



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

CROSS-LINKING CORNEANO EM CÃES

Aline Moreira Hupalo

Orientadora: Prof. Dra. Paula Diniz Galera

BRASÍLIA - DF

2021



ALINE MOREIRA HUPALO

II

CROSS-LINKING CORNEANO EM CÃES

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de Agronomia
e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientadora: Prof. Dra. Paula Diniz Galera

BRASÍLIA - DF

2021

Hupalo, Aline Moreira

Cross-Linking Corneano em Cães / Aline Moreira Hupalo; orientação de Paula Diniz Galera. – Brasília, 2021.

35 p.: il.

Trabalho de conclusão de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021

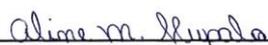
Nome do Autor: Aline Moreira Hupalo

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Cross-linking Corneano em Cães

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Formatado: Português (Brasil)



Aline Moreira Hupalo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: HUPALO, Aline Moreira

Título: Cross-linking Corneano em Cães

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 04/11/2021

Banca Examinadora:

Prof. Dr.ª Paula Diniz Galera
Instituição: FAV/UnB
Assinatura: <u><i>Paula Diniz Galera</i></u>
Julgamento: <u><i>Aprovada</i></u>
Dra. Ana Carolina V. Rodarte Almeida
Instituição:
Assinatura: <u><i>Ana Carolina Rodarte Almeida</i></u>
Julgamento: <u><i>Aprovada</i></u>
Dra. Daniela Nogueira Cremonini
Instituição:
Assinatura: <u><i>Daniela Cremonini</i></u>
Julgamento: <u><i>Aprovada</i></u>

DEDICATÓRIA

v

À minha família, amigos e aos animais
que passaram por minha vida, em
especial à Dama e Luly, cujas vidas e
partidas nortearam minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

A minha caminhada, embora ainda curta e singela, não teria dado frutos sem o auxílio de alguns amigos e familiares que se fizeram presentes em todos os momentos, bons e ruins. Mariana e Amanda, vocês foram minha base durante toda a graduação, nossa conexão se formou desde o primeiro dia do curso e se manteve até o final. As madrugadas de estudo regadas à pizza, risadas, sono e desespero nos fizeram chegar até aqui. Obrigada pela paciência, compreensão e amor que sempre me estenderam, vocês permaneceram ao meu lado quando mais precisei. Tenho certeza que, independente dos caminhos que escolhermos trilhar, sempre encontraremos apoio umas das outras. Amo vocês.

Letícia, minha amiga, parceira de resumo, já sinto uma imensa falta dos esquemas que criamos para passar pela graduação juntas. Sem seu suporte a vida universitária teria sido um tanto mais difícil e sem graça. Confesso que até nossos cochilos nos corredores da UnB farão falta. Tenho muito orgulho e admiração da profissional que você está se tornando. Obrigada por todas as vezes que me estendeu a mão, saiba que permanecerei sempre aqui, quando precisar.

Rafael, meu amigo, você foi o motivo de muitas risadas e momentos felizes, a dose de humor extremamente necessária, que tornou meus dias mais leves.

Isaque, sua ajuda foi fundamental para que eu entendesse o potencial que tenho, e que nossas aspirações e sonhos sempre estão mais próximos do que imaginamos, basta darmos o primeiro passo em direção a eles.

Tio Márcio, obrigada pelos conselhos, correções e esclarecimentos, que se mostraram de extrema importância na minha vida acadêmica. Aqui registro minha admiração pelo excelente padrinho e professor que o senhor é.

Professora Paula, obrigada pela compreensão e auxílio estendidos a mim durante a reta final da minha graduação. A senhora coloca em prática todas as virtudes de uma boa mentora.

À minha vó Regina, obrigada por ter me acolhido em sua casa quando precisei, a partida temporária de meus pais para outra cidade me deu de presente um período incrível ao lado da senhora. As noites de novela e tricô ficarão para sempre em minha memória, assim como todo amor e apoio que recebi da senhora e da Tia Patrícia.

Finalmente, aos meus pais: vocês são, e sempre foram, meu porto-seguro. Obrigada por terem me dado todas as ferramentas e oportunidades durante minha caminhada. Em vocês encontro segurança, conforto, compreensão, conselhos e puxões de orelha, quando necessários. Que sorte eu tive de ter nascido em um lar com tanto amor, onde nos esforçamos diariamente para conviver bem uns com os outros, apesar das discordâncias e desavenças. Sei como isso é raro nos dias de hoje. Nada é por acaso, e estamos exatamente onde devíamos estar, e com quem devíamos estar. Sei que seguiremos juntos. Espero um dia poder retribuir pelo menos um pouco de tudo que fizeram por mim. Vocês embarcaram nesse sonho junto comigo, compreenderam as dificuldades e me ajudaram a passar por elas. A vocês, minha eterna gratidão e amor incondicional.

Dama, Luly, Cristal, Dasha, Maya e Sol, são vocês que fazem da nossa casa um lar. Foram minha fuga e minha alegria até nos dias mais nublados. Vocês dão propósito à minha vida.

“O que nos torna verdadeiramente felizes é conhecer alguém que nos aceite como somos. Mesmo quando somos bem-sucedidos, podemos nos sentir inadequados e inseguros se formos levados a crer que há algo de errado conosco”.

(Hemin Sunim)

RESUMO

Esta revisão tem como objetivo reunir informações sobre a utilização do *Cross-Linking* em cães. Tal técnica é amplamente utilizada na medicina humana, porém apenas recentemente foi introduzida na medicina veterinária. Seu propósito envolve o fortalecimento da estrutura do colágeno do estroma corneano através da formação de *cross-links* entre tais moléculas, catalisado por uma reação oxidativa induzida pela luz UVA. As estabilidades mecânica e química provenientes de tal técnica podem ser benéficas para uma série de afecções oculares que afetam os cães. Edema causado por distrofia endotelial da córnea, ceratopatia bolhosa, ceratite ulcerativa e ceratomalácia infecciosa ou asséptica são afecções cuja técnica pode ser indicada. Porém, questões como variações do protocolo e transitoriedade nos resultados obtidos em relação à melhora na espessura e transparência da córnea precisam de maior elucidação.

Palavras-chave: córnea; ceratomalácia; cross-linking; ceratite ulcerativa, estroma corneano.

ABSTRACT

This review aims to gather information about the use of Cross-Linking in dogs. This technique is widely used in human medicine, but only recently introduced in veterinary medicine. Its purpose involves strengthening the collagen structure of the corneal stroma through the formation of cross-links between such molecules, catalyzed by an oxidative reaction induced by UVA light. The mechanical and chemical stability resulting from such technique can be beneficial for several eye diseases that affect dogs. Edema caused by corneal endothelial dystrophy, bullous keratopathy, ulcerative keratitis, and infectious or aseptic keratomalacia are conditions to which the technique may be indicated. However, issues such as divergence in protocols and temporary results obtained regarding the improvement in corneal thickness and transparency need further elucidation.

Keywords: cornea; keratomalacia; cross-linking; ulcerative keratitis; corneal stroma.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	ANATOMIA E FISIOLOGIA DA CÓRNEA	12
	2.1 Epitélio	13
	2.2 Estroma	13
	2.3 Membrana de Descemet e endotélio	14
3.	COLÁGENO: ORGANIZAÇÃO E REPARAÇÃO	15
4.	CROSS-LINKING CORNEANO (CXL)	16
	4.1 Definição.....	16
	4.2 Indicações.....	18
	4.3 Técnica	20
	4.4 Resultados.....	23
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6.	REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

O *cross-linking* é uma técnica muito versátil, com grande quantidade de indicações, pois é baseada em um princípio fisiológico, que ocorre naturalmente nos tecidos conjuntivos (RANDLEMAN et al., 2015). Tal técnica envolve a ocorrência de reações químicas que levam à formação de ligações entre proteínas ou outras moléculas (HOROVITZ et al., 2015) cujas aplicações são amplas na medicina humana, para fixação tecidual e enrijecimento de próteses de valvas cardíacas, por exemplo (SOMPURAM et al., 2004; BALGUID et al., 2007; MOHAMMADPOUR et al., 2017). Porém, foi apenas no final dos anos 90 que o *cross-linking* começou a ser estudado como uma alternativa para afecções corneanas (RANDLEMAN et al., 2015). A ideia do *cross-linking* corneano foi introduzida em 1998 na Alemanha por Spoerl et al., através de um trabalho com olhos de suínos (SPOERL et al., 1998; MOHAMMADPOUR et al., 2017). A observação de que *cross-links* proteicos formados naturalmente (e acelerados com a idade) fortalecem e enrijecem o estroma corneano levou à ideia de que *cross-links* induzidos artificialmente poderiam ter efeitos similares (MEEK & HAYES, 2013). O presente trabalho busca, de forma sucinta, reunir as principais informações sobre a aplicação desta técnica em cães, abordando o procedimento, indicações, segurança e resultados descritos.

2. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA CÓRNEA

O bulbo ocular compreende três túnicas, a fibrosa, a vascular e a nervosa, ou túnica externa, média e interna, respectivamente. A córnea e a esclera compõem a túnica fibrosa e, juntas, protegem as estruturas internas do olho e dão formato ao bulbo ocular (MAGGS, 2018).

A córnea, por sua vez, é uma estrutura transparente e avascular que desempenha papéis como a refração e transmissão da luz (para a formação da imagem na retina) além de suporte às estruturas oculares internas. Nos animais domésticos o diâmetro horizontal da córnea é maior que o diâmetro vertical, dando ao bulbo ocular um formato elíptico. Nos cães e gatos, porém, essa diferença é muito pequena e o olho tem um formato quase circular (SAMUELSON et al., 2013).

A córnea é composta de quatro camadas, sendo o epitélio a mais externa, seguido do estroma, membrana de Descemet e endotélio, internamente. Sua espessura varia de acordo com a espécie e a região da córnea (MAGGS, 2018).

A transparência é a característica mais marcante da córnea e fundamental para a visão, e resulta de uma superfície lisa, não queratinizada, avascular e não pigmentada, com densidade celular relativamente baixa, estado de relativa desidratação e das características e organização das fibras de colágeno (MAGGS, 2018).

2.1 Epitélio

O epitélio corneano é estratificado, escamoso, não queratinizado, cujo processo de regeneração é bastante eficiente (MAGGS, 2018). Há um ciclo constante de descamação das células superficiais e proliferação das células basais, cuja reposição ocorre por meio da migração de células tronco do limbo corneano, que é a zona de transição entre a córnea anterior e a parte posterior da esclera (GENEDELLA & FLECHNER, 1990; LEDBETTER & GILGER, 2013).

À medida que as células da membrana basal sofrem mitose, vão sendo forçadas em direção à camada mais externa, passando pela camada intermediária. Tais células passam por um processo de diferenciação celular até que se tornam as células escamosas da superfície (MAGGS, 2018). O epitélio é completamente renovado a cada duas semanas, aproximadamente (LEDBETTER & GILGER, 2013).

O epitélio é vastamente inervado, principalmente com receptores de dor, o que explica o fato das lesões corneanas superficiais serem mais dolorosas do que as lesões mais profundas (SAMUELSON, 2013).

2.2 Estroma

O estroma corneano é composto, principalmente, por colágeno, ceratócitos, água e glicosaminoglicanos, e representa 90% da espessura da córnea. A forma como as fibras de colágeno estão organizadas é um fator de extrema importância para a transparência da córnea. Lesões que resultam em um processo de

reparação e mudança dessa organização acabam formando um tecido cicatricial que compromete tal característica (MAGGS, 2018).

Há pelo menos cinco tipos de colágeno no estroma corneano, sendo o tipo I o mais comum. As fibras de colágeno se organizam paralelamente em lamelas; porém, entre elas, há outras fibras de colágeno em direções variadas. Além disso, também entre as lamelas há a presença de ceratócitos e leucócitos (SAMUELSON, 2013). A integração das fibras de colágeno com a substância fundamental da matriz extracelular, formada por proteoglicanos, permite a manutenção da organização do estroma corneano, de forma estratificada (HASSELL & BIRK, 2010; SAMUELSON, 2013).

O colágeno da estrutura em questão pode ser repostado por meio de dois mecanismos diferentes, que podem ocorrer juntos ou em separado. Lesões denominadas simples, que são superficiais, não contaminadas e agudas, comumente levam a um processo de reparação avascular, onde os ceratócitos são ativados e se tornam fibroblastos os quais, juntamente com a matriz extracelular, sintetizam colágeno. Porém, lesões classificadas como complicadas por serem profundas, infectadas e crônicas, normalmente desencadeiam um processo vascularizado de reparação, onde vasos adentram a córnea e levam a uma expressiva infiltração celular com posterior formação de tecido de granulação. Este último geralmente resulta em cicatrizes mais significativas (MAGGS, 2018).

2.3 Membrana de Descemet e Endotélio

Situada imediatamente depois do estroma e antes do endotélio, a membrana de Descemet é uma estrutura elástica secretada continuamente pelas células endoteliais, e que se espessa com o passar do tempo (MAGGS, 2018)

O endotélio é formado por uma única camada celular e, juntamente com o epitélio, é responsável pelo estado de deturgescência da córnea. A córnea é uma estrutura relativamente desidratada, quando comparada a outros tecidos. Esse efluxo de água ocorre, principalmente, devido ao fato de as células do endotélio e epitélio ativamente bombearem íons do estroma corneano para o humor aquoso, fazendo com que haja um movimento de água de forma a seguir tais íons (SAMUELSON, 2013; MAGGS, 2018).

As células endoteliais da córnea canina, cujo formato é hexagonal, tendem a diminuir em quantidade e aumentar em tamanho com o passar do tempo (GWIN et al., 1982; LEDBETTER & GILGER, 2013). A irregularidade no tamanho e na morfologia de tais células, denominados polimegatismo e pleomorfismo, respectivamente (MELO, 2007), costumam aumentar à medida que o cão envelhece e conseqüentemente ocorre a diminuição da densidade das células endoteliais (MCCAREY et al, 2008; DONALDSON & HARTLEY, 2021). Tais alterações podem estar relacionadas também a doenças como a diabetes (YEE et al., 1985; MATSUDA et al., 1990 NEUENSCHWANDER et al., 1995; LEE et al., 2006; DONALDSON & HARTLEY, 2021) ou a injúrias ao endotélio corneano, sugerindo uma limitada capacidade mitótica (GWIN et al., 1983; LEDBETTER & GILGER et al., 2013).

Frente à perda de células endoteliais, as células endoteliais vizinhas buscam cobrir a área até certo limite e, quando há uma diminuição muito grande da densidade de tais células, o edema corneano pode ocorrer (MAGGS, 2018).

3. COLÁGENO

A estrutura e organização das fibras de colágeno presentes no estroma corneano são fundamentais para que a córnea desempenhe suas principais funções pois são, em parte, responsáveis por características como a resistência e transparência da córnea. A força biomecânica da córnea resulta da organização das fibras e lamelas de colágeno no estroma, pois tal organização confere resistência ao estroma corneano. Porém, as características dessa complexa integração ainda são pouco compreendidas (LEONARD et al., 2019). Os *cross-links* de colágeno natural são ligações covalentes entre as cadeias laterais de amino das fibras de colágeno e são fundamentais para assegurar a estabilidade mecânica da córnea (SPIESS et al., 2014). Tais *cross-links* desempenham um papel de estabilização mecânica da córnea e impedem que as fibrilas de colágeno deslizem na curvatura da mesma (BECKMAN et al., 2019).

Ainda em relação à rigidez da córnea, o estroma anterior é mais rígido que o posterior, provavelmente porque há uma diferença na intensidade em que as fibras de colágeno se entrelaçam nessas duas camadas. O estroma anterior é altamente entrelaçado, enquanto há uma organização mais paralela das fibras no

estroma posterior. Um maior entrelaçamento está relacionado a uma maior rigidez, fator fundamental para a manutenção de duas importantes características da córnea: proteção e refração da luz. É necessário que a curvatura da córnea seja mantida para que haja essa última (LEONARD et al., 2019).

A microscopia eletrônica não conseguiu delimitar o final das fibras de colágeno presentes no estroma, o que sugere que tais fibras, cujo diâmetro é altamente uniforme, atravessam toda a córnea antes de fundirem-se com as fibras de colágeno do limbo corneano ou continuar pela esclera. A organização do colágeno no estroma corneano é altamente precisa e, provavelmente, advém de uma complexa interação entre os proteoglicanos e as fibras de colágeno tipo I, VI e XII (MEEK & BOOTE, 2014).

Como dito anteriormente, as fibras de colágeno tipo I são as que estão presentes em maior quantidade no estroma, formando fibrilas pequena, estriadas e de tamanho uniforme. Quanto aos outros tipos, o VI está associado com a matriz interfibrilar e junto dos ceratócitos, formando uma espécie de rede ao redor das fibrilas. Evidência em ratos sugere que tal tipo está conectado ao tipo I através de glicosaminoglicanos. O tipo VI parece desempenhar alguma função em relação a interação das células com a matriz, o que pode ser importante para o processo de desenvolvimento e reparação dessa complexa organização do estroma (DOANE et al., 1992; SAMUELSON, 2013). Os tipos III e XII parecem ser formas em desenvolvimento, cuja importância no reparo de feridas ainda é desconhecida (SAMUELSON, 2013), enquanto o V está junto das fibrilas de colágeno tipo I e parece ser um fator que contribui para o diâmetro pequeno e uniforme das fibrilas estriadas (LINSENMAYER et al., 1993; SAMUELSON, 2013).

4. CROSS-LINKING (CXL) CORNEANO

4.1 Definição

O termo “*cross-linking*”, por definição, descreve reações químicas que formam ligações covalentes entre duas ou mais moléculas (RUBINFELD et al., 2019). Usada amplamente na medicina humana com várias aplicações, inclusive

para fixação de tecidos e enrijecimento de prótese valvar cardíaca (SOMPURAM et al., 2004; BALGUID et al., 2007; MOHAMMADPOUR et al., 2017), tal técnica visa a formação de ligações cruzadas (*cross-links*) intermoleculares entre os monômeros de colágeno da córnea, para que haja um fortalecimento da estrutura do mesmo (MOHAMMADPOUR et al., 2017). Em humanos, o *cross-linking* (CXL) pode ocorrer naturalmente com o envelhecimento da córnea ou frente a determinadas doenças, como a diabetes ou cicatrizes (MOHAMMADPOUR et al., 2017; BECKMAN et al., 2019). O CXL visa aumentar a estabilidade mecânica e química da córnea, aumentando a densidade do colágeno presente no estroma e a resistência à digestão enzimática e reduzindo o inchaço da fração hidrofílica rica em glicosaminoglicanos da matriz corneana (WOLLENSAK et al., 2003; SPOERL et al., 2004; SPOERL et al., 2007; SONDERGAARD et al., 2013; KIM et al., 2019).

Tais ligações podem ocorrer de três formas diferentes: através de reações enzimáticas, oxidativas ou glicação. No caso do CXL utiliza-se uma reação oxidativa, onde a luz UVA forma espécies reativas de oxigênio (ERO) que, por sua vez, transformam os monômeros de colágeno em polímeros interligados (MOHAMMADPOUR et al., 2017). Portanto, a reação fotoquímica induzida em tal técnica leva à formação de espécies reativas de oxigênio, que são capazes de modificar moléculas com as quais tem contato (DA SILVA & GONÇALVES, 2010) e formar, assim, ligações covalentes entre as fibras de colágeno por desaminação oxidativa (FRANZCO, 2010).

A riboflavina, também conhecida como vitamina B12, é o fotoindutor comumente utilizado em tal técnica, pois é fotossensível (sensível a um amplo intervalo do espectro de luz) e termoestável. Além disso, sua eventual absorção sistêmica é segura. A riboflavina absorve a luz UVA e passa para um estado excitado, onde dois tipos de reação podem ocorrer: a reação aeróbica tipo II e anaeróbica tipo I. Ambas as reações irão produzir as ERO, formando ligações covalentes entre as moléculas de colágeno (RANDLEMAN et al., 2015). O tipo I ocorre em condições de baixo oxigênio, onde o peróxido de hidrogênio tóxico é gerado como produto final, enquanto o tipo II ocorre em condições aeróbicas e forma oxigênio singlete, menos tóxico. Esse papel fundamental do oxigênio foi proposto, inicialmente, por MCCALL et al. (2010), onde teorizaram que o CXL efetivo estava diretamente relacionado à presença do oxigênio singlete (MCCALL et al., 2010; RUBINFELD et al., 2019). Portanto, é fundamental a presença de

oxigênio para que tal processo ocorra (FRANZCO, 2010; RANDLEMAN et al., 2015). O aumento na concentração de riboflavina não necessariamente aumenta a quantidade de radicais livres produzidos, visto que há um estado de saturação a ser alcançado (BECKMAN et al., 2019).

4.2 Indicações

Desenvolvida inicialmente para impedir ou retardar a progressão de ectasias corneanas em humanos, como o ceratocone (RANDLEMAN et al., 2015; MOHAMMADPOUR et al., 2017), o CXL tem o intuito de aumentar a estabilidade e diminuir a biodegradação da matriz de colágeno da córnea frente a afecções ectásicas primárias ou secundárias que acometem tal estrutura, principalmente o ceratocone em humanos (WOLLENSAK et al., 2003; POT et al., 2014). Porém, determinados efeitos do CXL - como o aumento da rigidez corneana, diminuição da susceptibilidade à colagenase e a toxicidade induzida pelas ERO aos microrganismos – levaram à expansão da aplicação de tal técnica, como nos casos de ceratomalácia (POT et al., 2015; KIM et al., 2019).

Edema causado por distrofia endotelial da córnea, ceratopatia bolhosa, ceratite ulcerativa e ceratomalácia infecciosa ou asséptica são afecções relatadas em aplicação da técnica em animais (SPIESS et al., 2014; POT et al., 2015; FAMOSE, 2016; EDMAN et al., 2019; KIM et al., 2019). Tal procedimento foi descrito principalmente como um possível adjuvante aos tratamentos comumente utilizados para tais afecções, de forma a tentar evitar, inclusive, cirurgias mais invasivas (SPIESS et al., 2014; POT et al., 2014; FAMOSE et al., 2016; EDMAN et al., 2019).

A distrofia da córnea é qualquer afecção primária, bilateral e hereditária sem caráter inflamatório ou de doença sistêmica (CRISPIN, 1988; COOLEY & DICE, 1990; LEDBETTER & GILGER, 2013), que pode afetar o epitélio, endotélio ou estroma (LEDBETTER & GILGER, 2013). A distrofia endotelial da córnea envolve a presença de células endoteliais anormais que levam a um edema corneano espontâneo e progressivo, manifestando-se por espessamento e opacidade da córnea, ceratopatia bolhosa e cicatriz subepitelial (LEDBETTER & GILGER, 2013). A ceratopatia bolhosa caracteriza-se pela presença de bolsas preenchidas por

líquido no epitélio ou abaixo dele, podendo romper espontaneamente e levar a uma erosão ou ulceração corneana (KIM et al., 2019).

A ceratite ulcerativa, ou ulceração da córnea, é uma das afecções oculares mais comum em cães. Ocorre quando há a ruptura do epitélio corneano com consequente exposição do estroma. Tais lesões podem ser classificadas de acordo com sua profundidade e causa (LEDBETTER & GILGER, 2013). Em animais, ela está associada com uma maior atividade proteolítica no filme lacrimal, atividade esta que diminui à medida que há regressão da úlcera (OLLIVIER et al., 2007).

A ceratomalácia é resultado da colagenólise causada pela liberação da enzima colagenase por microrganismos, leucócitos e/ou células do epitélio corneano. Tal afecção leva a uma perda da rigidez e da estrutura do colágeno corneano, levando a uma flacidez que pode resultar no extravasamento e perda do estroma pela região ventral da córnea, podendo evoluir para uma ulceração profunda ou descemetocele (MAGGS, 2018). Há inibidores naturais da proteinase presentes no filme lacrimal pré-corneano e córnea, que previnem a degradação excessiva de tecido saudável. As desordens acontecem quando há um desequilíbrio entre as enzimas proteolíticas e os inibidores de proteinase, fazendo com que haja maior atividade proteolítica, levando à degradação patológica do colágeno e proteoglicanos presentes no estroma corneano. Na ceratomalácia, a quantidade de proteinases se mantém elevada, levando à rápida progressão da úlcera (OLLIVIER et al., 2007).

Em relação a ceratomalácia infecciosa, vários relatórios de estudos *in vitro* confirmaram o efeito antibacteriano do CXL em diferentes patógenos, incluindo bactérias com resistência a antibióticos (MARTINS et al., 2008; SCHRIER et al., 2009; MAKDOUMI et al., 2010; MAKDOUMI et al., 2016; EDMAN et al., 2019). Estudos clínicos em humanos demonstraram que ceratites infecciosas e ulcerativas podem ser tratadas com sucesso por tal técnica, sem o complemento da antibioticoterapia (MAKDOUMI et al., 2012; EDMAN et al., 2019).

Para melhor distinção do uso do CXL para o tratamento de ceratites infecciosas em relação ao uso para combater o desenvolvimento de ectasias corneanas, passou a utilizar-se, para o primeiro caso, o termo "PACK-CXL" (*photoactivated chromophore for infectious keratitis*). Tal termo foi criado no 9º congresso de cross-linking em Dublin, Irlanda, em 2013 (DALIA et al., 2014). O PACK-CXL detém o derretimento da córnea e melhora a ceratite infecciosa por pelo

menos dois mecanismos que provavelmente funcionam em sinergismo: através da resistência enzimática fornecida por tal técnica, visto que os patógenos relacionados à ceratomalácia podem agir através da digestão enzimática da córnea (HOBDEN, 2002; SPOERL et al., 2004; MATSUMOTO, 2004; SAID et al., 2014); e devido à maior rigidez conferida ao estroma, que também pode impedir a penetração de toxinas liberadas pelos microrganismos patogênicos. Além disso, a apoptose induzida pelo PACK-CXL não apenas elimina os ceratócitos mas também, provavelmente, os microrganismos patogênicos, o que retarda o processo infeccioso, tendo um efeito bactericida (SALOMAO et al., 2011; SAID et al., 2014).

Mais recentemente, IOMDINA et al. (2019) relatam o uso do CXL modificado para o tratamento de estafiloma corneano e ceratoconjuntivite seca e autoimune.

4.3 Técnica

4.3.1 Anestesia e preparo

É recomendado que tal procedimento seja realizado com o animal sob anestesia geral, assim como anestesia tópica. O olho é mantido aberto com o auxílio de um blefarostato (SPIES et al., 2014; FAMOSE, 2016; KIM et al., 2019). IOMDINA et al. (2019) relataram a realização do CXL modificado sem necessidade de sedação e imobilização do animal, apenas com colírio anestésico.

4.3.2 Ceratectomia superficial

É necessária uma adequada concentração de riboflavina na córnea para que o CXL seja efetivo. Como o epitélio da córnea não permite a passagem de moléculas maiores, protocolos padrões requerem o debridamento do epitélio, a fim de favorecer a absorção de tal substância (RANDLEMAN et al., 2015). Segundo AYTEKIN & PEHLIVAN (2021), a riboflavina não passa pelo epitélio corneano saudável - devido ao seu alto peso molecular e propriedades físico-químicas e, para isso, o epitélio necessita ser removido para que haja um aumento na passagem de tais moléculas.

A ceratectomia superficial (CS) é comumente realizada com instrumentos microcirúrgicos tradicionais, porém, pode-se utilizar laser de dióxido de carbono (LEDBETTER & GILGER, 2013). Parte do estroma lesionado também pode ser retirado. KIM et al. (2019), determinaram a quantidade de estroma a ser removido juntamente com o epitélio, por meio da tomografia de coerência óptica (OCT), preconizando remover a região edematosa mantendo uma espessura corneana de pelo menos 600 µm, com auxílio de bisturi de diamante e pinça colibri (KIM et al., 2019).

FAMOSE (2016), por sua vez, debridou a superfície corneana utilizando uma esponja de microcirurgia. Esse debridamento comedido, chamado de "*window technique*", permite que haja uma adequada absorção da riboflavina sem atrasar a cicatrização epitelial (ROSETTA et al., 2013; FAMOSE, 2016). POT et al. (2014) realizaram a remoção do epitélio com um swab com ponta de algodão, e utilizaram a mesma ferramenta para avaliar de forma tátil a estabilidade do estroma.

É importante garantir que, mesmo após a ceratectomia superficial, haja uma espessura corneana de pelo menos 400 µm para que o endotélio corneano, células do limbo corneano, lente e retina não sejam prejudicados pela luz UVA. Há, inclusive, a possibilidade de utilizar solução de riboflavina hiposmolar para entumecer a córnea após o debridamento do epitélio (RANDLEMAN et al., 2015; HOROVITZ et al., 2015). KIM et al. (2019) também cita a remoção de parte do estroma anteriormente à realização da técnica, cuja quantidade a ser retirada é determinada através da tomografia de coerência óptica, buscando remover a maior parte da porção afetada de tal camada.

4.3.3 CXL

O CXL é realizado imediatamente após a ceratectomia superficial. O protocolo padrão do CXL envolve a administração de gotas da solução de riboflavina isosmolar 0,1% a cada dois a cinco minutos durante 30 minutos, com posterior confirmação de sua penetração através da visualização dela na câmara anterior, pela lâmpada de fenda. Depois, realiza-se irradiação de luz UVA de comprimento de 365 nm e irradiância de 3 mW/cm² durante 30 minutos. Durante tal irradiação, mantém-se a aplicação da riboflavina isosmolar 0,1% a cada dois a cinco minutos. (SPIESS et al., 2014; POT et al., 2014; HOROVITZ et al., 2015; AYTEKIN

& PEHLIVAN, 2021). É possível regular o diâmetro do feixe da luz UVA, utilizando feixes de 9, 10 ou 11 mm, dependendo da área afetada e com cuidado para que não haja incidência da luz UVA sobre o limbo corneano, visto que ele contém as células-tronco fundamentais para a reconstituição da camada epitelial da córnea (SPIESS et al., 2014; POT et al., 2014; KIM et al., 2019). Apesar de estudos clínicos prospectivos em humanos não identificarem dano ao limbo corneano, há a possibilidade, demonstrada por estudo *in vitro*, de que a exposição de tal estrutura à riboflavina e luz UVA possa ocasionar citotoxicidade e redução da expansão celular. Portanto, no homem, recomenda-se inclusive a utilização de anéis de polimetacrilato ou outras formas de proteção do limbo corneano durante a técnica (MAZZOTA et al., 2008; THORSRUD et al., 2012; MEEK & HAYES, 2013). O procedimento convencional de CXL também é conhecido como “Dresden CXL” (HOROVITZ et al., 2015; AYTEKIN & PEHLIVAN, 2021).

Tal protocolo pode apresentar algumas variações. FAMOSE et al. (2016) - após limpeza das margens das lesões, remoção de debris da superfície corneal, realização da ceratectomia superficial e aplicação da solução de riboflavina isomolar 0,1%, de forma semelhante ao processo do protocolo padrão - utilizaram a luz UVA em um comprimento de 370 nm com uma irradiância de 30 mW/cm² durante três minutos, sendo que após dois minutos do início da radiação administra-se uma gota da riboflavina isomolar. Tal variação da técnica é denominada “*cross-linking* acelerado” (FAMOSE et al., 2016). No final obtém-se a mesma quantidade de energia total, de 5.4 J/cm² (HOROVITZ et al., 2015). O CXL padrão e o acelerado parecem promover resultados comparáveis, porém mais estudos, com maior tempo de acompanhamento, são necessários para avaliar o resultado dos diferentes protocolos do CXL acelerado em relação ao CXL padrão (SHAJARI et al., 2019)

Há também algumas variações da técnica onde não é realizada a ceratectomia superficial, são elas: CXL transepitelial e “*stromal pocket*”. Tais técnicas buscam diminuir o desconforto do paciente e possíveis complicações causadas pela retirada da camada epitelial central da córnea (HOROVITZ et al., 2015). A abordagem transepitelial consiste na utilização de métodos que enfraquecem a barreira do epitélio corneano, aumentando a penetração da riboflavina no estroma, por exemplo, o uso de substâncias como a tetracaína ou o ácido benzalcônio-etilenodiaminotetracético (BKC-EDTA) (ARMSTRONG et al., 2013; HOROVITZ et al., 2015). Não se sabe ao certo se tal técnica apresenta uma

eficácia a longo termo, mas estudos reportam que ela aparentemente interrompe o progresso do ceratocone em humanos, porém de maneira mais discreta que o CXL convencional (HOROVITZ et al., 2015). Há também a técnica do “*stromal pocket*”, também chamada de “aplicação direta”, que consiste na criação de um “bolso” no estroma, seguido da aplicação de riboflavina diretamente no mesmo. Atualmente, tal técnica tem sido feita de forma bastante precisa com a utilização do laser *femtosecond*, sendo uma técnica promissora que necessita de mais investigação para adentrar a rotina do CXL (HOROVITZ et al., 2015).

A fluoresceína pode competir com a riboflavina pela absorção da luz UVA durante o procedimento, por isso é importante que haja um intervalo de pelo menos 24 horas entre a realização do teste da fluoresceína e o CXL (FAMOSE et al., 2016). Após a técnica, há o relato principalmente da utilização de colírios antibióticos e/ou antibióticos orais (FAMOSE, 2016; KIM et al., 2018).

4.4 Resultados

Em seu estudo clínico sobre a utilização da ceratectomia superficial e CXL no tratamento da distrofia corneana em cães, KIM et al. (2019) relataram redução significativa da espessura corneana e aumento da transparência imediatamente após o procedimento, em todos os casos (quatro olhos de quatro cães). Porém, à medida que a espessura aumentou no período pós-operatório, houve também um aumento da opacidade corneana. Ao final, dois casos obtiveram uma melhora na transparência quando comparados os valores da última avaliação em relação aos valores pré-operatórios, enquanto outros dois retornaram ao mesmo nível de transparência anterior ao procedimento. KIM et al. (2019) concluíram que tal procedimento reduz a espessura corneana, porém com resultados transitórios em relação a transparência da córnea (fig. 1). Quanto à espessura, apesar de voltar a aumentar depois da redução imediata após a técnica, ela se manteve significativamente abaixo dos valores iniciais em todos os casos, até a última avaliação (cujo intervalo de tempo varia de 3 semanas até 2 meses do pós-operatório, dependendo do animal).

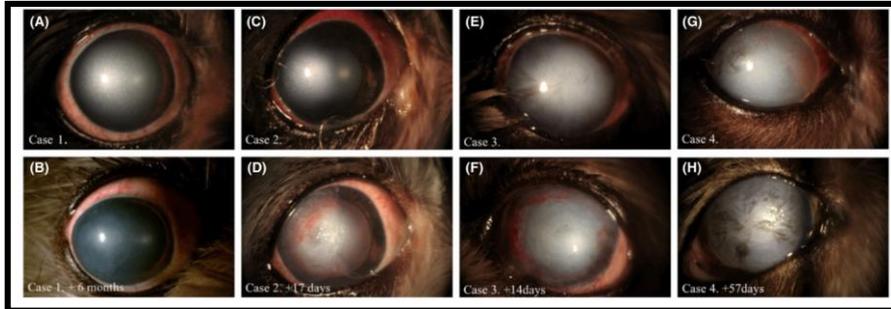


FIGURA 1 – Fotos dos olhos antes e após a SK e CXL. (KIM et al., 2019). A: caso 1 antes do procedimento; B: caso 1 após seis meses do procedimento; C: caso 2 antes do procedimento; D: caso 2 após 17 dias do procedimento; E: caso 3 antes do procedimento; F: caso 3 com 14 dias após o procedimento; G: caso 4; H: caso 4 com 57 dias após o procedimento.

POT et al. (2014) identificaram a mesma característica transitória dos efeitos do CXL em seu relato de caso, em que tal técnica foi utilizada para tratar dois cães com ceratopatia bolhosa. O CXL resultou em um aumento subjetivo da transparência corneana no primeiro caso e em um afinamento objetivo (porém clinicamente insignificante) da córnea no segundo caso. Ambos os efeitos foram temporários e, no segundo caso, os valores da espessura corneana obtidos no 4º mês pós-procedimento estavam maiores do que os valores obtidos imediatamente antes da realização da técnica, apesar da queda após o procedimento, mostrando seu caráter transitório. Nenhuma explicação comprovada em relação a temporariedade do afinamento da córnea após o CXL foi proposta na literatura científica (POT et al., 2014).

FAMOSE et al. (2016) utilizaram o CXL acelerado no tratamento de ceratopatia bolhosa em oito cães (dez olhos). Todos os animais apresentavam ulcerações epiteliais superficiais crônicas na córnea, além de edema no estroma, e apresentaram cicatrização epitelial total no sétimo dia em todos os casos, sem recorrência durante seis meses de avaliação, havendo também a resolução da dor. Houve redução do edema corneano durante os primeiros três meses após a técnica, sendo que voltou a aumentar e retornou a valores bem próximos do pré-operatório no sexto mês. Além disso, a redução clinicamente significativa do edema foi obtida em apenas seis dos dez olhos envolvidos, sendo que nenhum alcançou

o resultado de uma córnea normal. Nos homens, o achatamento observado pelo ceratômetro foi mantido durante um período de acompanhamento de dois anos após o procedimento (WOLLENSAK et al., 2003)

Verificou-se que o CXL foi capaz de melhorar significativamente a transparência e espessura corneana e a dor ocular, porém tais efeitos não pareceram ser duradouros (GHANEM et al., 2010; GHARAEI et al., 2011; EHLERS & HJORTDAL, 2008; KIM et al., 2019). Tais achados indicam que as ligações covalentes formadas não são suficientes para impedir o acúmulo de líquido no estroma (KIM et al., 2019).

LUKASHINA et al. (2021) realizaram um estudo clínico com cães e gatos acometidos de úlcera corneana séptica grave. Onde foi utilizado o CXL modificado e observou-se aumento na densidade das fibras de colágeno nas camadas anteriores do estroma, sem sinal de edema. Concluiu-se que tal método apresentou uma alta eficiência. Em comparação com o CXL convencional, concluiu-se que o método modificado minimiza o risco de complicações e permite a redução do tempo de regeneração e período de tratamento do paciente.

IOMDINA et al. (2019), em um estudo com cães, gatos e cavalos que apresentavam úlcera, estafiloma corneano e ceratoconjuntivite seca e autoimune, relataram que o CXL demonstrou excelente efeito terapêutico. Nas lesões ulcerativas da córnea observou-se interrupção no processo inflamatório, promoção de epitelização corneana, redução significativa do diâmetro das lesões com suavização de suas bordas, redução de descarga purulenta e produção lacrimal normal. Nos casos de estafiloma e ceratoconjuntivite foi possível restaurar a transparência, brilho e esfericidade da córnea, melhorando a função visual dos animais em questão. Ainda sobre este relato, é importante ressaltar que as melhoras foram observadas através da utilização de CXL modificado, onde não foi realizada a ceratectomia superficial, visto que a integridade do epitélio já estava comprometida e foram realizadas mais de uma sessão de CXL acelerado, com maior exposição à luz UVA por um menor período. Além disso, antibióticos foram utilizados concomitantemente.

JABBARVAND et al. (2021) utilizaram um método denominado "*Corneal Visualization Scheimpflug Technology*" (Corvis ST) para avaliação do resultado do CXL em pacientes humanos com ceratocone. Esse aparelho usa imagens em ultra-alta-velocidade para monitorar a resposta da córnea frente a deformação por um

jato de ar. A avaliação biomecânica da córnea com tal aparelho indicou mudanças estatísticas significativas seis meses após o procedimento, indicando uma córnea mais rígida.

Essa transitoriedade dos efeitos parece não ser tão evidente no homem. Uma enorme quantidade de ensaios clínicos foi realizada em humanos, e quase todos demonstraram que o CXL é um método eficaz para impedir a progressão e até mesmo auxiliar na regressão do ceratocone (MEEK & HAYES, 2013)

Embora a transitoriedade dos efeitos não seja evidente em humanos, pacientes pediátricos curiosamente tendem a apresentar uma retomada na progressão do ceratocone com o passar do tempo, após o procedimento. Em um estudo retrospectivo realizado por CHATZIS et al (2012) e citado por MOHAMMADPOUR et al. (2017), observou-se esse efeito transitório do CXL em pacientes pediátricos. O mesmo foi observado por RANDLEMAN et al. (2015).

Segundo BECKMAN et al. (2019), em humanos, a recuperação completa após o procedimento pode levar até um ano. Muitos pacientes podem experimentar, inicialmente, piora na visão até um mês após o procedimento, seguido da recuperação gradual. Essa recuperação prolongada é devido a resolução da opacidade da córnea e pelo tempo necessário para a remodelação epitelial compensatória da superfície corneana (após a ceratectomia). Ainda segundo BECKMAN et al., (2019), o evento adverso mais comum após a realização do procedimento é a opacidade corneana, que atinge seu pico no período de um mês após o procedimento e depois tende a se resolver gradualmente. Ceratite infecciosa também é relatada em uma taxa de 0,3%. Essa baixa incidência pode estar relacionada com a capacidade antimicrobiana da técnica.

Alguns casos de sequestro de córnea após a realização do CXL em gatos com ceratomalácia foram relatados. Tal complicação pode ser devido a um maior volume de apoptose em ceratócitos, causada pela técnica em questão ou associada afecção em questão (SPIESS et al., 2013, POT et al., 2014)

O CXL convencional é, atualmente, o método mais confiável e utilizado, porém, devido as complicações que a ceratectomia pode causar e a longa duração do procedimento, um novo e confiável método é necessário. Para tanto, evoluções deste estão sendo estudadas, como as que não envolvem a retirada do epitélio corneano, o CXL acelerado e o CXL feito por iontoforese (AYTEIN & PEHLIVAN, 2021).

O relativo baixo custo do tratamento e a facilidade de desempenhar o procedimento são fatores que o deixa mais acessível ao mercado veterinário. Porém, o CXL pode causar prejuízos quando utilizado em situações e formas inadequadas e, por isso, mais estudos comparando as taxas de eficácia e complicações deste em relação as terapias medicamentosas tradicionais são necessárias (SPIESS et al., 2014). De acordo com KIM et al. (2019), a eficácia da técnica para a ceratopatia bolhosa em cães pode aumentar no futuro, com a otimização dos protocolos para se adequar as diferentes indicações e espécies. Ainda seguindo o exemplo da ceratopatia bolhosa, POT et al. (2015) dizem que os protocolos provavelmente necessitarão de adaptações em relação a intensidade do CXL e a concentração de riboflavina, para que seja mais adequada a córnea canina e o tratamento seja otimizado.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do propósito inicial de impedir ou retardar a progressão de ectasias corneanas em humanos, alguns efeitos benéficos do CXL, como o aumento da rigidez corneana, diminuição dos efeitos da colagenase e ação antimicrobiana, fizeram com que a técnica incorporasse maior quantidade de indicações. Afecções oculares comuns em cães, como a ceratopatia bolhosa, distrofias endoteliais da córnea, ceratomalácia infecciosa ou asséptica e a ceratite ulcerativa são doenças para as quais há relatos e indicação do CXL em animais.

Em humanos adultos, a presente técnica parece ter um efeito positivo e duradouro, sendo capaz de retardar a progressão do ceratocone. Em contrapartida, parece ter um efeito transitório e/ou pouco significativo nos cães, sendo indicado como uma terapia coadjuvante ou simplesmente não indicada. O efeito temporário relatado nos cães também é relatado em pacientes pediátricos submetidos à técnica na medicina humana.

Apesar de ser um procedimento com uma relativa facilidade de implantação na medicina veterinária, pela maior acessibilidade técnica e financeira, ainda há necessidade de mais estudos e ensaios clínicos que relatem as complicações e benefícios da técnica.

Presume-se que a adaptação do protocolo, inicialmente desenvolvido para o ceratocone em humanos, para as novas indicações e demais espécies otimize os benefícios trazidos por ela. Portanto, a implantação recente do CXL na veterinária limita sua utilização, dependendo de maiores estudos para que o potencial total de tal técnica consiga ser obtido.

6. REFERÊNCIAS

1. ARMSTRONG, Brian K.; LIN, Michelle P.; FORD, Matthew R.; *et al.* Biological and Biomechanical Responses to Traditional Epithelium-Off and Transepithelial Riboflavin-UVA CXL Techniques in Rabbits. **Journal of Refractive Surgery**, v. 29, n. 5, p. 332–341, 2013.
2. AYTEKIN, Eren; PEHLIVAN, Sibel Bozdağ. Corneal cross-linking approaches on keratoconus treatment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102524, 2021.
3. BALGUID, Angelique; RUBBENS, Mirjam P.; MOL, Anita; *et al.* The Role of Collagen Cross-Links in Biomechanical Behavior of Human Aortic Heart Valve Leaflets—Relevance for Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 7, p. 1501–1511, 2007.
4. BECKMAN, Kenneth A.; GUPTA, Preeya K.; FARID, Marjan; *et al.* Corneal crosslinking: Current protocols and clinical approach. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 45, n. 11, p. 1670–1679, 2019.
5. BLATT, H. L.; RAO, G. N.; AQUAVELLA, J. V. Endothelial cell density in relation to morphology. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 18, n. 8, p. 856–859, 1979.
6. CARLSON, K.H.; BOURNE, W.M.; MCLAREN, J.W.; *et al.* Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. **Experimental Eye Research**, v. 47, n. 1, p. 27–41, 1988.
7. CENEDELLA, R. J.; FLESCHNER, C. R. Kinetics of corneal epithelium turnover in vivo. Studies of lovastatin. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 31, n. 10, p. 1957–1962, 1990.
8. CHATZIS, Nico; HAFEZI, Farhad. Progression of Keratoconus and Efficacy of Corneal Collagen Cross-linking in Children and Adolescents. **Journal of Refractive Surgery**, v. 28, n. 11, p. 753–758, 2012.
9. COOLEY, Pennie L.; DICE, Paul F. Corneal Dystrophy in the Dog and Cat. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 681–692, 1990.
10. DOANE, Kathleen J.; YANG, George; BIRK, David E. Corneal cell-matrix interactions: Type VI Collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 200, n. 2, p. 490–499, 1992.

11. DONALDSON , David; HARTLEY , Claudia . Ocular Imaging. In: GELLAT, Kirk N. (Org.). *Veterinary Ophthalmology*. Sixth. [s.l.]: Wiley-Blackwell , 2021, v. 1.
12. EHLERS, Niels; HJORTDAL, Jesper. Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. **Acta Ophthalmologica**, v. 86, n. 5, p. 549–551, 2008.
13. FAMOSE, Frank. Evaluation of accelerated corneal collagen cross-linking for the treatment of bullous keratopathy in eight dogs (10 eyes). **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, n. 3, p. 250–255, 2016.
14. FRANZCO, Grant R S. Collagen cross-linking: a new treatment paradigm in corneal disease - a review: Corneal collagen cross-linking. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 38, n. 2, p. 141–153, 2010.
15. GHANEM, Ramon C.; SANTHIAGO, Marcony R.; BERTI, Thaís B.; *et al.* Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 36, n. 2, p. 273–276, 2010.
16. GWIN, R. M.; LERNER, I.; WARREN, J. K.; *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 22, n. 2, p. 267–271, 1982.
17. GWIN, R. M.; WARREN, J. K.; SAMUELSON, D. A.; *et al.* Effects of phacoemulsification and extracapsular lens removal on corneal thickness and endothelial cell density in the dog. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 24, n. 2, p. 227–236, 1983.
18. HASSELL, John R.; BIRK, David E. The molecular basis of corneal transparency. **Experimental Eye Research**, v. 91, n. 3, p. 326–335, 2010.
19. HOBDEN, Jeffery A. *Pseudomonas aeruginosa* Proteases and Corneal Virulence. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 5–6, p. 391–396, 2002.
20. HOROVITZ, Roberto Novaes Campello; GARCIA, Renato; BECHARA, Samir Jacob. Crosslinking: an updated and effective insight. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 74, n. 2, p. 119–123, 2015.
21. IOMDINA, E. N.; SOTNIKOVA, L. F.; GONCHAROVA, A. V.; *et al.* Using ultraviolet corneal crosslinking for the treatment of corneal ulcers and other

- corneal pathologies in animals. **Russian Ophthalmological Journal**, v. 12, n. 3, p. 51–57, 2019.
22. JABBARVAND, Mahmoud; MORAVVEJ, Zahra; SHAHRAKI, Kianoush; *et al.* Corneal biomechanical outcome of collagen cross-linking in keratoconic patients evaluated by Corvis ST. **European Journal of Ophthalmology**, v. 31, n. 4, p. 1577–1583, 2021.
23. KIM, Jury; JI, Dong-Beom; TAKIYAMA, Naoaki; *et al.* Corneal collagen cross-linking following superficial keratectomy as treatment for corneal endothelial cell dystrophy in dogs: Preliminary clinical study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 22, n. 4, p. 440–447, 2019.
24. LAING, Ronald A.; SANDSTROM, Marita M.; BERROSPI, Amado R.; *et al.* Changes in the corneal endothelium as a function of age. **Experimental Eye Research**, v. 22, n. 6, p. 587–594, 1976.
25. LEDBETTER, Eric C.; GILGER, Brian C. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. *In*: GELATT, Kirk N.; GILGER, Brian C.; THOMAS, Kern J. (Orgs.). **Veterinary Ophthalmology**. Fifth. [s.l.]: Wiley-Blackwell, 2013, v. 2.
26. LEE, J. S.; OUM, B. S.; CHOI, H. Y.; *et al.* Differences in corneal thickness and corneal endothelium related to duration in Diabetes. **Eye**, v. 20, n. 3, p. 315–318, 2006.
27. LEONARD, Brian C.; COSERT, Krista; WINKLER, Moritz; *et al.* Stromal Collagen Arrangement Correlates with Stiffness of the Canine Cornea. **Bioengineering**, v. 7, n. 1, p. 4, 2019.
28. LINSENMAYER, T. F.; GIBNEY, E.; IGOE, F.; *et al.* Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 121, n. 5, p. 1181–1189, 1993.
29. LUKASHINA, U.E.; SLESARENKO, N.A.; SHILKIN, A.G. Efficiency evaluation of cornea crosslinking in septic ulcers in small pets. **E3S Web of Conferences**, v. 282, p. 03012, 2021.
30. MAGGS, David J.; MILLER, Paul E.; OFRI, Ron (Orgs.). Diseases of the Cornea and Sclera. *In*: MAGGS, David J. (Ed.). **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. Sixth. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018.
31. MAKDOUMI, Karim; BÄCKMAN, Anders. Photodynamic UVA-riboflavin bacterial elimination in antibiotic-resistant bacteria: Photodynamic effect in

- antibiotic resistance. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 44, n. 7, p. 582–586, 2016.
32. MAKDOUMI, Karim; BÄCKMAN, Anders; MORTENSEN, Jes; *et al.* Evaluation of antibacterial efficacy of photo-activated riboflavin using ultraviolet light (UVA). **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 248, n. 2, p. 207–212, 2010.
33. MAKDOUMI, Karim; MORTENSEN, Jes; SORKHABI, Omid; *et al.* UVA-riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 250, n. 1, p. 95–102, 2012.
34. MARTINS, Suy Anne R.; COMBS, Juan Castro; NOGUERA, Guillermo; *et al.* Antimicrobial Efficacy of Riboflavin/UVA Combination (365 nm) In Vitro for Bacterial and Fungal Isolates: A Potential New Treatment for Infectious Keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 8, p. 3402, 2008.
35. MATSUDA, M.; OHGURO, N.; ISHIMOTO, I.; *et al.* Relationship of corneal endothelial morphology to diabetic retinopathy, duration of diabetes and glycemic control. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 34, n. 1, p. 53–56, 1990.
36. MATSUMOTO, Koki. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. **Biological Chemistry**, v. 385, n. 11, 2004. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BC.2004.131/html>>. Acesso em: 9 nov. 2021.
37. MAZZOTTA, Cosimo; TRAVERSI, Claudio; BAIOCCHI, Stefano; *et al.* Corneal Healing After Riboflavin Ultraviolet-A Collagen Cross-Linking Determined by Confocal Laser Scanning Microscopy In Vivo: Early and Late Modifications. **American Journal of Ophthalmology**, v. 146, n. 4, p. 527-533.e1, 2008.
38. MCCALL, A. Scott; KRAFT, Stefan; EDELHAUSER, Henry F.; *et al.* 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, 2010.
39. MCCAREY, Bernard E.; EDELHAUSER, Henry F.; LYNN, Michael J. Review of Corneal Endothelial Specular Microscopy for FDA Clinical Trials of Refractive Procedures, Surgical Devices and New Intraocular Drugs and Solutions. **Cornea**, v. 27, n. 1, p. 1–16, 2008.

40. MEEK, Keith M.; BOOTE, Craig. The organization of collagen in the corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 78, n. 3, p. 503–512, 2004.
41. MEEK, Keith M.; HAYES, Sally. Corneal cross-linking - a review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 33, n. 2, p. 78–93, 2013.
42. MELO, Cinthia Mendonça de. **Estudo das amostras endoteliais de microscopia especular da córnea**. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/8196/1/2007_CinthiaMendoncad eMelo.pdf>. Acesso em: 25 out. 2021.
43. MOHAMMADPOUR, Mehrdad; MASOUMI, Ahmad; MIRGHORBANI, Masoud; *et al.* Updates on corneal collagen cross-linking: Indications, techniques and clinical outcomes. **Journal of Current Ophthalmology**, v. 29, n. 4, p. 235–247, 2017.
44. NEUENSCHWANDER, Heike; JULIA, Christine; WYMAN, Milton; *et al.* Endothelial changes in galactose-fed dogs. **Current Eye Research**, v. 14, n. 4, p. 319–322, 1995.
45. OLLIVIER, F. J.; GILGER, B. C.; BARRIE, K. P.; *et al.* Proteinases of the cornea and precorneal tear film. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 199–206, 2007.
46. POT, Simon A.; GALLHÖFER, Nicolin S.; MATHEIS, Franziska L.; *et al.* Corneal collagen cross-linking as treatment for infectious and noninfectious corneal melting in cats and dogs: results of a prospective, nonrandomized, controlled trial. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. 4, p. 250–260, 2014.
47. POT, Simon A.; GALLHÖFER, Nicolin S.; WALSER-REINHARDT, Ladina; *et al.* Treatment of bullous keratopathy with corneal collagen cross-linking in two dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 2, p. 168–173, 2015.
48. RANDLEMAN, J. Bradley; KHANDELWAL, Sumitra S.; HAFEZI, Farhad. Corneal cross-linking. **Survey of Ophthalmology**, v. 60, n. 6, p. 509–523, 2015.
49. RODRIGUES, Georgia N.; LAUS, Jose L.; SANTOS, Jaime M.; *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 101–107, 2006.

50. ROSETTA, Pietro; VINCIGUERRA, Riccardo; ROMANO, Mario R.; *et al.* Corneal Collagen Cross-Linking Window Absorption. **Cornea**, v. 32, n. 4, p. 550–554, 2013.
51. RUBINFELD, Roy S.; CARUSO, Ciro; OSTACOLO, Carmine. Corneal Cross-Linking: The Science Beyond the Myths and Misconceptions. **Cornea**, v. 38, n. 6, p. 780–790, 2019.
52. SAID, Dalia G.; ELALFY, Mohamed S.; GATZIOUFAS, Zisis; *et al.* Collagen Cross-Linking with Photoactivated Riboflavin (PACK-CXL) for the Treatment of Advanced Infectious Keratitis with Corneal Melting. **Ophthalmology**, v. 121, n. 7, p. 1377–1382, 2014.
53. SALOMÃO, Marcella Q.; CHAURASIA, Shyam S.; SINHA-ROY, Abhijit; *et al.* Corneal Wound Healing After Ultraviolet-A/Riboflavin Collagen Cross-Linking: A Rabbit Study. **Journal of Refractive Surgery**, v. 27, n. 6, p. 401–407, 2011.
54. SAMUELSON, Don A. Ophthalmic Anatomy. *In*: GELATT, N. Kirk; GILGER, C. Brian; THOMAS, J. Kern (Orgs.). **Veterinary Ophthalmology**. Fifth. [s.l.]: John Wiley & Sons, 2013, v. 1.
55. SHAJARI, Mehdi; KOLB, Carolin M.; AGHA, Bishr; *et al.* Comparison of standard and accelerated corneal cross-linking for the treatment of keratoconus: a meta-analysis. **Acta Ophthalmologica**, v. 97, n. 1, p. e22–e35, 2019.
56. SILVA, Andreza Amaral da; GONÇALVES, Roberto Calderon. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.
57. SOMPURAM, Seshi R.; VANI, Kodela; MESSANA, Elizabeth; *et al.* A Molecular Mechanism of Formalin Fixation and Antigen Retrieval. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 121, n. 2, p. 190–199, 2004.
58. SØNDERGAARD, Anders P.; IVARSEN, Anders; HJORTDAL, Jesper. Reduction of Stromal Swelling Pressure after UVA-Riboflavin Cross-Linking. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, n. 3, p. 1625, 2013.
59. SPIESS, Bernhard M.; POT, Simon A.; FLORIN, Marion; *et al.* Corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of melting keratitis in cats and dogs: a pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2014.

60. SPOERL, Eberhard; HUHLE, Michael; SEILER, Theo. Induction of Cross-links in Corneal Tissue. **Experimental Eye Research**, v. 66, n. 1, p. 97–103, 1998.
61. SPOERL, Eberhard; MROCHEN, Michael; SLINEY, David; *et al.* Safety of UVA-Riboflavin Cross-Linking of the Cornea. **Cornea**, v. 26, n. 4, p. 385–389, 2007.
62. SPOERL, Eberhard; WOLLENSAK, Gregor; SEILER, Theo. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. **Current Eye Research**, v. 29, n. 1, p. 35–40, 2004.
63. THORSRUD, Andreas; NICOLAISSEN, Bjørn; DROLSUM, Liv. Corneal collagen crosslinking in vitro: Inhibited regeneration of human limbal epithelial cells after riboflavin–ultraviolet-A exposure. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 38, n. 6, p. 1072–1076, 2012.
64. SPOERL, Eberhard; WOLLENSAK, Gregor; SEILER, Theo. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. **Current Eye Research**, v. 29, n. 1, p. 35–40, 2004.
65. WOLLENSAK, Gregor; SPOERL, Eberhard; SEILER, Theo. Riboflavin/ultraviolet-a–induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. **American Journal of Ophthalmology**, v. 135, n. 5, p. 620–627, 2003.
66. WOLLENSAK, Gregor; SPOERL, Eberhard; SEILER, Theo. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 29, n. 9, p. 1780–1785, 2003.
67. YEE, Richard W.; MATSUDA, Mamoru; KERN, Timothy S.; *et al.* Corneal endothelial changes in diabetic dogs. **Current Eye Research**, v. 4, n. 7, p. 759–766, 1985.