

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**Camila Melo Gadelha Pereira Diniz**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AGENTES RETICULANTES  
PARA POSSÍVEL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CERATOCONE**

Campina Grande – PB

2017

**Camila Melo Gadelha Pereira Diniz**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AGENTES RETICULANTES PARA  
POSSÍVEL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CERATOCONE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande – PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

D585e      Diniz, Camila Melo Gadelha Pereira.  
Estudo comparativo entre agentes reticulantes para possível aplicação no tratamento de ceratocone / Camila Melo Gadelha Pereira Diniz. – Campina Grande, 2017.  
63 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".  
Referências.

1. Polímeros. 2. *Crosslinking*. 3. Agentes Reticulantes. 4. Ceratocone - Tratamento. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Título.

CDU 678.7(043)

## **CURRÍCULO VITAE DO ALUNO**

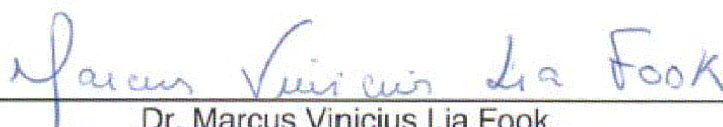
- Formada em Medicina (Universidade Federal da Paraíba), 1997 - 2003;
- Residência Médica em Oftalmologia (UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina), 2004 - 2007;
- Especialização em Cirurgia Refrativa (UNIFESP), 2007 - 2008;
- Especialização em Doenças Externas Oculares e Córnea (UNIFESP), 2008 - 2009;
- Oftalmologista Concursada da Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba - 2007;
- Diretora do Banco de Olhos da Paraíba desde 2009;
- Oftalmologista, Especialista em Córnea, Concursada da UFPB desde 2012;
- Diretora Clínica do Hospital Visão – João Pessoa-PB, 2013.

CAMILA MELO GADELHA PEREIRA DINIZ

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AGENTES RETICULANTES PARA  
POSSÍVEL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CERATOCONE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 21/12/2017



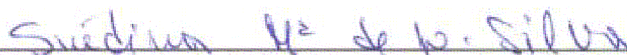
Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
Orientador  
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa  
Examinador Externo  
UAEMA/UFCG/PNPD/CAPE



Dr.ª Maria Roberta de Oliveira Pinto  
Examinadora Externa  
DQ/UEPB



Dr.ª Suédina Maria de Lima Silva  
Examinadora Interna  
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

*À Deus, sempre presente em minha vida; aos meus pais, grandes incentivadores, que me ensinaram a sempre me sentir capaz; ao meu esposo, como compensação dos momentos dos quais, por motivo de estudo, precisei estar ausente; e aos meus filhos, que iluminam minha vida de forma especial e me dão motivos para continuar sempre buscando dar o melhor de mim. DEDICO.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Orientador, Professor Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, pela paciência, dedicação e ensinamentos que possibilitaram que eu realizasse este trabalho.

Ao Professor Dr. Josué da Silva Buriti por toda a sua dedicação para que tudo, dentro da pesquisa acontecesse da melhor maneira possível, pelo seu incentivo, pela sua dedicação, pelos seus ensinamentos e boa vontade, fundamentais na construção deste trabalho.

Aos professores que contribuíram para minha formação neste mestrado, em especial às professoras Itamara, Roberta e Suédina, que, através de didáticas exemplares, transmitiram ensinamentos essenciais. Ao Professor Rosseberg, que me ajudou na escolha do tema a ser pesquisado, sempre disposto a ensinar, a acrescentar, a ajudar, e dar alicerce para que o estudo aconteça.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, a Universidade Federal de Campina Grande e ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos funcionários, pós-graduandos, graduandos e estagiários do CERTBIO, que direta ou indiretamente, me ajudaram na realização dos experimentos e ensaios de caracterização, em especial a Anderson, André, Daniel, William, Dona Socorro, Maria Eduarda, João e Vitor.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte dessa imensa oportunidade de aprendizado e engrandecimento pessoal.

## RESUMO

O *crosslinking* do colágeno corneano (CXL) é um tratamento cirúrgico, utilizado para inibir progressão da doença em pacientes portadores de Ceratocone, tal doença é uma distrofia da córnea, progressiva, associada a afinamento e abaulamento, em forma de cone, que provocam baixa acuidade visual devido ao astigmatismo irregular secundário. O CXL apresenta um protocolo padrão, atualmente bem estabelecido, que consiste na aplicação de riboflavina e ultravioleta A (UVA) na superfície corneana desepitelizada. A riboflavina atua como fotoindutor e, submetida à exposição à radiação UVA, gera radicais livres que promovem ligações cruzadas no colágeno corneano, além de promover proteção à radiação às estruturas intraoculares como cristalino e retina. No entanto, a riboflavina é uma molécula grande e necessita da desepitelização para alcançar o colágeno do estroma corneano. Muitas técnicas na promoção de *crosslinking* (CXL) do colágeno corneano vêm sendo estudadas no intuito de se evitar a desepitelização corneana, mas nenhuma demonstra a mesma eficácia da técnica padrão. Com o presente estudo, objetivou-se comparar a técnica padrão do CXL com o tratamento utilizando-se a genipina como reticulante, com e sem desepitelização da córnea. Comparou-se propriedades químicas, mecânicas e morfológicas de córneas de suínos submetidas aos tratamentos de *crosslinking* com a riboflavina e com a genipina e comparar a citotoxicidade das soluções reticulantes. Para isso, as córneas foram divididas em quatro grupos: riboflavina e UVA conforme tratamento padrão, genipina com desepitelização corneana, genipina sem desepitelização da córnea e controle sem reticulante. Dessa forma, as córneas foram submetidas às caracterizações e, analisadas pelas seguintes técnicas: Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ensaio mecânico de tração, Dilatometria e Grau de Intumescimento (GI). Análise de Citotoxicidade foi realizada comparando o tratamento padrão com a genipina. Os Resultados demonstram uma maior resistência corneana à tração, bem como, um maior grau de intumescimento quando a genipina foi aplicada após desepitelização da córnea. As inclinações descendentes na curva de dilatometria mostram-se lineares no UV-CXL e controle, e com a genipina, a contração tende a ficar mais acentuada em temperaturas maiores. Pela MEV foi capaz de demonstrar uma linha de demarcação no estroma corneano tratado com UV-CXL ou genipina e a MO exibiu padrões diversos de luz transmitida nos diferentes grupos, demonstrando maior opacidade no UV-CXL. Conclui-se que o *crosslinking* do colágeno corneano induzido pela genipina 0,1% produz aumento na resistência da córnea sem provocar opacidade corneana considerável, podendo ser útil no tratamento do ceratocone. O potencial de citotoxicidade aos fibroblastos se mostrou semelhante entre os métodos de reticulação.

**Palavras-chave:** *Crosslinking*. Córnea. Genipina. Riboflavina. Ceratocone.



## ABSTRACT

The corneal collagen crosslinking (CXL) is a surgical treatment, used to inhibit disease progression in patients with keratoconus, a progressive corneal dystrophy associated with thinning and ectasia, which causes low visual acuity due to secondary irregular astigmatism. Such treatment presents a standard protocol, currently well established, which consists of the application of riboflavin and ultraviolet A (UVA) on the epithelium off corneal surface. Riboflavin acts as a photoinducer and, subject to exposure to UVA radiation, generates free radicals that promote crosslinking in the corneal collagen, besides promoting radiation protection to intraocular structures such as lens and retina. However, riboflavin is a large molecule and requires epithelium off to reach the corneal stroma collagen. Many techniques in the promotion of CXL of corneal collagen crosslinking have been studied in order to avoid corneal de-epithelialization, but none demonstrates the same efficacy as the standard technique. With the present study, we aimed to compare the standard technique of CXL with the treatment using genipine as a cross-linker, with and without corneal de-epithelialization. The chemical, mechanical and morphological properties of pig corneas submitted to the crosslinking treatment with riboflavin and genipine were compared and the cytotoxicity of the crosslinking solutions was compared. Thus, the corneas were divided into four groups: riboflavin and UVA according to standard treatment, genipina with corneal epithelium off, genipina with epithelium on and control without crosslinker. In this way, the corneas were submitted to the characterizations and analyzed by the following techniques: Optical Microscopy, Scanning Electron Microscopy, Mechanical Traction Test, Dilatometry and Swelling Degree. Cytotoxicity analysis was performed comparing the standard treatment with genipine. The results demonstrate a greater corneal tensile strength, as well as a greater degree of swelling when genipine was applied to the epithelium off corneal surface; The downward slopes in the dilatometry curve are linear in the UV-CXL and control, and with genipine, the contraction tends to become more pronounced at higher temperatures. Scanning Electron Microscopy was able to demonstrate a demarcation line in the corneal stroma treated with UV-CXL or genipine and Optical Microscopy exhibits different patterns of transmitted light in the different groups, demonstrating greater UV-CXL opacity. In Conclusion, corneal collagen crosslinking induced by 0.1% genipine produces an increase in corneal resistance without causing considerable corneal opacity and may be useful in the treatment of keratoconus. The potential for cytotoxicity to fibroblasts was similar between crosslinking methods.

**Keywords:** Crosslinking. Cornea. Genipina. Riboflavin. Keratoconus.

## PUBLICAÇÕES

DINIZ, C. M. G. P.; BURITI, J. S.; FOOK, M. V. L.; BARBOSA, R. C.; SOUSA, W. J. B.; CARDOSO, M. J. B. MÉTODO DE RETICULAÇÃO DO COLÁGENO CORNEANO COM GENIPINA PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CERATOCONE. 2017, Brasil. **Patente:** Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170263282, título: **“MÉTODO DE RETICULAÇÃO DO COLÁGENO CORNEANO COM GENIPINA PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CERATOCONE.”**, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depósito: 06/12/2017.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte Sagital do Olho.....	17
Figura 2 – Camadas da Córnea Humana (Biomedicinaemação, 2013). .....	19
Figura 3 – Corte ultraestrutural do estroma mostrando lamelas de colágeno dispostas paralelamente entre si (setas). Observe ceratócito presente no intervalo interlamelar. (Microscopia eletrônica de transmissão 4800x). .....	20
Figura 4 – Ceratocone.....	22
Figura 5 – Topografia computadorizada do ceratocone. ....	23
Figura 6 – Tomografia do segmento anterior de um paciente portador de Ceratocone. ....	24
Figura 7 – Estrutura química da Riboflavina .....	25
Figura 8 – Demonstração do enrijecimento do tecido corneano após CXL.....	26
Figura 9 – Mecanismo pelo qual a riboflavina pode induzir <i>crosslinking</i> do colágeno da córnea na presença de UVA. ....	27
Figura 10 – Tratamento dos 7 mm centrais da córnea com Riboflavina + UVA. ....	28
Figura 11 – (a) gardênia; (b) jenipapo; (c) estrutura da genipina. ....	30
Figura 12 – Espectro eletromagnético com destaque para tipos de radiação UV. ....	31
Figura 13 – Aplicação da luz ultravioleta na córnea, e concomitante aplicação de riboflavina durante cirurgia de CXL. ....	32
Figura 14 – Equipamento utilizado como fonte UVA para o CXL. ....	34
Figura 15 – Aplicação da riboflavina + UVA – Grupo C1.....	34
Figura 16 – Aplicação da genipina e Grupo controle [(a) grupo C2 (genipina 0,1% sem epitélio); (b) grupo C3 (genipina 0,1% com epitélio)]; (c) grupo C4 (controle, sem reticulante).....	35
Figura 17 – Botões Córneo-esclerais e botões corneanos: C1 (Riboflavina + UVA); C2 (genipina 0,1% sem epitélio); C3 (genipina 0,1% com epitélio); C4 (controle, sem reticulante).....	36
Figura 18 – Fluxograma da metodologia desenvolvida no trabalho. ....	37
Figura 19 – Curvas tensão x deformação das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4.....	42
Figura 20 – Curvas dilatométricas das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4, obtidas sob razão de aquecimento de 2°C/min. ....	46
Figura 21 – Micrografias obtidas por MO das córneas (região central) dos grupos C1, C2, C3 e C4, com representações longitudinais de 300x de aumento.....	47

Figura 22 – Fotografias dos botões corneanos (C1, C2, C3), comparando-os, em transparência, com o controle (C4). .....	49
Figura 23 – Micrografias obtidas por MEV das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4, com representações transversais (corte central) e 400x de aumento. ....	50
Figura 24 – Resultados de grau de intumescimento (%) das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4.....	51
Figura 25 –Análise de citotoxicidade de genipina 0,1% ou associação de riboflavina + UVA aos fibroblastos L929. ....	53

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Dados das propriedades mecânicas com base nas curvas tensão x deformação das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4. ....	43
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CERTBIO – Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CXL – Corneal Collagen *Crosslinking* – *Crosslinking* do Colágeno Corneano

DRX – Difração de raios X

FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

GAGs – Glicosaminoglicanos

GI – Grau de Intumescimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MMP – Metaloproteinases

Na,K-ATPase – Sódio, Potássio – Adenosina, Trifosfatase

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

UVC – Ultravioleta C

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Estrutura Ocular .....	17
2.1.1 A Córnea .....	18
2.1.2 Ceratocone .....	21
2.1.3 <i>Crosslinking</i> do colágeno corneano no tratamento do ceratocone .....	25
2.2 Riboflavina .....	28
2.3 Genipina .....	29
2.4 Ultravioleta .....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1 Local da Pesquisa .....	33
3.2 Materiais .....	33
3.3 Métodos .....	33
3.3.1 Caracterizações .....	37
3.3.2 Ensaio Mecânico de Tração .....	38
3.3.3 Dilatometria .....	38
3.3.4 Microscopia Óptica (MO) .....	39
3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	39
3.3.6 Grau de Intumescimento (GI) .....	40
3.3.7 Citotoxicidade .....	40
3.4 Comitê de Ética em Pesquisa .....	41
3.5 Análise Estatística .....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1 Ensaio Mecânico de Tração .....	42
4.2 Dilatometria .....	45
4.3 Microscopia Óptica (MO) .....	47
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	49
4.5 Grau de Intumescimento .....	51
4.6 Citotoxicidade .....	52
5 CONCLUSÃO .....	55
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	56
REFERÊNCIAS .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

O ceratocone é uma desordem da córnea caracterizada por ectasia e consequente aumento de sua curvatura central, geralmente bilateral e progressiva (Lamy *et al.*, 2008). Observações quanto a menor progressão do ceratocone em pacientes com diabetes e maior idade levou à idéia de que o *crosslinking* (CXL) natural das fibras de colágeno da córnea poderia resultar em fortalecimento e enrijecimento dos tecidos (Daxer *et al.*, 1998). Isso levou ao desenvolvimento da reticulação do colágeno corneano, um processo, no qual, uma combinação de um fotoindutor, luz ultravioleta (UV) e uma reação fotoquímica leva a indução de radicais livres, que conduz a uma ligação química entre as fibras de colágeno.

A reticulação polimérica é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por pontes de ligações, formando uma rede polimérica tridimensional, processo também conhecido como *crosslinking* (formação de ligações cruzadas) (Mano e Mendes, 1999; Andrade *et al.*, 2001). O *crosslinking* pode ser induzido através de diferentes métodos, como glicação não enzimática, irradiação utilizando luz ultravioleta com ou sem a associação de fotossensibilizantes e por reações de aldeído (Spoerl, Huhle e Seiler, 1998).

Seiler *et al.* (1996) demonstrou que o uso de irradiação ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina (vitamina B2) para indução de *crosslinking* de colágeno da córnea apresentar-se-ia como uma técnica promissora; que, de fato, vem sendo divulgada através das experiências clínicas de pesquisadores do mundo inteiro. O principal objetivo do uso do *crosslinking* é conter a progressão do ceratocone. Logo, o melhor candidato ao tratamento é o indivíduo com sinais claros de progressão da doença. Até o momento, não existem critérios definitivos para a progressão do ceratocone, porém os parâmetros a serem considerados são a mudança do erro refrativo, piora da acuidade visual, bem como progressão nos valores encontrados nas topografias e tomografias da córnea (Conitec, 2016).

Outro agente reticulante que vem sendo muito utilizado é a genipina, alvo de várias pesquisas na reticulação de biomateriais (Sung *et al.*, 1999; Butler, Ng e Pudney, 2003; Jin, Song e Hourston, 2004; Onuki *et al.*, 2008).

Há poucos estudos considerando a genipina como reticulante do colágeno corneano (Ávila, 2010; Ávila, 2012). Devido às suas propriedades físicas, químicas e



biológicas, se mostra promissora nesse intuito, e teria a vantagem de não utilizar radiação ultravioleta, agente físico necessário no protocolo padrão do CXL.

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar e comparar a influência de agentes reticulantes como a riboflavina + UVA e solução de genipina 0,1% (m/v), pelas propriedades químicas, mecânicas, térmicas e morfológicas de córneas de porcos, bem como comparar a citotoxicidade das soluções reticulantes, para possível aplicação no tratamento do ceratocone.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estrutura Ocular

Para que as funções de integração e coordenação funcionem corretamente, sendo executadas pelo sistema nervoso, que comandam contínuos ajustamentos necessários para o perfeito funcionamento do organismo, é preciso que estas informações provenientes dos meios interno e externo cheguem até ele. Esses informes se originam a partir de estímulos captados por órgãos específicos, denominados sensoriais. Dentre estes órgãos específicos, o órgão da visão pode ser considerado como sensorial, altamente complexo, encarregado de captar o estímulo luminoso (Dangelo e Fattini, 2001).

Os órgãos da visão são compreendidos pelo olho (Figura 1) e órgãos acessórios. O olho está localizado na órbita e funciona como uma máquina fotográfica, isto é, dotado de um sistema de lentes que fazem convergir os raios luminosos para os fotorreceptores. O bulbo ocular apresenta três túnicas concêntricas: túnica fibrosa, a mais externa; túnica vascular, média; túnica interna e a retina.

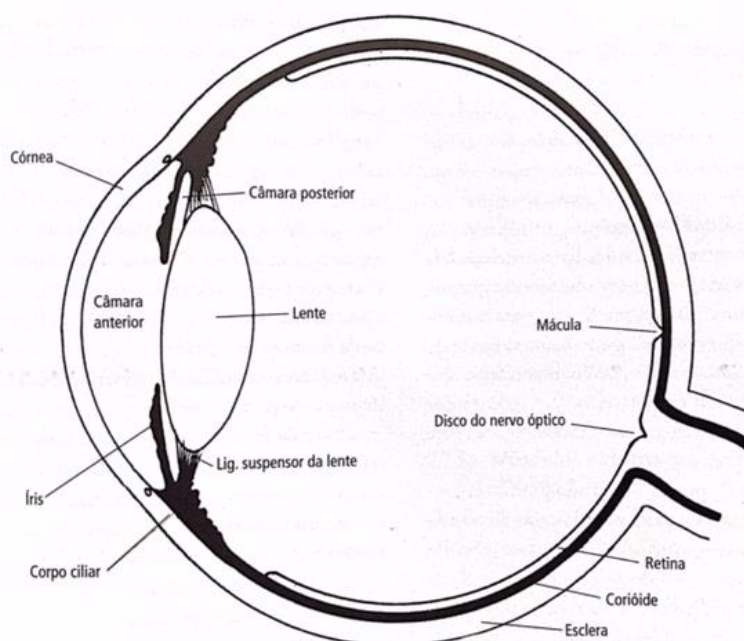


Figura 1 – Corte Sagital do Olho (Dangelo e Fattini, 2001).

A Túnica fibrosa, que é objeto de estudo desta pesquisa, compreende a esclera (ou esclerótica) e a córnea. Esta última é a parte anterior, transparente, da

túnica fibrosa do bulbo ocular, e funciona como meio dióptrico, isto é, como meio de refração para os raios luminosos. A esclera é a parte opaca, posterior, da túnica fibrosa, servindo como meio de proteção e para inserção de tendões dos músculos motores do olho. Tem uma coloração esbranquiçada e pode ser vista através da conjuntiva, como o “branco do olho” (Dangelo e Fattini, 2001).

### 2.1.1 A Córnea

A córnea é um tecido transparente, avascular, esférico. A mesma contribui com 74% do poder dióptrico do olho (43,25 D), de um valor total de 58,60 D, e a maior parte desse grau encontra-se na superfície ar-lágrima. O poder refrativo da córnea central é de aproximadamente 43 D, sendo a soma dos poderes dióptricos do ar-lágrima (+44,00 D), lágrima-córnea (+5,00 D) e córnea-humor aquoso (-6,00 D) (Lima, Dantas e Alves, 2013).

As células epiteliais e endoteliais corneanas são metabolicamente ativas. A nutrição da córnea depende de glicose que se difunde através do humor aquoso. O oxigênio se difunde principalmente pela lágrima, sendo em maior quantidade pela circulação limbal e aquoso. A córnea possui grande inervação, sendo a maior densidade de terminações nervosas do organismo. A inervação corneana é feita através dos nervos ciliares longos, formando um anel perilimbal, de onde penetram na córnea através do estroma profundo, radialmente, e cursam anteriormente para compor um plexo subepitelial. A perda do epitélio expõe as terminações nervosas, resultando em dor ocular intensa (Lima, Dantas e Alves, 2013). Ela apresenta as seguintes camadas (Figura 2): Epitélio, Membrana basal epitelial, Camada de Bowman, Estroma, Membrana de Descemet e Endotélio. Recentemente, foi descrita uma nova camada, a Camada de Dua ou Camada Pré-Descemet.

O epitélio corneano compõe 10% da espessura corneana (50  $\mu\text{m}$ ) e é composto por epitélio escamoso estratificado. É formado por 5 a 6 camadas de células, sendo uma basal, duas a três aladas e superficiais. O epitélio corneano diferencia-se da pele por não se queratinizar, salvo na presença de condições patológicas. A regularidade da superfície epitelial é fundamental na manutenção da transparência corneana. As fortes junções celulares previnem a penetração de líquidos para o estroma. Ocorre um constante processo de diferenciação das células epiteliais basais, formando as superficiais, em um período de 7 a 14 dias. As células

superficiais formam microvilos na sua superfície externa, permitindo maior troca de nutrientes e oxigênio com a lágrima. Componentes celulares epiteliais participam da imunologia corneana (Lima, Dantas e Alves, 2013). A Figura 2 apresenta as Camadas da Córnea Humana.

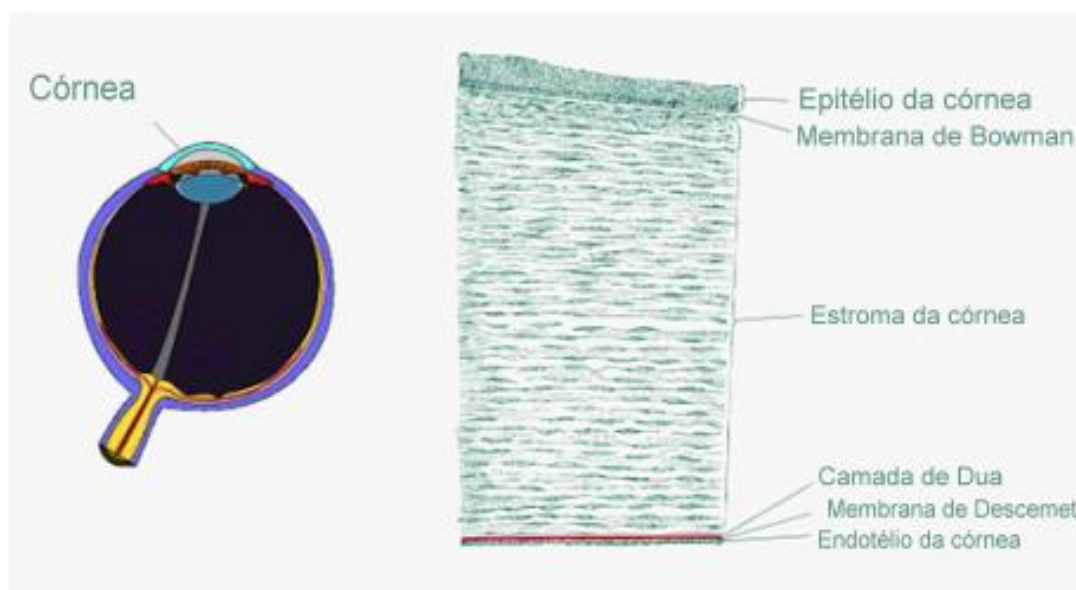


Figura 2 – Camadas da Córnea Humana (Biomedicinaemação, 2013).

A Camada de Bowman é uma camada de tecido conjuntivo compacto, acelular, com 7 a 12  $\mu\text{m}$  de espessura, encontrada em humanos, mas não em todos os mamíferos. Presumivelmente sintetizada pelos ceratócitos superficiais da córnea, é constituída por delgadas fibrilas colágenas cruzadas em todas as direções e com arranjo condensado, o que lhe confere resistência a traumatismos e invasão de microorganismos ou de células tumorais. A camada de Bowman é perfurada por grande quantidade de nervos não mielinizados, que inervam o epitélio da córnea. Ela não tem capacidade de regeneração (Gomes, 2011).

O Estroma corresponde a 90% da espessura corneana e é composto por matriz extracelular, fibroblastos e fibras nervosas. O componente celular ocupa 2 a 3% do volume estromal. A matriz extracelular é formada por colágeno e glicosaminoglicanos. O colágeno estromal é primariamente tipo I e, em menor quantidade, tipos II, V e VI. As fibras colágenas são produzidas pelos queratócitos, apresentam diâmetro entre 22 e 32 nm e formam 300 a 500 lamelas que se encontram dispostas de forma paralela no estroma e são orientadas em vários ângulos entre si.

A distância entre as fibras de colágeno é extremamente uniforme e constante, cerca de 41,4 nm. Este arranjo regular contribui para a transparência corneana (Gomes, 2011; Lima, Dantas e Alves, 2013).

As lamelas anteriores estromais são mais curtas, estreitas e interconectadas, enquanto as posteriores são mais largas, longas e menos interconectadas. Entre as fibras colágenas, são encontrados vários glicosaminoglicanos (GAG), sendo os mais freqüentes o queratan sulfato (65% do total) e o condroitin sulfato, na proporção de 3:1. Outro glicosaminoglicano encontrado é o dermatan sulfato, porém em pequenas proporções. O componente celular do estroma é basicamente o ceratócito, que possui forma fusiforme e encontra-se disperso entre as lamelas de colágeno (Figura 3).

Essas células são semelhantes aos fibroblastos e possuem citoesqueleto intracelular composto por fibras parecidas com actina, o que lhes confere capacidade de contração. Os ceratócitos também são responsáveis pela manutenção dos componentes da matriz extracelular, participando da produção de colágeno e de glicosaminoglicanos. Por outro lado, também sintetizam enzimas degradadoras de colágeno, como as metaloproteinases (MMP). Esta produção paradoxal leva a um importante equilíbrio entre a síntese e degradação de matriz extracelular, que é regulada por diferentes citocinas e fatores de crescimento (Gomes, 2011).



Figura 3 – Corte ultraestrutural do estroma mostrando lamelas de colágeno dispostas paralelamente entre si (setas). Observe ceratócito presente no intervalo interlamelar. (Microscopia eletrônica de transmissão 4800x) (Gomes, 2011).

A córnea necessita de uma superfície epitelial muito regular para atingir sua perfeição óptica, com um índice de refração uniforme e mínima dispersão de luz. A disposição regular das estruturas celulares e extracelulares estromais é importante

para manter a transparência da córnea. Doenças, como o Ceratocone que, afetam o formato e a espessura da córnea, provocam a percepção de imagens distorcidas. A conformação *lattice* das fibras colágenas embebidas na matriz extracelular, sendo seu tamanho menor que o comprimento de onda de luz visível, também contribui decisivamente para a transparência corneana. A transparência corneana também depende da sua hidratação. O controle da hidratação dá-se por meio de diversos fatores, barreiras epiteliais e endoteliais, superfície de evaporação, pressão intraocular, pressão de edema estromal, bem como pela bomba endotelial, que é ligada a um sistema de transporte iônico controlado por enzimas, tais como Na,K-ATPase (Lima, Dantas e Alves, 2013).

A Camada de Dua é uma camada acelular, constituída por colágeno e identificada entre o estroma e membrana de Descemet. A membrana basal do endotélio, conhecida como Membrana de Descemet, é secretada pelo mesmo. Apresenta, na sua composição, colágeno tipo IV, laminina e pequenas porções de fibronectina. A Membrana de Descemet não se regenera e clinicamente é resistente à degradação enzimática das metaloproteinases (Gomes, 2011).

O endotélio é composto por uma camada única de células dispostas em um mosaico poligonal que cobre a superfície posterior da membrana de Descemet. A densidade celular é de aproximadamente 3.500 a 4.000 células/mm<sup>2</sup> ao nascimento. Em condições normais, esta celularidade diminui com o passar da idade. No adulto, este número pode variar de 1.400 a 2.500 células/mm<sup>2</sup>. A principal função do endotélio é regular o conteúdo aquoso do estroma (Gomes, 2011).

### **2.1.2 Ceratocone**

Trata-se de um afinamento corneano central ou paracentral (geralmente inferior), progressivo, que faz com que a córnea apresente um abaulamento anterior, em forma de cone (Figura 4) (Krachmer e Palay, 2008).



Figura 4 – Ceratocone (Krachmer e Palay, 2008).

O ceratocone geralmente se inicia e progride na puberdade podendo levar a uma perda da acuidade visual devido a ectasia, astigmatismo irregular e opacidade. Geralmente é bilateral, assimétrico e constitui uma das principais indicações de transplante de córnea. No histórico familiar, está presente em 6 a 8% dos casos, sugerindo herança familiar, talvez autossômica dominante, com penetrância incompleta (Santhiago, 2017).

Nos exames complementares, a ceratometria mostra precocemente a presença de astigmatismo irregular ou simplesmente a irregularidade das miras ceratométricas. Imagem em tesoura à retinoscopia é outro sinal precoce, mas a videoceratoscopia computadorizada (Figura 5) é o exame que melhor evidencia um ceratocone incipiente; tem sido utilizada no diagnóstico e prognóstico do ceratocone há mais de 25 anos e os parâmetros estudados são aumento da curvatura corneana central, assimetria do poder apical e encurvamento corneano assimétrico inferior (Rabinowitz, Garbus e McDonnel, 1990).

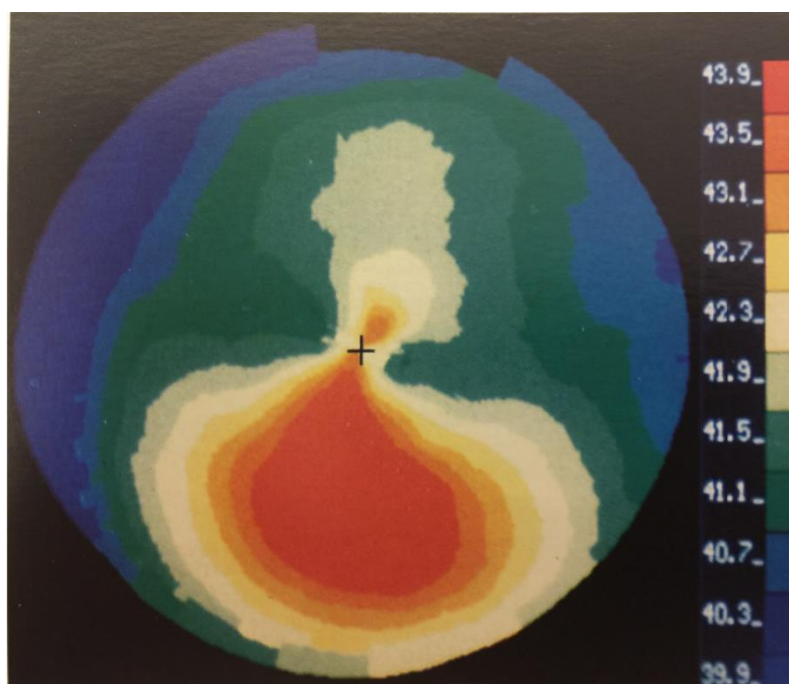


Figura 5 – Topografia computadorizada do ceratocone (Krachmer e Palay, 2008).

A tomografia do segmento anterior combina avaliação do padrão topográfico corneano, da espessura corneana (paquimetria) e da elevação posterior da córnea com índices quantitativos, algoritmos, aumentando, assim, a sensibilidade no diagnóstico do ceratocone e vem sendo regularmente utilizada para “screening” e classificação do Ceratocone (Sadigh, Aali e Sadeghi, 2015), conforme a Figura 6.

O tratamento da doença pode inicialmente ser com óculos, para correção do erro refrativo. Em termos de paradigmas de tratamento, a evidência sugere que manejo conservador deve incluir orientações para evitar coçar os olhos e prescrição de medicamentos tópicos como antihistamínicos, estabilizadores de mastócitos e agentes combinados, bem como lubrificantes oculares sem preservativos, evitando-se, dessa forma, a progressão do ceratocone que pode ocorrer devido a microtraumas epiteliais (Mcghee, Kim e Wilson, 2015).

Em fases mais adiantadas da doença ou para astigmatismos maiores, lentes de contato rígidas gás-permeáveis (Downie e Lindsay, 2015) podem ser adaptadas com êxito. Implante de anel intraestromal (Ertan e Colin, 2007) e lentes intraocularesfácicas (Kurian *et al.*, 2012) podem ser indicados em determinadas situações. Transplante lamelar anterior geralmente é indicado para casos mais avançados, e



aqueles que apresentam cicatrizes extensas devem ser tratados com transplante penetrante de córnea (Henein e Nanavaty, 2017). A hidrópsia é tratada apenas clinicamente com agentes hiperosmóticos tópicos. Alguns autores recomendam o uso de medicações anti-hipertensivas e antiinflamatórios tópicos.

Paradigmas do tratamento do Ceratocone incluem diagnóstico precoce, monitorização regular e uso de intervenções para retardar ou prevenir progressão da doença (Mcghee, Kim e Wilson, 2015).

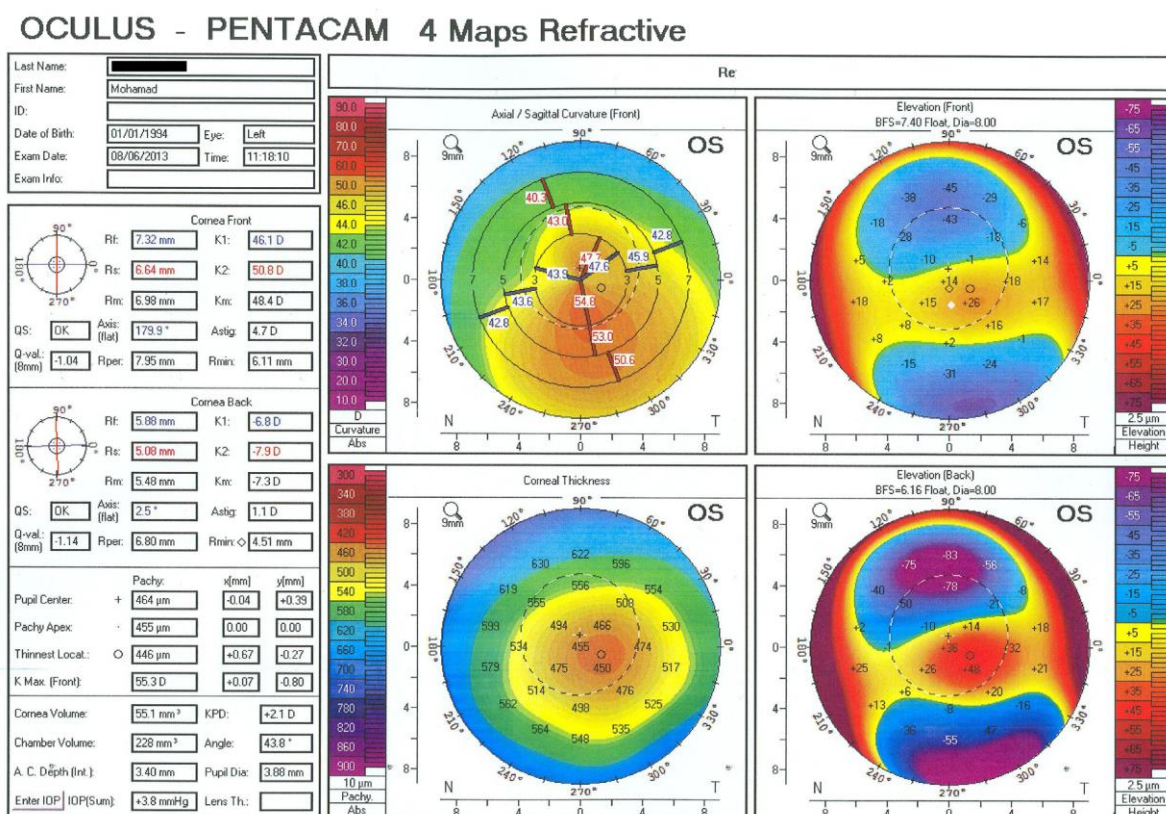


Figura 6 – Tomografia do segmento anterior de um paciente portador de Ceratocone (Sadigh, Aali e Sadeghi, 2015).

O uso primário do CXL (*crosslinking*) tem sido utilizado na interrupção da progressão do ceratocone. Dessa forma, o CXL deve ser indicado para crianças com Ceratocone já no momento do diagnóstico, e, para adultos que apresentem critérios de progressão da doença, tais como aumento de parâmetros ceratométricos, variação miópica no equivalente esférico, perda de linhas de visão corrigida e afinamento corneano (Hafezi e Randleman, 2013).

### 2.1.3 Crosslinking do colágeno corneano no tratamento do ceratocone

Observações quanto a menor progressão do ceratocone em pacientes com diabetes e maior idade levou à ideia de que o CXL natural das fibras de colágeno da córnea poderia resultar em fortalecimento e enrijecimento dos tecidos. Isso levou ao desenvolvimento da reticulação ou CXL da córnea, um processo no qual uma combinação de um fotoindutor, luz ultravioleta (UV) e uma reação fotoquímica leva a indução de radicais livres, que conduz a uma ligação química entre as fibras de colágeno. Esse estímulo de formação de ligações covalentes ocorre de maneira semelhante à utilizada por dentistas para o endurecimento de resinas. Em Bioengenharia, o CXL é utilizado com finalidade semelhante para fortalecer diferentes tipos de materiais por meio de alterações físicas dos mesmos (Daxer *et al.*, 1998; Santhiago, 2017).

Um estudo inicial em animais revelou um aumento de até 70% da rigidez da córnea, enquanto o primeiro estudo clínico por Wollensak, Spoerl e Seiler (2003b), mostrou interromper a progressão e levar a aplanamento da topografia corneana em pacientes com ceratocone. Desde então, vários estudos prospectivos têm ecoado os mesmos resultados em pacientes com ceratocone.

A riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina), designada também por vitamina B2, é o fotoindutor padrão no CXL. É um composto orgânico baseado no anel tricíclico isoaloxazina (Figura 7), e uma molécula predominantemente hidrofóbica (130 mg/L a 27°C) (Souza *et al.*, 2005).

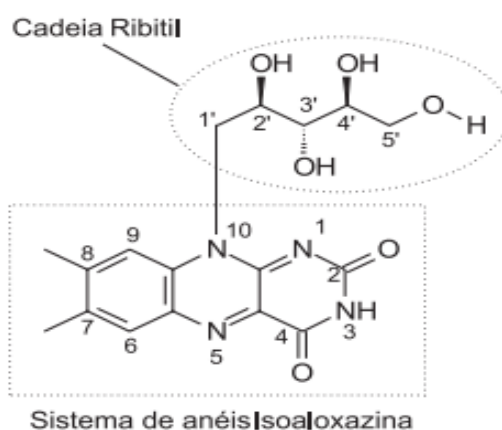


Figura 7 – Estrutura química da Riboflavina (Souza *et al.*, 2005).

Durante o procedimento de CXL corneano, a riboflavina age como um importante filtro quanto à penetração intraocular da radiação UVA e na proteção de estruturas oculares como o endotélio da córnea, cristalino e retina. É, no entanto, uma molécula relativamente grande, e sua principal limitação é a penetração adequada no estroma da córnea através do epitélio íntegro, o que é fundamental para a sua ação eficaz. Assim, a técnica padrão (ou tradicional) do CXL inclui a remoção do epitélio. Várias técnicas de CXL com epitélio íntegro (denominada “epi-on”) têm sido estudadas para contornar esse problema, embora a eficácia destes protocolos seja controversa (Edwards, 2014).

O CXL fotoquímico com a utilização de outras substâncias que não a riboflavina está sob contínua pesquisa: derivados de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e bacterioclorofilas) excitados utilizando iluminação infravermelha de baixo comprimento de onda; corante Rosa Bengala excitado por luz verde, ambos com aparente ausência de toxicidade aos ceratócitos quando estudados em córneas de coelhos.

A reação fotoquímica que leva ao real processo de enrijecimento (Figura 8) envolve a riboflavina absorvendo a energia UV e excitação da molécula, para criar espécies reativas de oxigênio. Esta reação induz ligações covalentes entre as próprias moléculas de colágeno da córnea e entre o colágeno e proteoglicanos, processo que conduz a maior rigidez biomecânica (Figura 9).

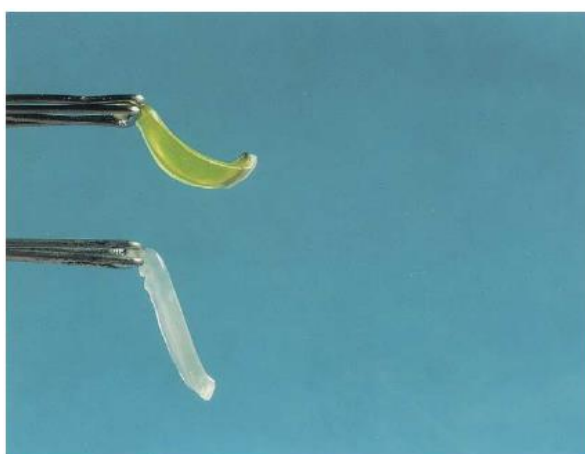


Figura 8 – Demonstração do enrijecimento do tecido corneano após CXL (Wollensak, Spoerl e Seiler, 2003a).

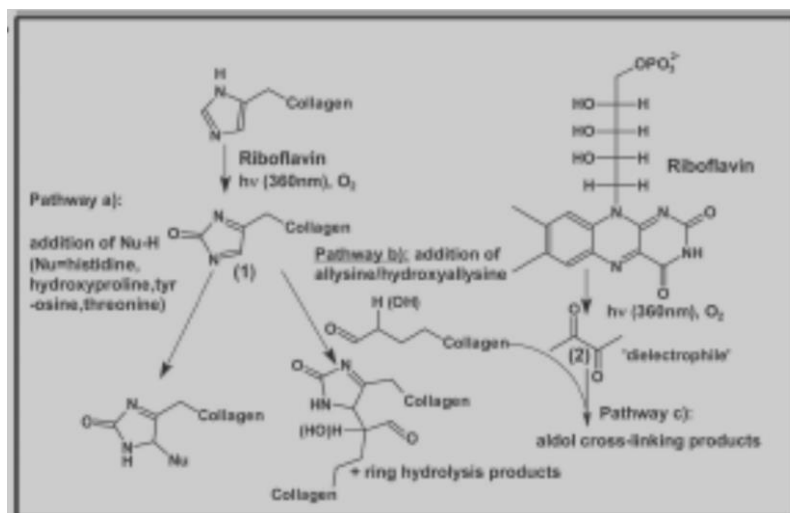


Figura 9 – Mecanismo pelo qual a riboflavina pode induzir *crosslinking* do colágeno da córnea na presença de UVA (McCall *et al.*, 2010).

O protocolo padrão do tratamento, conhecido como protocolo de Dresden, primeiramente descrito por Wollensak *et al.* (2003), consiste nos seguintes passos (Kubrak-Kisza, Kiska e Misiuk-Hojlo, 2016):

1. Anestesia ocular tópica em forma de gotas (colírio anestésico);
1. Remoção dos 7-9 mm centrais do epitélio corneano com espátula sem corte;
2. Antes de iniciar com a radiação UV, o estroma é embebido com o fotoindutor: riboflavina A (Vitamina B 2). Ela é aplicada na forma de colírio de Riboflavina 5-fosfato 0.1% e Dextran 20% na córnea desepitelizada a cada 5 minutos durante 30 minutos;
3. A aplicação de riboflavina por mais 30 minutos, administrada a cada 5 minutos, é combinada com a aplicação da radiação UVA (370nm, 3mW/cm<sup>2</sup>, 5.4J/cm<sup>2</sup>) a 5 cm do olho;
4. Aplicação de lente de contato terapêutica e colírios de antibiótico e corticosteróide. A lente de contato e o antibiótico são mantidos até total re-epitelização corneana. O corticosteróide é mantido por alguns meses.

A Figura 10 ilustra o tratamento dos 7 mm centrais da córnea com Riboflavina e UVA (Wollensak, Spoerl e Seiler, 2003).



Figura 10 – Tratamento dos 7mm centrais da córnea com Riboflavina + UVA (Wollensak, Spoerl e Seiler, 2003).

## 2.2 Riboflavina

Powers (2003) relata que a riboflavina, 7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B2, apresenta coloração amarela e é fluorescente. Além do leite que é uma das primeiras fontes de obtenção, a riboflavina é encontrada também em carne, peixe e, principalmente, em vegetais de cor verde-escura.

Segundo Massey e Biochem (2000), a riboflavina, bem como as flavinas em geral, apresenta uma característica muito importante para o seu papel biológico que é a capacidade de participar de reações químicas com transferência tanto de dois como também de um elétron, o que implica, neste último caso, a existência de estados de semiquinona.

A reação inicial da riboflavina é uma redução de  $O_2$  que se dá através da transferência de um único elétron da flavina reduzida, gerando um par radicalar formado pela flavina neutra e ânion superóxido. O par radicalar gerado pode, então, seguir várias rotas alternativas como, por exemplo, levar à formação de uma peroxirriboflavina que é um nucleófilo. Este intermediário pode, por sua vez, ser protonado, gerando um hidroperóxido de características eletrofílicas (E). Além disso, as espécies peroxiconjugadas de riboflavina podem eliminar peróxido de hidrogênio e gerar a riboflavina oxidada (F) ou participar de processos oxidativos, como hidroxilações aromáticas ou reações de Baeyer-Villiger que são oxidações de substratos que possuem grupamentos cetônicos e aldeídos para, respectivamente

ésteres e ácidos carboxílicos. Outra possibilidade é a dissociação do par radicalar gerando o radical de riboflavina e o radical superóxido, o qual pode reagir com peróxido para formar radical hidroxil ou com óxido nítrico para formar peroxinitrito. Acredita-se que o radical hidroxil seja um dos principais responsáveis por estresse oxidativo e danos teciduais, em grande parte através da reação com lipídios que levam à produção de hidroperoxilipídios (Wyllie, Kerr e Currie, 1980; Massey e Biochem, 2000).

Dalle Carbonare e Pathak (1992) denotam que o conhecimento da capacidade de reação das moléculas de colágeno com produtos provenientes de seu ambiente (reticulação) levou a testarem a sensibilidade do colágeno frente à associação de riboflavina sob irradiação UVA. Observou-se um efeito catalisador atribuído à riboflavina no processo denominado fotopolimerização do colágeno, com consequente aumento na resistência da estrutura colágena atribuída à formação de novas ligações covalentes inter e intraestruturais (*crosslinking*).

A reduzida reticulação do colágeno corneano em pacientes com ceratocone foi demonstrada por Cannon em 1978. Estudos têm demonstrado que a indução da reticulação do colágeno corneano através do uso de radiação ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina promove um aumento da rigidez biomecânica da córnea possibilitando a estabilização da doença (Cannon e Foster, 1978; Wollensak, Spoerl e Seiler, 2003). Outro agente que pode ser utilizado no processo de reticulação da córnea é a genipina, um reticulante natural, que vem se mostrando promissor em inúmeras pesquisas para desenvolvimento de biomateriais.

### **2.3 Genipina**

Genipina é um produto hidrolítico do geniposídeo que é achado na fruta da Gardênia (Figura 11). Gardênia é um gênero de cerca de 250 espécies de plantas da família do café, Rubiaceae, nativa das regiões tropicais e subtropicais da África, sul da Ásia, Austrália e Oceania (Butler, Ng e Pudney, 2003; Kuo e Lin, 2006). Ações farmacológicas efetivas da genipina, como atuações antioxidativas, anti-inflamatória e atividades fibrolíticas têm sido identificadas. É utilizada também como um corante azul, devido à sua afinidade a proteínas, na indústria de alimentos (Renhe, 2008; Yoo *et al.*, 2011).

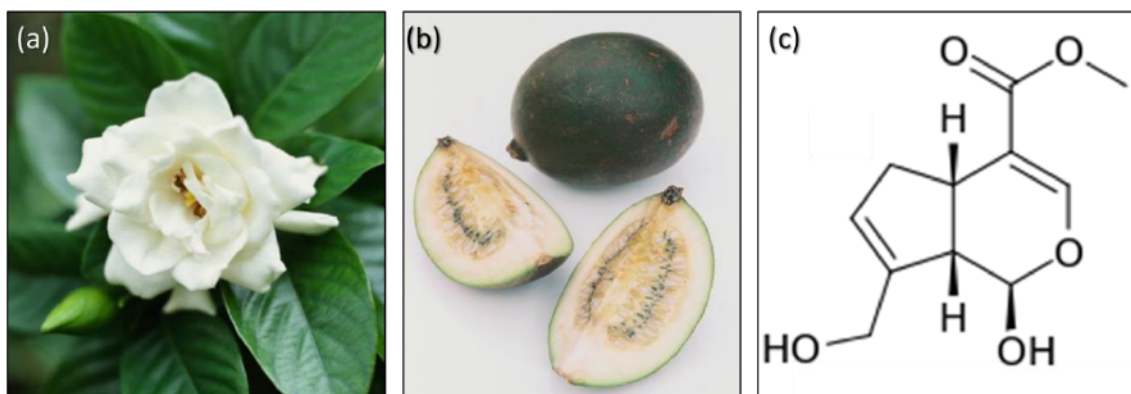


Figura 11 – (a) gardênia; (b) jenipapo; (c) estrutura da genipina (Sampaio *et al.*, 2012).

Por ser uma substância natural e uma molécula biodegradável com baixa citotoxicidade, a genipina tem sido investigada, como um agente reticulante a ser usado em aplicações biológicas. Recentes estudos usando gelatina reticulada por genipina obtiveram bons resultados (Bispo, 2009).

Segundo pesquisas realizadas por Mi, Shyu e Peng (2005) e Muzzarelli (2009), o mecanismo de reticulação das cadeias poliméricas de quitosana pela genipina é influenciado pelo pH do meio. Assim, dois principais processos químicos de reticulação podem acontecer, sendo um em meio ácido ou neutro e outro em meio alcalino. Muzzarelli (2009) relata que a genipina age como um dialdeído, mas seus produtos de condensação são muito mais estáveis se comparados àqueles resultantes da reação com o glutaraldeído.

O *crosslinking* do colágeno corneano com genipina mostrou aumento da rigidez biomecânica de córneas suínas, dose-dependente, quando se utilizou genipina 0.10%, 0.25% e 1.00%; bem como, aumentou, em cinco vezes, a resistência da córnea à colagenase bacteriana (Ávila, Gerena e Navia 2010). A genipina 0.25% foi similar ao UV-CXL com riboflavina 0.1% no *crosslinking* de córneas suínas em relação a rigidez ocular e toxicidade às células endoteliais corneanas. (Ávila, Gerena e Navia 2012).

## 2.4 Ultravioleta

A radiação UV compreende uma faixa de comprimento de onda (Figura 12) que vai de 100 a 400 nm, sendo classificada em três regiões: UVA (320 – 400 nm) UVB (280 – 320 nm) e UVC (100 – 280 nm) (Puche e Caro, 1998; Ter Veen *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2013).

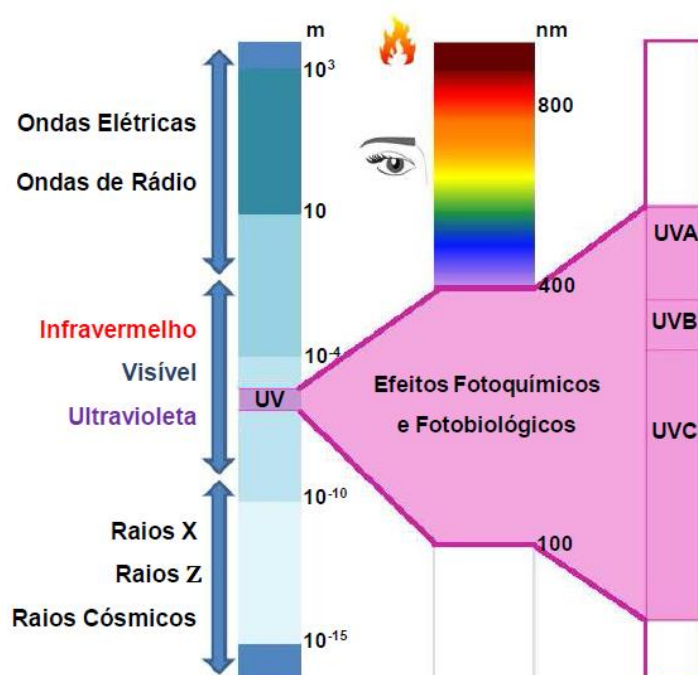


Figura 12 – Espectro eletromagnético com destaque para tipos de radiação UV (Niu *et al.*, 2013).

Atualmente, a fotoquímica constitui uma área de pesquisa multidisciplinar que está tendo um grande desenvolvimento tanto em nível acadêmico como industrial. A fotoquímica de polímeros é uma das áreas que mais tem se desenvolvido em nível industrial, devido não só ao grande número de novas aplicações como também do ponto de vista econômico, técnico e ecológico (Teixeira, 2013).

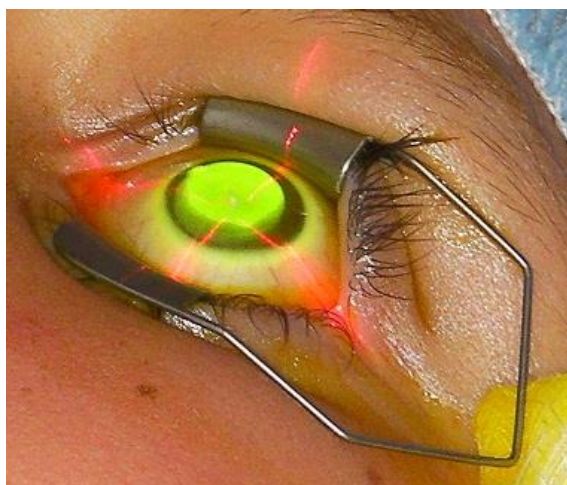
As aplicações da fotoquímica de polímeros podem ser divididas em três grandes grupos: reações de síntese, fotodegradação/fotoestabilização e processos de fotopolimerização/fotoreticulação. O setor de fotopolimerização/fotoreticulação tem recebido atenção especial devido a inúmeras e importantes aplicações na área de Materiais (Rodrigues e Neumann, 2003).

Nos processos de fotopolimerização/fotoreticulação a utilização de luz UVA no comprimento de onda de 320 - 400 nm é fator chave nos tratamentos baseados na



reticulação do colágeno corneano. A luz ultravioleta A (UVA) associada à riboflavina cria novas ligações entre as moléculas de colágenos adjacentes, produzindo diminuição da espessura da córnea, bem como diminuindo sua permeabilidade (Spoerl *et al.*, 2007). A irradiação por meio da UVA faz com que ocorra perda do equilíbrio interno das moléculas de riboflavina, que atua como um fotomediador, criando radicais livres que induzem novas ligações entre fibrilas de colágeno (Wollensak e Redl, 2008). Esta reestruturação das fibras de colágeno ocasiona aumento da força biomecânica da córnea (Spoerl *et al.*, 2007; Wollensak e Redl, 2008).

A luz ultravioleta é um componente importante no CXL (Figura 13). Parâmetros-chave incluem comprimento de onda, fluência e tempo de irradiação, que são específicos para a eficácia e a segurança do tratamento. A gama de pico de absorção de riboflavina para CXL varia entre 360 e 370nm, tal como determinado através de estudos iniciais.



*Figura 13 – Aplicação da luz ultravioleta na córnea, e concomitante aplicação de riboflavina durante cirurgia de CXL (Vilar, 2017).*

As variações na intensidade e duração em estudos pré-clínicos estabeleceram que a máxima rigidez envolveu o uso de  $3\text{mW}/\text{cm}^2$  de energia durante 30 minutos, o que correspondeu a uma dose total de energia (fluência) de  $5,4\text{J}/\text{cm}^2$  e permitiu a maior eficiência e endurecimento do tecido. Esta forma de utilização foi denominada de protocolo padrão ou Standard (ou protocolo de Dresden).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, localizado no Bloco CJ3, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

### 3.2 Materiais

- Córneas de suínos coletadas em Matadouro (Campina Grande-PB);
- Riboflavina (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>; PM:376,36 g/mol; Eyepharma);
- Genipina (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>; PM: 226,23 g/mol; ChallengeBioproducts);
- Tampão Fosfato Salino P.A (PBS; Sigma-Aldrich);

### 3.3 Métodos

Trinta e dois olhos de suínos, com córneas claras, isentas de qualquer defeito ou opacidade, foram coletados logo após o abate, transportados em caixa térmica, em temperatura de 2 a 8 °C e usados, dentro de 8 a 10 h post-mortem, mantidos sob refrigeração para separação das córneas. Vale salientar que as córneas foram transportadas em caixas térmicas com gelo.

Posteriormente, as córneas foram separadas em quatro grupos, denominados grupo 1 (**C1**–córneas submetidas a aplicação de riboflavina + UVA de acordo com o tratamento de *crosslinking* (Figuras 14 e 15) em humanos, segundo protocolo de Dresden), grupo 2 (**C2** –córneas submetidas a aplicação da solução de genipina 0,1% por 30 min, sendo aplicada uma gota da solução a cada 5 min, após a desepitelização da córnea – Figura 16a), grupo 3 (**C3** –córneas, com epitélio íntegro, sendo aplicada uma gota da solução de genipina 0,1% a cada 5 min – Figura 16b) e grupo 4 (**C4** – córneas do grupo controle, com epitélio íntegro, sem reticulante – Figura 16c).

Após cada tratamento, botões córneo-esclerais foram retirados dos globos oculares. Em seguida, foram preparadas faixas verticais centrais para os Ensaios de Tração e Dilatometria e, foram trepanados botões corneanos (7,75 mm centrais) para os Ensaios de Grau de Intumescimento, Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica

de Varredura. Os botões corneanos foram secos com papel toalha e submetidas às caracterizações (Figura 17).



Figura 14 – Equipamento utilizado como fonte UVA para o CXL (Pescketrade, 2017).

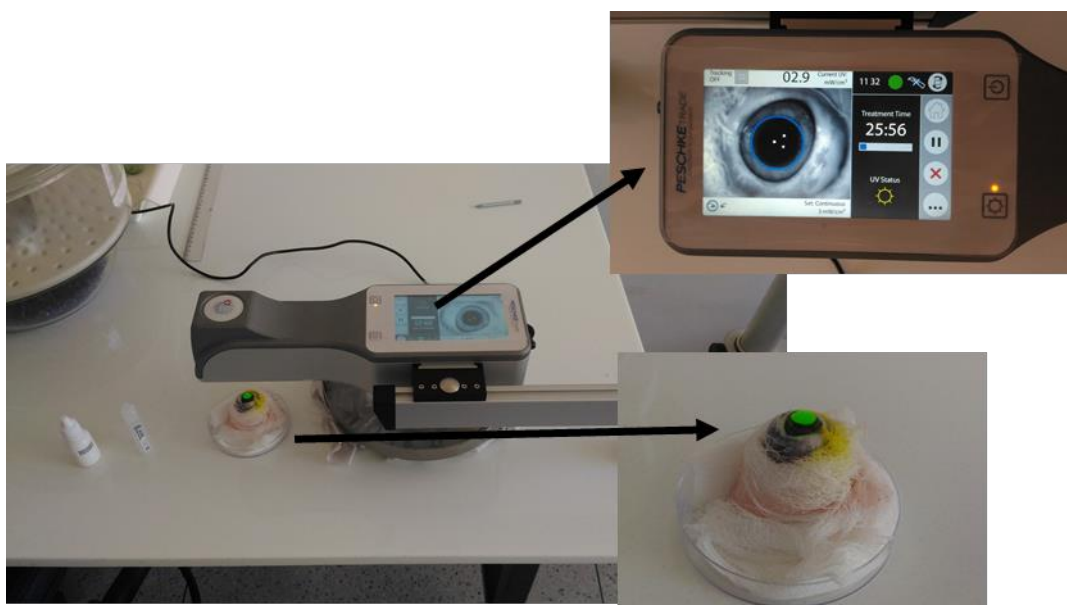


Figura 15 – Aplicação da riboflavina + UVA – Grupo C1.

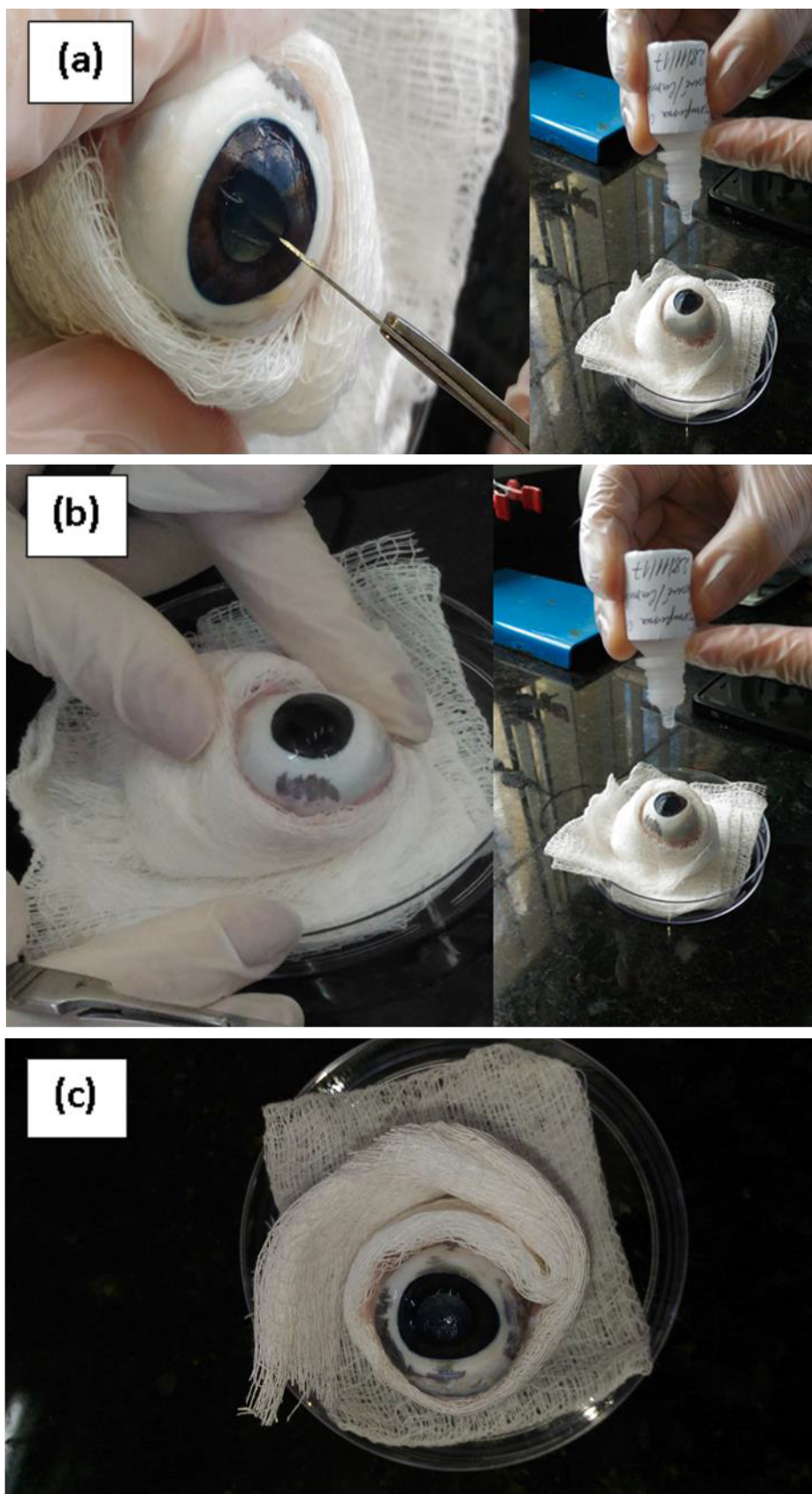


Figura 16 – Aplicação da genipina e Grupo controle [(a) grupo C2 (genipina 0,1% sem epitélio); (b) grupo C3 (genipina 0,1% com epitélio)]; (c) grupo C4 (controle, sem reticulante).

A Figura 17 demonstra os botões córneo-esclerais, após a retirada do globo ocular e seus respectivos botões corneanos, após a trepanação com trépano de Barron.

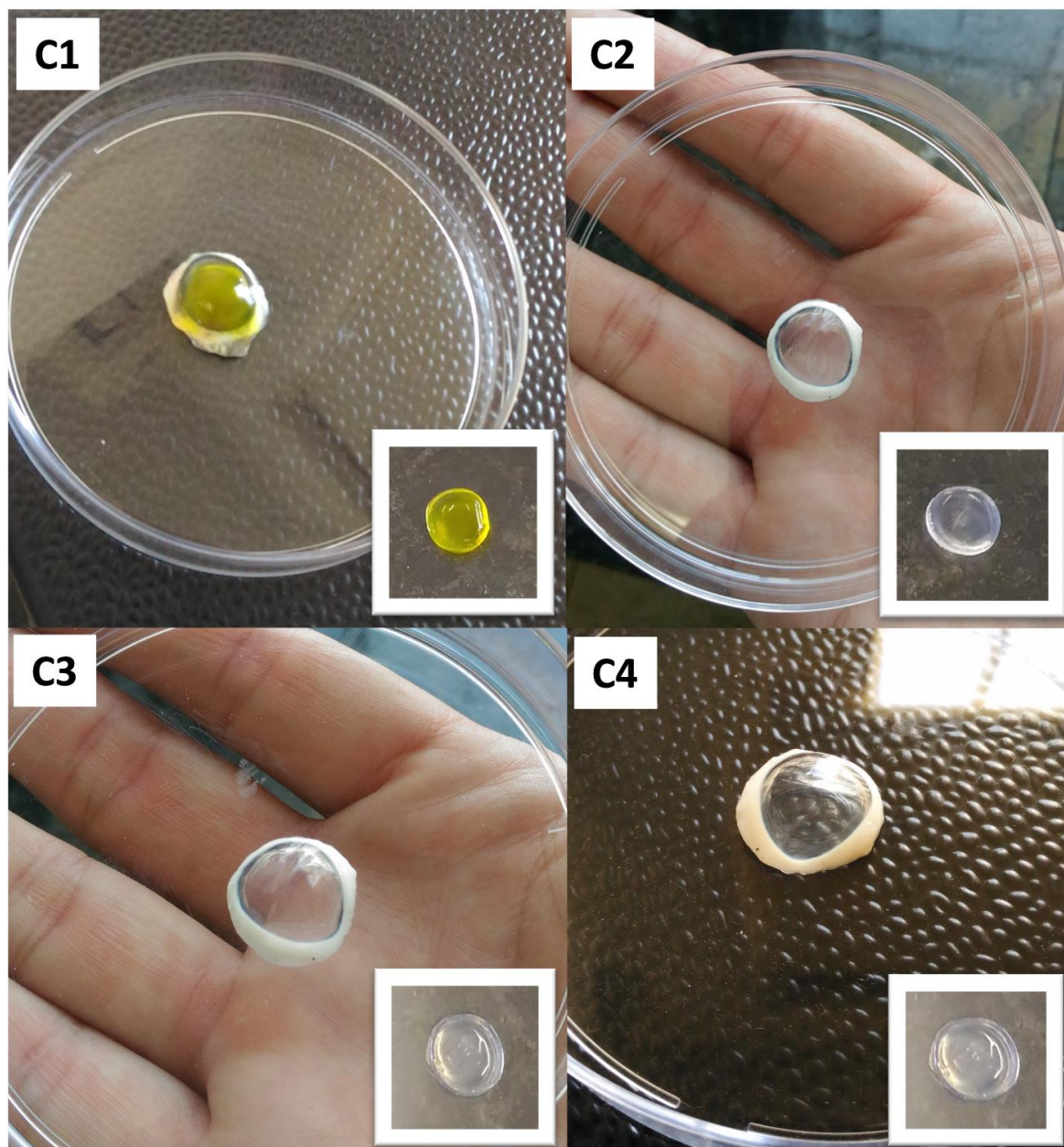


Figura 17 – Botões Córneo-esclerais e botões corneanos: C1 (Riboflavina + UVA); C2 (genipina 0,1% sem epitélio); C3 (genipina 0,1% com epitélio); C4 (controle, sem reticulante).

A Figura 18 apresenta o fluxograma da metodologia desenvolvida no trabalho

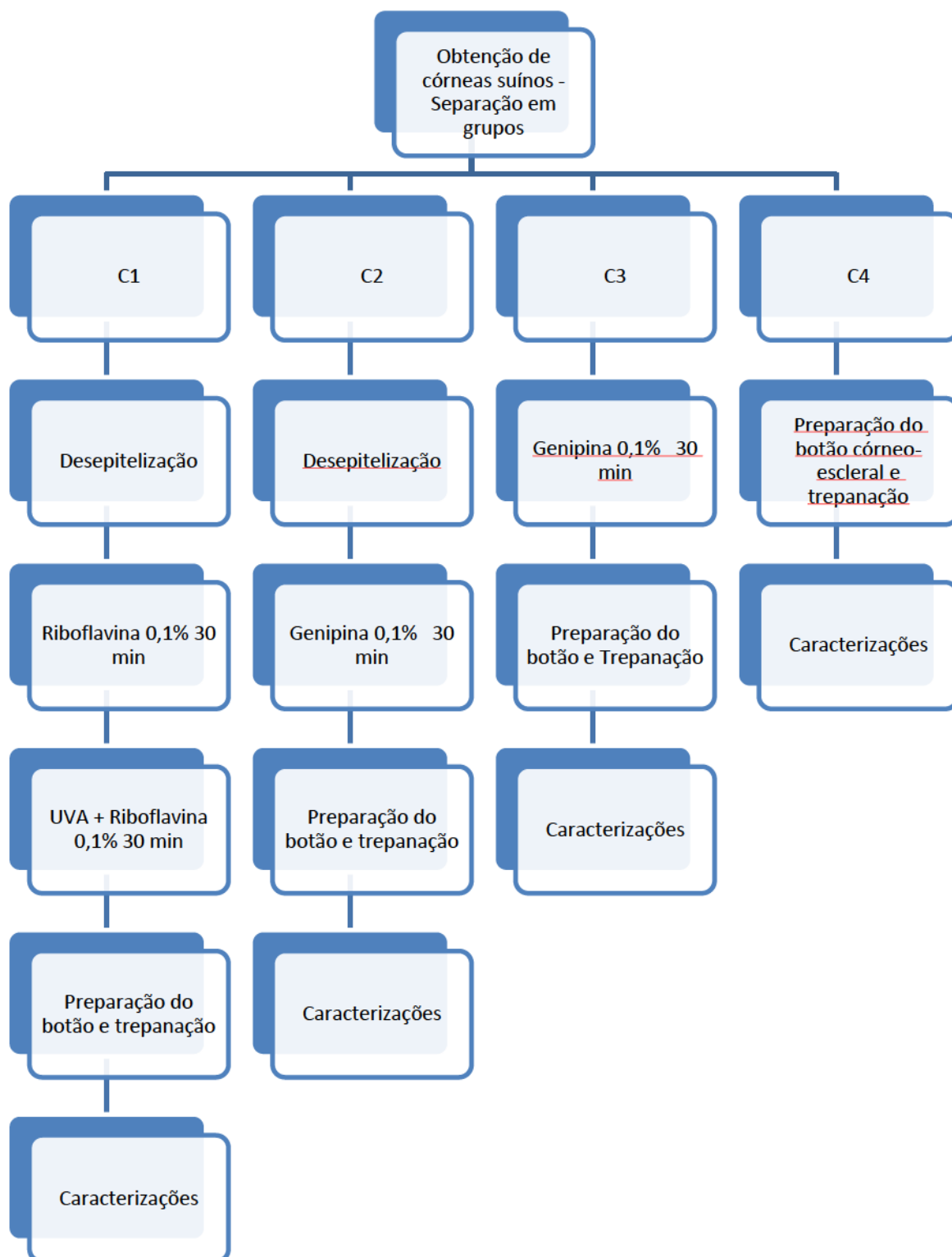


Figura 18 – Fluxograma da metodologia desenvolvida no trabalho.

Importante ressaltar que a solução de genipina 0,1% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,1 g do pó da genipina em 100 mL de Tampão Fosfato Salino (PBS). A solução foi utilizada no mesmo dia do preparado.

### 3.3.1 Caracterizações

Após os procedimentos descritos no item 3.3, as córneas foram analisadas pelas seguintes técnicas: Ensaio Mecânico de Tração, Dilatometria, Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Grau de Intumescimento (GI). Os ensaios de Citotoxicidade foram realizados em amostras de fibroblastos submetidas a genipina 0,1% ou riboflavina + UVA, simulando os tratamentos realizados nas córneas.

### 3.3.2 Ensaio Mecânico de Tração

O ensaio de tensão-deformação fornece uma indicação da resistência e também da tenacidade do material em teste. Em geral, os resultados do ensaio de tensão-deformação são apresentados como tensão versus deformação de engenharia. A curva típica é obtida a partir das medições de carga ( $F$ ) e da elongação ( $\Delta L$ ). A tensão nominal ou de engenharia ( $\sigma_N$ ) é determinada dividindo-se a carga aplicada ( $F$ ) pela área da seção transversal inicial do corpo de prova ( $A_0$ ). A deformação nominal ou de engenharia ( $\epsilon$ ) é obtida da leitura do extensômetro, ou seja, dividindo-se a variação do comprimento de referência ( $\Delta L$ ) pelo comprimento de referência inicial,  $L_0$ , que representa a área útil do corpo de prova (Silva, 2012).

Os ensaios de tração foram realizados numa máquina de ensaio universal, da marca Instron, modelo 3366, com célula de carga de 10 kN, velocidade de 1,0 mm/min, com 3 amostras de aproximadamente 15 mm de comprimento e 4mm de largura. A distância entre as garras foi de 5 mm. O ensaio teve como objetivo determinar o módulo de elasticidade (MPa), deformação máxima (%) e a tensão (MPa) das córneas.

### 3.3.3 Dilatometria

A Dilatometria é a técnica na qual a mudança nas dimensões de uma amostra é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada (NETZSCH, 2017).

Esta técnica foi utilizada para medir a variação de comprimento das córneas quando submetida a um programa controlado de temperatura. Foi utilizado um

dilatômetro da Netzsch modelo 402 C. A faixa de temperatura utilizada foi de 20 a 40 °C com razão de aquecimento de 2°C/min.

### **3.3.4 Microscopia Óptica (MO)**

A Microscopia Óptica (MO) é uma técnica empregada para ver, próxima, uma amostra, com a ampliação de uma lente, com a luz visível. O microscópio óptico, também conhecido às vezes como um fotomicroscópio, usa uma ou uma série de lentes para ampliar imagens de amostras pequenas com luz visível. As lentes são colocadas entre a amostra e o olho do examinador para ampliar a imagem de modo que possa ser examinada em maiores detalhes (Medical, 2017).

Desta forma, a caracterização por MO foi utilizada para avaliação da morfologia das córneas dos 4 grupos. A análise foi realizada em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-400X, acoplado a uma estação de análise de imagens, com aumento de 300x, da parte longitudinal.

### **3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para verificação e análise das características morfológicas e/ou microestruturais. O princípio de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com a do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe é guiado de modo a varrer determinada área da amostra segundo uma malha retangular, obtendo assim a imagem, resultante da interação do feixe incidente com a superfície da amostra (Dedavid, Gomes e Machado, 2007).

Para obter as micrografias por MEV, foi utilizado um equipamento de bancada, modelo TM-1000, da marca Hitachi, com aumento de até 10000x, com profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada de 1 a 270 Pa, sem recobrimento metálico. As imagens foram obtidas com aumento de 400x.



### 3.3.6 Grau de Intumescimento (GI)

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o grau de intumescimento das córneas dos quatro grupos. As córneas foram inicialmente pesadas em uma balança analítica e mantidas em solução de tampão fosfato salino (PBS) por 24 h. Em seguida, foram retiradas da solução, colocadas sobre papel filtro para retirar o excesso de solução e pesadas novamente. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo  $t$ , foi calculado de acordo com a Equação 1.

Todas as amostras passaram por medições antes e após o intumescimento para verificar o quanto o sistema variou.

$$GI = \frac{WT - Wo}{Wo} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Wt: é a massa da amostra no tempo  $t$ ; Wo: é a massa inicial da amostra.

### 3.3.7 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi realizada pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos L929 por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular).

O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo, sensível e de confiança que mensura a viabilidade, proliferação e atividade das células, baseando-se na capacidade da enzima desidrogenase encontrada nas mitocôndrias de células vivas converter o substrato amarelo, solúvel em água (MTT), em produto de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazana, que são insolúveis em água, que poderão ser então detectados através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro. Sabe-se que a quantidade do formazana produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

De acordo com a classificação de citotoxicidade *in vitro* de materiais do documento ISO10993-5 2009, a viabilidade celular (%), em cultura celular de

fibroblastos L929, determina a citotoxicidade do material, de modo que, resultado abaixo de 70% demonstra que o mesmo é potencialmente citotóxico (ISO, 2009).

Utilizou-se igual volume das soluções de genipina 0,1% e riboflavina, sendo que as amostras que foram submetidas à riboflavina também foram expostas à radiação UVA durante 30 minutos. Ambas as amostras estiveram nas mesmas condições ambientais, durante os 30 minutos de experimento, em câmara de fluxo laminar.

### **3.4 Comitê de Ética em Pesquisa**

Todo o experimento foi baseado nos critérios preconizados pela Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) para o uso de animais em pesquisa oftálmica e na Resolução do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Resolução Normativa N 30 (CONCEA) diretriz VI – 6.1.10 na letra b, que orienta sobre uso de cadáveres, parte deles ou amostras biológicas.

### **3.5 Análise Estatística**

O teste ANOVA ou Análise de Variância (fator único) foi utilizado para comparar os resultados obtidos, quanto ao ensaio de tração com o objetivo de verificar se houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ou não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Com relação à ANOVA, a hipótese nula ( $H_0$ ) foi a não existência de diferenças significativas entre as médias, ou seja, se o valor da probabilidade calculada ( $p$ ) para as etapas de decomposição fosse menor que 0,05 ( $p_0$ ) rejeita-se  $H_0$ ; caso contrário, aceita  $H_0$ , ou seja, o *p-valor* é a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra, sob a hipótese nula.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio Mecânico de Tração

Os resultados dos ensaios de tração das córneas, para três corpos de prova de cada grupo, estão apresentados na Figura 19 e Tabela 1.

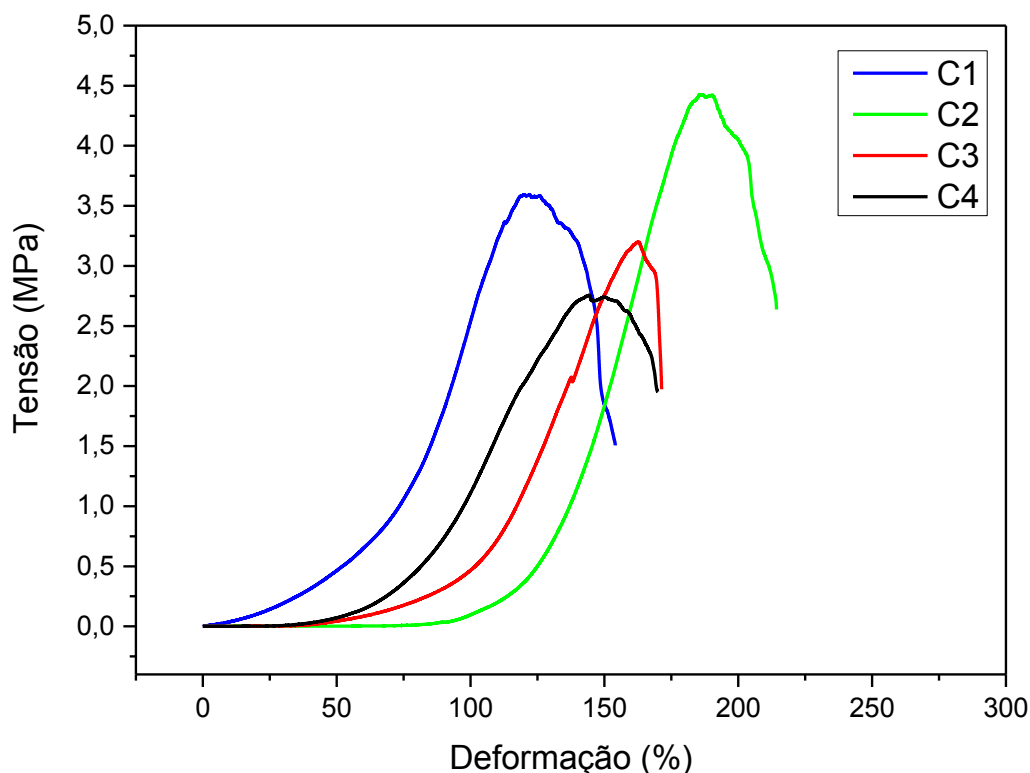


Figura 19 – Curvas tensão x deformação das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4.

Analisando as curvas tensão x deformação, verifica-se que os grupos C1, C2 e C3 exibiram perfil semelhante, sem diferença significativa quanto ao módulo de elasticidade (MPa) e a tensão (MPa), com  $p$ -valor igual a 0,81 ( $p > 0,05$ ) e 0,10 ( $p > 0,05$ ), respectivamente. Os grupos C1, C2 e C3 apresentaram maior resistência à tração quando comparados ao grupo controle (C4), que demonstrou menor valor de tensão máxima ( $2,90 \pm 0,250$  MPa), confirmando que o processo de reticulação seja por riboflavina + UVA ou genipina 0,1% foi efetivo. Embora bastante semelhante entre os grupos, o módulo de elasticidade apresentou-se menor no grupo C4 (controle) quando comparado ao dos demais grupos, corroborando os resultados de resistência à tração obtidos pela análise das curvas tensão x deformação.

Tabela 1 – Dados das propriedades mecânicas com base nas curvas tensão x deformação das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4.

<b>Amostra</b>	<b>Módulo de Elasticidade (Mpa)</b>	<b>Deformação Máxima (%)</b>	<b>Tensão (Mpa)</b>
C1	0,039 ± 0,0042	116,00 ± 7,61	3,29 ± 0,749
C2	0,038 ± 0,0014	186,89 ± 5,64	4,50 ± 0,007
C3	0,035 ± 0,0099	162,48 ± 2,62	3,20 ± 0,140
C4	0,033 ± 0,0035	162,86 ± 18,51	2,90 ± 0,250

Para o módulo de elasticidade, o *p*-valor entre C4 e C1 foi de 0,24, entre C4 e C2 de 0,13 e entre C4 e C3 de 0,85. Para a deformação, o *p*-valor entre C4 e C1 foi de 0,09, entre C4 e C2 de 0,09 e entre C4 e C3 de 0,45. Para a tensão, o *p*-valor entre C4 e C1 foi de 0,56, entre C4 e C2 de 0,01 e entre C4 e C3 de 0,28. Assim, pela análise dos dados, comparado módulo de elasticidade (MPa), deformação (%) e tensão (MPa) do grupo controle (C4) com os grupos C1, C2 e C3, não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ), com exceção da tensão (MPa) entre os grupos C4 e C2, com *p*-valor igual a 0,01 ( $p < 0,05$ ), estatisticamente significativo.

Importante ressaltar que o módulo de elasticidade ou módulo de Young é um parâmetro fundamental, pois está associado com a descrição de valores de outras propriedades mecânicas, como por exemplo, tensão de ruptura e tensão de escoamento. No caso, o módulo de elasticidade foi obtido na parte linear das curvas, criando-se uma convenção na qual foi construída uma linha reta paralela à porção elástica, passando pela deformação de 0,2% da deformação total (Callister, 2008).

Verificou-se também que os grupos C1 e C2 apresentaram maior resistência à tração (3,29 ± 0,749 MPa; 4,50 ± 0,007 MPa respectivamente) quando comparados ao grupo C3 (3,20 ± 0,140 MPa). Este fato pode estar relacionado ao tecido epitelial, presente nas córneas dos grupos C3 e C4, podendo representar uma barreira à maior penetração do reticulante no estroma corneano, onde encontra-se o colágeno, diminuindo, assim, a formação de ligações cruzadas.

A deformação máxima das córneas do grupo 1 se apresentou menor do que a dos demais grupos ( $116,0 \pm 7,61\%$ ). Córneas submetidas ao tratamento com genipina 0,1%, após desepitelização, apresentam maior plasticidade, com deformação máxima de  $186,89 \pm 5,64\%$ . A necessidade de aumentar a tensão para dar continuidade à deformação plástica do material decorre de um fenômeno denominado encruamento. A partir da região de escoamento, o material entra no campo de deformações permanentes, onde ocorre endurecimento por deformação a frio. Esse fenômeno ocorre em função da interação entre discordâncias e das suas interações com outros obstáculos, como solutos, contornos de grãos, entre outros, que impedem a livre movimentação das discordâncias.

À medida que os planos cristalinos escorregam e deslizam entre si, permitindo o escoamento, eles são continuamente travados devido à ancoragem desses planos pelas discordâncias que atingem os contornos de grãos. Conforme mais e mais planos cristalinos são travados, é preciso uma energia cada vez maior para que os planos que ainda possuem liberdade de movimentação continuem a deslizar, e, conseqüentemente, dando continuidade à deformação plástica, até o limite em que a fratura tem início (Garcia, 2012).

As propriedades biomecânicas da córnea se encontram intimamente relacionadas à sua estrutura, com especial envolvimento de seu estroma (Hjortdal, 1996). Sua elasticidade depende basicamente do arranjo estabelecido pelas fibras colágenas, e varia conforme a direção e região em que a variável é mensurada (Kotecha, 2007). Estudos têm demonstrado que a córnea humana apresenta comportamento elástico não-linear (Hjortdal, 1996). Além disso, o módulo de elasticidade da córnea varia direccionalmente e regionalmente. Elevados módulos de elasticidade são observados meridionalmente, em regiões centrais e paracentrais da córnea, e circunferencialmente, próximo ao limbo (Hjortdal, 1998).

Vale salientar que a espessura média das córneas, neste estudo, para os grupos C1, C2, C3 e C4 foram de  $880 \pm 43 \mu\text{m}$ ,  $1000 \pm 99 \mu\text{m}$ ,  $1160 \pm 197 \mu\text{m}$  e  $1210 \pm 64 \mu\text{m}$ . Realizaram-se as medidas nas córneas que foram submetidas ao ensaio de tração.

Em estudo prévio, com objetivo de avaliar o efeito da genipina, como reticulante natural em córneas porcinas, em diversas concentrações, os autores puderam perceber aumento do módulo de elasticidade e rigidez da córnea, de um modo dose-dependente (Ávila, 2010). Os valores de módulo de elasticidade foram bastante

superiores ao encontrado no presente estudo, o que pode ser explicado pela penetração da genipina pelas laterais das faixas corneanas confeccionadas antes da aplicação do reticulante. No presente estudo, o método de aplicação do tratamento, antes da confecção de botões corneanos ou faixas córneo-esclerais, simula ou assemelha-se, mais perfeitamente ao que ocorre no tratamento *in vivo*.

Ao se comparar a rigidez corneana, em condições fisiológicas, em olhos tratados com genipina 0,25% ou tratados com associação de riboflavina + UVA, o efeito do *crosslinking* foi similar (Ávila, 2012). No presente estudo, verificamos maior limite de resistência à tração das córneas tratadas com genipina após despitelização, no entanto, essas mesmas córneas apresentam uma deformação máxima mais elevada do que as submetidas ao protocolo padrão de *crosslinking* corneano.

Pode-se entender que, ao utilizar concentração menor da genipina, permitimos ainda a presença de regiões sem *crosslinking* do colágeno, aumentando a deformação máxima das córneas tratadas com essa concentração. Estudos comparando diversas concentrações da genipina com o tratamento com riboflavina e UVA podem ser realizados para tornar essa hipótese mais firme.

## 4.2 Dilatometria

A Figura 20 apresenta as curvas dilatométricas das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4, obtidas sob razão de aquecimento de 2°C/min.

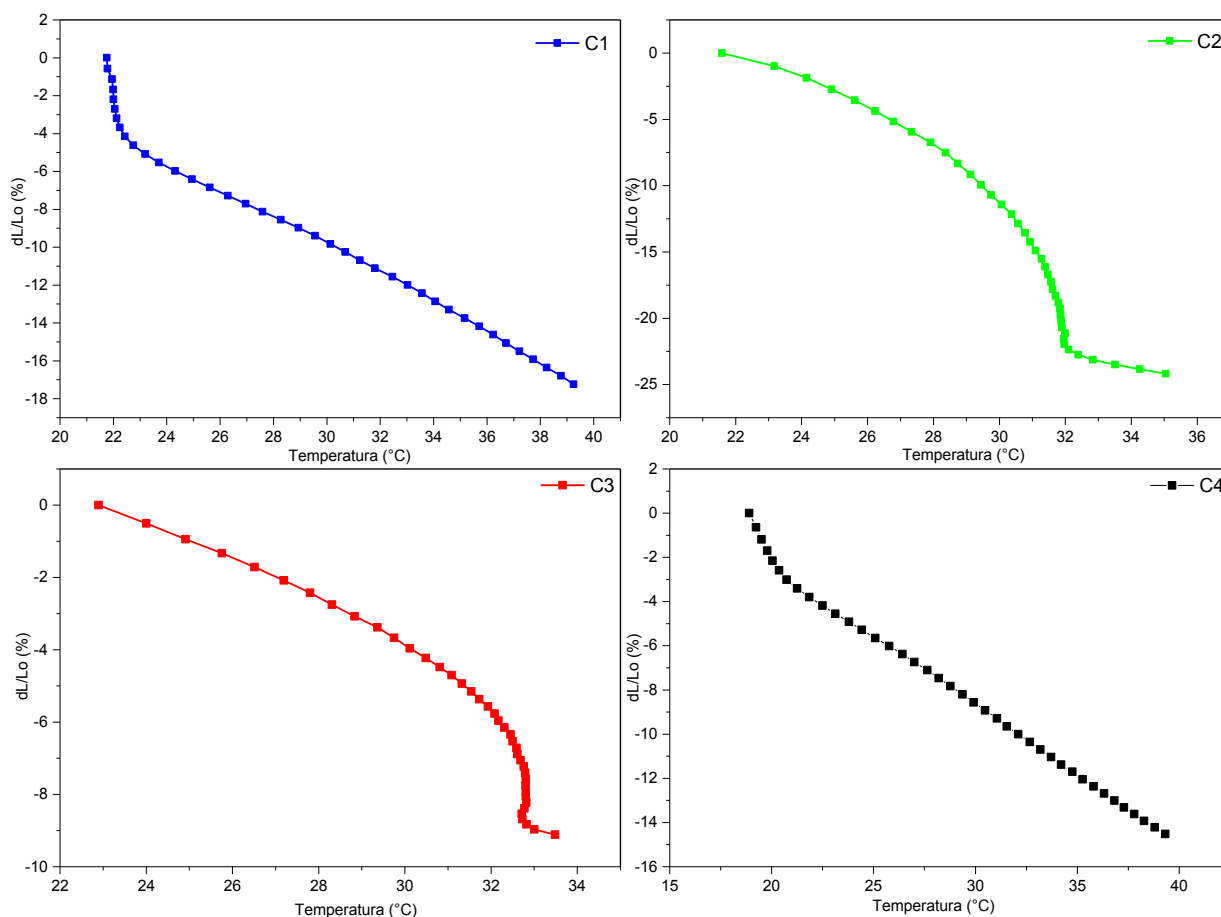


Figura 20 – Curvas dilatométricas das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4, obtidas sob razão de aquecimento de 2°C/min.

Pela Figura 20, observa-se que, já em temperaturas de 20 a 22°C, ocorre uma contração mais acelerada das córneas dos grupos C1 (Riboflavina + UVA) e C4 (Controle sem reticulante), e, em seguida, as inclinações descendentes são lineares até a temperatura de 40°C; enquanto que, quando utilizada genipina 0,1% (C2 e C3), a curva tende a ficar mais linear em temperaturas menores e ocorrer uma inclinação descendente mais acelerada em temperaturas maiores, por volta de 30°C. O maior percentual de contração foi das córneas do grupo C2 (genipina 0,1% sem epitélio), seguidas das córneas do grupo C1, corroborando os resultados do ensaio de tração, demonstrando maior resistência mecânica nos grupos C1 e C2 (córneas desepitelizadas previamente a aplicação da riboflavina e UVA (C1) ou genipina 0.1% (C2), onde, provavelmente, o efeito do crosslinking foi maior.

Deve-se considerar também que essas diferenças na amplitude de contração das córneas, bem como das diferentes temperaturas envolvidas nas contrações, entre

os grupos, podem ser um sinal dos diferentes níveis ou tipos de ligações cruzadas, ou ainda das diferentes formas de envelhecimento da tripla-hélice do colágeno, o que pode ser atribuído à distribuição heterogênea das ligações cruzadas, causada pela difusão lenta dos reagentes no tecido (Danilov *et al.*, 2008).

Não foi encontrado nas bases de dados e pesquisa utilizados, estudos de dilatométrica em córneas, sejam elas de qualquer espécie.

### 4.3 Microscopia Óptica (MO)

A Figura 21 apresenta as micrografias obtidas por MO das córneas (região central), com representações longitudinais de 300x de aumento, com o objetivo de investigar o comportamento do material, quanto a interação com a luz.

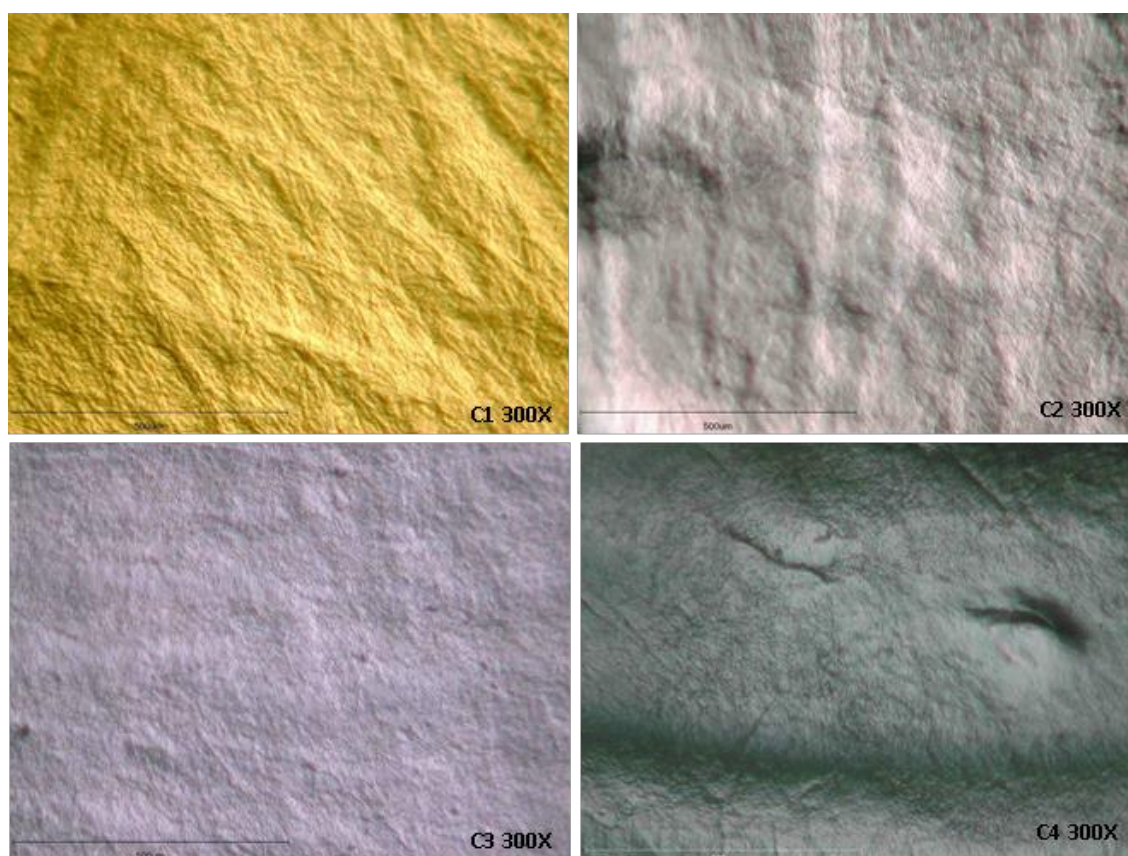


Figura 21 – Micrografias obtidas por MO das córneas (região central) dos grupos C1, C2, C3 e C4, com representações longitudinais de 300x de aumento.

Pela análise das micrografias, percebe-se uma coloração amarelada para a córnea submetida ao tratamento com riboflavina + UVA (C1), coloração discretamente



azulada para as córneas submetidas ao tratamento com genipina 0,1% (C2 e C3) e mais transparentes ou acinzentadas para a córnea do grupo controle (C4).

Verifica-se que houve um aumento da rugosidade e da densidade nas amostras dos grupos C1 e C2, onde provavelmente houve maior reticulação, quando comparada com a superfície da C3 e C4. Este fato corrobora com o observado nos ensaios mecânicos, as quais (C1 e C2) apresentaram maior resistência à tração.

Através da caracterização realizada por microscopia óptica, pode-se perceber as diferentes colorações das amostras. A técnica utilizada foi a de transmissão. A cor dos materiais observados em transmissão depende claramente da absorção seletiva. Um material iluminado por luz branca e que absorve seletivamente determinada cor, será visto com sua cor complementar. Para o caso de materiais opacos, o processo é mais complicado. A grande maioria dos materiais coloridos apresenta coloração pigmentada, na qual a luz penetra uma certa distância durante a qual sofre absorção seletiva, e por um mecanismo (que pode ser reflexão, refração, difração ou espalhamento) emerge da sua superfície a sua cor complementar (Mannheimer, 2002).

No tratamento padrão de *crosslinking* do colágeno corneano, o estroma da córnea deve ficar embebido com a solução de riboflavina, tanto para que haja o efeito fotoquímico desejado quanto para que a mesma exerça função de proteção de estruturas intra-oculares contra os danos da radiação ultravioleta. Isso, por si só, já é capaz de provocar a coloração amarelada da córnea. Sabe-se que o *crosslinking* “padrão ” pode estar associado ao aparecimento de opacidade corneana ou “haze” em 57% dos pacientes submetidos ao mesmo (Hersh *et al.*, 2017) e que esse haze é maior no primeiro mês, apresenta um platô em 3 meses, e reduz significativamente entre 3 e 12 meses do período pós-operatório (Greenstein *et al.*, 2010); estende-se até 60% da profundidade do estroma e, apesar da sua natureza não ser totalmente conhecida, pode estar associado a uma transformação anômala dos fibroblastos e morte dos ceratócitos e a profundidade do efeito do *crosslinking* (Koller, 2009; Salomão *et al.*, 2011).

Esse haze, ou opacidade da córnea, é tido como complicação do UV-CXL, visto que pode provocar, embora transitóriamente, uma indesejada diminuição da acuidade visual. O tratamento com genipina pode ser uma melhor alternativa ao tratamento no que diz respeito ao grau de transparência corneana pós-tratamento. Estudos, com essa finalidade, podem trazer informações adicionais.

Curiosamente, verificou-se por fotografias, a comparação da transparência e visualização de imagens de letras através dos botões corneanos dos diversos grupos, comparados ao controle (Figura 22).

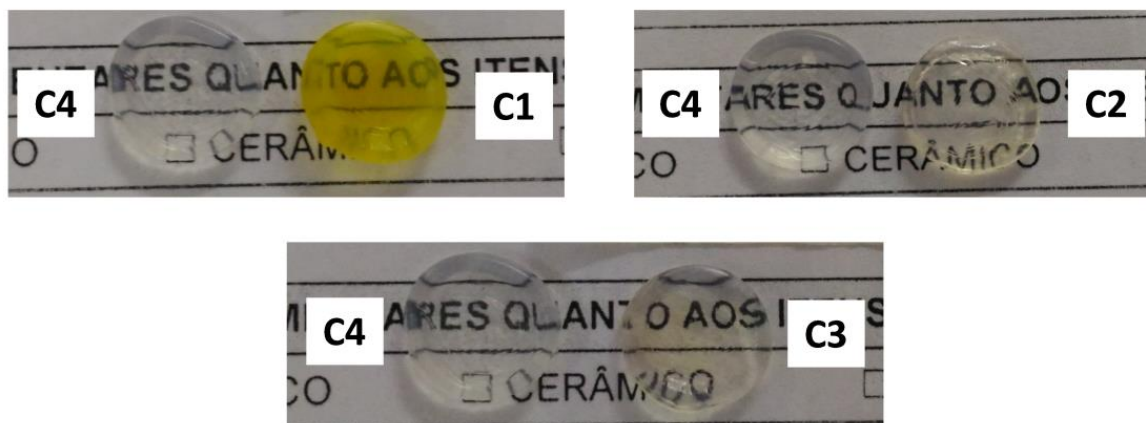


Figura 22 – Fotografias dos botões corneanos (C1, C2, C3), comparando-os, em transparência, com o controle (C4).

As córneas submetidas à genipina demonstraram melhor visualização das letras quando comparadas às submetidas ao protocolo padrão. Análises de transmitância podem ser realizadas para melhor investigação da transparência dessas córneas.

#### 4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 23 apresenta as micrografias obtidas por MEV das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4, com representações transversais (corte central) e 400x de aumento.

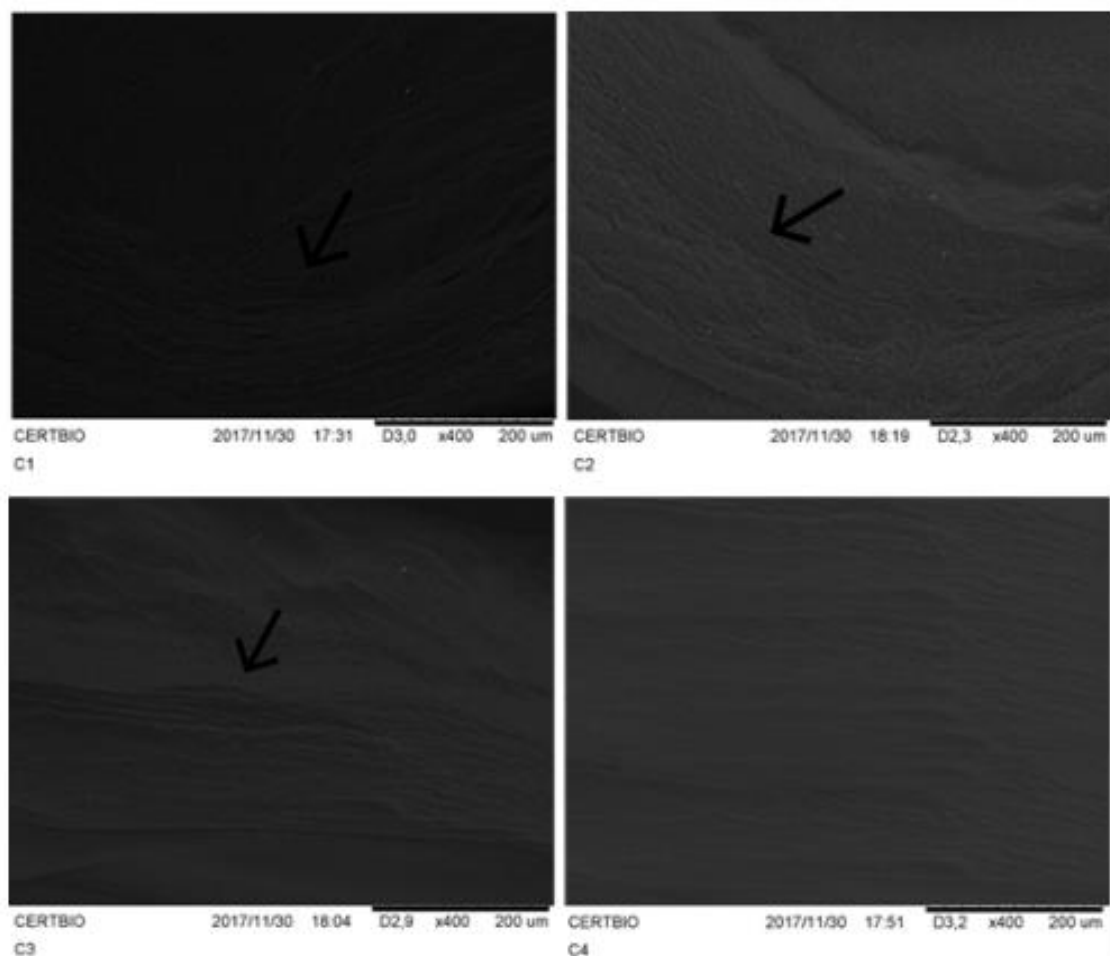


Figura 23 – Micrografias obtidas por MEV das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4, com representações transversais (corte central) e 400x de aumento.

Na Microscopia Eletrônica de Varredura, da superfície de corte da trepanação corneana, foi possível evidenciar uma linha de demarcação que, deve estar associada à profundidade do efeito dos tratamentos, tanto com a associação de riboflavina + UVA, como com a aplicação de genipina 0,1% na córnea desepitelizada ou não.

A nova estruturação das fibras colágenas proporciona um novo arranjo molecular, com aproximação das fibrilas adjacentes como visualizado por microscopia de fluorescência confocal, no trabalho de Bottos (2008).

Após o tratamento convencional com riboflavina + UVA, tem sido detectada uma linha de demarcação no estroma corneano, ao exame de biomicroscopia em lâmpada de fenda, já em 2 semanas do período pós-operatório a uma profundidade de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  no estroma corneano (Seiler, 2006). Essa linha de

demarcação também pode ser detectada utilizando-se microscopia confocal e tomografia de coerência óptica do segmento anterior ocular, representando a efetividade do *crosslinking* do colágeno corneano (Mazzota, 2007).

Assim, pode-se inferir que a genipina 0,1% administrada na córnea com ou sem epitélio, foi capaz de provocar alterações no estroma corneano, compatíveis com o *crosslinking* do colágeno corneano, semelhante ao produzido pelo tratamento convencional com riboflavina + UVA.

#### 4.5 Grau de Intumescimento

A Figura 24 apresenta os resultados de grau de intumescimento (%) das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4.

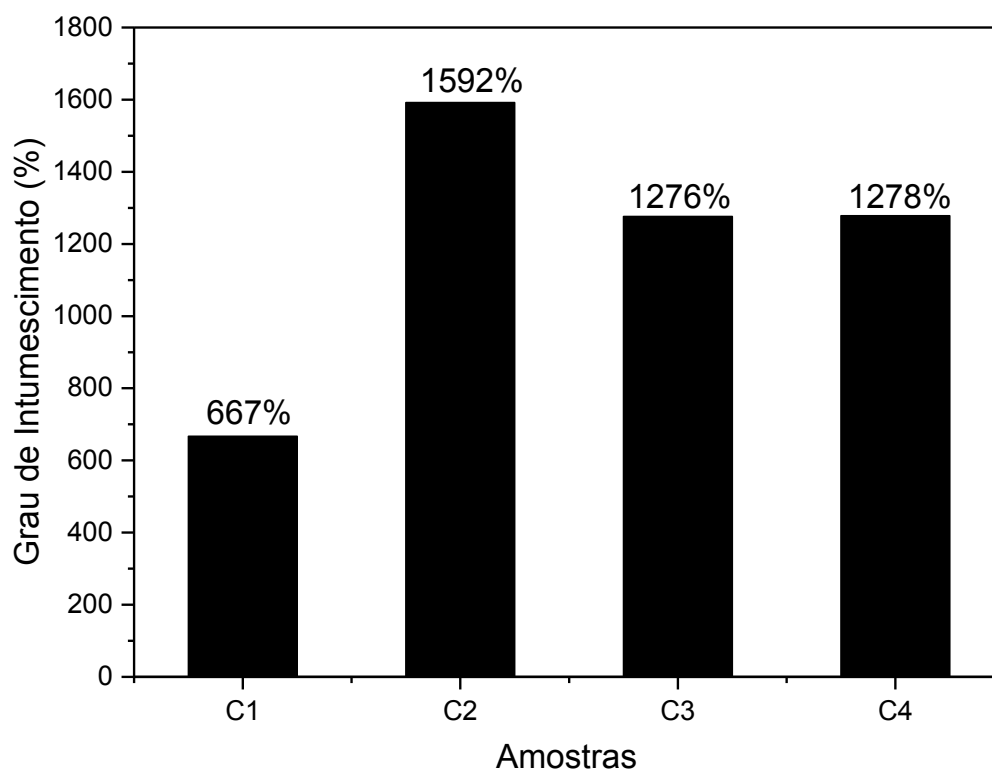


Figura 24 – Resultados de grau de intumescimento (%) das córneas dos grupos C1, C2, C3 e C4.

Com base nos resultados de grau de intumescimento, observa-se que as córneas dos grupos C3 e C4 apresentaram grau de intumescimento bastante semelhante, e o que as tornam iguais é a presença do epitélio, que pode representar barreira à penetração da solução de PBS no estroma corneano.

Analisando, nesse sentido da presença ou ausência do epitélio, observa-se maior grau de intumescimento nas córneas desepitelizadas e submetidas a aplicação de genipina 0,1% (C2). No entanto, apesar de também submetidas à desepitelização, as córneas do grupo C1 (riboflavina e UVA) demonstram o menor grau de intumescimento, o que denota uma maior força de interação ou compactação entre as camadas de fibras de colágeno, no estroma corneano, impedindo a entrada da solução de PBS no mesmo.

Córneas humanas, portadoras de ceratocone, mostraram uma razão alterada dos proteoglicanos dermatan sulfato/keratan sulfato (Wollensak, 1990) e pouco se entende sobre propriedades de intumescimento da cornea nos portadores de ceratocone. Vimos, em outra oportunidade, que o *crosslinking* do colágeno corneano, com riboflavina + UVA, provoca uma diminuição na síntese dos glicosaminoglicanos (Diniz, 2009). Os glicosaminoglicanos possuem alta quantidade de carga negativa e por isso acabam atraindo uma nuvem de cátions, onde o mais atraído é o sódio que traz com ele moléculas de água. Essa capacidade dos glicosaminoglicanos de atrair cátions e água, confere aos proteoglicanos a função de dar a matriz extracelular uma característica hidratada. É possível que a genipina exerça menor influência na quantidade de glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular do estroma corneano.

A reticulação do colágeno da córnea (CXL) com riboflavina 0,1% e ultravioleta-A (UVA) pode fortalecer as ligações interfibrilares do estroma, reduzindo o espaço potencial para o acúmulo de fluido nas córneas. Avaliação objetiva da hidratação da córnea, após CXL do colágeno corneano, com riboflavina e UVA, demonstrou, na microscopia óptica, que não houve hidratação nos 351  $\mu\text{m}$  anteriores do estroma da córnea, região onde ocorreu o efeito biomecânico do *crosslinking* (Wollensak, 2007).

#### **4.6 Citotoxicidade**

A Figura 25 apresenta os resultados de citotoxicidade nas amostras de fibroblastos L929 submetidas à exposição à genipina 0,1% ou a associação de riboflavina + UVA.

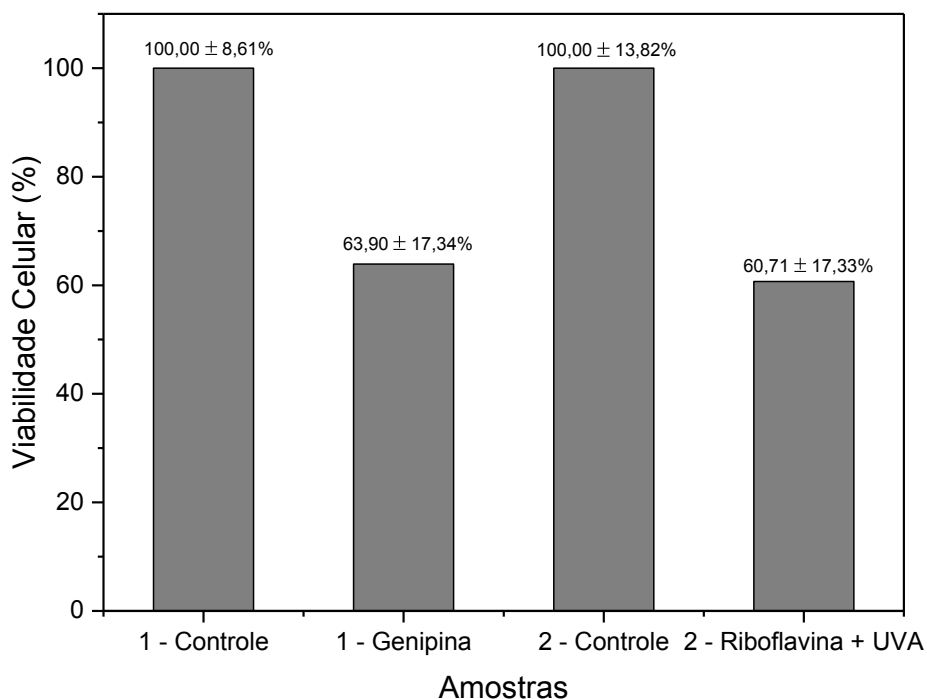


Figura 25 –Análise de citotoxicidade de genipina 0,1% ou associação de riboflavina + UVA aos fibroblastos L929.

Com base na avaliação da viabilidade celular de fibroblastos L929, em cultura, observou-se que a genipina 0,1% e a associação de riboflavina + UVA são, ambos, potencialmente citotóxicos.

Utilizando-se a irradiação padrão, da superfície corneana, com a fluência de  $3\text{mW}/\text{cm}^2$ , o efeito citotóxico atinge a profundidade de  $300\mu\text{m}$  em córneas humanas (Wollensak *et al.*, 2004).

Então, o estroma é despovoado de ceratócitos até essa profundidade de  $300\mu\text{m}$ . No entanto, repovoamento desta área se dá em até 6 meses. A exposição à radiação UVA, atualmente utilizada de  $5,4\text{mJ}/\text{cm}^2$ , que corresponde a  $3\text{mW}/\text{cm}^2$ , está abaixo dos limiares de danos conhecidos do UVA para o endotélio corneano, cristalino e retina. Em relação ao dano fotoquímico causado pelos radicais livres, os limiares de danos para ceratócitos e células endoteliais são de  $0,45$  e  $0,35\text{mW}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Em uma córnea de  $400\mu\text{m}$  de espessura saturada com riboflavina, a irradiância no nível endotelial é de  $0,18\text{mW}/\text{cm}^2$ , o que é duas vezes menor do que o valor limite para ocorrer danos.

Assim, se a córnea, a ser tratada, tiver uma espessura mínima de  $400\mu\text{m}$  (conforme recomendado), o endotélio corneano não sofrerá danos, nem estruturas

mais profundas, como o cristalino e a retina (Spoerl, 2007). Dessa forma, devido a semelhança dos resultados observados nos ensaios de citotoxicidade, do presente estudo, é necessário considerar a genipina como um reticulante promissor para o *crosslinking* do colágeno corneano.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que os ensaios de caracterização realizados em MEV e MO demonstraram que a genipina 0,1%, aplicada em córneas de porcos, promove *crosslinking* do colágeno, e que o efeito desse reticulante é semelhante ao produzido pelo protocolo padrão de CXL com riboflavina + UVA.

Os ensaios de tração, dilatometria e grau de intumescimento não foram suficientes para avaliar qual dos métodos de reticulação apresenta maior efetividade.

O potencial de citotoxicidade aos fibroblastos se mostrou semelhante entre os métodos de reticulação.

Assim, novos estudos podem ratificar o benefício da genipina como reticulante do colágeno corneano no tratamento do ceratocone, tornando-a uma alternativa ao protocolo padrão de *crosslinking* no qual é necessário radiação ultravioleta.



## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar e comparar outros reticulantes naturais como extrato da semente de uva e tripolifosfato de sódio na promoção de ligações cruzadas no colágeno corneano;
- Estudar as concentrações mais adequadas dos possíveis agentes reticulantes em vários tempos de reticulação;
- Utilizar outros métodos de caracterização morfológica como Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) ou métodos de Imunofluorescência;
- Utilizar outros métodos de caracterização térmica ou química que possam demonstrar ou inferir a presença de novas ligações covalentes induzidas pelos diversos agentes reticulantes;
- Estudos com maior número de amostras e menor número de caracterizações, permitindo análise estatística acurada.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. T.; COUTINHO, F. M. B.; DIAS, M. L.; LUCAS, E. F.; OLIVEIRA, C. M. F.; TABAK, D. **Dicionário de polímeros**. Interciência, 2001. ISBN 857193052X.

ARVO – Association for Research in Vision and Ophthalmology. Disponível em: <<https://www.arvo.org/>>. Acesso: junho de 2017.

AVILA, M Y.; NAVIA, J L. Effect of genipin collagen *crosslinking* on porcine corneas. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, 2010.

AVILA, M Y.; GERENA, V A.; NAVIA, J L. Corneal *crosslinking* with genipin, comparison with UV-riboflavin in ex-vivomodel. **Molecular vision**, 2012.

BIOMEDICINAEMAÇÃO. NOVIDADE NO MUNDO DA MEDICINA: Cientistas descobrem nova camada no olho humano - CAMADA DE DUA. Disponível em: <<http://www.biomedicinaemacao.com.br/2013/06/novidade-no-mundo-da-medicina.html>>, 2013. Acesso em: maio de 2017.

BISPO, V. M. Estudo do efeito da reticulação por genipin em suportes biocompatíveis de quitosana-PVA. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais.

BOTTÓS, K.M.; DREYFUSS, J.L.; REGATIERI, C.V.; LIMA-FILHO, A.A.; SCHOR, P.; NADER, H.B.; CHAMON, W. Immunofluorescence confocal microscopy of porcine corneas following collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A. **J Refract Surg**. 2008.

BUTLER, M. F.; NG, Y. F.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the *crosslinking* reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 2003.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. Rio de Janeiro: LTC, 7º ed., 2008.

CANNON, D.; FOSTER, C. Collagen *crosslinking* in keratoconus. **Investigative ophthalmology & visual science**, 1978.

CONCEA - **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Resolução Normativa**, nº 12, DE 20 DE SETEMBRO, 2013.

CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias do SUS. Protocolo de uso da radiação para *cross-linking* corneano no tratamento do ceratocone. **Relatório de Recomendação de Uso**, 2016.

DALLE CARBONARE, M.; PATHAK, M. A. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 1-2, p. 105-124, 1992.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Atheneu, 2001.

DANILOV, N.A; IGNATIEVA, N.Y.U.; IOMDINA, E.M.; SEMENOVA, A.S.; RUDENSKAYA, G.N.; GROKHOVSKAYA, T.E.; LUNIN, V.V. Stabilization of scleral collagen by glycerol aldehyde cross-linking. **Biochim Biophys Acta**. 2008; 1780(5):764-72.

DAXER, A.; MISOF, K.; GRABNER, B.; ETTL, A.; FRATZL, P. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 39, n. 3, p. 644-648, 1998.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**[recurso eletrônico] – Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007. ISBN: 978-85-7430-702-2.

DINIZ C.M.G.P.; GADELHA F.M., MICHELACCI Y.; CAMPOS M. Effects of riboflavin and UV upon glycosaminoglycan synthesis in human keratoconic corneas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** April 2009, Vol.50, 5461

DOWNIE, L. E.; LINDSAY, R. G. Contact lens management of keratoconus. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 98, n. 4, p. 299-311, 2015.

EDWARDS, A. M. Structure and general properties of flavins. **Flavins and Flavoproteins: Methods and Protocols**, p. 3-13, 2014.

ERTAN, A.; COLIN, J. Intracorneal rings for keratoconus and keratectasia. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 33, n. 7, p. 1303-1314, 2007.

GARCIA, A, SPIM, J A, SANTOS, C. **Ensaio dos Materiais**, 2ª edição. LTC, 04/2012. [Minha Biblioteca].

GOMES, J. À. P. Superfície ocular: córnea, limbo, conjuntiva, filme lacrimal. In: (Ed.). **Superfície ocular: córnea, limbo, conjuntiva, filme lacrimal**. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan Editora, v.2 ed., 2011. p. ISBN 8570064713.

GREENSTEIN, S.A.; FRY, K.L.; BHATT, J.; HERSH, P.S. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. **J Cataract Refract Surg**, 2010.

GREENSTEIN SA, FRY KL, BHATT J, HERSH P. **Corneal Collagen Cross-Linking**. Slack Incorporated, 1st ed., 2013. ISBN-13: 978-1617110764, ISBN-10: 1617110760

HAFEZI, F.; RANDLEMAN, J. B. Corneal Cross-Linking, **Survey of ophthalmology**, 2013

HENEIN, C.; NANAVATY, M. A. Systematic review comparing penetrating keratoplasty and deep anterior lamellar keratoplasty for management of keratoconus. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 40, n. 1, p. 3-14, 2017.

HERSH, P.S.; STULTING, R.D.; MULLER, D.; DURRIE, D.S.; RAJPAL, R.K. United States Multicenter Clinical Trial of Corneal Collagen Crosslinking for Keratoconus Treatment. **Ophthalmology**, 2017.

HJORTDAL, J. O. Regional elastic performance of the human cornea. **Journal of Biomechanics**, New York, v. 29, n. 7, p. 931-942, 1996.

HJORTDAL, J. O. On the biomechanical properties of the cornea with particular reference to refractive surgery. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, Hvidovre, v. 76, n. S225, p. 1-23, 1998. Supplement.

ISO. **Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. ISO 10993-5 2009.

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON, D. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 1, p. 162-168, 2004.

KOLLER T, MROCHEN M, SEILER T. Complication and failure rates after corneal crosslinking. **J Cataract Refract Surg**. 2009 Aug;35(8):1358-62

KOTECHA, A. What biomechanical properties of the cornea are relevant for the clinician? **Survey of Ophthalmology**, Brookline, v. 52, n. 6, p. 109-114, 2007.

KRACHMER, J. H; PALAY, D. A. **Atlas da Córnea**. 2ed. São Paulo: Santos Editora, 2008

KUBRAK-KISZA, M.; KISZA, K.; MISIUK-HOJŁO, M. Corneal Cross-Linking: An Example of Photoinduced Polymerization as a Treatment Modality in Keratoconus. **Polimery w medycynie**, v. 46, n. 1, p. 89, 2016.

KUO, Y. C.; LIN, C. Y. Effect of genipin-crosslinked chitin-chitosan scaffolds with hydroxyapatite modifications on the cultivation of bovine knee chondrocytes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 95, n. 1, p. 132-144, 2006.

KURIAN, M.; NAGAPPA, S.; BHAGALI, R.; SHETTY, R.; SHETTY, B. K. Visual quality after posterior chamber phakic intraocular lens implantation in keratoconus. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 38, n. 6, p. 1050-1057, 2012.

LAMY, R.; NETTO, C. F.; PECEGO, M. G.; PECEGO, J. G. D. C.; PEREIRA, B. D. B.; MORAES JUNIOR, H. V. D.; DANTAS, A. M. Reticulação do colágeno corneano com radiação ultravioleta e riboflavina para tratamento do ceratocone: resultados preliminares de um estudo brasileiro. **Revista Brasileira Oftalmol**, v. 67, n. 5, p. 231-5, 2008.

LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C. N.; ALVES, M. R. **Doenças externas oculares e córnea**. Guanabara Koogan, 2013.

MANNHEIMER, WA. **Microscopia dos Materiais**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2002. ISBN 85-87922-54-8

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros** São Paulo: Edgar Blücher, 1999. ISBN 8521202474.

MASSEY, V.; BIOCHEM. **The chemical and biological versatility of riboflavin**. Portland Press Limited, 2000.283 ISBN 0300-5127.

MAZZOTTA, C.; BALESTRAZZI, A.; TRAVERSI, C.; Baiocchi, S.; Caporosso, T.; Tommasi, C.; Caporossi, A. **Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans cornea**. 26:390–397, 2007.

McCALL, A.S.; KRAFT, S.; EDELHAUSER, H.F.; KIDDER, G.W.; LUNDQUIST, R.R.; BRADSHAW, H. E.; DEDEIC, Z.; DIONNE, M. J.; CLEMENT, E. M.; CONRAD, G.W. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 1, p. 129-138, 2010.

MEDICAL: O que é Microscopia Ótica? Disponível em: [https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Optical-Microscopy-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Optical-Microscopy-(Portuguese).aspx). Acesso em: novembro de 2017.

MCGHEE, C. N.; KIM, B. Z.; WILSON, P. J. Contemporary treatment paradigms in keratoconus. **Cornea**, v. 34, p. S16-S23, 2015.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; PENG, C. K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 1985-2000, 2005.

MUZZARELLI, R. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1-9, 2009.

NETZSCH – Ensaio de dilatométrica. Disponível em: <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/pt/produtos-solucoes/dilatometria/>. Acesso: outubro de 2017.

NIU, Y.; XING, M.; ZHANG, J.; TIAN, B. Visible light activated sulfur and iron co-doped TiO<sub>2</sub> photocatalyst for the photocatalytic degradation of phenol. **Catalysis Today**, v. 201, p. 159-166, 2013.

ONUJI, Y.; BHARDWAJ, U.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D. J. **A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response**: SAGE Publications 2008.

PESCHKETRADE. PXL Platinum 330 - Medical Device. p. Disponível em: <<http://www.peschketrade.com/products/peschke-cxl/>>, 2017. Acesso em: maio de 2017.

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1352-1360, 2003.

PUCHE, R. S.; CARO, P. **Rare Earths-Cursos de Verano de El Escorial**. Madrid: Editorial Complutense, SA, 1998.

RABINOWITZ, Y. S.; GARBUS, J.; MCDONNELL, P. J. Computer-assisted corneal topography in family members of patients with keratoconus. **Archives of Ophthalmology**, v. 108, n. 3, p. 365-371, 1990.

RENHE, I. R. T. **Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (Genipaamericana L.)**. 2008. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-BA.

RODRIGUES, M. R.; NEUMANN, M. G. Fotopolimerização: princípios e métodos. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 13, n. 4, 2003.

SADIGH, A. L.; AALI, T. A.; SADEGHI, A. Outcome of intrastromal corneal ring segment relative to depth of insertion evaluated with scheimpflug image. **Journal of current ophthalmology**, v. 27, n. 1, p. 25-31, 2015.

SALOMÃO, M.Q.; CHAURASIA, S.S.; SINHA-ROY, A.; AMBRÓSIO JÚNIOR, R.; ESPOSITO, A.; SEPULVEDA, R.; AGRAWAL, V.; WILSON, S.E. < Cornealwoundhealingafterultraviolet-a/riboflavincollagencross-linking: a rabbitstudy. > Acesso em novembro 2017. **J RefractSurg**. 2011 Jun;27(6):401-7.

SAMPAIO, G.; FOOK, A.; FIDÉLES, T.; FURTADO, G.; FOOK, M. ARCABOUÇOS BIODEGRADÁVEIS DE QUITOSANA: EFEITO DA RETICULAÇÃO COM GENIPINA. In: COLAOB - Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal-RN, 2012.

SANTHIAGO, M. R. D. Cross-linking da córnea: protocolo padrão. **e-Oftalmo. CBO: Revista Digital de Oftalmologia**, v. 3, n. 1, 2017.

SEILER, T.; SPOERL, E.; HUHLE, M.; KAMOUNA, A. Conservative therapy of keratoconus by enhancement of collagen cross-links. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 37, n. 3, p. 4671-4671, 1996.

SEILER T, HAFEZI F. Cornealcross-linking-inducedstromaldemarcationline. **Cornea**, 25:1057–1059, 2006.

SILVA, A. J. D. J. **Efeito de etanol nas propriedades físico-mecânicas de poli(éter éter cetona) (PEEK)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006. ISBN: 85-221-0436-0.

SOUZA, A. C. S. D.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

SPOERL, E.; HUHLE, M.; SEILER, T. Induction of cross-links in corneal tissue. **Experimental eye research**, v. 66, n. 1, p. 97-103, 1998.

SPOERL, E.; MROCHEN, M.; SLINEY, D.; TROKEL, S.; SEILER, T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. **Cornea**, v. 26, n. 4, p. 385-389, 2007.

SUNG, H. W.; CHANG, Y.; CHIU, C. T.; CHEN, C. N.; LIANG, H. C. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 47, n. 2, p. 116-126, 1999.

TEIXEIRA, R. S. P. **Sistemas Poliméricos reticulados por radiação UV como modificadores das Propriedades Mecânicas das formações durante a perfuração de poços de petróleo**. 2013. Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

TER VEEN, H. R. J.; KIM, T.; WACHS, I. E.; BRONGERSMA, H. H. Applications of high sensitivity-low energy ion scattering (hs-leis) in heterogeneous catalysis. **Catalysis Today**, v. 140, n. 3, p. 197-201, 2009.

VILAR, M. Crosslinking do Colágeno. Curitiba-PR, p. Disponível em <http://marcelovilar.com.br/cross-linking-do-colageno-2/>, 2017. Acesso em: 08 de maio de 2017.

WOLLENSAK, G.; REDL, B. Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. **Cornea**, v. 27, n. 3, p. 353-356, 2008.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; SEILER, T. Riboflavin/ultraviolet-A–induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. **American journal of ophthalmology**, v. 135, n. 5, p. 620-627, 2003.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, F.; REBER, F.; SEILER, T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. **Eye**, v. 18, n. 7, p. 718-722, 2004.

WOLLENSAK G., AURICH H., PHAM D.-T., WIRBELAUER C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. **J Cataract Refract Surg**, 33, pp. 516-521, 2007.

WOLLENSAK J.; BUDDECKE E. Biochemical studies on human corneal proteoglycans-a comparison of normal and keratoconic eyes. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 228 (1990), pp. 517-523.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; SEILER, T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 29, n. 9, p. 1780-1785, 2003.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. R.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **International review of cytology**, v. 68, p. 251-306, 1980.

YOO, J. S.; KIM, Y. J.; KIM, S. H.; CHOI, S. H. Study on genipin: a new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. **The Korean journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 44, n. 3, p. 197, 2011.