olhos lesados dos

coelhos Chinchila, conforme revelado na Tabela 1, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,28$) entre os três tempos pós queimadura, em nenhum dos períodos de avaliação. As lesões se mantiveram com as características entre prognóstico reservado e mau pronóstico, mas apresentaram, na terceira semana (21 dias), sinais clínicos de um quadro mais estável.

Da Vascularização

A vascularização que, a partir da segunda semana, gradativamente exacerbou-se, repetiu o descrito na classificação de Thoft²³. Confirmou o ocorrido nos outros modelos já citados, bem caracterizando a eficácia da queimadura, que apresentou, na terceira semana (21 dias pós queimadura), extensa vascularização corneal, em mais de 50% dos olhos, ela só deixou de estar presente, em menor escala, em 4 dos demais olhos lesados.

Nos olhos dos coelhos da raça Nova Zelândia, a neovascularização foi mais precoce, já na primeira semana, havendo aumento gradual e progressivo (Tabela 2).

Nos olhos dos coelhos da raça Chinchila verificou-se que a clínica é referendada pela diferença estatisticamente significativa, na evolução vascular. Os olhos dos coelhos Chinchila tiveram, na terceira semana, um crescimento vascular bem mais acentuado.

Os achados referentes à comparação do grau de vascularização (Classificação de Thoft)²³, nas avaliações pós queimadura, nos diferentes tempos, nos olhos dos coelhos da raça Chinchila são apresentados na Tabela 2. Houve diferença estatisticamente significativa no grau de vascularização ($p < 0,001$).

Na terceira semana, dez dos catorze olhos com vascularização grau 4 confirmam e comprovam que a vascularização é mais acentuada tardiamente, em

concordância com a literatura (Thoft)²³.

A classificação de Dua²⁰ para queimaduras da superfície ocular valoriza a extensão do comprometimento da queimadura na conjuntiva bulbar e fórnice. Os achados como a queimadura do fórnice conjuntival e conjuntiva bulbar, presentes nos olhos deste experimento em questão, corroboram a eficácia do modelo. Neste experimento, o modelo de queimadura proposto produziu envolvimento limbar em 95% dos olhos, considerando os graus III e VI. O envolvimento das conjuntivas bulbar e fórnice ocorreu em 100% dos olhos, todos entre os graus III, IV, V e VI, sendo 87,5% nos dois últimos graus, de prognósticos reservado a ruim e muito ruim da classificação de Dua²⁰.

Verificou-se, no presente estudo, que independentemente das duas raças utilizadas, as lesões foram reproduzidas com características semelhantes, apresentando um quadro clínico inflamatório menos intenso nos olhos dos coelhos da raça chinchila, gerando a suposição que seria esta uma raça mais resistente.

Os trabalhos relatados a respeito de experimentos com coelhos da raça Chinchila são em muito menor número, se comparados aos que utilizam olhos de coelhos da raça Nova Zelândia^{32,33,34,35,36}.

Constatou-se que, nos olhos dos coelhos da raça Chinchila, a vascularização exacerbou-se ($p < 0,001$) nos olhos do grupo avaliado na terceira semana. Nos olhos dos coelhos da raça Nova Zelândia, a vascularização iniciou mais precocemente, com aumento na terceira semana sem significância estatística.

A neovascularização corneal assimétrica é referida por outros autores^{37,23}.

Pfister tentou 'simplificar a classificação', ao apresentar um grupo de desenhos para classificar a severidade do envolvimento em normal, leve, moderado,

moderado a severo, severo, muito severo.

O modelo novo proposto diferencia-se dos demais, pois promove uma queimadura similar àquela encontrada na clínica diária. Todos os modelos experimentais descritos na literatura podem apresentar mais uniformidade nas lesões, pois utilizam anéis que delimitam, circunscrevem as lesões à superfície corneal e ao limbo córneo-conjuntival, com maior ou menor diâmetro, sem, no entanto, comprometerem a conjuntiva bulbar e muito menos o fórnice. A lesão às células caliciformes provocam alterações no filme lacrimal, olho seco com importante repercussão no prognóstico clínico e visual^{27,28,29,30}.

O modelo é de fácil execução e bem simula um acidente de trabalho. Ele produz e reproduz grau de severidade de queimaduras com prognóstico reservado e mau prognóstico que, além do tratamento clínico, exigem, como coadjuvante, tratamento cirúrgico, que, nestes casos, torna-se fundamental para melhora do prognóstico ocular e visual.

CONCLUSÃO

O novo modelo é reprodutível e de rápida e fácil execução. Lesa 82,5% dos olhos submetidos ao agente químico, corroborando as lesões encontradas nos modelos descritos na literatura. Considerando o envolvimento do limbo e das conjuntivas bulbar e fórnice, o modelo lesa, respectivamente, 95% e 100% dos olhos acometidos. Ele simula bem uma queimadura por acidente de trabalho.

REFERÊNCIAS



- 1) HUGHES, W. F. Alkalis burns of the cornea II. Clinical and pathologic course. **Arch Ophthalmol**, 36:189-214, 1946.
- 2) BECHARA, S. J.; GARCIA, I. A.; KOBIMGER, E. Uso simultâneo de acetil-cisteína e vitamina "C" na terapêutica das queimaduras corneanas por álcali. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 49(4):109-11, 1986.
- 3) MORI, K.; BARROS, P. S. M.; TAKAHASHI, A. H. S. Fibronectina tópica no tratamento de úlcera de córnea de coelho após queimadura por álcali. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 56(5):254-57, 1993.
- 4) ALVES, M. R.; MATTAR, D. B.; MILANI, J. A. A. Estudo comparativo da reparação do epitélio corneano após trauma planejado, em coelhas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 57(2):134-36, 1994.
- 5) CHUNG, J. H.; KIN, H. J.; FAGERHOLMB, P. Effect of topically applied N-hiluronan on experimental corneal alkali wound healing. **Korean J. Ophthalmol**, 10:68-75, 1996.
- 6) PATERSON, C. A.; WELLS, J. G.; KOKLITIS, P. A. Recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 suppresses alkali-burns-induced corneal ulceration in rabbits. **Invest ophthalmol Vis Sci**; 35(2):677-84, 1994.
- 7) GIESSLER, S.; STRUCK, H. G.; GIESSLER, C. Consensual inflammatory reaction in chemical eye burn of the rabbit eye. **Klin Monatsbl Augenheilkd**, 208:235-8, 1996.
- 8) LEVINSON, R. A.; PATERSON, C. A.; PFISTER, R. R. Ascorbate acid prevents corneal ulceration and perforation following experimental alkali burns. **Invest Ophthalmol**, 15: 986-993, 1976.
- 9) HUANG, Y. F.; SONG, C. The changes of hydroxyproline content in the cornea after alkali burns and the treatment effects. **Chin. Ophthalmic Res**, 7:135-9, 1989.
- 10) BURNS, F. R., GRAY, R. D.; PATERSON, C. A. Inhibition of alkali, induced corneal ulceration and perforation by a thio peptide. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci**, 31:107-14, 1990.
- 11) CHUNG, J.; FAGERHOLM, P.; LINDSTRON, B. The behaviour of corneal epithelium following a standardized alkali wound. **Acta Ophthalmol**, 65:529-37,

1987.

12) PFISTER, R. R.; HADDOX, J. L.; YUILLE-BARR, D. The Combined effect of citrate/ascorbate treatment in alkali – injured rabbit eyes. **Cornea**, 10:100-104, 1991.

13) FAGERHOLM, P.; FITZSIMMONS, T.; HÄRFSTRAND, A.; SCHENHOLM, M. Reactive formation of hyaluronic acid in the rabbit corneal alkali burn. **Acta Ophthalmol Suppl**, 202:67-72, 1992.

14) PERRY, H. D.; HODES; L. W.; SEEDOR, J. A. *et al.* Effect of doxycycline hyclate on corneal epithelial wound healing in the rabbit alkali-burn model. Preliminary observations. **Cornea**, 12:379-382, 1993.

15) CONNERS, M. S.; URBANO, F.; VAFEAS, C.; STOLTZ, R. A.; DUNN, M. W.; SCHWARTZMAN, M. L.; Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 38(10) 1963-71, sep.1997.

16) VON FISCHERN; T.; LORENZ, U.; BURCHARD, W. G.; REIM, M.; SCHRAGE, N. F. Changes in mineral composition of rabbit corneas after alkali burn. **Graefe, Arch Clin Exp Ophthalmol**, 236:553-558, 1998.

17) RYMER, S.; BURNIER, M.; MARINHO, D.; KWITKO, S.; BELFORT JR, R.; ROHE, D. Estudo Comparativo entre Transplante autólogo de limbo conjuntival e de limbo córneo-conjuntival no tratamento das queimaduras químicas oculares em coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 65 (2) 161-170, 2002.

18) MARINHO, D.; HOLFLING-LIMA, A. L.; KWITKO, S.; TSENG, S. C. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation? **Cornea**, 22(4): 338-342, 2003.

19) OBENBERGER, J. Paper strips and rings as simple tools for standardization of experimental eye injuries. **Ophthalmic Res**, 7:363-367, 1975.

20) DUA, H. S.; KING, A. J.; JOSEPH, A. A new classification of ocular surface burns. **Br J Ophthalmol**, 85:1379-1383, nov. 1976.

21) GOLDIN, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28p.

22) CHUNG, J. H. Experimental corneal alkali wound healing. **Acta Ophthalmologica Supplement**, 187 v.66, 1-34, 1988.

23) THOFT, R. A.; FRIEND, J.; MURPHY, H. S. Ocular surface epithelium and corneal vascularization in rabbits. I.The role of wounding. **Invest Ophthalmol Vis**

Sci, 18(1):85-92, 1979.

24) CONNOR, S. S.; FUEZALINDA-PUELMA, H. L. **Bioethicis**: issues and perspectives. Washington DC: Paho, 226-229, 1990.

25) HADDOX, J. L.; PFISTER, R. R.; SLAUGHIER, S. G. Na excess of topical calcium and magnesium reverses the therapeutic effect of citrate on the development of corneal ulcers after alkali injury. **Cornea**, 15(2):191-5, 1996.

26) KOMPA, S.; REDBRAKE, C.; HILGERS, C.; WÜSTEMEYER, H.; SCHRAGE, N.; REMKY, A. Effect of different irrigating solutions on aqueous humor pH changes, intraocular pressure and histological findings after induced alkali burns. **Acta Ophthalmol. Scand.**, 83: 467-470, 2005.

27) FRANZCO, L. W. H.; SUMMERS, P. M.; FANZCA, D. G.; BANCROFT, J. ; FRANZCO, G. R. L. Controlled trial of hyperbaric oxygen treatment for alkali corneal burn in the rabbit. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, 32:67-70, 2004.

28) LISHA, G., FAGERHOLM, P.; PALMBLAD. J. Expression of basic fibroblast growth factor in rabbit corneal alkali wounds in the presence and absence of granulocytes. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.83, issue 3, pp 374-378, 2005.

29) KATO, T.; SAIKA, S.; OHNISHI, Y. Effects of the Matrix Metalloproteinase Inhibitor GM6001 on the Destruction and Alteration of Epithelial Basement Membrane During the Healing of Post-alkali Burn in Rabbit Cornea. **Jpn J Ophthalmol**, 50: 90-95, 2006.

30) HE, JIUCHENG; BAZAN, NICOLAS G.; BAZAN, H. E. Alkali-Induced Corneal Stromal Melting Prevention by a Novel Platelet - Activating Factor Receptor Antagonist. **Arch Ophthalmol**, v.124(1), 70-78, jan. 2006.

31) MC CULLEY, J. P. Chemical injuries. Smolin G and Thoft RA. **The cornea**: scientific foundations and clinical practice. 2.ed., 527-42. Boston: Little Brown, 1987.

32) NAJAC, H.; COOPER, B.; JACOBSON, J. H.; SHAMOS, M.; BREITFELLER, M. Direct thermocomple measurements of temperature rise and heat conduction in the rabbit retina. **Investigative Ophthalmology**, 2(1):32-36, 1963.

33) KOVALCHUK, L. V.; KHOROSHILOVA-MASLOVA, I. P.; GANKOVSKAYA, L. V.; KRAINOVA, T. A.; GUNDOROVA, R. A.; ILATOVSKAYA, L. A.; MARLEVSHEV, A. V.; TUMNOV, A. V. Natural Complex of cytokines is a potent stimulant to posttraumatic regeneration in rabbit cornea. **J Ocul Pharmacol Ther.**, 12(3): 271-9, 1996.

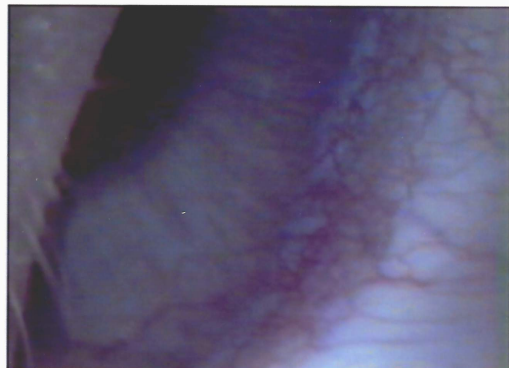
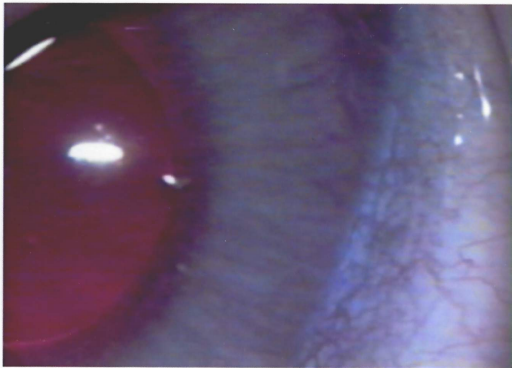
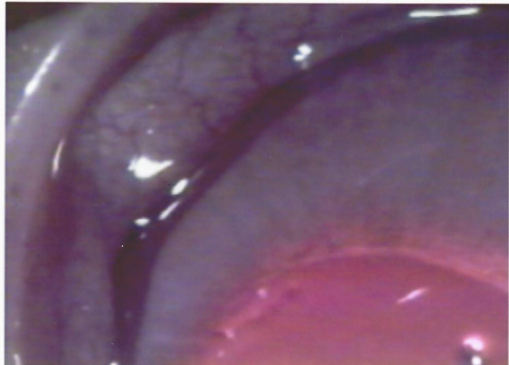
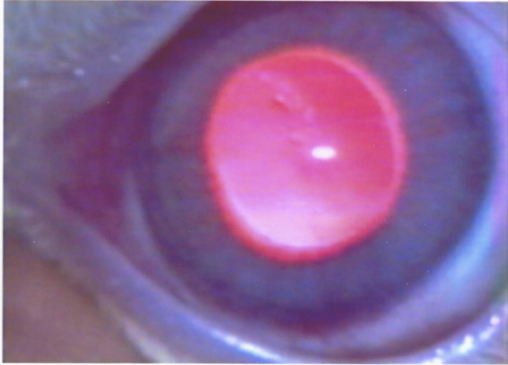
- 34) KOSÁK, I.; TRBOLOVA, A.; KOLODZIEYSKI, L.; JUHAS, T.; LEDECKY, V. Experimental anterior lens capsule transplantation for chronic corneal ulcers-Bowman,s layer replacement? **Cornea**, 22(4);359-62, 2003.
- 35) LAUBE, T.; BROCKMANN. C.; BUB, R.; LAU, C.; HÖCK, K.; STAWSKI, N.; STIEGLIZ, T.; RICHTER, H. A.; SCHILLING, H. Optical energy transfer for intraocular Microsystems studied in rabbits. **Graefe,s Arch Clin Exp. Ophthalmol**, 242:661-667, 2004.
- 36) FRAME, C.; FLUCKE, B.; BIRNGRUBER, R. Comparison of reduced and standard light application in photodynamic therapy of the eye in two rabbit models. **Graef,s Arch Clin Exp Ophthalmol**, 244:773-781, 2006.
- 37) CHEN, J.J., TSENG SC. Abnormal Corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 1991; 32:2219-33.

ANEXO A - RESULTADOS DOS EXAMES DOS OLHOS LESADOS

RAÇA	O AFET.	SEM	HUGHES (queimadura)				THOFT (vascularização)						
			G1	G2	G3	G4	0	1	2	3	4		
1	NZ1	NZ1OE	1 ^a				G4		1				
2	CH1	CH1OE	1 ^a			G3		0					
3	CH1	CH1OD	1 ^a	G1				0					
4	NZ2	NZ2OE	1 ^a				G4			2			
5	CH2	CH2OE	1 ^a	G1				0					
6	CH2	CH2OD	1 ^a				G4		1				
7	NZ3	NZ3OE	1 ^a				G4			2			
8	CH3	CH3OE	1 ^a				G4		1				
9	CH3	CH3OD	1 ^a				G4	0					
10	NZ4	NZ4OE	1 ^a				G4			2			
11	CH4	CH4OD	1 ^a				G4		1				
12	CH4	CH4OE	1 ^a				G4		1				
13	NZ5	NZ5OE	2 ^a				G4			2			
14	CH5	CH5OD	2 ^a			G3		1					
15	CH5	CH5OE	2 ^a			G3						3	
16	NZ6	NZ6OE	2 ^a				G4					3	
17	CH6	CH6OD	2 ^a		G2								4
18	CH6	CH6OE	2 ^a			G3							4
19	NZ7	NZ7OE	2 ^a				G4						4
20	CH7	CH7OE	2 ^a			G3				2			
21	CH7	CH7OD	2 ^a			G3		1					
22	NZ8	NZ8OE	2 ^a				G4			2			
23	CH8	CH8OE	2 ^a		G2					2			
24	CH8	CH8OD	2 ^a				G4						4
25	NZ9	NZ9OE	2 ^a				G4			2			
26	CH9	CH9OD	2 ^a			G3						3	
27	CH9	CH9OE	2 ^a				G4					3	
28	NZ10	NZ10OE	3 ^a		G2							3	
29	CH10	CH10OE	3 ^a			G3							4
30	CH10	CH10OD	3 ^a				G4						4
31	NZ11	NZ11OE	3 ^a			G3							4
32	CH11	CH11OD	3 ^a		G2			1					
33	CH11	CH11OE	3 ^a			G3							4
34	NZ12	NZ12OE	3 ^a				G4						4
35	NZ13	NZ13OE	3 ^a			G3							4
36	CH13	CH13OD	3 ^a				G4						4
37	CH13	CH13OE	3 ^a				G4						4
38	NZ14	NZ14OE	3 ^a		G2					2			
39	CH14	CH14OD	3 ^a				G4						4
40	CH14	CH14OE	3 ^a				G4						4

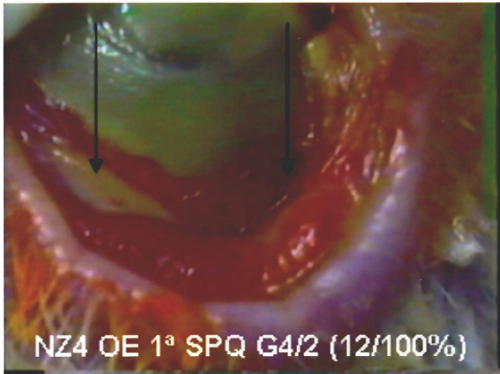
ANEXO B – FOTOS DOS OLHOS DO EXPERIMENTO

OLHO NORMAL DE COELHO.



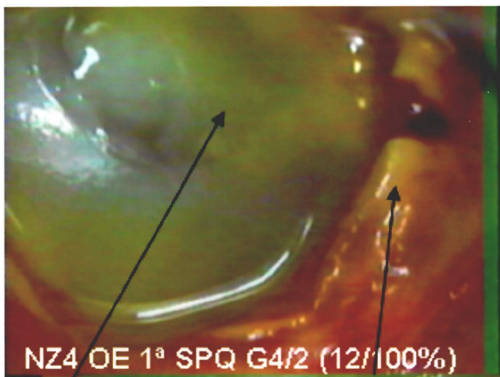
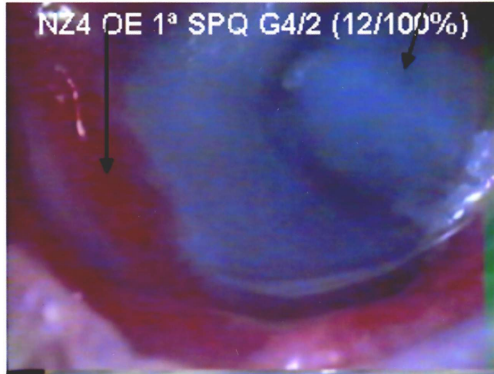
ISQUEMIA DE CONJUNTIVA

HIPEREMIA LIMBAR



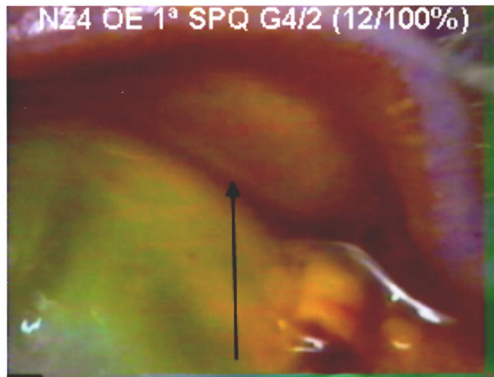
HIPEREMIA LIMBAR

LEUCOMA

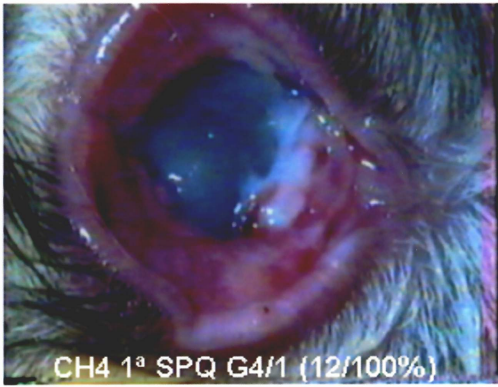


DANO EPITELIAL

NECROSE DE MEMBRANA NICTANTE

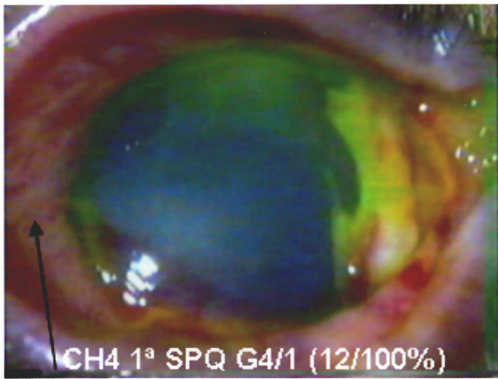
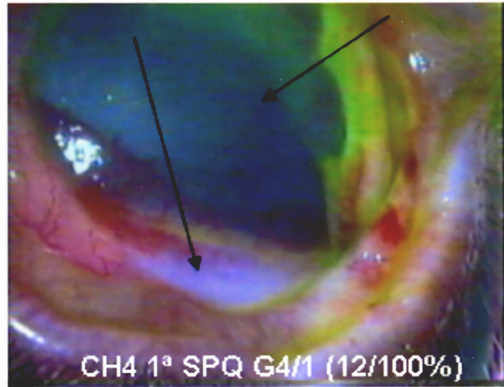


ISQUEMIA DE FÓRNICE

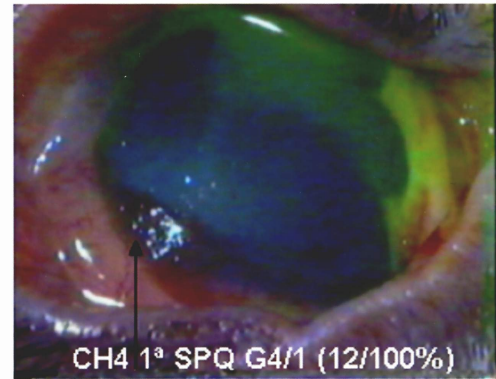


ISQUEMIA DE
CONJUNTIVA

LEUCOMA

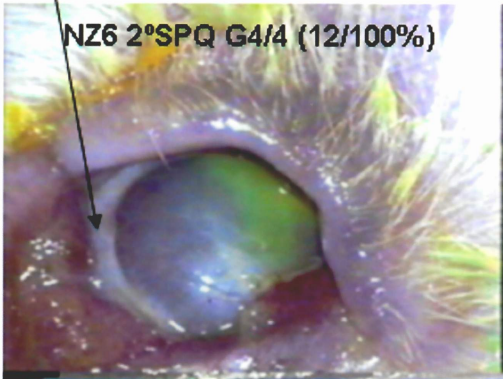


ENVOLVIMENTO CONJUNTIVAL

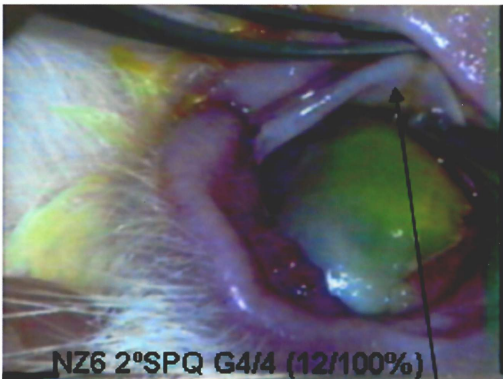
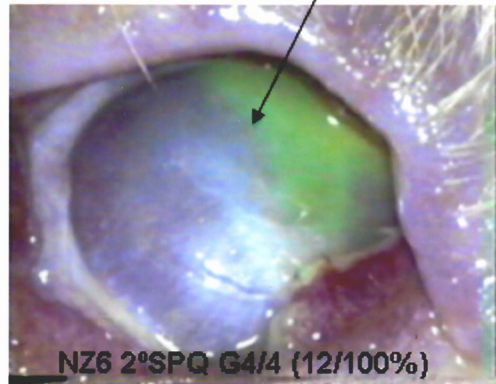


NEOVASCULARIZAÇÃO
CORNEAL

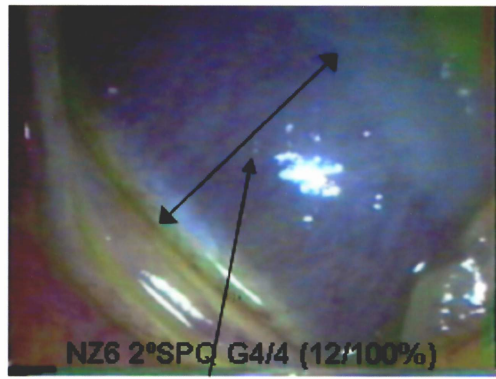
ENVOLVIMENTO LIMBAR - ISQUEMIA



LEUCOMA E DANO EPITELIAL

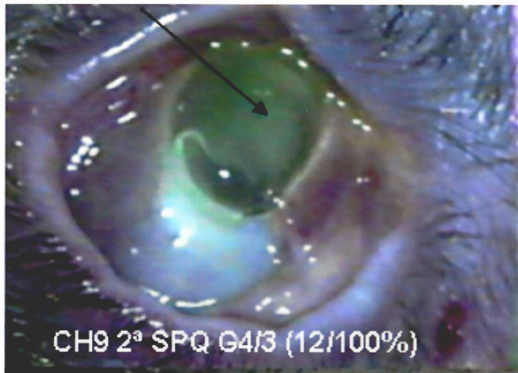


ISQUEMIA E EDEMA DE CONJUNTIVA

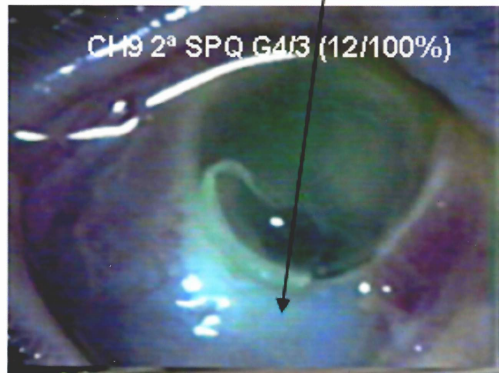


NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEAL

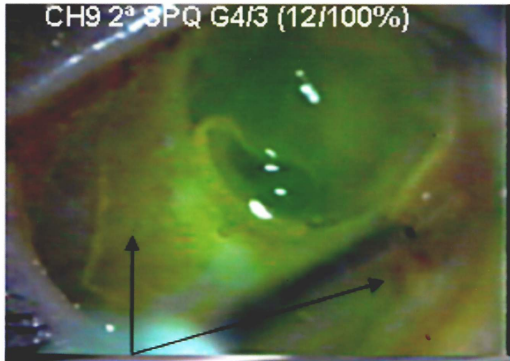
LEUCOMA



ENVOLVIMENTO LIMBAR - ISQUEMIA

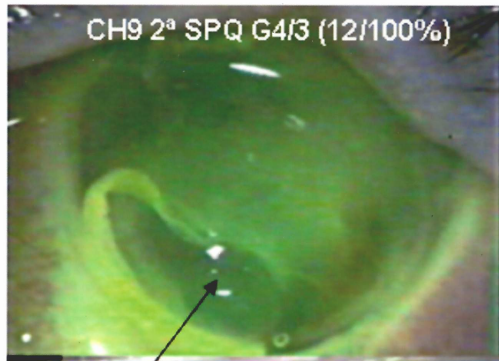


CH9 2º SPQ G4/3 (12/100%)



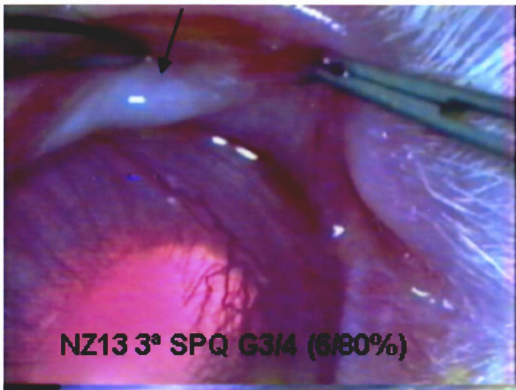
ENVOLVIMENTO DE CONJUNTIVA BULBAR

CH9 2º SPQ G4/3 (12/100%)

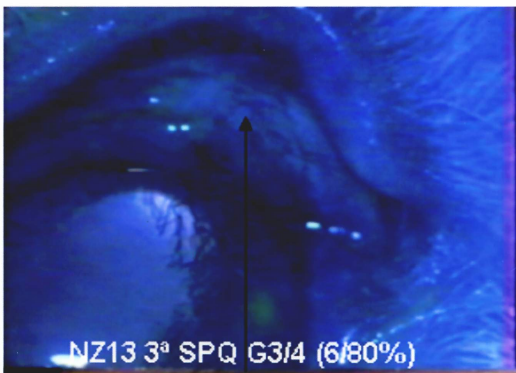
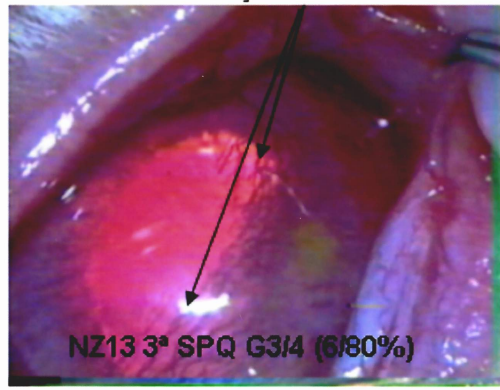


AFINAMENTO CORNEAL

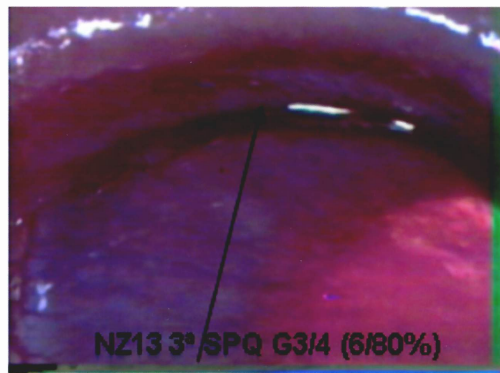
ISQUEMIA E EDEMA DE CONJUNTIVA



NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEAL

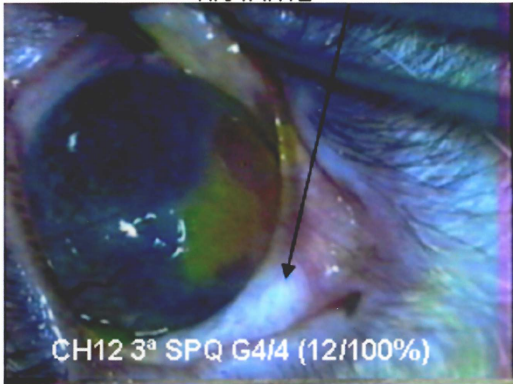


ISQUEMIA DE FÓRNICE

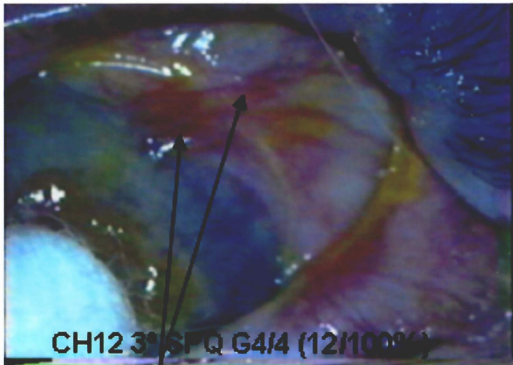
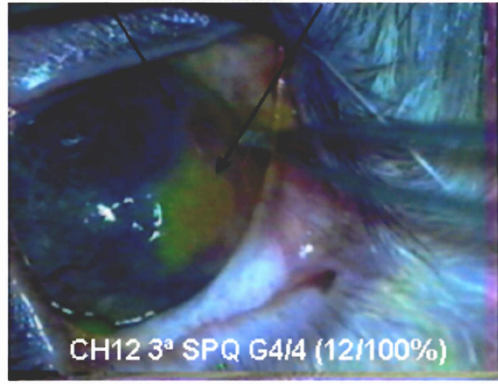


ENVOLVIMENTO LIMBAR - ISQUEMIA

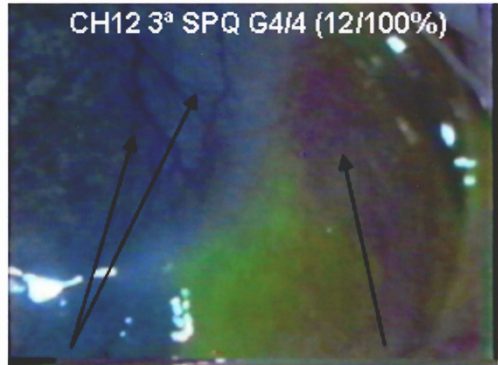
NECROSE DE MEMBRANA
NICTANTE



LEUCOMA DANO EPITELIAL



ENVOLVIMENTO DE CONJUNTIVA BULBAR E
LIMBO



NEOVASOS CONJUNTIVALIZAÇÃO