

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OMENTO ALÓGENO DE COELHO (TECIDO OU CULTIVO)
ASSOCIADO A MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃO NA
CERATOPLASTIA LAMELAR EM COELHOS**

**Séfora Vieira da Silva Gouvêa de Barros
Médica Veterinária**

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OMENTO ALÓGENO DE COELHO (TECIDO OU CULTIVO)
ASSOCIADO A MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃO NA
CERATOPLASTIA LAMELAR EM COELHOS**

Séfora Vieira da Silva Gouvêa de Barros

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

Folha de Aprovação

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SÉFORA VIEIRA DA SILVA GOUVÊA DE BARROS - nascida em 11 de Julho de 1971, em São Carlos, São Paulo. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Câmpus de Araçatuba, em 22 de novembro de 1996. Concluiu o Mestrado na Universidade Federal de Viçosa em 24 de abril de 2000. Atualmente, é aluna regular do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, nível de Doutorado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus. É docente da Universidade de Vila Velha (ES) na área de Clínica Médica Cirúrgica.

“E ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; e tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse amor, não seria nada” (I Coríntios 13:2).

Dedico a Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus em que acredito que sempre fornece meios para que o objetivo alcançado seja aquele que realmente nos tornará seres humanos melhores, mesmo que por vezes custemos a perceber. Obrigado, Senhor, por todas as oportunidades e pessoas com as quais pude conviver durante a realização desse projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Laus, por ter aberto as portas dessa Universidade para mim, por seus ensinamentos, por sua franqueza construtiva e pelo apoio e compreensão nos momentos em que fui forçada a reorganizar as velas.

A Profa. Dra. Paola Castro Moraes; ao Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi e ao Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen G. Dias, pelas correções e sugestões ao trabalho.

A Dra. Marcela Aldrovani, que é exemplo de competência e profissionalismo no grupo da Oftalmologia. Obrigado por suas vitais contribuições, ensinamentos, disposição e atenção.

Aos professores Júlio Carlos Canola e José Corrêa de Lacerda Neto pelo apoio e compreensão.

Aos meus colegas da Oftalmo, que em algum momento dividiram comigo as dificuldades, as realizações e as inquietações da pesquisa com seres vivos. Luciana Lacerda, Luciano Conceição, Alexandre Ribeiro (Dedo), Fábio Marinho, Ivan Pádua, Tiago Lima, Camila Balthazar (Bia), Roberta Renzo, Alexandre Sobrinho (Antonio), Dúnia Trujilo, Miguel Ladino, Germana Alegro, Kethye Ortêncio, Karina Kobashigawa (Tchaina), Roberta Crivelaro (Tititi), Gisele Valdetaro e Bianca Martins .

A Mônica Horr, que ao anestésiar os coelhos me fez admirar ainda mais o profissional que se dedica em fazer sempre o melhor para os pacientes e não somente o suficiente.

Ao Dr. Fábio Brito, por ser o idealizador dessa pesquisa.

Ao Dr. José E. Krieger, diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia – do Instituto do Coração (InCor) por contribuir com a realização dessa

pesquisa cedendo espaço, funcionários e pesquisadores, em especial ao Dr Vinícius Bassaneze, Dra. Juliana S. Nakamuta e a Mestre Samantha Omae.

A UNESP – Câmpus de Araçatuba, na pessoa da Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto, pelo auxílio, atenção com a pesquisa e por ser fonte inspiração.

Aos doutores, amigos e colegas de profissão, Renato Travassos Beltrane, Krishna Duro de Oliveira, Flávia Mara Machado, Luis Gustavo Picorelli de Oliveira, Mayra Cunha Flecher e Fernanda Vieira por importantes contribuições ao trabalho.

A minha família de gente com pai, mãe, irmãs, vó, bisavó, sobrinha e primos e a minha família com gatinhos, obrigado por todo apoio, por todo o carinho incondicional, por serem meu porto seguro.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, ao Serviço de Oftalmologia, ao Departamento de Obstetrícia e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e a todos os seus professores e funcionários, pela disponibilidade da estrutura necessária para realização do projeto.

A Universidade de Vila Velha e seus funcionários, alunos, residentes, colegas de profissão e amigos que me ajudaram e incentivaram a concluir esse projeto.

A Seção de Pós-graduação e seus funcionários, pela cordialidade e eficiência no atendimento ao aluno da pós-graduação enxergando-o com humanidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio financeiro, sob o número de processo 2011/17665-0, possibilitando o desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

Aos coelhos que serviram para que uma ideia gerasse frutos. Espero ter conseguido agradecê-los de fato durante todas as etapas da pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE QUADROS	xvii
LISTA DE TABELAS	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA CÓRNEA	24
2.2 REPARAÇÃO CORNEAL	25
2.3 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E OMENTO	29
2.4 MEMBRANA AMNIÓTICA	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 CONSIDERAÇÕES QUANTO À ETICA	33
3.2 PACIENTES E GRUPOS	34
3.3 MEMBRANA BIOLÓGICA E CULTIVO CELULAR	34
3.3.1 Obtenção e preservação da membrana amniótica	34
3.3.2 Obtenção e preservação do omento	34
3.3.3 Extração e cultivo das células mesenquiais do omento	34
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIAIS DO OMENTO	36
3.4.1 Citometria de fluxo	36
3.4.2 Morfologia celular	37
3.5 ADESÃO DAS CÉLULAS MESENQUIAIS DO OMENTO	38
3.6 PROCEDIMENTO EM ANESTESIA	39
3.7 CERATECTOMIAS E PÓS-OPERATÓRIO	39
3.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA	40
3.9 AVALIAÇÃO À MICROSCOPIA	42
3.9.1 Histopatologia	42
3.9.2 Imuno-histoquímica na detecção da proliferação celular	43
3.10 ESTATÍSTICA	44

4 RESULTADOS	45
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	45
4.2 AVALIAÇÃO À MICROSCOPIA	47
4.2.1 Histopatologia.....	48
4.2.2 Imuno-histoquímica	48
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS	56
APÊNDICES	71
APÊNDICE 1	71
APÊNDICE 2	72
APÊNDICE 3	73
APÊNDICE 4	74
APÊNDICE 5	75
APÊNDICE 6	76
APÊNDICE 7	77
APÊNDICE 8	78

Certificado da Comissão de Ética

OMENTO ALÓGENO DE COELHO (TECIDO OU CULTIVO) ASSOCIADO A MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃO NA CERATOPLASTIA LAMELAR EM COELHOS

RESUMO - O omento, tecido gorduroso rico em células tronco mesenquimais, expressa fatores de crescimento, que atuam na regeneração tecidual, tornando-o atrativo para utilização em medicina regenerativa. Não há relatos, todavia, quanto à investigação sobre células do omento na cirurgia regenerativa em oftalmologia. Avaliaram-se os efeitos clínicos e à microscopia do omento com membrana amniótica na reparação da córnea de coelhos submetidos a ceratectomia. Duas modalidades foram avaliadas. Na primeira, o omento foi coberto com membrana amniótica imediatamente à sua implantação na córnea (grupo OM); na segunda, a membrana amniótica foi colonizada por células progenitoras extraídas do omento e transplantadas para a córnea (grupo OMC). Os efeitos clínicos foram avaliados a partir de dados coletados por até 60 dias de pós-operatório. A incidência e a prevalência de quemose foram maiores no grupo OM ($p < 0,05$). O grupo OMC mostrou mais incidência de blefarospasmo ($p < 0,001$). À microscopia de luz, encontrou-se reparação corneal gradativa em ambos os grupos, com reepitelização ao 10^o de pós-operatório. Aos 60 dias da avaliação, todas as córneas estavam reparadas, entretanto, no grupo OMC constatou-se vascularização. Proliferação celular acentuada foi observada com o ki-67, nos estágios finais do processo de reparação de córneas que receberam MA contendo células do omento (grupo OMC). Somente no grupo OMC, a reparação corneal sem transparência foi alcançada.

Palavras-chave: coelho, células tronco mesenquimais, membrana amniótica, reparação corneal

ALLOGENIC RABBIT OMENTUM (TISSUE OR CULTURE) ASSOCIATED WITH DOG AMNIOTIC MEMBRANE IN LAMELLAR KERATOPLASTY IN RABBITS

ABSTRACT - The omentum, a fatty tissue rich in mesenchymal stem cells, expresses growth factors that act in tissue regeneration, making it attractive for use in regenerative medicine. To our knowledge, reports that investigate the use of omentum cells in ophthalmology have yet to be published. The purpose of this study was to assess the clinical and microscopic effects of omentum associated with amniotic membrane on the repair of rabbit cornea submitted to keratectomy. Two methods were evaluated; in the first, the omentum was covered with amniotic membrane immediately following its implantation on the cornea (OM group), while in the second, the amniotic membrane was colonized by omental progenitor cells and transplanted to the cornea (OMC group). Clinical parameters were evaluated from data collected up to 60 days postoperatively. The incidence and prevalence of chemosis were higher in the OM group ($p < 0.05$). The OMC group showed greater incidence of blepharospasm ($p < 0.001$). Under light microscopy, the absence of epithelium in the lesioned area and stromal disorganization were observed in the early postoperative period. After 60 days of evaluation, all the corneas were repaired. Intense cell proliferation was detected with Ki-67, in the final stages of the repair process, where amniotic membrane containing omental progenitor cells was transplanted to the corneas. The use of omentum and its cells, in association with amniotic membrane, favored the repair of the cornea and did not induce complications.

Keywords: rabbit, mesenchymal stem cells, amniotic membrane, corneal repair.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ARVO - *Association for Research in Vision and Ophthalmology*
- BSA - albumina bovina sérica
- °C - grau Celsius
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- cm - centímetro
- CO₂ - dióxido de carbono
- CTM - célula tronco mesenquimal adulta
- DAB - cromógeno diaminobenzidina
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose*
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
- FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
- HE - hematoxilina-eosina
- InCor - Instituto do Coração
- iPS - células tronco pluripotentes induzidas
- ISCT - Sociedade Internacional de Terapia Celular
- L/min – litro por minuto
- Ltda – limitada
- MA - membrana amniótica
- mg/kg – miligramas por quilo
- mL - mililitro
- mm - milímetro
- NaCl - cloreto de sódio
- NaOH - hidróxido de sódio
- OM - grupo omento
- OMC - grupo omento com células
- PBS - tampão fosfato-salino
- % - percentual
- pH - potencial hidrogeniônico
- PO - passagem
- ® - marca registrada

RAEC - células endoteliais de coelho

rpm - rotação por minuto

μ L - microlitro

μ m - micrômetro

UNESP - Universidade Estadual Paulista

USP - Universidade de São Paulo

v/v – volume/volume

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

VETMOL - Laboratório de Diagnóstico em Patologia Molecular Veterinária e Pesquisa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição, porcentagem, de células mesenquimais do omento de coelho (omento); de células mesenquimais do tecido adiposo de coelhos (Rabbit ASC) e de células endoteliais de coelho (RAEC), submetidas a citometria de fluxo para os marcadores Anti-rat CD31 PE e Anti-Human CD90 APC.....	28
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros adotados para avaliação da evolução de ceratoplastias lamelares, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco que receberam enxerto de omento livre, recoberto com MA (OM) ou MA com células do omento (OMC)	32
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição da ocorrência dos parâmetros avaliados na evolução de ceratoplastias lamelares, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, que receberam enxerto de omento (OM) ou membrana amniótica com células do omento (OMC) 37

1 INTRODUÇÃO

Lesões na córnea podem desencadear disfunção estromal, com exaustão ou depleção gradual das células progenitoras corneolimbais envolvidas na reparação, comprometendo a integridade morfofuncional da estrutura. A ceratite ulcerativa é condição comum na clínica de pequenos animais, podendo ser incitada por ampla diversidade de agentes. Instituir precocemente terapia clínica adequada torna-se imprescindível para que não ocorram prejuízos à visão (GOMES; PIRES; ALVES, 2002; ANDRADE *et al.*, 2009). Terapêuticas de rotina incluem antibióticos locais, agentes antiproteases e de fármacos parassimpáticos, muitas vezes associados a terapia cirúrgica (GELATT, 2007; LAUS, 2009). Apesar do arsenal disponível, casos refratários são comuns, tornando-se desafiador para o oftalmologista decidir por alternativas que garantirão o bom reparo da lesão. Surgem perspectivas em terapia celular.

O termo “terapia celular” refere-se a um conjunto de métodos e abordagens técnicas, que agrega conhecimentos transdisciplinares visando à utilização de células para o tratamento de doenças. A modalidade mais antiga de terapia celular é a transfusão de componentes do sangue. Atualmente, seu principal campo de abrangência é a medicina regenerativa (ZAGO, 2005; DEL CARLO; MONTEIRO; ARGOLO NETO, 2009), com a qual se buscam repor células perdidas ou que deixaram de exercer suas funções em consequência de alterações genéticas, adquiridas ou idiopáticas; estimular tecidos danificados, devolvendo suas propriedades; e restaurar a função de órgãos e de sistemas (WEISSMAN; ANDERSON; GAJE, 2001).

Três modalidades de terapia celular foram descritas, até o momento: a que utiliza células tronco embrionárias (EVANS; KAUFMAN, 1981; KERKIS *et al.*, 2001; ZAGO; COVAS, 2004); a que emprega células tronco somáticas adultas (BARRY; MURPHY, 2004; BRAGA-SILVA *et al.*, 2006); e a que mobiliza células tronco pluripotentes induzidas, ou seja, células somáticas geneticamente modificadas e reprogramadas, por meio de transfecção celular, adquirindo características de células tronco embrionárias (TAKAHASHI *et al.*, 2007).

O conceito de célula tronco mesenquimal adulta (CTM) foi introduzido por Caplan (1991). Trata-se de linhagem de células indiferenciadas observada em pequena quantidade na maioria dos tecidos de indivíduos adultos, notadamente em regiões perivasculares, incluindo a medula óssea, a gordura, o periósteo, os músculos lisos e os estriados, os órgãos parenquimatosos e o omento (PLATELL *et al.*, 2000; MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008; CAPLAN, 2009; SHAH *et al.*, 2012). Dentre as múltiplas características que permitem distinguir as células tronco mesenquimais das demais células de um tecido adulto, destacam-se a capacidade de autorrenovação e a plasticidade (OLSSON; PIPPI, 2006; DE KRETZER, 2007; FRITSCH *et al.*, 2007; PINTO FILHO *et al.*, 2013).

Autores defendem que muitas das células indiferenciadas adultas definidas como tronco seriam, na realidade, células progenitoras que compartilham características fenotípicas com as mesmas, porém apresentam menor plasticidade, tendendo para a multi ou a oligopotência (MORRISSON; SHAH; ANDERSON, 1997; SEABERG; VAN DER KOOY, 2003).

Independente de debates técnicos envolvendo nomenclatura, a descoberta de que os tecidos adultos são fontes doadoras das células indiferenciadas mesenquimais permitiu que ensaios clínicos fossem elaborados, a custos praticáveis, sem confrontação com questões éticas (STRAUER; KORNOWSKI, 2003; ZAGO, 2005; DEL CARLO; MONTEIRO; ARGOLO NETO, 2009). Adjunto, o uso clínico de células tronco ou progenitoras mesenquimais adultas é mais seguro, uma vez que a diferenciação “*ex vivo*” dessas células está condicionada à presença de um estímulo indutor, diferentemente do que ocorre com as células tronco embrionárias.

A segurança de terapias envolvendo células tronco depende das características intrínsecas de cada linhagem, de fatores extrínsecos relacionados ao microambiente suscitado pelas condições de cultivo, dos procedimentos usados para manipulação celular e das vias de administração ou de transplantação dessas células. Tais variáveis também determinam o perfil de risco associado à terapia celular. Os riscos estimados a partir de experimentação animal ou de observações clínicas, incluem a gênese de tumores, a ocorrência de respostas imunes indesejadas e a transmissão

acidental de agentes infecciosos (HERBERTS; KWA; HERMSEN, 2011). O omento é uma dobra do peritônio, composto por uma membrana mesotelial que contém agregados de tecido linfóide. Ele possui células tronco mesenquimais (PLATELL *et al.*, 2000; GÓMEZ-GIL *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2012) e expressa fatores de crescimento que desempenham papel importante na regeneração tecidual, tornando-o atrativo para a medicina regenerativa (PEPTAN; HONG; MAO, 2006; RICHARDSON *et al.*, 2007). Até o presente, não há relatos quanto à aplicação experimental do omento livre (biomaterial), ou de seus componentes mesenquimais, incluindo as células tronco, no reparo de tecidos oculares. Há, contudo, estudos reportando que células tronco mesenquimais da medula óssea restauraram a transparência corneal, após lesão química em ratos (MA *et al.*, 2006) e lesão térmica em camundongos (LAN *et al.*, 2012). Células da polpa dentária foram responsabilizadas pelo sucesso na reparação corneal, de coelhos, após lesão por hidróxido de sódio (GOMES *et al.*, 2010).

Com base nas propriedades regenerativas do omento, intentou-se, na presente pesquisa, estudá-lo como enxerto (biomaterial) na reparação da córnea, uma vez que afecções acometendo essa estrutura figuram como causas importantes de perda da visão em animais e em seres humanos. Considerando-se que o omento livre não poderia ser transplantado para a córnea, como enxerto, isoladamente, por sua fragilidade, sua utilização ficou condicionada à associação com um tecido de suporte. A membrana amniótica (MA), por suas características, que a tornaram padrão ouro em oftalmologia, foi escolhida (BARROS *et al.*, 2005; GELLAT, 2007; ANDRADE *et al.*, 2009; PONTES *et al.*, 2011).

Além do suporte mecânico, os benefícios que decorrem da associação da MA com outros tecidos, com células tronco ou progenitoras podem advir de diferentes mecanismos: aumento da concentração ou ação sinérgica de fatores de crescimento, citocinas, interleucinas e outras moléculas solúveis estimuladoras da migração celular, acelerando a reparação corneal; estabelecimento e suporte de sítios de contato célula-célula e célula-matriz envolvidos na reparação; reposição e recrutamento "in situ" de células progenitoras epiteliais ou mesenquimais hábeis para se diferenciarem em

células da córnea (PELLEGRINI *et al.*, 1997; DUA *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2004; PANG; DU; WU, 2010).

Avaliaram-se clínica e histologicamente, na presente investigação, os efeitos da associação do omento livre conservado em glicerina (biomaterial) ou como fonte de células, associado à MA, em ceratoplastias lamelares em coelhos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA CÓRNEA

A córnea, juntamente com a esclera, representa a túnica fibrosa que compõe o bulbo do olho. Sua espessura varia entre as espécies, entre raças e entre indivíduos. Nos coelhos, a espessura central é de 0,35 mm; no cão de 0,6 a 0,7 mm e no gato de 0,8 a 1,0 mm (GELATT, 2007; SLATTER; DIETRICH, 2007; CHEN *et al.*, 2011). A córnea possui arranjo histológico diferenciado, que lhe confere transparência e propriedades refrativas (SLATTER; DIETRICH, 2007; GELATT, 2007). Do meio externo para o interno, ela é formada por epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Primatas, aves, baleias e girafas possuem, ainda, a camada de Bowman, situada entre o epitélio e o estroma (SAMUELSON *et al.*, 2005).

O epitélio corneal é do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado. As células da camada superficial são achatadas, as das camadas intermediárias são predominantemente poliédricas e as da camada basal são cubóides (SLATTER; DIETRICH, 2007). Células epiteliais da camada basal repousam sobre uma fina membrana constituída por fibras de ancoragem, por proteoglicanos e por glicoproteínas, as quais se prendem firmemente por meio de estruturas de adesão célula-matriz que recebem o nome de hemidesmossomos.

O epitélio corneal, juntamente com o da conjuntiva e o do limbo, formam a superfície ocular. O limbo é a zona de transição entre a córnea e a

esclera. Trata-se de estrutura altamente especializada, ricamente vascularizada e que contém células tronco epiteliais atuantes na reparação corneal (DUA; AZUARA-BLANCO, 2000; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Imediatamente abaixo da membrana basal, encontra-se o estroma, que representa cerca de 90% da espessura total da córnea (SLATTER, 2005; GELLAT 2007). Ele é composto por ceratócitos, fibroblastos, substância fundamental amorfa, fibras colágenas e por colágenos não fibrilares. As fibras colágenas da córnea apresentam diâmetro menor que o comprimento de onda da luz visível, condição decisiva para que a córnea seja transparente. Ademais, apresentam distância uniforme entre si e organizam-se espacialmente em lamelas. O arranjo lamelar das fibras colágenas relaciona-se com as propriedades mecânicas da córnea, especialmente o ângulo de curvatura, e é determinante para o poder refrativo (SLATTER, 2005; GELATT, 2007).

O estroma corneal é posteriormente delimitado pela membrana de Descemet, uma estrutura acelular e elástica (SAMUELSON *et al.*, 2005). Ela é composta por macromoléculas de colágenos, de laminina e de fibronectina, que são continuamente (por toda a vida) sintetizadas pelas células endoteliais, resultando em espessamento estrutural com o avançar da idade (STADES *et al.*, 1999; SLATTER, 2005).

O endotélio corneal apresenta sua face anterior voltada para a membrana de Descemet e a posterior para o humor aquoso. Constitui-se por células poligonais com alta intensa atividade metabólica, ricas em mitocôndrias e em retículos endoplasmáticos liso e rugoso (BOEVÉ; STADES, 2007). O endotélio contém, em suas células, bomba de sódio e potássio ATPase, o que lhe permite atuar como barreira ativa entre a córnea e o humor aquoso, além de garantir o transporte ativo de íons e de impedir a entrada de água para o estroma corneal (SAMPAIO *et al.*, 2006). A densidade de células endoteliais diminui com o avançar da idade. A capacidade de regeneração dessa estrutura é mínima e varia entre as espécies (SLATTER, 2005).

2.2 REPARAÇÃO CORNEAL

A resposta da córnea a qualquer insulto é limitada e, muitas das afecções que a acometem podem ensejar opacificação e perda da visão (CREMONINI *et al.*, 2007). A ceratite ulcerativa é considerada a mais comum dentre as afecções que acometem a córnea do cão (LAUS, 2009; PONTES *et al.*, 2011).

A cinética de reparação das lesões que afligem a superfície da córnea envolve três etapas: proliferação, migração e diferenciação celulares. A integração dessas etapas depende de sinais emitidos por proteínas estruturais presentes no estroma, além da atuação de moléculas solúveis e de enzimas proteolíticas. Quando a membrana basal não está corrompida, as células epiteliais utilizam-na para se aderirem ao estroma. Contudo, destruição da membrana basal, por ulcerações, resulta em lentidão reparatória, por até oito semanas em casos mais graves (MILLER, 2001).

Segundo Miller (2001), ao se classificarem deve-se considerar a profundidade do dano corneal. Amontam-se a ulceração superficial, superficial persistente, profunda, profunda progressiva e a descemetocèle.

Úlceras de córnea superficiais tendem a reparar-se se complicações, como contaminação, não ocorrerem e o agente causal for removido (GELLAT, 2007; SLATTER, 2005). A reparação, nas ulcerações superficiais, envolve migração de células do epitélio, com mínima ou nenhuma cicatriz (MILLER, 2001; PONTES *et al.*, 2011). A migração celular inicia-se imediatamente à ocorrência da lesão. Células epiteliais basais achatam-se e deslizam para a área desnuda, associando-se com fibrina, fibrinogênio e fibronectina (SLATTER; DIETRICH, 2007). Leucócitos polimorfonucleares chegam à lesão pelo filme lacrimal. Inicia-se a remoção de *debris*. Em média, mitose ativa e migração celular ocorrem no interregno de três a quatro dias do trauma. A reparação epitelial se completa em cinco a sete dias, com reconstituição da arquitetura normal (SLATTER; DIETRICH, 2007).

Nas ulcerações corneais manifestam-se sinais clínicos de dor, evidenciados por blefaroespasmos, descarga ocular, fotofobia e protrusão da terceira pálpebra (GELLAT, 2007). O blefaroespasmos decorre, entre outras

razões, da contração reflexa do músculo orbicular; enquanto que a fotofobia resulta do espasmo da musculatura ciliar por uveíte reflexa (SLATTER; DIETRICH, 2007). São sinais concorrentes a hiperemia conjuntival, o edema, a vascularização corneal e a miose (SLATTER, 2005).

Se nas lesões superficiais não encontrarem condições favoráveis para a reparação, elas tenderão a progredir para as camadas mais profundas da córnea, ensejando sequelas (GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

2.3 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E OMENTO

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) estabeleceu critérios para o reconhecimento e a classificação das células tronco mesenquimais (CTM). Elas devem ser plásticas-aderentes; expressarem (>95%) os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90; não expressarem (<2%) marcadores de células hematopoéticas e endoteliais, tais como CD11b (marcador de célula imune-integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS) CD34 (receptor de células endoteliais) e CD45 (presentes em todas as células hematopoéticas); e reterem habilidade para diferenciação “in vitro” em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006; KOLF; CHO; TUAN, 2007). Evidências endossam o perfil imunoprivilegiado e imunossupressor das CTMs (DOMINICI *et al.*, 2006; KOLF; CHO; TUAN, 2007). Evidências endossam o perfil imunoprivilegiado e imunossupressor das CTMs (RYAN *et al.*, 2005; KERKIS *et al.*, 2006; NAUTA *et al.*, 2006; BAIGUERA *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2012; SCHU *et al.*, 2012).

Avanços no campo da terapia celular têm propiciado a aplicação das CTMs na reparação tecidos oculares danificados por doenças degenerativas ou por traumas. As CTMs mais utilizadas são as adultas, que apesar de não reporem ou substituírem as células de uma estrutura lesionada auxiliam na recuperação funcional, provavelmente, por secretarem moléculas de efeito parácrino (fatores de crescimento, citocinas e fatores antiapoptóticos). O efeito parácrino das CTMs tem sido progressivamente valorizado em medicina regenerativa (SIQUEIRA, 2009). Alguns estudos, inclusive clínicos,

demonstraram a viabilidade de utilizarem CTMs para se repararem lesões da córnea (MA *et al.*, 2006; LAN *et al.*, 2012). Pesquisaram-se, também, os efeitos da aplicação de células progenitoras retinianas no tratamento da degeneração retiniana senil, na degeneração macular, no glaucoma e em outras condições oculares (NARFSTRÖM; OFRI, 2007; NARFSTRÖM; DECKMAN; MENOTTI-RAYMOND, 2011). Há evidências que CTMs adultas da medula óssea (GRANT *et al.*, 2002; TOMITA *et al.*, 2002; KICIC *et al.*, 2003) ou que células tronco embrionárias (YANG *et al.*, 2002) podem ser transplantadas para a retina, resultando no desenvolvimento de células retinianas.

CTMs podem ser facilmente cultivadas e rapidamente expandidas em laboratório. Entretanto, o seu isolamento depende da fonte (WEISSMAN; ANDERSON; GAGE, 2001). Tecidos ricos em gordura constituem fontes doadoras importantes (BLANDE *et al.*, 2009; BASSANEZE *et al.*, 2010; DANOVIZ *et al.*, 2011a).

O omento, além de expressar fatores de crescimento, neurotransmissores, fatores neurotróficos e mediadores inflamatórios, contém CTMs (ZHANG *et al.*, 1997; HERRICK; MUTSAERS, 2004; ALAGUMUTHU; DAS; PATTANAYAK, 2006; REQUICHA *et al.*, 2012).

Anatomicamente, o omento maior prende-se à grande curvatura do estômago e desde há muito tem sido utilizado em intervenções cirúrgicas, notadamente as gastrointestinais, vasculares, ortopédicas, neurológicas, cardiotorácicas, plásticas e reconstrutivas (MENDES *et al.*, 1985; YOSHIOKA *et al.*, 1998; LEVASHEV; AKOPOV; MOSIN, 1999; FOSSUM, 2002; MADIBA *et al.*, 2005; KANAMORI *et al.*, 2006; FERRIGNO *et al.*, 2010).

Microscopicamente, no omento do homem, do rato, do cão e do coelho encontram-se pequenos agregados de tecido linfoide, entre 0,5 e 3,0 cm de diâmetro, conhecidos como “milky spots”, os quais aumentam de tamanho quando funcionalmente estimulados (SINGH *et al.*, 2008; GÓMEZ-GIL *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2012). O mesotélio interno é descontínuo sobre o “milky spots”. O endotélio dos vasos sanguíneos do omento interliga-se diretamente com os “milky spots” da cavidade peritoneal, facilitando a migração de células (monócitos, macrófagos e linfócitos T e B) presentes no estroma omental (PLATELL *et al.*, 2000; RANGEL-MORENO *et al.*, 2009).

García-Gómez *et al.* (2005), em amostras de omento humano provenientes de cirurgias eletivas, observaram células altamente proliferativas, responsivas para Ki-67, expressando CD34 e fatores angiogênicos. Com a implantação dessas células no subcutâneo de ratos, os autores observaram neovascularização no sítio de injúria. O Ki-67 é um antígeno expresso durante o ciclo celular. Sua meia-vida é curta, perdurando não por mais de uma hora após a mitose. Observou-se que ele foi capaz de detectar diferenças na cinética celular corneal em diferentes modelos experimentais (coelhos), após modulação da atividade proliferativa (normal, hiperproliferação e hipoproliferação) (CRESTA; ALVES, 2007).

Singh *et al.* (2008) injetaram partículas de poliacetato de dextrano na cavidade peritoneal de ratos. Decorrida uma semana, observaram aumento da massa omental (20%) por produção de neotecido de células estromais, intersticiais e de vasos sanguíneos. As células adiposas, que no estado inativo representaram 95% do total de células do omento, diminuíram para 30% e o quantitativo de células estromais elevou-se para 70%. As células tronco não adiposas, principalmente as próximas ao tecido expandido e aderido, expressaram marcadores de células pluripotentes, além de altas concentrações de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). No mesmo trabalho, os pesquisadores comprovaram que quando o tempo de coleta do omento, após ativação, foi de 14 dias, as células comportaram-se como as coletadas de omento não ativado, com menor taxa de proliferação em cultivo. Atribuíram o evento à possível interação entre mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, desencadeando a diferenciação celular no omento ativado. A expressão dos marcadores foi mantida ao longo de sucessivos cultivos a partir da primeira amostra proveniente do omento ativado *in vivo*. Ao concluírem, ressaltaram a vantagem que essa fonte autógena propicia por tornar desnecessária a terapia imunossupressora.

Gómez-Gil *et al.* (2009) usaram coelhos (Nova Zelândia Branco, machos) para caracterizar o perfil imunogênico da população celular proveniente da resposta do omento à presença de corpo estranho (malha de polipropileno) cavidade abdominal. Os autores concluíram que, dependendo do ambiente, as células mesenquimais são capazes de diferenciar-se, *in vivo*, em dois tipos distintos de populações: uma com características de linhagem

vascular e outra em forma de miofibroblastos, com grande quantitativo de colágeno. Células próximas e aderidas ao corpo estranho apresentaram taxa de crescimento significativamente maior, em comparação às que não entraram em contato com o corpo estranho (ou seja, que não foram estimuladas).

Requicha *et al.* (2012) avaliaram o potencial de células tronco do tecido adiposo (subcutâneo) e do omento maior de cães. Após submeterem as amostras ao mesmo protocolo de digestão enzimática e cultivo, em frascos plásticos, evidenciaram células com formato de fibroblastos, que mesmo após sucessivas passagens em cultura, mantiveram-se fusiformes e viáveis. Encontraram, em ambos os tecidos, expressão de marcadores CD73, CD90 e de CD105, que diminuiu ao longo das passagens em amostras provenientes do tecido subcutâneo de cães. A capacidade de diferenciação em condroblastos e em osteoblastos foi demonstrada nas duas populações.

Shah *et al.* (2012) caracterizaram as propriedades anti-inflamatórias e cicatriciais das células derivadas do omento de camundongos. Os dados demonstraram que o omento contém dois tipos de células: uma mielóide, imunomodulatória, e outra, tronco, denominada CTM funcional.

Patrício *et al.* (2013), estudando células mesenquimais do tecido adiposo de cão, chamaram a atenção para a falta de marcadores específicos de células tronco na espécie, como fora reforçado por Dudas Junior *et al.* (2008) em coelhos Nova Zelândia Branco e por De Schauwer *et al.* (2011), em equinos.

Lan *et al.* (2012) estudaram o impacto da injúria corneal sobre a homeostase de CTMs endógenas, além do potencial dessas células em reconhecer e migrar para o local da injúria. Para o estudo, valeram-se de células tronco da medula óssea de camundongos, que foram injetadas (na veia caudal) uma hora após a injúria corneal induzida por eletrocautério. Quarenta e oito horas após a injúria, a população de células tronco e o quantitativo de moléculas quimiotáticas dobrou no sangue e na córnea lesada, mas não aumentou na córnea íntegra.

Porzionato *et al.* (2013) avaliaram por técnicas de decelularização, a possibilidade de se obter do omento um arcabouço para cultivo celular. Utilizaram-se do omento de ratos e de seres humanos e observaram a

eficácia da decelularização, que resultou em um biomaterial rico em fibras colágenas, fibras elásticas, fibras reticulares e em glicosaminoglicanos.

2.4 MEMBRANA AMNIÓTICA

A história quanto à aplicação da membrana amniótica em oftalmologia médica iniciou-se com De Roth (1940, *apud* KIM; TSENG,1995), no tratamento do simbléfaro e de defeitos conjuntivais. Kim e Tseng (1995) empregaram-na em modelo experimental de deficiência limbal em coelhos, relatando que 77% dos casos resultaram em melhora na transparência corneal e em diminuição da neovascularização. Desde então, esse biomaterial tornou-se importante adjunto terapêutico na reparação de diversas doenças da superfície ocular, como defeitos corneais persistentes ou recorrentes; perfurações corneais; defeitos conjuntivais, pterígio e tumores; simbléfaros severos; olho seco; bolhas filtrantes com vazamentos e em disfunções palpebrais (GOMES *et al.*, 2006; HIGA *et al.*, 2007). Em veterinária, a MA é utilizada em ceratectomias penetrantes, no simbléfaro, após ressecção de tumores esclerais e corneais e no tratamento de úlceras superficiais não complicadas. Outrossim, na deficiência limbal, nas queimaduras químicas e no sequestro corneal felino (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS *et al.*, 2005; PONTES *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013).

Em 1999, Schwab reportou o uso da MA como substrato de expansão e carreamento de células tronco destinadas à reconstrução de superfícies oculares com deficiência limbal. Células tronco para cultivo sobre MA podem advir de diferentes origens, como do limbo, da mucosa oral, da conjuntiva e a da própria MA (PELLEGRINI *et al.*, 1997; SHORT *et al.*, 2008; RICARDO; GOMES, 2010).

A MA, porção mais interna da placenta, é composta por cinco camadas: epitélio em contato direto com o líquido amniótico, membrana basal, camada compacta, camada fibroblástica e camada esponjosa (DUA *et al.*, 2004). A membrana basal é espessa, contém colágeno tipo IV e laminina.

As demais camadas compõem a matriz estromal avascular (DUA *et al.*, 2004; HEINZ *et al.*, 2004). A presença de colágeno tipo IV, de fatores de crescimento, de citocinas e de moléculas anti-apoptóticas na membrana basal torna a amniótica excelente substrato para o crescimento de células epiteliais (ENDO *et al.*, 2004). Entre os efeitos da MA sobre a reparação corneal, elencam-se a atividade antimicrobiana, a proteção, a redução da dor, efeitos sobre a epitelização e a ausência ou baixa imunogenicidade (AZUARA-BLANCO *et al.*, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2006).

Em cirurgia oftálmica, a MA pode ser usada como enxerto, sendo incorporada ao tecido receptor, com o intuito de reduzir a inflamação (técnica do embutimento). Pode ser empregada como ponte para a migração de células remanescentes da córnea, promovendo reepitelização (técnica da sobreposição). Pode, ainda, ser mobilizada como bandagem para proteção de tecidos transplantados na córnea ou como carreadora de células tronco cultivadas (DUA *et al.*, 2004).

Estudos comprovaram as qualidades da MA na reconstrução da superfície ocular, estando ela a fresco, refrigerada, congelada, liofilizada ou conservada em glicerina (TSUBOTA *et al.*, 1995; TSENG; PRABHASAWAT; LEE, 1997; ADDS; HUNT; DART, 2001; ANDRADE, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2004).

A glicerina é meio utilizado, notadamente em Veterinária, para a conservação de membranas biológicas, por sua ação antibacteriana, antiviral e antifúngica de ação lenta, além de método simples e barato (DUA *et al.*, 2004; TSUBOTA *et al.*, 1995). Sua efetividade depende da concentração, do tempo e da temperatura (KIM; TSENG, 1995; SAFATLE, 1998; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; GODOY; GUERRA; BARROS, 2002; SOUZA, 2003; BARROS *et al.*, 2005).

Segundo Dua *et al.* (2004), qualquer dos métodos de conservação da MA comprometem as condições de viabilidade das células, influenciando nos processos de reparação. Entretanto, resultados experimentais mostraram que alterações dos componentes teciduais não impede a sua efetividade biológica (BARROS *et al.*, 1995; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1999; GARCIA *et al.*, 1996; BARROS; SAFATLE; RIGUEIRO, 1997; BARROS *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2013).

Por não expressar antígenos de histocompatibilidade leucocitários e beta-2-microglobulinas, a MA é considerada imunogenicamente inerte (DUA *et al.*, 2004). Gomes *et al.* (2006) compararam a resposta da córnea de coelhos a implantes de MAs autógena e xenógena (humana) e verificaram que ambas são incorporadas e absorvidas. Wang *et al.* (2006) estudaram a imunogenicidade da MA a fresco e constataram que existe alguma imunogenicidade, que pode induzir à rejeição em pacientes pré-sensibilizados.

Pontes *et al.* (2008) utilizaram MA da espécie canina, conservada em glicerina 98%, em temperatura ambiente, como bandagem na reparação de lesões superficiais da córnea de coelhos, sem resultados favoráveis. Observaram retardo na reparação, comparativamente ao grupo não tratado.

Barbosa *et al.* (2013) avaliaram a MA equina, conservada em glicerina 98%, em ceratectomias lamelares experimentais em cães. Concluíram, clínica e histologicamente, que o material incorporou-se ao estroma, resultando em restabelecimento parcial da transparência, ao final de 40 dias e observação.

A MA, como substrato para cultivo de células do limbo, considerando-se a sua capacidade em preservar e em expandir células progenitoras epiteliais, foi utilizada por Schwab, Reyes, e Isseroff (2000), Koizume *et al.* (2000) e Meller, Pires e Tseng (2002). Os autores verificaram que as células progenitoras epiteliais mantiveram suas características indiferenciadas. MA associada com outros tecidos, especialmente o limbo, foi utilizada para promover reparação corneal (RICARDO; GOMES 2010).

Cremonini *et al.* (2007) estudaram as alterações secundárias à deficiência limbal em coelhos, bem como os efeitos da MA sobre a reparação corneal. O transplante de MA não foi efetivo no tratamento da deficiência limbal; entretanto, reduziu o tempo médio de reparação da córnea. Shimazaki, Shinozaki e Tsubota (1998) recorreram ao transplante de MA associado ao transplante de limbo autógeno ou alógeno, para tratar casos de deficiência limbal total e parcial encontraram bons resultados, com restauração da população de células progenitoras.

Nakamura *et al.* (2003) informaram sobre experiência bem sucedida com o auto-transplante de células epiteliais da mucosa oral de coelhos cultivadas em MA humana criopreservada. O dano na superfície ocular foi

provocado por ceratectomia lamelar, estendendo-se ao limbo. Amostras de mucosa oral foram cultivadas, por três semanas, sobre fragmentos de MA desepitelizada. O transplante de MA, contendo células epiteliais da mucosa oral, ocorreu entre três e quatro semanas após a evolução da lesão. Aos dez dias da transplantação, a córnea havia recuperado a sua transparência.

Ma *et al.* (2006) estudaram a potencialidade de CTMs da medula óssea de humanos em reparar lesões corneais de ratos. CTMs, após expansão em MA, foram transplantadas para as córneas (sete dias após indução de lesão corneal). Os resultados demonstraram que ambas, CTMs e MA, atuaram na reconstrução da superfície corneal.

A MA, como substrato para a proliferação celular “ex vivo”, pode ser utilizada epitelizada ou desepitelizada. A desepitelização é conseguida por técnicas diversas, dentre as quais a digestão enzimática (tripsina ou lipase), o tratamento químico com EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético,) e ou mecânico (desbridamento). Há controvérsias quanto ao emprego de MA epitelizada ou desepitelizada na expansão de células tronco do epitélio limbal. Trabalhos demonstraram que a membrana epitelizada retém células epiteliais em estado indiferenciado, com gênese limitada de estruturas de adesão, podendo comprometer a viabilidade pós transplante. Melhores resultados foram percebidos com a membrana desepitelizada. Obteve-se epitélio mais confluyente, com maior número de estruturas de adesão, aumentando-se a segurança do transplante (KOIZUMI *et al.*, 2007; LEE; TSENG, 1997; MELO *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES QUANTO À ÉTICA

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas “Association for Research in Vision and Ophthalmology” (ARVO), de consoante com o código de NÜREMBERG (SHUSTER, 1998). Para sua realização, o projeto foi

aprovado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo 017001\12), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal.

3.2 PACIENTES E GRUPOS

Foram utilizados 32 animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos, com peso médio de 3,0 kg. Trinta deles foram separados em dois grupos de quinze indivíduos. O trigésimo primeiro coelho foi submetido a coleta de uma amostra do omento que serviu para cultivo celular e o trigésimo segundo indivíduo forneceu amostra de omento para armazenamento em glicerina 98%¹.

Para a constituição de grupos homogêneos, os animais passaram por exame físico e por semiotécnica oftálmica balizada no teste da lágrima de Schirmer², na biomicroscopia com luz em fenda³, na tonometria de aplanção⁴, na oftalmoscopia binocular indireta⁵ e na prova do tingimento pela fluoresceína⁶. Foram selecionados animais hígidos. Os indivíduos foram identificados e mantidos, individualmente, em gaiolas, recebendo água potável e ração apropriada⁷ *ad libitum*. Previamente aos procedimentos experimentais aleatoriamente, separaram-se os trinta animais em dois grupos: grupo omento (OM), composto por animais que receberam enxerto de omento livre recoberto por MA, ambos conservados em glicerina 98%; e grupo omento com células (OMC), composto por animais que receberam MA (conservada em glicerina) colonizada com células do omento. Os estudos foram realizados empregando-se o olho direito de cada coelho.

¹ Rioquímica Ltda São José do Rio Preto-SP, Brasil.

² Teste da Lágrima de Schirmer – Ophthalmos Ltda, São Paulo, SP.

³ Slit Lamp SL-14 –Kowa Company Ltda, Tóquio, Japão.

⁴ TonoPen XL - Reichert® Buffalo, NY, EUA.

⁵ Oftalmoscópio binocular indireto FOH-5 – Eyetec S.A., São Carlos, SP.

⁶ Fluoresceína strips – Ophthalmos Ltda, São Paulo, SP.

⁷ Ração Nutri Coelho® - Purina, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

3.3 MEMBRANA BIOLÓGICA E CULTIVO CELULAR

3.3.1 Obtenção e preservação da MA

Membranas foram coletadas de maneira asséptica, no curso de operação cesariana de duas fêmeas caninas clinicamente saudáveis, em gestações normais levadas a termo. Após a coleta, as MAs foram lavadas em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%⁸, cortadas e colocadas sobre papel filtro de nitrocelulose⁹, com a face epitelial voltada para cima. Em ato contínuo, elas foram imersas em solução de glicerina 98%¹⁰ e acondicionadas em frascos de vidro esterilizados, segundo o proposto por Kim e Tseng (1995), onde permaneceram em temperatura ambiente, por trinta dias, prévios à sua utilização.

3.3.2 Obtenção e preservação do omento

O omento foi obtido de coelho adulto da raça Nova Zelândia Branco. Empregou-se a anestesia inalatória (*vide* item 3.6) e o animal foi preparado para a realização de procedimento asséptico. Após celiotomia, parte do omento maior (cerca de dois gramas) foi removida e lavada em solução de NaCl 0,9%. Para conservação, ele foi acondicionado em frasco de vidro estéril, contendo glicerina 98%, onde foi mantido por trinta dias, prévios à sua utilização (Apêndice 1).

⁸ Fresenius Kabi Brasil Ltda, Fazenda Tamboré Barueri – SP, Brasil.

⁹ *Ophthalmos*®, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁰ Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil.

3.3.3 Extração e cultivo das células mesenquimais do omento

Procedimentos envolvendo extração, cultivo e citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Genética e Cardiologia do Instituto do Coração (InCor), Universidade de São Paulo (USP-SP).

A extração e o cultivo das células seguiram protocolo proposto por Danovitz *et al.* (2011b). Um único coelho foi preparado para a realização de procedimento cirúrgico asséptico, à similitude do item anterior. Após celiotomia e coleta, parte do omento maior foi lavada em tampão fosfato salino (PBS)¹¹, submetida à digestão enzimática com colagenase tipo IA 0,075%¹² diluída em “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium Low Glucose” (DMEM)¹³, por trinta minutos (em estufa¹⁴ a 37°C) e centrifugada¹⁵ a 1200 rpm, por cinco minutos. O “pellet” de células foi ressuspensionado em DMEM e suplementado com 10% de soro fetal bovino¹⁶, penicilina G¹⁷ e estreptomicina¹⁸. As células foram plaqueadas e mantidas em estufa com 5% de CO₂ à temperatura constante de 37°C, por doze horas. A seguir, o meio de cultivo foi trocado e as células não plástico-aderentes foram descartadas. As células foram cultivadas por doze dias, sendo o meio de cultura trocado a cada três dias. A população de células resultantes da primeira troca foi chamada de população zero (P0). A cada nova troca do meio de cultura, que envolveu também descolamento e transferência celular de um recipiente para outro, as amostras passaram às denominações de população um (P1), população dois (P2), até população três (P3). O descolamento enzimático das células aderidas às placas foi realizado com solução de tripsina 0,25%¹⁹, diluída em 1 mL de EDTA²⁰. A viabilidade do material foi avaliada empregando-se método de exclusão com azul de Tripán²¹. Amostras foram

¹¹ Interlab, SP, Brasil Ltda

¹² C-2674- Sigma®; St. Louis, MO.

¹³ Cutilab, Campinas, SP, Brasil.

¹⁴ Estufa ULP400 Uniscienc Equipamentos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁵ Centrífuga mod 206 FANEN, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁶ Cutilab, Campinas, SP, Brasil.

¹⁷ Cutilab, Campinas, SP, Brasil.

¹⁸ Germedpharma®, Campinas, SP, Brasil.

¹⁹ Germedpharma®, Campinas, SP, Brasil.

²⁰ Germedpharma®, Campinas, SP, Brasil.

²¹ Germedpharma®, Campinas, SP, Brasil.

caracterizadas por citometria de fluxo²² e análise de imagem²³. Após acondicionamento em “ependorff”, elas foram armazenadas em nitrogênio líquido até a etapa de adesão a MA.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO OMENTO

3.4.1 Citometria de fluxo

Amostras de P3 foram utilizadas. As células foram marcadas, por trinta minutos, a 4°C, com anticorpos “anti-mouse” CD29 FITC, “anti-human” CD29 PeCy5, “anti-mouse” CD90-PE, “anti-human” CD90 APC, “anti-mouse” CD31-PE, “anti-rat” CD31 Alexa488 e “anti-rat” CD31PE, da BD Biosciences²⁴, seguindo-se as instruções do fabricante. Na sequência, foram lavadas três vezes em PBS²⁵ suplementado com 2% de albumina bovina sérica (BSA) e analisadas. As análises foram feitas em equipamento FACSCalibur²⁶, para 10.000 eventos. A população de células positivas foi definida como aquela com fluorescência superior a, aproximadamente, 1% de falsos positivos da população não marcada com anticorpos. Para se estabelecerem controles negativo e positivo, utilizaram-se células endoteliais de coelho (RAEC, que devem expressar CD31), células mesenquimais de tecido adiposo de coelho (rASC, que devem expressar CD29, CD90) e células pluripotentes induzidas, postas a diferenciação em cardiomiócitos, cuja população é rica em fibroblastos (CD90+) e em células endoteliais (CD31+). Apenas anticorpos com marcação para células do omento e dos controles foram considerados.

Na população de células extraídas do omento, certificou-se da não contaminação por células endoteliais, denotada pelo baixo percentual (5%) de células expressando marcador de superfície CD31. Cerca de 18% das células expressaram CD90, um marcador de superfície de células mesenquimais de

²²BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Diego, EUA.

²³Image J® “National Institute of Health” NIH, EUA.

²⁴BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA.

²⁵Gibco® pH 7.4, Paisley, Scotland, UK.

²⁶BD FACSCalibur™, BD Biosciences, San Diego, EUA.

gordura ou de fibroblastos. Para a comprovação, três repetições foram feitas (Figura 1).

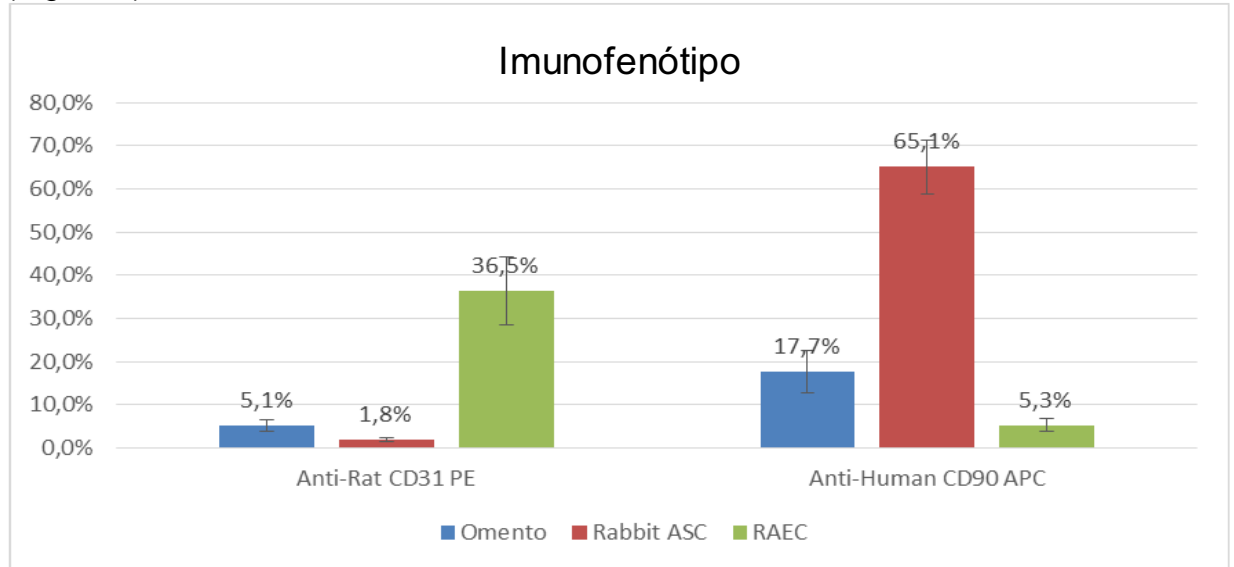


Figura 1. Distribuição, em porcentagem, de células mesenquimais do omento de coelho (omento); de células mesenquimais do tecido adiposo de coelhos (Rabbit ASC) e de células endoteliais de coelho (RAEC), submetidas a citometria de fluxo para os marcadores Anti-rat CD31 PE e Anti-Human CD90 APC. Fonte: Instituto do Coração (Incor SP) (2014).

3.4.2 Morfologia celular

Amostras de P3 foram aleatoriamente selecionadas, fixadas em solução de etanol e ácido acético²⁷ (3:1, v/v) e avaliadas com microscópio EVOS® XL Core²⁸, equipado com contraste de fase, objetiva de 40x e vídeo-câmera digital colorida²⁹. Sete campos microscópicos, por amostra, foram randomicamente fotografados e examinados em “software”³⁰. A população de células (P3) transferidas para a MA e implantadas na córnea exibia baixo pleomorfismo citoplasmático e nuclear. A densidade celular estimada, por campo microscópico, em aumento de 400x, foi de $50,45 \pm 1,36$. Células mesenquimais do omento eram predominantemente fusiformes, com tamanhos homogêneos e com núcleos proeminentes (APÊNDICE 2 A).

²⁷ Merck © Biosciences, Darmstadt, Germany.

²⁸ Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, EUA.

²⁹ Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, EUA.

³⁰ Image J ©, NIH, EUA.

Células mesenquimais de formato arredondado e citoplasma texturalmente heterogêneo (APÊNDICE 2 A) foram observadas em pequeno número (5% da população total). Todas as imagens foram convertidas para um sistema binário (com até 256 pixels) e tratadas com filtros digitais para eliminação de “backgrounds” e suavização ou realce do contorno das estruturas de interesse (APÊNDICE 2 B). Não havia células em mitose nas amostras fotografadas.

3.5 ADESÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO OMENTO À MEMBRANA AMNIÓTICA

Essa etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Cultivo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV, UNESP, Câmpus de Jaboticabal. As culturas de células do omento foram trazidas de São Paulo à Jaboticabal (via aérea) e mantidas em estufa com 5% de CO₂ à temperatura constante de 37°C. Após avaliação sob microscópio de contraste³¹ de fase, as células (P3) foram descoladas das garrafas de cultivo, conforme descrito no item 3.3.3, e diluídas em DMEM visando à sua transferência para a MA. Trinta minutos antes, os fragmentos de MA foram retirados da glicerina, removidos da membrana de nitrocelulose, lavados em solução de NaCl 0,9% e colocados (com a face epitelial voltada para cima) em cubas de inox contendo solução fisiológica, onde permaneceram por vinte minutos, em temperatura ambiente. Todos os procedimentos foram realizados sob fluxo laminar. Os fragmentos foram divididos em duas metades iguais e, individualmente, acomodados em placas de cultivo (24 “wells”). Adicionaram-se, às membranas, 2 mL de DMEM contendo células do omento (P3). Por amostragem, estimou-se que $6,42 \times 10^4$ células foram transferidas para cada fragmento de membrana. As placas contendo as amostras foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ (37°C), por 24 horas, para a adesão das células do omento.

³¹Nikon® do Brasil, São Paulo, SP.

3.6 PROCEDIMENTO EM ANESTESIA

Os coelhos não foram submetidos a jejum alimentar ou a hídrico, porquanto na espécie, ele é desnecessário (FLECKNELL, 2007). Para a pré-anestésia empregou-se acepromazina³² (0,4 mg/kg) associada a tramadol³³ (4 mg/kg), pela via intramuscular. Decorridos quinze minutos, aplicou-se cetamina³⁴ (10 mg/kg) e midazolam³⁵ (0,3 mg/kg), pela via intravenosa. Após intubação orotraqueal com sonda de Magill³⁶ de 3,0 mm de diâmetro, sem balonete, procedeu-se à anestesia geral em circuito anestésico sem reinalação de gases, empregando-se isoflurano³⁷ a 2,5 CAM, diluído em fluxo total de 1L/min de oxigênio a 100%. A superfície corneal foi dessensibilizada com colírio de tetracaína 1% com 0,1% de fenilefrina³⁸.

3.7 CERATOPLASTIAS E PÓS-OPERATÓRIO

Após medidas rotineiras de antissepsia da superfície ocular, com solução de polivinilpirrolidona³⁹ diluída a uma concentração final de 1:50, realizou-se fixação do bulbo do olho com dois pontos escleroconjuntivais, colocados nas posições seis e doze horas, com fio de nylon 5-0⁴⁰. Todos os procedimentos foram realizados à luz da microscopia cirúrgica⁴¹. Com trépano de 6 mm⁴² de diâmetro, realizou-se ceratectomia superficial na região central

³² Acepromazina 1% UNIVET, São Paulo, SP, Brasil.

³³ Tramadol[®] – Cristália, Itapira, SP, Brasil.

³⁴ Cetamin[®] - Syntec, Cotia, SP, Brasil.

³⁵ Dormire[®] - Cristália, Itapira, SP, Brasil

³⁶ Embramac[®], Campinas, SP, Brasil.

³⁷ VetfluranoVirbac[®], São Paulo, SP, Brasil.

³⁸ Colírio anestésico, Allergan Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil.

³⁹ Rioquímica Ltda São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴⁰ Mononylon 5-0 – Bioline Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

⁴¹ M-9 - DF Vasconcellos, São Paulo, SP, Brasil.

⁴² Kolplast Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

da córnea, envolvendo cerca de um terço da sua espessura. O defeito corneal foi concluído empregando-se bisturi angulado de 15 graus⁴³ e pinça colibri⁴⁴.

Nos coelhos do grupo OM, os defeitos corneais serviram de leito para a implantação do omento coberto com MA. Para tal, o omento e a MA foram retirados da glicerina e lavados em solução de NaCl 0,9% estéril, onde permaneceram, para hidratação, por vinte minutos prévios ao uso. O omento foi recortado com trépano de 7 mm de diâmetro e suturado à córnea, empregando-se quatro pontos isolados simples, perfurando totalmente o implante, mas parcialmente a córnea, com fio de náilon 9-0.⁴⁵ A MA foi posicionada com sua face estromal em contato com o omento e a córnea de modo a cobrir o omento. Suas bordas foram fixadas ao fórnice conjuntival, com oito pontos isolados simples, empregando-se fio de náilon 8-0⁴⁶.

Nos defeitos corneais dos coelhos do grupo OMC, implantou-se MA colonizada com células do omento. A face epitelial contendo as células do omento foi colocada em contato com o leito receptor. Sua fixação à córnea foi feita com oito pontos isolados simples, empregando-se fio de náilon 9-0.

Cuidados pós-operatórios foram os mesmos para os dois grupos. Instilou-se colírio à base de tobramicina⁴⁷, a cada quatro horas, durante quinze dias consecutivos. Administrou-se tramadol (4 mg/kg), pela via subcutânea, a cada doze horas, durante cinco dias consecutivos. Como analgesia preemptiva administrou-se por via intravenosa o anti-inflamatório a base de meloxicam⁴⁸ na dose de 0,1mg/kg. Não foi usado colar elisabetano.

3.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os coelhos foram avaliados a partir do primeiro dia de pós operatório, a cada 24 horas durante os primeiros dez dias, período de epitelização da lesão

⁴³ Slit knife 15 degrees® - Alcon Laboratorios Do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

⁴⁴ Steel inox, São Paulo, Brasil.

⁴⁵ Mononylon, – Bioline Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

⁴⁶ Mononylon, – Bioline Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

⁴⁷ Tobramicina 0,3% solução oftálmica - Cristália, Brasil.

⁴⁸ Movatec® meloxicam, solução injetável, Boehringer Ingelheim.

corneal, confirmada com fluoresceína⁴⁹. O registro dos eventos clínicos avaliados foram feitos no 3^o, 7^o, 14^o, 30^o e 60^o dias de pós-operatório. Os eventos avaliados foram o blefarospasmo, a secreção, a quemose, a hiperemia conjuntival, a vascularização e a opacidade corneais. Os escores, para avaliação, foram ausência e presença dos eventos e, quando presentes, quanto aos tipos discreto, moderado e intenso. Em relação à secreção ocular e à opacidade corneal, classificações adicionais foram feitas. A secreção ocular foi classificada, quanto ao tipo, em serosa, mucosa e purulenta. A opacidade corneal o foi quanto à dificuldade para a visibilização, sob iluminação (luz em fenda), da íris a partir das áreas corneais que não receberam os implantes (Quadro 1).

Quadro 1. Parâmetros adotados para avaliação da evolução de ceratoplastias lamelares, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco que receberam enxerto de omento livre, recoberto com MA (OM) ou MA com células do omento (OMC).

PARÂMETROS CLÍNICOS
Blefarospasmo (0): ausente (1): discreto (2): moderado (3): intenso
Secreção ocular serosa, mucosa, purulenta (0): ausente (+): 1 (++): 2 (+++): 3
Quemose (0): ausente (p): presença
Hiperemia Conjuntival (0): ausente (1): discreto (2): moderado (3): intensa
Vascularização corneal (0): ausente (p): presença
Opacidade corneal

⁴⁹ Fluoresceína strips - Ophthalmos®, São Paulo, SP, Brasil.

(0): quando não houver dificuldade para observação de detalhes da íris.
 (1): discreta – quando houver borramento dos detalhes da íris.
 (2): moderada – quando houver dificuldade em definir detalhes da íris.
 (3): severa – quando não for possível observar os detalhes da íris.

Fonte: Adaptado de Andrade *et al.* (2009).

3.9 AVALIAÇÃO À MICROSCOPIA

3.9.1 Histopatologia

A coleta das córneas ocorreu em três animais de cada grupo respectivamente, ao 3^o, 7^o, 14^o, 30^o e 60^o dia de pós-operatório. Para tal, os animais foram submetidos à eutanásia ativa, empregando-se cetamina, pela via intramuscular, na dose de 40 mg/kg de peso corpóreo, e injeção intravenosa de propofol⁵⁰ até atingirem plano profundo de anestesia. Administrou-se cloreto de potássio⁵¹ para a indução de parada cardíaca.

As córneas foram colhidas, fixadas em formaldeído tamponado 10%⁵² e transportadas ao Laboratório de Anatomia Patológica e Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Câmpus de Araçatuba, onde os fragmentos foram embebidos em parafina⁵³ e cortados em micrótomo⁵⁴ à quatro micrômetros (µm) de espessura.

As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e com tricrômico de Gomori⁵⁵ e analisadas ao microscópio de luz⁵⁶ para avaliação descritiva. A HE serviu para se avaliarem eventos relacionados com congestão, edema, hemorragia, infiltração de células inflamatórias e vascularização corneal. Com o tricrômico de Gomori buscou-se avaliar a deposição de colágeno. A infiltração de células inflamatórias, na área da lesão, foi classificada, subjetivamente, em leve, moderada e intensa. O grau de epitelização recobrimo a área da lesão, foi classificado em completo ou

⁵⁰ Diprivan® Astra Zeneca do Brasil LTDA.

⁵¹ Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil

⁵² Formol-solução 10% Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA.

⁵³ Parafina/ Petrobrás, Rio e Janeiro, RJ.

⁵⁴ Micrótomo/RJUNG-Heidelberg.

⁵⁵ Merck-Brasil, Rio de Janeiro, RJ.

⁵⁶ Olympus BX400/Microscópio Óptico- Leica.

incompleto. O estroma foi avaliado quanto à organização das fibras colágenas. Todas as análises foram feitas por um único examinador.

3.9.2 Imuno-histoquímica na detecção da proliferação celular (Ki-67)

Etapa realizada no Laboratório de Diagnóstico em Patologia Molecular Veterinária e Pesquisa (VETMOL), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Câmpus de Botucatu. A imuno-histoquímica foi realizada a partir dos mesmos blocos de parafina confeccionados para a histologia.

Cortes foram acondicionados em lâminas silanizadas⁵⁷ e desparafinados em dois banhos consecutivos (vinte minutos cada) de Xilol PA⁵⁸, por vinte minutos cada. Em seguida, foram imersos em álcool etílico (três banhos de três minutos cada) e, posteriormente lavados em água deionizada⁵⁹ para a remoção de traços do álcool.

A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato⁶⁰, pH 6,0, em panela de pressão⁶¹, por quinze minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução peroxidase⁶². Lâminas foram lavadas com tampão PBS/Tween20xPBT125⁶³. As proteínas endógenas (sítios inespecíficos de marcação) foram bloqueadas com solução de bloqueio de proteína⁶⁴. O anticorpo anti-Ki-67, clone MIB-1⁶⁵, foi diluído em tampão PBS/Tween 20xPBT125 à titulação de 1:50 µL e acondicionado em tubo de “ependorff”, tendo, como método, o quantitativo de 100 microlitros da solução final por lâmina. As lâminas foram incubadas, com o anticorpo, em esponjas umedecidas e permaneceram em temperatura ambiente (25 °C), por 45 minutos. Posteriormente, foram lavadas em tampão PBS/Tween 20xPBT125,

⁵⁷StarFrost®, Biogen, São Paulo, SP.

⁵⁸Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil

⁵⁹Deionizador de Água 50 L/H (Spencer Scientific Brasil, Santo André, São Paulo, Brasil

⁶⁰Labsynth, Diadema, São Paulo, Bras

⁶¹Pascal Dako® do Brasil, São Paulo, SP.

⁶²Spring® SBP125, Pleasanaton, CA, EUA.

⁶³Spring® SBP125, Pleasanaton, CA, EUA.

⁶⁴Spring® SBP125, Pleasanaton, CA, EUA.

⁶⁵Dako® do Brasil, São Paulo, SP.

por cinco minutos. Para revelar a reação, empregou-se o polímero Histofine®⁶⁶ e o cromógeno diaminobenzidina (DAB)⁶⁷, por dez a quinze minutos, até o aparecimento de reação colorimétrica. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, por um minuto, lavadas em água destilada, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Goma de Damar⁶⁸. Amostras incubadas com meio de diluição, sem anticorpo primário, foram usadas como controles negativos. Cortes de linfonodos normais de coelhos foram usados como controles positivos. A constatação, quanto à ocorrência de imunomarcação, se deu pela observação de núcleos evidentes e acastanhados localizados no epitélio corneal. As avaliações foram feitas em microscópio de luz com aumento de 400x.

3.10 ESTATÍSTICA

Variáveis clínicas categóricas foram comparadas empregando-se o teste exato de Fisher. Os resultados apresentados como porcentagem. Diferenças foram consideradas significativas, quando p menor que 5%, com intervalo de confiança de 95% (± 2 EP). Todos os cálculos e comparações estatísticas foram implementados em “softwares”⁶⁹.

⁶⁶SimpleStain MAX PO MULTI, Biogen, São Paulo, Brasil

⁶⁷Spring® SPB125, Pleasanaton, CA, EUA..

⁶⁸Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil.

⁶⁹Minitab 12™ San Diego, USA e MedCalc 9.3 -MedCalc Inc, Mariakerke, Belgium.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

No grupo OM encontrou-se secreção ocular intensa do tipo mucoso, do primeiro até o 7^o dia, decrescendo ao 14^o, quando foi moderada, para desaparecer nos períodos subsequentes (Apêndice 3 A e Tabela 1). Relativamente ao blefarospasmo, a variação de intensidade deu-se de moderada a discreta, segundo a evolução temporal. Decorreu hiperemia conjuntival intensa a partir do 3^o dia, tendendo ao desaparecimento ao 14^o dia de observação. Quemose de moderada a intensa foi observada no período inicial de avaliação, com tendência ao desaparecimento (Tabela 1 e Apêndice 3 B). Opacidade corneal de discreta a moderada foi vista no início da avaliação, desaparecendo no interregno de sete a 10 dias, ocasião em que se observou deiscência dos pontos de fixação da MA e do omento, em todos os animais deste grupo (Apêndice 3 C e D). Observou-se nenhuma vascularização em todos os momentos de observação

Nos indivíduos do grupo OMC, verificou-se discreta secreção do tipo mucosa a partir do 3^o dia de observação, que assim se manteve até o 14^o dia (Tabela 1 e Apêndice 4 A). Hiperemia conjuntival, do tipo moderada, esteve presente até o 60^o dia de observação. Apenas ao primeiro dia de coleta de informações, houve quemose, que fora discreta. Blefarospasmo em intensidade moderada ocorreu do 3^o ao 7^o dias de pós-operatório ($p < 0,001$). Discreta opacidade foi observada em todos os períodos de observação, não desaparecendo aos 60^o dia (Apêndice 4 B e Tabela 1). Observou-se vascularização a partir do 14^o dia, até o final do período de acompanhamento estando presente ao 60^o dia. (Apêndice 4 C e Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição da ocorrência dos parâmetros avaliados na evolução de ceratoplastias lamelares, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, que receberam enxerto de omento (OM) ou membrana amniótica com células do omento (OMC).

Parâmetros	Período pós-operatório														
	3 ^o dia		7 ^o dia		14 ^o dia		30 ^o dia		60 ^o dia		P				
	OM	OMC	OM	OMC	OM	OMC	OM	OMC	OM	OMC					
Blefarospasmo	93.3	85.7	0.597	58.3	66.6	1	22.2	66.6	0.619	0	0	---	0	0	---
Secreção ocular	46.6	78.5	0.128	0	75	0.000	0	0	---	0	0	---	0	0	---
Quemose	100	85.7	0.224	100	75	0.217	100	55.5	0.082	16.6	16.6	1	16.6	16.6	1
Quemose	100	7.14	<0.000	75	0	0.000	66.6	0	0.009	0	0	---	0	0	---
Hiperemia conjuntival	0	0	---	0	0	---	0	100	---	0	100	---	0	100	---
Vascularização corneal															
Opacidade corneal	80	71.4	0.681	41.6	41.6	1	33.3	44.4	1	0	33.3	0.454	0	33.3	0.454

Fonte: A autora (2014).

4.2 AVALIAÇÃO À MICROSCOPIA

4.2.1 Histologia

Evidenciou-se ao 3^o dia de pós operatório, nas córneas de ambos os grupos, ausência de epitélio nas áreas de lesão (Apêndice 5 e 6 A), bem como desorganização estromal proeminente com presença de polimorfonucleares. Observou-se no grupo OMC, vestígios de MA, ao 3^o dia. Ao 7^o dia, evidenciou-se edema (Apêndice 5 B) e áreas de hiperplasia epitelial, acentuadamente no grupo OM. No interregno do 7^o ao 14^o dias, encontraram-se, em ambos os grupos, células polimorfonucleares e desorganização estromal (Apêndice 5 e 6 C). No grupo OMC, ao 7^o dia de pós operatório, as córneas apresentaram-se com áreas incompletas e imaturas de epitelização revestindo parcialmente o estroma corneal desorganizado (Apêndice 6 B). Em uma amostra do grupo OMC, encontraram-se ilhas de epitélio invadindo o estroma e entremeando as fibras colágenas (Apêndice 6 B). Ao 30^o dia, todas as córneas, de ambos os grupos, mostraram-se reepitelizadas, com evidência de vascularização leve nas amostras do grupo OMC (Apêndice 6 C), perdurando até o 60^o dia de avaliação (Apêndice 6 D). Nas amostras do grupo OM encontraram-se estratificação epitelial e organização estromal (Apêndice 6 D e Apêndice 7).

4.2.2 Imuno-histoquímica

Em ambos os grupos as células imunomarcadas concentraram-se no epitélio (Apêndice 8). O número de células positivas para Ki-67 variou segundo o do grupo e do tempo de evolução da reparação corneal. Houve expressão reduzida para ambos os grupos, nos períodos compreendidos entre o 3^o e o 14^o dias, com aumento da imunomarcagem no 30^o dia. Ao final do período de observação, o grupo OMC apresentou quantitativo acentuado de células imunomarcadas, comparativamente ao grupo OM.

5 DISCUSSÃO

O omento tem sido sobejamente empregado em cirurgias reconstrutivas. Estudos comprovaram sua capacidade em controlar a propagação de inflamação e infecções peritoneais além de promover vascularização e reparação tecidual (PLATELL *et al.*, 2000; COLLINS *et al.*, 2009; SHA *et al.*, 2012). Rotineiramente, cirurgiões utilizam-no sob a forma de retalho pediculado, que pode ser tunelizado no subcutâneo até o sítio da lesão alvo (ITO, 2008; FERRIGNO *et al.*, 2010). Como ineditismo, nesta pesquisa, fragmentos de omento livre (*i.e.*, não pediculado) e células isoladas do omento foram utilizados, em associação à MA, visando-se a reparar lesões corneais.

A aplicação de tecidos livres ou de membranas, em ceratoplastias lamelares, é prática corriqueira. Dificuldades interpõem-se quanto à escolha, à obtenção e ao processamento de materiais justificando a busca por novas opções. Há relatos sobre o emprego de MA, da membrana de celulose, da cápsula renal, da escama de sardinha e do pericárdio bovino (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000; ANDRADE; LAUS; FIGUEIREDO-FLORENCIO, 1999; BARROS; SAFATLE; RIGUIERO, 1999;). Omento livre pode ser facilmente colhido durante cirurgias abdominais eletivas ou por procedimentos videolaparoscópicos. Por se tratarem de células imunoprivilegiadas não é imprescindível que sejam de origem autógena, como ficará confirmado pelos resultados da presente pesquisa (GÖTHERSTRÖM, 2007; JONES; McTAGGART, 2008; SHAH *et al.*, 2012).

Ainda que considerado tecido gorduroso, o omento possui conjuntivo rico em colágenos, em fibras do sistema elástico, fibras reticulares e glicosaminoglicanos (PORZIONATO; MACCHI; DE CARO 2013). A composição o coloca em condições de exploração, mesmo estando em glicerina, como biomaterial. Estudos prévios recomendaram, todavia, procedimentos em criopreservação ou em liofilização para conservação de tecidos gordurosos (PU, 2009). Em favor do omento livre, como biomaterial, Porzionato *et al.* (2013) propuseram técnicas, voltadas ao seu

processamento, visando-se obterem arcabouços para aplicação em medicina regenerativa.

A glicerina 98% é o meio de conservação mais empregado em Veterinária. Além da simplicidade técnica, do baixo custo e da efetividade consagrada, protege os tecidos biológicos da ação de bactérias Gram negativas (BARROS *et al.*, 1995; SAMPAIO *et al.*, 2006; PONTES *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2013). Sabe-se que implante, após conservação em glicerina 98% integram-se ao leito receptor com a participação de fibroblastos, sem que sejam rejeitados.

Na presente pesquisa constatou-se que a utilização de omento livre com enxerto passa por dificuldades quanto à sua fixação no leito receptor. Por sua fragilidade, a fixação fica condicionada à associação a um tecido de suporte. Optou-se pela MA por se tratar de implante desde há muito utilizado em oftalmologia médica e veterinária. Sua escolha foi lastreada por casuísticas expressivas quanto às aplicações como tecido de suporte para biomateriais de origem animal, especialmente corneolimbais (PELLEGRINI *et al.*, 1997; DUA *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2004; PANG; DU; WU, 2010).

Concebeu-se, nesta pesquisa, a ideia de que associar omento livre com MA, uma vez que a MA, por citações da literatura, foi também utilizada para o carreamento de células do omento à córnea. Outra condição considerada foi a riqueza e o detalhamento de dados disponibilizados, que serviriam como controle externo de resultados da pesquisa.

Indicações para o transplante de MA associada a outros tecidos, preferencialmente os contendo células progenitoras ou fatores de crescimento, vão desde o tratamento de úlceras profundas até a deficiência limbal e os defeitos epiteliais persistentes (MA *et al.*, 2006; SHORT *et al.*, 2008; RICARDO; GOMES, 2010; LAN *et al.*, 2012). Benefícios adicionais, em comparação ao uso clínico de MA isoladamente, podem advir do aumento da concentração ou da ação sinérgica de fatores de crescimento, de citocinas, de interleucinas e de outras moléculas solúveis estimuladoras da migração celular, do estabelecimento e do suporte de sítios de contato célula-célula e célula-matriz envolvidos na reparação; na reposição e no recrutamento *in situ* de células hábeis para sinalização parácrina ou com alta atividade

proliferativa (PELLEGRINI *et al.*, 1997; DUA *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2004; PANG; DU; WU, 2010).

Em decorrência da inexistência de dados comparativos quanto às propriedades do omento na reparação de lesões corneais, não há como afirmar por qual via ele pode ter atuado na reepitelização corneal. Não obstante, observou-se, à histopatologia, reorganização gradual de fibras de colágeno consistentes com restabelecimento de microambiente estromal e, por conseguinte, de sítios de interação célula-matriz necessários à reepitelização. Reepitelização ou proliferação de células epiteliais envolve, entre outros fatores, remodelação de moléculas de adesão e, na presente pesquisa, o grau de estratificação alcançado sugere que houve biossíntese dessas moléculas (WOO *et al.*, 2001).

Os resultados demonstraram que em ambos os grupos entre o 3^o e 7^o dias de pós-operatório, houve intensa reação inflamatória, com invasão por polimorfonucleares na área da lesão, ausência de epitélio e desorganização estromal. Tais achados corroboram com os de outros autores, que informaram que a epitelização completou-se entre o décimo e décimo quarto dia (MONTEIRO *et al.*, 2000; GODOY, C. A. L, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2006; CREMONINI *et al.*, 2007 GODOY-ESTEVEZ *et al.*, 2013). Monteiro *et al.* (2000) constataram completa epitelização em córneas tratadas com membrana homóloga ou não, aos 07 dias, sem diferenças qualitativas ou no tempo de reparação, mas nos eventos inflamatórios (edema, vascularização) mais acentuados no grupo sem membrana amniótica.

Adjunto ao emprego como biomaterial avaliou-se o omento como fonte de células progenitoras destinadas à reparação corneal. Ele foi submetido a protocolo de cultivo validado para a extração de células tronco mesenquimais (DANOVIZ *et al.*, 2011a).

Estudos demonstraram que o omento contém células tronco mesenquimais (PLATELL *et al.*, 2000; GÓMEZ-GIL *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2012). A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu critérios para o reconhecimento dessa linhagem celular. Células tronco mesenquimais devem ser plásticas-aderentes; expressarem (>95%) os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90; não expressarem (<2%) marcadores de células hematopoéticas e endoteliais; e manterem habilidade para

diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006; KOLF; CHO; TUAN, 2007). Considerando-se que na presente pesquisa, apenas dois dos critérios acima puderam ser avaliados (adesão à garrafa plástica usada para cultivo e expressão de CD90), optou-se pela denominação “progenitoras mesenquimais”.

O termo progenitora abrange todas as células indiferenciadas de um tecido adulto; seu emprego constitui medida acauteladora e adéqua-se às situações cuja fenotipagem mínima para definir uma célula como tronco não fora alcançada. Admite-se que células progenitoras guardam características fenotípicas com as células tronco, porém, ocupam posição intermediária entre as células tronco verdadeiras e as diferenciadas (SEABERG; VAN DER KOOY; 2003). A principal diferença seria que células progenitoras podem se replicar apenas em um número limitado de vezes; enquanto que as células tronco podem se dividir indefinidamente. Há controvérsias sobre a definição exata do que são células progenitoras, conquanto os conceitos estão evoluindo. Alguns autores creem que elas derivem do recrutamento das células tronco; enquanto outros não separam esses dois tipos celulares.

Dados em morfologia e em citometria de fluxo mostraram que a população celular isolada do omento e expandida em cultura, para posterior transferência a MA, era mista, composta não apenas por progenitoras. Esse achado corrobora com os de Singh *et al.* (2008) que, também, observaram perfis celulares distintos no omento, em que 90% das células eram adiposas. As demais eram estromais, intersticiais e endoteliais.

Admite-se que a presença de células diferenciadas, em culturas de omento, se deve à manipulação excessiva dos tecidos, bem como ao tempo transcorrido entre a coleta e o estabelecimento do cultivo celular (RIERA *et al.*, 2006). Na presente pesquisa, contudo, o omento foi processado trinta minutos após sua remoção cirúrgica. Não é possível afirmar se as células não progenitoras encontradas nas culturas de omento provêm do tecido *in vivo*, de diferenciação *ex vivo* ou de ambos. Dificuldades se interpõem quanto ao isolamento de células progenitoras mesenquimais, dependendo do tecido escolhido como fonte doadora. Relativamente ao omento, não há relatos sobre estudos comparando a efetividade de diferentes protocolos de cultivo celular. Adiciona-se a dificuldade já relatada por Dudas *et al.* (2008) sobre a

falta de marcadores específicos de célula tronco mesenquimal no coelho, entre outras espécies.

Proliferação celular acentuada foi observada com o ki-67, nos estágios finais do processo de reparação de córneas que receberam MA contendo células do omento. O Ki-67 é um antígeno expresso durante o ciclo celular (CRESTA; ALVES, 2007). Sua meia-vida é curta, perdurando por menos de uma hora após a mitose, o que garante imunomarcagem apenas de células que tenham concluído o ciclo celular (CRESTA; ALVES, 2007). Não se pode estabelecer a origem das células em proliferação. Segundo dados da literatura, células progenitoras mesenquimais, após transplantação, têm sobrevivência curta (SIQUEIRA, 2009). Não é esperado que a atuação de células progenitoras adultas, em processos de reparação, envolva diferenciação e a proliferação. Admite-se que elas atuem secretando moléculas de sinalização, que incitam o recrutamento ou ativação de células remanescentes do próprio tecido lesado; ou seja, ceratócitos, células basais do epitélio corneal; células tronco do limbo corneoescleral e células do fórnice conjuntival (MAJO *et al.*, 2008; DUA *et al.*, 2009).

Em todas as córneas do grupo OMC constatou-se, a partir do 14^o dia, vascularização que fora mantida até o 60^o dia de observação. Infere-se que esse achado possa ser atribuído a MA xenógena, como constatado por Godoy-Esteves *et al* (2013) que encontrou maior grau de infiltrado inflamatório e vascularização, com diferença estatisticamente significativa, em MA humana se comparada com MA halógena em ceratoplastia lamelar em coelhos. Deve-se considerar também que o omento expressa fator de crescimento endotelial (GÁRCIA-GÓMEZ *et al.*, 2005), todavia, células progenitoras tem sobrevivência curta após implantação na cornea, fato este que diminui a probabilidade de serem estas, na presente pesquisa, as responsáveis pelo surgimento tardio da vascularização (MA *et al.*, 2006; LAN *et al.*, 2012). Pesquisadores que utilizaram MA em superfície corneal como implante removeram os pontos em um período de 12 horas a uma semana após o procedimento (KIM; TSENG, 1995; NAKAMURA *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2001), dessa forma, é possível especular que a vascularização encontrada no grupo OMC ocorreu devido a presença do fio de sutura até os períodos finais de observação.

Ao sétimo dia de pós operatório, uma amostra do grupo OMC apresentou ilhas de epitélio dentro do estroma, entre as fibras colágenas. Barbosa *et al.* (2013) atribuem esse achado ao carreamento de células epiteliais da córnea para a MA no momento da sutura. Entretanto, outros autores observaram evento semelhante em culturas celulares, denominando-o de transição epitélio-mesênquima (KAWAKITA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007). Transição epitélio-mesênquima foi observada em culturas estabelecidas com explantes de limbo (em substrato colágeno e em MA) ou com suspensão de células humanas indiferenciadas da polpa dentária (KAWAKITA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2010) e, ainda, em implantes de MA equina em ceratoplastias lamelares em cães (BARBOSA *et al.*, 2013). Acredita-se que esse evento reflita um processo muito ativo de recrutamento celular, estando associado com desenvolvimento tecidual normal, processos reparativos ou neoplásicos (MICALLIZZI, FARABAUGH; FORD, 2010). Indução de neoplasias tem sido associada com terapias celulares.

Alguns autores defendem o uso de omento ativado como fonte doadora de células mesenquimais, ao invés de omento inativo, como o empregado na presente pesquisa (SINGH *et al.*, 2008; REQUICHA *et al.*, 2012). Por este ser o primeiro estudo visando a avaliar células do omento na reparação corneal, houve a intenção, fazê-lo na forma inativada ou minimamente manipulada, para futuramente realizá-lo segundo outras técnicas.

6 CONCLUSÕES

Considerando-se a maneira como a pesquisa fora concebida e os resultados que dela foram obtidos, admite-se que a membrana amniótica de cão, servindo como substrato para carreamento de células progenitoras mesenquimais do omento de coelho, cultivadas a partir de omento não ativado de coelhos, contribuiu para a ocorrência de reparação corneal desejável, com mínima cicatriz.

Não é possível recomendar o uso do omento (tecido) conservado em glicerina a 98% para uso em ceratoplastia lamelar .

7 REFERÊNCIAS

- ADDS, P. J.; HUNT, C. J.; DART, J. K. G. Amniotic membrane grafts, fresh or frozen? A clinical and vitro comparison. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, p. 905-907, 2001.
- ALAGUMUTHU, M.; DAS, B. B.; PATTANAYAK, S. P. The omento: a unique organ of exceptional versatility. **Indian Journal Surgery**, v. 68, n. 3, p. 136-141, 2006.
- ANDRADE, A. L.; LAUS, J. L.; FIGUEIREDO-FLORENCIO, B.C.M. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.2, p.79-82, 1999.
- ANDRADE, A. L. **Efeitos da membrana amniótica humana sobre a cicatrização de córnea de coelhos submetidos a traumas mecânicos e químicos: aspectos clínicos, morfológicos e bioquímicos**. 2003. 253 f. Tese (Doutorado em Cirurgia)-Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- ANDRADE, A. L.; GOMES, J. A. P.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V.; CAMPOS, M. Aspectos Clínicos e morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p. 127-142, 2009.
- AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, v. 83, p.399-402, 1999.
- BAIGUERA, S.; JUNGEBLUTH, P.; MAZZANTI, B.; MACCHIARINI, P. **Transplant International**, v. 25, n. 4, p. 369-82, 2012.
- BLANDE, I. S.; BASSANEZE, V.; LAVINI-RAMOS, C.; FAE, K. C.; KALIL, J.; MIYAKAWA, A. A.; SCHETTERT, I. T.; KRIEGER, J. E. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free médium supplement ed with autologous human plateletly sate. **Transfusion**, v. 49, n. 12, p. 2680-5, 2009.
- BARBOSA, A.; BARROS, P. S. de M.; GUERRA, J. L.; OTSUKI, D. A. Ceratoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica equina. Estudo clínico e morfológico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 211-219, 2013.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; MALERBA, T. A.; BURNIER JR., M. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprosthesis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32, n. 4, p. 251-255, 1995.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; RIGUEIRO, M. Uso do pericárdio eqüino conservado em glicerina como enxerto penetrante da córnea em cães. Estudo experimental. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.34, p.138-141, 1997.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; RIGUEIRO, M. Experimental lamellar corneal graft in dogs using preserved equine pericardium. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 6, p. 304-307, 1999.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; GODOY, C. A.; SOUZA, M. S. B.; BARROS, L. F. M.; BROOKS, D. E. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of ocular surface in three cases. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.3, p.189-192, 2005.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **International Journal Biochemical Cells Biological**, v. 36, p. 568-584, 2004.

BASSANEZE, V.; BARAUNA, V. G.; LAVINI-RAMOS, C., KALIL, J.; SCHETTERT, IT; MIYAKAWA, A. A.; KRIEGER, J. E. Shear stress induces nitricoxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 3, p. 371-8, 2010.

BOEVÉ, M. H.; STADES, F. C. Diseases and surgery of the canine vitreous. In: GELATT, K. N. (Ed.). **Veterinary ophthalmology**. 4th ed. Oxford: Blackwell, 2007. p. 932-943.

BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.; ROMAN, J. A.; MENTA, C.; ATKINSON, E. A.; MACHADO, C. D.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G. L.; BAES, C. V. W.; SILVA, V. D., COSTA, J. C. Efeito das células tronco mesenquimais adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n.5, p. 273-275, 2006.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research.**, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.

CAPLAN, A. I. All MSCs are pericytes? **Cell Stem Cell**, v. 3, p. 229-230, 2009.

CHEN, W.; LI, Z.; HU, J.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; CHEN, Y.; LIU, Z. Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 26103, 2011.

COLLINS, D.; HOGAN, A. M.; O'SHEA, D.; WINTER, D. C. The omentum: anatomical, metabolic, and surgical aspects. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 13, n. 6, p. 1138-46, 2009.

CREMONINI, D. N.; RANZANI, J. J. T.; MARQUES, M. E. A.; RODRIGUES, G. N.; BRANDÃO, C. V. S. Transplante de membrana amniótica canina criopreservada para cicatrização de córnea com deficiência de células límbicas em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1462-1467, 2007.

CRESTA, F. B.; ALVES, M. R. Avaliação da cinética do epitélio corneano com marcadores de proliferação celular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 6, p. 953-60, 2007.

DANOVIZ, M. E.; NAKAMUTA, J. S.; MARQUES, F. L. N.; SANTOS, L. dos; ALVARENGA, E. C. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 12077, 2011a.

DANOVIZ, M. E.; BASSANEZE, V.; NAKAMUTA, J. S.; SANTOS JUNIOR G. R. dos; SAINT-CLAIR, D.; BAJGELMAN, M. C.; FAÉ, K. C.; KALIL, J.; MIYAKAWA, A. A.; KRIEGER, J. E. Adipose tissue-derived stem cells from human sand mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 4, p. 661-70, 2011b.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M. Avanços no estudo de células tronco no Brasil e suas implicações. **Revista Ceres**, v. 56, p. 446-450, 2009.

DE KRETZER, D. de. Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology. **Journal of Law and Medicine**, v.15, n. 2, p. 212-218, 2007.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G. R.; VAN SOOM, A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1431-43, 2011.

DOMINICI M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. M.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI. F. C.; KRAUSE, D. S; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J. HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey of Ophthalmology**, v. 44, n. 5, p. 415-425, 2000.

DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; KING, A. J.; MAHARAJAN, V. S. The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, p. 51-77, 2004.

DUA, H. S.; MIRI, A.; ALOMAR, T.; YEUNG, A. M.; SAID, D. G. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: testing the dogma. **Ophthalmology** v. 116, n. 5, p.856-63, 2009.

DUDAS JUNIOR, L. J. E.; PENASCINO, V. M.; SMITH, D. M.; COOPER, G. M.; MOONEY, M. P.; JIANG, S.; RUBIN, J. P.; MARRA, K. G. Leporine-derived adipose precursor cells exhibit in vitro osteogenic potential. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 19, n. 2, p. 360-8, 2008.

ENDO, K.; NAKAMURA, T.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the $\alpha 5$ chain of type iv collagen. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, p. 1771-1774, 2004.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154-156, 1981.

FERREIRA, G. T. N. M.; SOUZA, T. F. B.; SAKAMOTO, S. S.; SILVA, T. C. C.; ANDRADE, A. L. Aspectos clínicos do enxerto conjuntival 360° e do implante da membrana amniótica criopreservada no tratamento de úlceras de córnea em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1239-1252, 2013.

FERRIGNO, C. R. A.; ITOR, K. C.; CAQUIAS, D. F. I.; MARIANI, T. C.; DELLA NINA, M. I.; FERRAZ, V. C. de M.; ROMANO, O. da C. L. Retalho de omento maior para indução de vascularização e consolidação óssea em cão. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.2033-2036, 2010.

FLECKNELL, P. A. Laboratory animals. In: TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C. (Eds). **Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p.765-784.

FRITSCH, M.; BAPTISTA, L. C.; PASQUALOTTO, F. F.; PASQUALOTTO, E. B. Células tronco mesenquimais: aspectos gerais. In: PASQUALOTTO, F. F. **Células-tronco: visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. cap. 1, p. 19-82.

FOSSUM, T. W. (Ed.) **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002.

GARCIA, J. A.; BARROS, P. S. M.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; SAFATLE, A. M. V. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 33, p. 290-294, 1996.

GARCÍA-GÓMEZ, I.; GOLDSMITH, H. S.; ÂNGULO, J.; PRADOS, A.; LÓPEZ-HERVÁS, P.; CUEVAS, B.; DUJOVNY, M.; CUEVAS, P. Angiogenic capacity of human omental stem cells. **Neurological Research**, v. 27, n. 8, p. 807-11, 2005.

GELATT, K. N. Doenças e cirurgia da cornea e sclera do cão. In: _____. **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2003. cap. 7, p. 125-164.

GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 4nd. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.

GODOY, C. A. L.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal eqüina como enxerto: estudo experimental. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v. 65, n. 5, p. 545-549, 2002.

GODOY, C. A. L. **Estudo comparativo da utilização de membranas amnióticas de coelha e humana como enxerto em ceratoplastia lamelar em coelhos**. 2005. 94 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GODOY-ESTEVEZ, C. A. L.; GOMES, J. Á. P.; YAZBEK, K.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Lamellar keratoplasty in rabbits using human and rabbit amniotic membrane grafts: a comparative study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. 3, p. 12109-13, 2013.

GOLDIN JUNIOR, F. Código de Nuremberg. Os comitês de ética hospitalar. **Revista de Medicina ATM**, v. 15, n. 1, p. 327-334, 2005.

GOMES, J. A. P.; PIRES, R. T. F.; ALVES, M. R. (Eds). **Doenças da superfície ocular: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002.

GOMES, J. A. P.; GODOY-ESTEVEZ, C. A. L.; YASBEK, K.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Human vs rabbit amniotic membrane to be used as graft for induced corneal thinning in rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, p. 3947, 2006.

GOMES, J. A. P.; MONTEIRO, B. G.; MELO G. B.; SMITH R.L.; PEREIRA DA SILVA M.C.; LIZIER N.F.; KERKIS A.; CERRUTI H.; KERKIS I. Corneal reconstruction with issue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. **Invest Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 3, p. 1408-14, 2010.

GÓMEZ-GIL, V.; PASCUAL, G.; GARCÍA-HONDUVILLA, N.; RODRÍGUEZ, M.; BUJÁN, J.; BELLÓN, J. M. Characterizing omental adhesions by culturing cells isolated from a novel in vivo adhesion model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 1, p. 51-61, 2009.

GÖTHERSTRÖM, C. Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells. **Transplantation**, v. 15, n. 84, suppl. 1, 2007.

GRANT, M. B.; MAY, W. S.; CABALLERO, S.; BROWN, G. A.; GUTHRIE, S. M.; MAMES, R. N.; BYRNE, B. J.; VAUGHT, T.; SPOERRI, P. E.; PECK, A. B.; SCOTT, E. W. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. **Natural Medicine**, v.8, p.1004-1010, 2002.

HEINZ, C.; ECKSTEIN, A.; STEUHL, K. P.; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of corneal ulcer in Graves ophthalmopathy. **Cornea**, v. 23, n. 5, p. 524-526, 2004.

HERBERTS, C. A.; KWA, M. S.; HERMSEN, H. P. Risk factors in the development of stem cell therapy. **Journal of Translation Medicine**, v. 22, p. 9-29, 2011.

HERRICK, S. E.; MUTSAERS, S. E. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 4, p. 621-42, 2004.

HIGA, K.; SHIMMURA, S.; KATO, N.; KAWAKITA, T.; MIYASHITA, H.; ITABASHI, Y.; FUKUDA, K.; SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineer edwith or with outan amniotic membran ecarrier. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 48, n. 2, p. 597-604, 2007.

ITO, K. C. **Avaliação do alcance de retalho pediculado de omento maior através de túnel subcutâneo para ossos longos em cães**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2008.

JONES, B. J.; McTAGGART, S. J. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 6, p. 733-41, 2008.

KANAMORI, T.; WATANABE, G.; YASUDA, T.; NAGAMINE, H.; KAMIYA, H.; KOSHIDA, Y. Hybrid surgical angiogenesis: omentopexy can enhance myocardial angiogenesis induced by cell therapy. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 81, n. 1, p. 160-70, 2006.

KAWAKITA, T.; ESPANA, EM.; HE, H.; LI, W.; LIU, C. Y.; TSENG, S. C. Intrastromal invasion by limbal epithelial cells is mediated by epithelial-mesenchymal transition activated by air exposure. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 2, p. 381-93, 2005.

KERKIS, A.; SOUKOIAN, M.; KERKIS, I.; MERKEL, C.; MELLO, M. R. B.; PEREIRA, L. V. Células-tronco embrionárias. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 20, p. 20-25, 2001.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; GOMES; MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cell sex pressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n.3-4, p. 105-16, 2006.

KICIC, A.; SHEN, W.; WILSON, A. S.; CONSTABLE, I. J.; ROBERTSON, T.; RACKOCZY, P. E. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 21, p. 7742-7749, 2003.

KIM, J. S.; TSENG, S. C. G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v. 14, n.5, p. 473-484, 1995.

KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; QUANTOCK, A. J.; FULLWOOD, N. J.; DOTA, A.; KINOSHITA, S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. **Cornea**, v.19, n. 1, p. 65-71, 2000.

KOIZUMI, N.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N. J.; KAWASAKI, S.; TANIOKA, H.; KOIZUMI, K. N.; JOUSSEN, A. M.; KINOSHITA, S. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 245, n.1, p. 123-134, 2007.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. 204-213, 2007.

LAN, Y.; KODATI, S.; LEE, H. S.; OMOTO, M.; JIN, Y.; CHAUHAN, S. K. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 14, n. 53/7, p. 3638-44, 2012.

LAUS, J. L.; FERREIRA A. L.; ANDRADE, A. L. The use of the sardine scale (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), preserved in glicerine, in experimental lamellar keratoplasties in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, 2000.

LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009.

LEE, S. H.; TSENG, S. C. G. Amniotic Membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **Animal Journal of Ophthalmology**, v.123, p.303-12, 1997.

LEVASHEV, Y. N.; AKOPOV, A. L.; MOSIN, I. V. The possibilities of greater omento usage in thoracic surgery. **European Journal Cardiothoracic Surgery**, v.15, p. 465-480, 1999.

LI, W.; HAYASHIDA, Y.; HE, H.; KUO, C. L.; TSENG, S. C. The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 2, p. 605-13, 2007.

MA, Y.; XU, Y.; XIAO, Z., YANG, W., ZHANG, C., SONG, E., DU, Y., LI, L. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 315-21, 2006.

MADIBA, T. E.; NAIR, R.; MULAUDZI, T. V.; THOMSOM, S. R. Perforated gastric ulcer – Reappraisal of surgical options. **South African Journal Surgery**, v. 43, p. 58-60, 2005.

MAJO, F.; ROCHAT, A.; NICOLAS, M.; JAOUDE, G. A.; BARRANDON, Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface, **Nature**, v. 13, n. 456, p. 250-254, 2008.

MEIRELLES, L. da S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 26, p. 2287-2299, 2008.

MELLER, D.; PIRES, R. T. F.; TSENG, S. C. G. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 86, p. 463-471, 2002.

MELO, G. B.; GOMES, J. A. P.; GLÓRIA, A. M.; MARTINS, M. C.; HAAPALAINEN, E. F. Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da membrana amniótica humana. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 70, n. 3, p. 407-11, 2007.

MENDES, D.; KAHN, M.; IBRAHIM, I. M.; SUSSMAN, B.; FOX, R.; DARDIK, H. Omental protection of autogenous arterial reconstruction following femoral prosthetic graft infection. **Journal Vascular Surgery**, v. 2, p. 603-606, 1985.

MICALLIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117-34, 2010.

MILLER, W. W. Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 51-57, 2001.

MONTEIRO, E. C. L.; SCHELLINI, S. A.; MARQUES, M. E. A.; KAMEGASAWA, A.; PADOVANI, C. R. Tratamento da úlcera corneana experimental com membrana amniótica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 63, n. 1, p. 33-37, 2000.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 287-298, 1997.

NAKAMURA, T.; ENDO, K.; COOPER, L. J.; FULLWOOD, N. J.; TANIFUTI, N.; TSUZUKI, M.; KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; SANO, Y.; KINOSHITA, S. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 1, p. 106-116, 2003.

NAKAMURA, T.; YOSHITANI, M.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N. J.; ITO, W.; INATOMI, T.; SOTOZONO, C.; NAKAMURA, T.; SHIMIZU, Y.; KINOSHITA, S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface construction. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, p. 93-99, 2004.

NARFSTRÖM, K.; OFRI, R. Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 10-22, 2007.

NARFSTRÖM, K.; DECKMAN, K. H.; MENOTTI-RAYMOND, M. The domestic cat as large animal model for characterization of disease and therapeutic intervention in hereditary retinal blindness. **Journal of Ophthalmology**, v. 2011, p. 8, 2011.

NAUTA, A. J.; WESTERHUIS, G., KRUISSELBRINK, A. B.; LURVINK, E. G.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 2114-20, 2006.

OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L. Células-tronco e marcadores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 2006, Santos, SP. **Resumos**, Santos: JBCV, 2006, p. 26-28.

PANG, K.; DU, L.; WU, X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. **Biomaterials**, v. 28, p. 7257-65, 2010.

PATRÍCIO, L. F. L.; REBELATTO, C. L. K.; BROFMAN, P. R. S.; MACIEL, B. B.; BELTRAME, O. C.; BRITO, H. F. V.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 946-954, 2013.

PELLEGRINI, G.; TRAVERSO, C. E.; FRANZI, A. T.; ZINGIRIAN, M.; CANCCEDA, R.; DE LUCA, M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. **The Lancet**, v. 349, n. 9057, p. 990-3, 1997.

PEPTAN, I. A.; HONG, L.; MAO, J. J. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 15, n. 117/5, p. 1462-70, 2006.

PINTO FILHO, S. T. L.; TREICHEL, T. L. E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J. S.; ROSA, M. B. da R.; DALMOLIN, F.; BRUN, M. V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N. L. Células-Tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 49-50, 2013.

PLATELL, C.; COOPER, D.; PAPADIMITRIOU, J. M.; HALL, J. C. The omentum. **World Journal Gastroenterology**, v. 6, n. 2, p. 169-176, 2000.

PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; DUARTE, T. S.; MORAT, G. L.; ZAVAN, V.; ELEOTÉRIO, R. B.; CARLO, E. C. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos – aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1069-1074, 2008.

PONTES, K. C. S.; DUARTE, T. S.; MACHADO, D. P. D.; SEPÚLVEDA, R. V.; RAMOS, D. R., BORGES, A. P. B. Membrana amniótica bovina, preservada em glicerina, no tratamento de úlcera de córnea em um cão e de sequestro corneal em dois felinos – Relato de casos. **Revista Clínica Veterinária**, n. 85, p. 88-96, 2010.

PONTES, K. C. de S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B.; FAVARATO, L. S. C.; DUARTE, T. S. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, 2011.

PORZIONATO A; SFRISO MM; MACCHI V; RAMBALDO A; LAGO G; LANCEROTTO L; VINDIGNI V; DE CARO R Decellularized omentum as novel biologic scaffold for reconstructive surgery and regenerative medicine. **European Journal Histochemistry** , 2013 Jan 24; 57(1).

PU, L.L Cryopreservation of adipose tissue. **Organogenesis.**, 2009 Jul; 5 (3):138-42.

RANGEL-MORENO, J.; MOYRON-QUIROZ, J. E.; CARREGHER, D. M.; KUSSER, K.; HARTSON, L.; MOQUIN, A.; RANDALL, T. D. Milky Spots Develop in the Absence of Lymphoid Tissue-Inducer Cells and Support B and T Cell Responses to Peritoneal Antigens. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 731-743, 2009.

REQUICHA, J. F.; VIEGAS, C. A.; ALBUQUERQUE, C. M.; AZEVEDO, J. M.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Stem Cell Reviews** , v. 8, n. 4, p. 1211-22, 2012.

RICARDO, J. R. S.; GOMES, J. A. P. Uso de células-tronco cultivadas ex vivo na reconstrução da superfície ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 6, p. 541-7, 2010.

RICHARDSON, L. E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P. D.; SMITH, R. Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 409-16, 2007.

RIERA, M.; MCCULLOCH, P.; PAZMANY, L.; JAGOE, T. Optimal method for isolation of human peritoneal mesothelial cells from clinical samples of omentum. (2006). **Journal of Tissue Viability** , v. 16, n. 4, p. 22-4, 2006.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal Inflammation** , v. 26, p. 2-8, 2005.

SAFATLE, A. M. V. **Estudo comparativo da capacidade angiogênica do pericárdio e da membrana amniótica de equino em córnea de ratos.** 1998. 92 f. Tese (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SAMPAIO, R. L.; RANZANI, J. J. T.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; STACCIARINI, M. S.; BRAGA, E. M.; BORREZZI, C. Aspectos clínicos e imunológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1077-1085, 2006.

SAMUELSON, J.; BANERJEE, S.; MAGNELLI, P.; CUI, J.; KELLEHER, D. J.; GILMORE, R.; ROBBINS, P. W. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**

SINGH, A. K.; PATEL, J.; LITBARG, N. O.; GUDEHITHLU, K. P.; SETHUPATHI, P.; ARRUDA, J. A. L.; DUNEA, G. Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers, produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. **Cell Tissue Research**, v. 332, p. 81-88, 2008.

SLATTER, D. **Fundamentos em oftalmologia veterinária.** 3. ed. São Paulo: Roca, 2005.

SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 3. ed. Barueri: Manole, 2007. v. 2, p. 1368-1396.

SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. The **British Journal Ophthalmology**, v. 82, n. 3, p. 235-40, 1998.

SCHWAB, I. R. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 97, p. 891-986, 1999.

SCHWAB, I. R.; REYES, M.; ISSEROFF, R. R. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. **Cornea**, v. 19, n. 4. p. 421-6, 2000.

SCHU, S.; NOSOV, M.; O'FLYNN, L.; SHAW, G.; TREACY, O.; BARRY, F. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 94-103, 2012.

SHUSTER, E. The Nuremberg Code: Hippocratic ethics and human rights. **The Lancet** , v.351, n.9107, p.974-977, 1998.

SEABERG, R. M.; VAN DER KOOY, D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. **Trends Neurosciences Journal**, v. 26, n. 3, p. 125-31, 2003.

SHAH, S.; LOWERY, E.; BRAUN, R. K.; MARTIN, A.; HUANG, N.; MEDINA, M; SETHUPATHI, P.; SEKI, Y.; TAKAMI, M.; BYRNE, K.; WIGFIELD, C.; LOVE, R. B.; IWASHIMA M. **Cellular basis of tissue regeneration by omentum. PLoSOne**, v. 7, n. 6, p. 38368, 2012.

SHORTT, A. J.; SECKER, R. M. S.; MELIGONIS, G.; DARK, J. K.; TUFT, S. J.; DANIELS, J. T. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. **Ophthalmology**, v. 115, n. 11, p. 1989-97, 2008.

SIQUEIRA, R. C. O uso de células-tronco na oftalmologia. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 68, n. 2, p. 71-2, 2009.

SOUZA, M. S. B. **Estudo comparativo entre a ceratoplastia lamelar em cães utilizando membranas amniótica e alantoamniótica alógenas preservadas em glicerina: avaliação clínica e morfológica**. 2003. 161 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

STADES, F. C.; BOEVÉ, M. H.; NEUMANN, W.; WYLMAN, M. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1999.

STRAUER, B. E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. **Circulation**, v. 107, p. 929-934, 2003.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 1-12, 2007.

TOMITA, M., ADACHI, Y.; YAMADA, H.; TAKAHASHI, K.; KIUCHI, K.; OYAZU, H.; IKEBUKURO, K.; KANEDA, H.; MATSUMURA, M.; IKEHARA, S. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. **Stem Cells**, v. 20, p. 279-283, 2002

TSENG, S. C. G.; PRABHASAWAT, P.; LEE, S. H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. **American Journal of Ophthalmology**, v. 124, p. 765-75, 1997.

TSUBOTA, K.; TODA, I.; SAITO, H.; SHINOZAKI, N.; SHIMAZAKI, J. Reconstruction of corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v. 102, p. 1586-1496, 1995.

WANG, M.; YOSHIDA, A.; KAWASHIMA, H.; ISHIZAKI, M.; TAKAHASHI, H.; HORI, J. Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva and anterior chamber. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, n. 4, p. 1522-1532, 2006.

WEISSMAN, I. L.; ANDERSON, D. L.; GAGE, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 387-403, 2001.

WOO, H. M.; KIM, M. S.; KWEON, O-K; KIM, D-Y.; NAM, T-C.; KIMBR, J. H. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. **British Journal of Ophthalmol.**, v. 85, p. 345-349, 2001.

YANG, P.; SEILER, M.; ARAMANT, R.; WHITTEMORE, S. R. Differential lineage restriction of rat retinal progenitor cells in vitro and in vivo. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, p. 466-476, 2002.

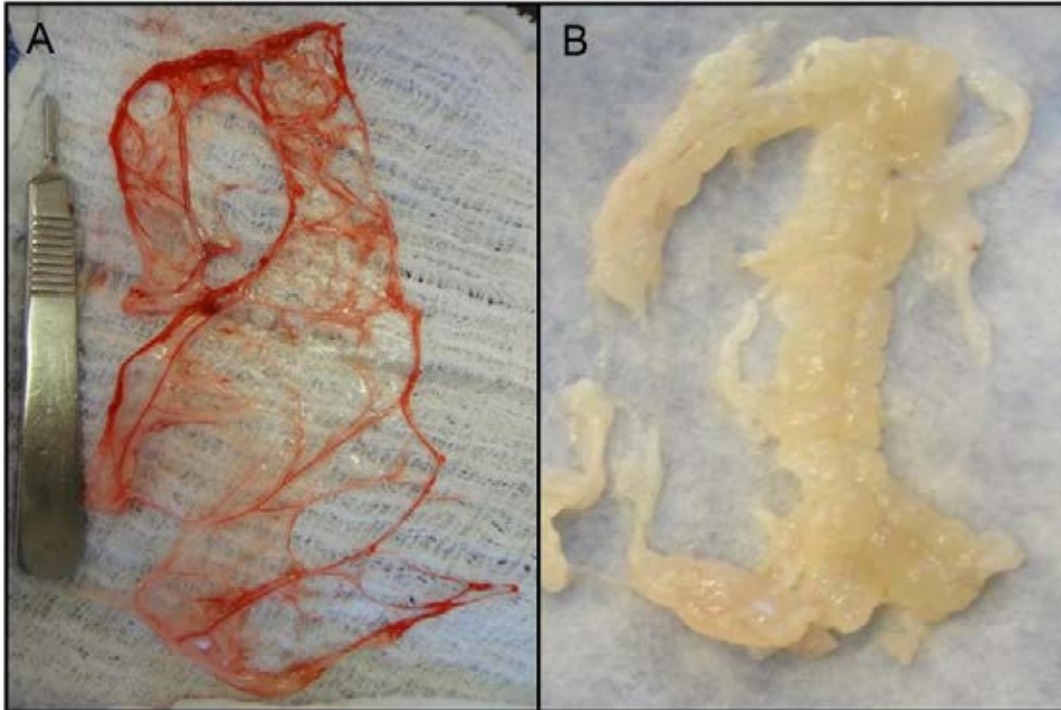
YOSHIOKA, N.; TOMINAGA, S.; SUZUKI, Y.; YAMAZATO, K.; HIRANO, S.; NONAKA, K.; INUI, T.; MATUOKA, N. Cerebral revascularization using omento and muscle free flap for ischemic cerebrovascular disease. **Surgery Neurology**, v. 49, p. 58-65, 1998.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2004.

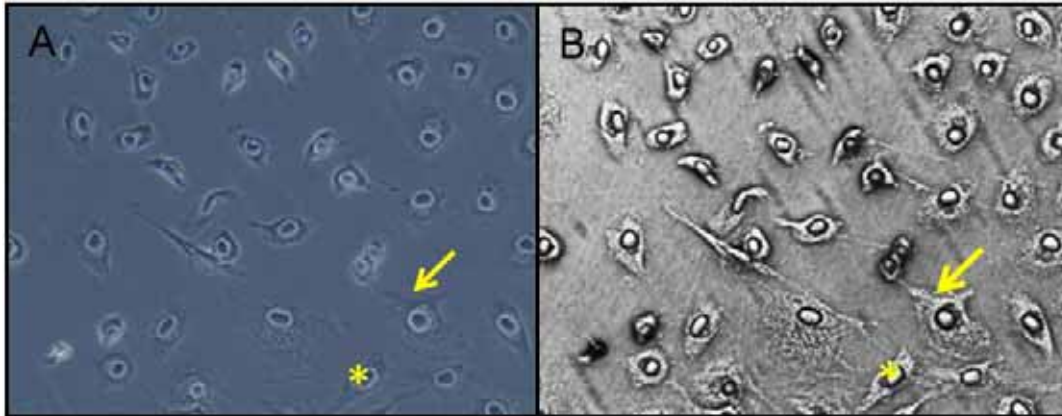
ZAGO, M. A. Terapia com células-tronco: fundamentos, oportunidades e obstáculos. **Hipertensão**, v. 8, p.145-150, 2005.

ZHANG, Q. X.; MAGOVERN, C. J.; MACK, C. A.; BUDENBENDER, K.; ROSENGART, T. K. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omento: mechanism of the omento-mediated angiogenesis. **Journal Surgery Research**, v. 67, p. 147-154, 1997.

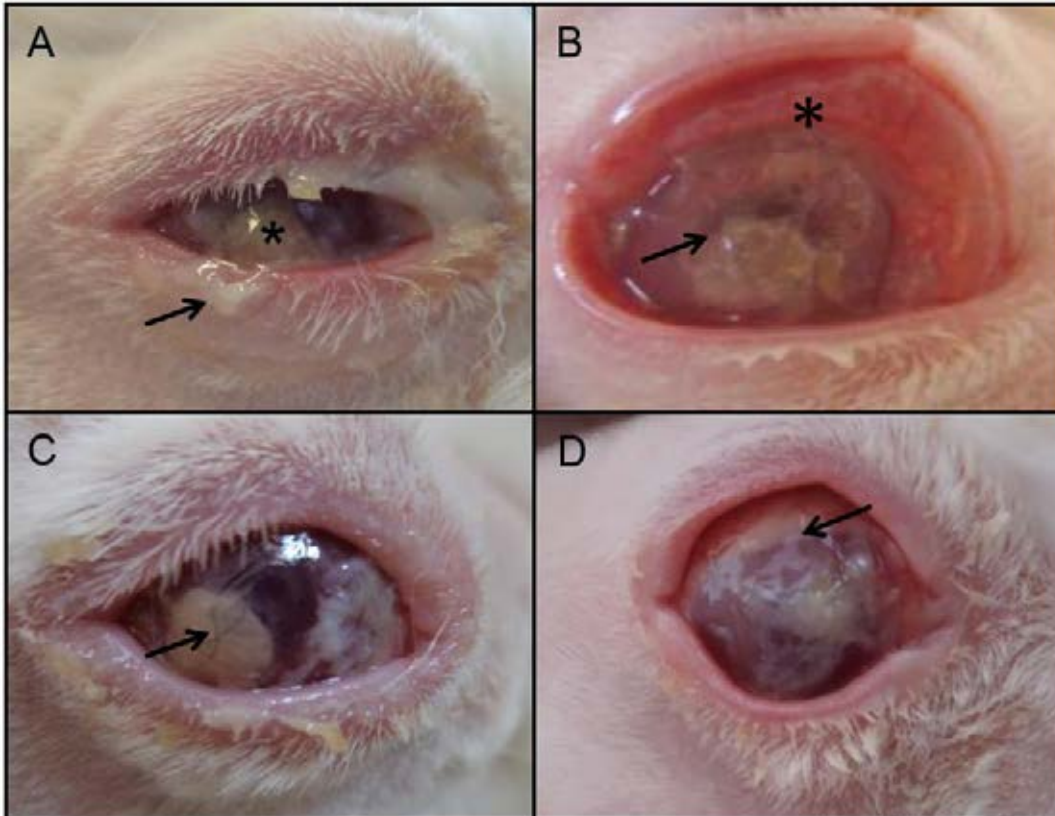
APÊNDICES



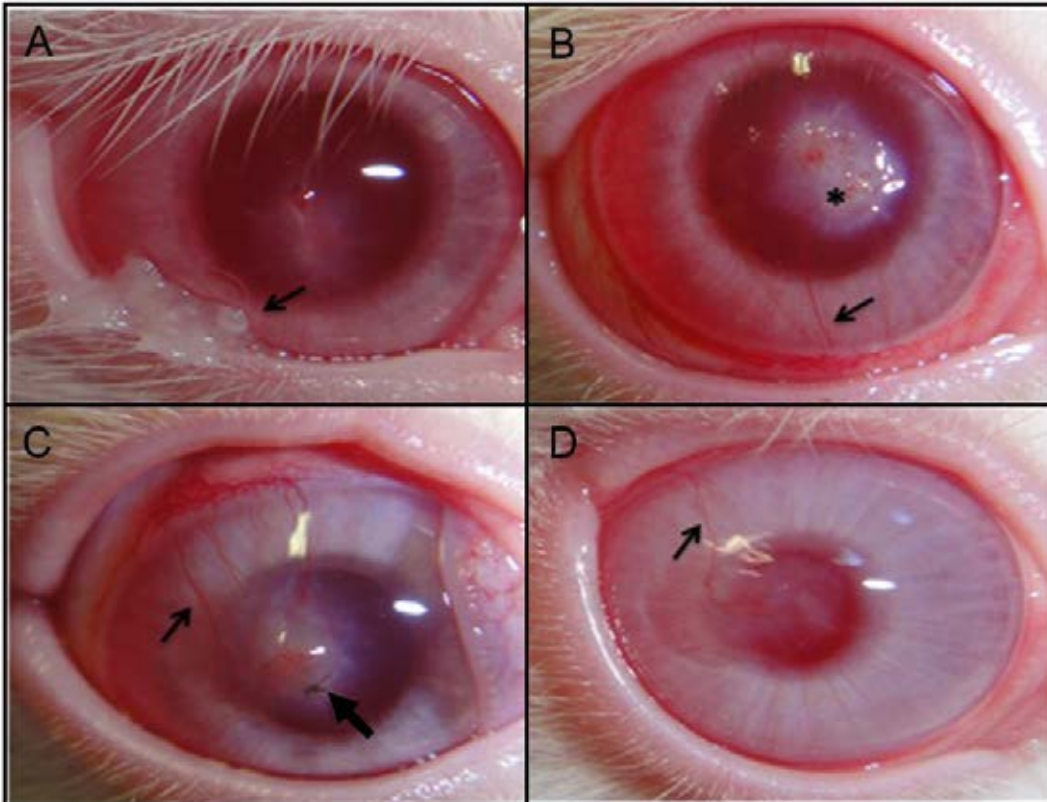
Apêndice 1. Imagens fotográficas mostrando omento de coelho da raça Nova Zelândia Branco. Em A, imediatamente após a coleta; em B, omento após 30 dias de conservação em glicerina 98%.Fonte: Jabotical, SP (2014).



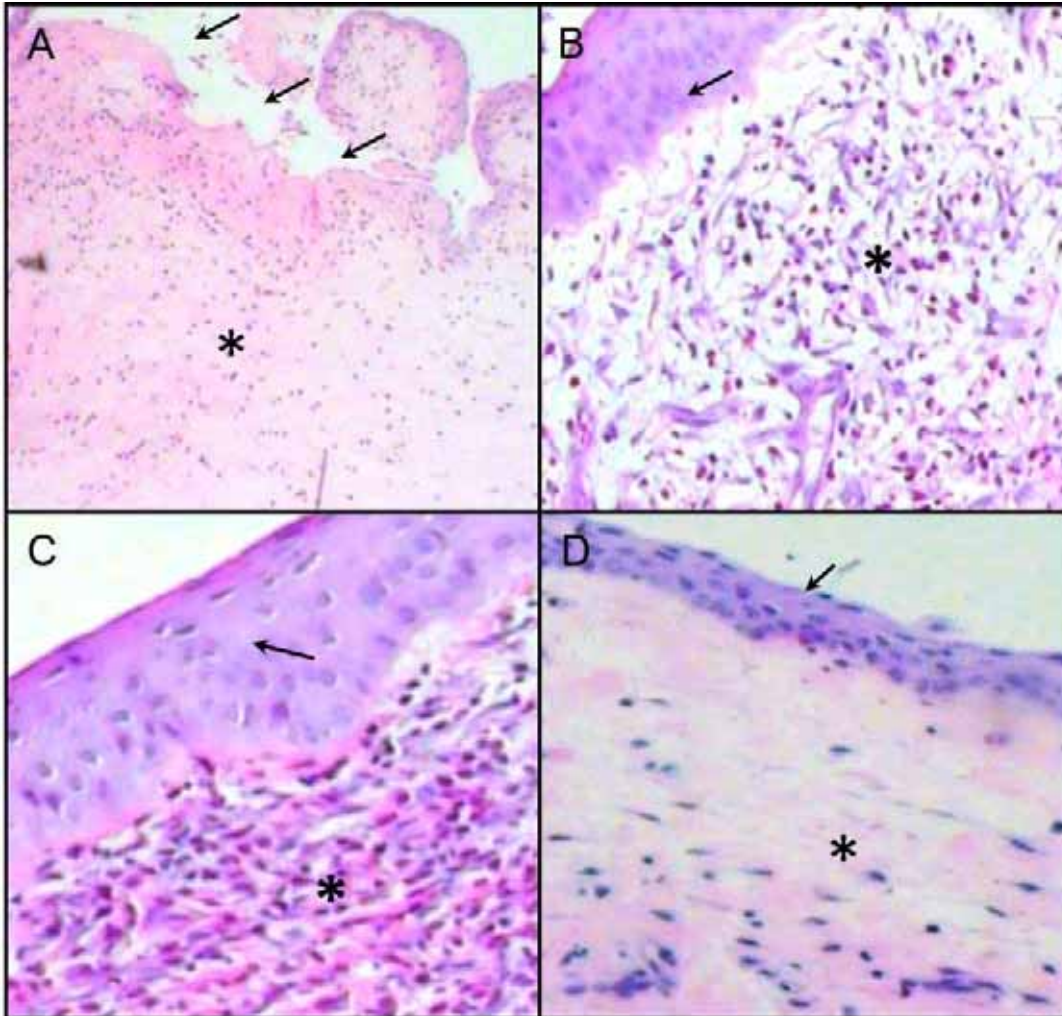
Apêndice 2. Morfologia das células de coelho da raça Nova Zelândia Branco transferidas para a membrana amniótica de cão. Em A, imagem original de células observadas com microscopia de contraste de fase. Notar o predomínio de células pequenas, fusiformes com citoplasma homogêneo (→). Células maiores, arredondas e com citoplasma de aspecto granular também compuseram as amostras (*). Em B, mesma imagem de A, após aplicação de filtro digital para realçar os contornos das células, permitindo melhor visibilização da geometria e textura. 400x. Fonte: Jaboticabal, SP (2014).



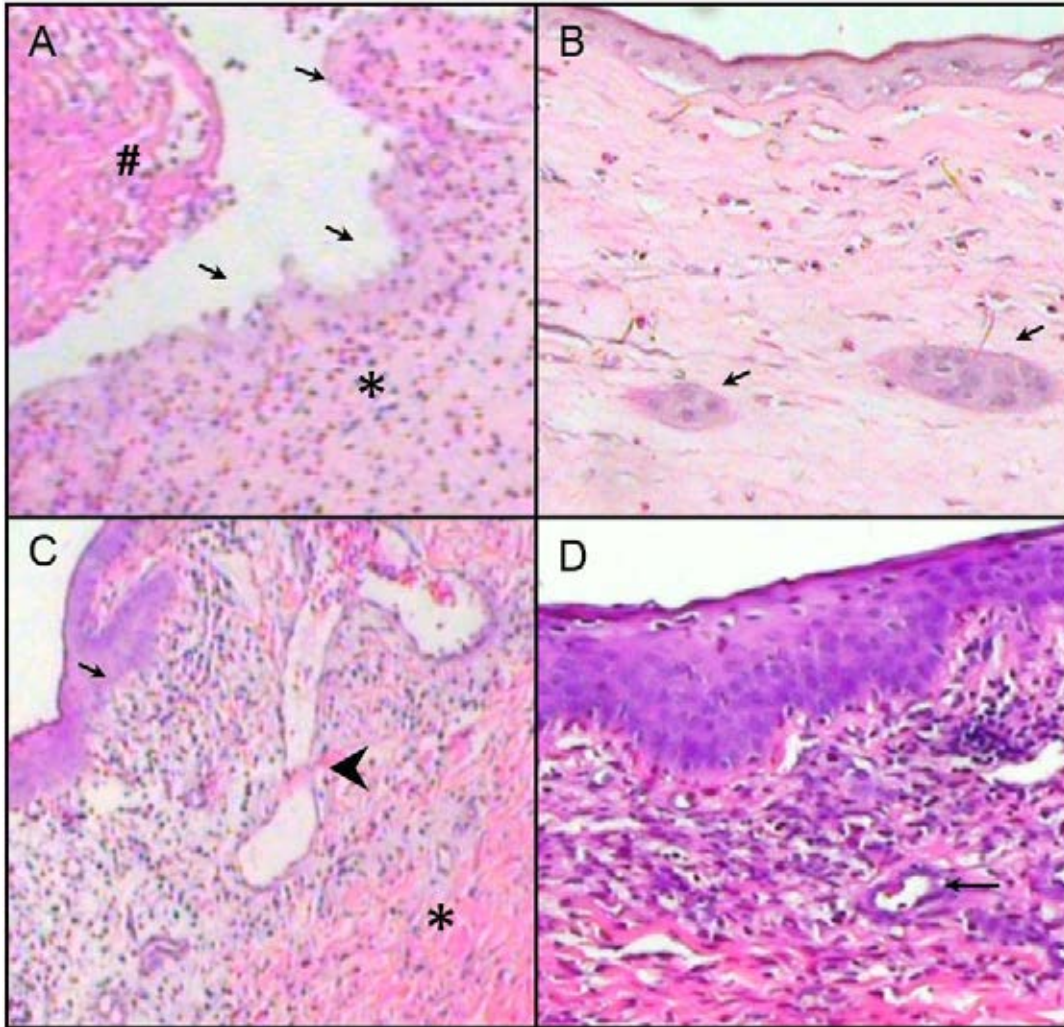
Apêndice 3. Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, do grupo OM, em diferentes dias de pós-operatório. Em A, ao 3^o dia, secreção mucosa moderada (→) e presença do omento (*); em B, ao 3^o dia, presença do omento (→) e quemose intensa (*); em C, ao 7^o dia, deiscência do omento (→) e em D, ao 7^o dia, opacidade moderada (→). Fonte: Jaboticabal, SP (2014)



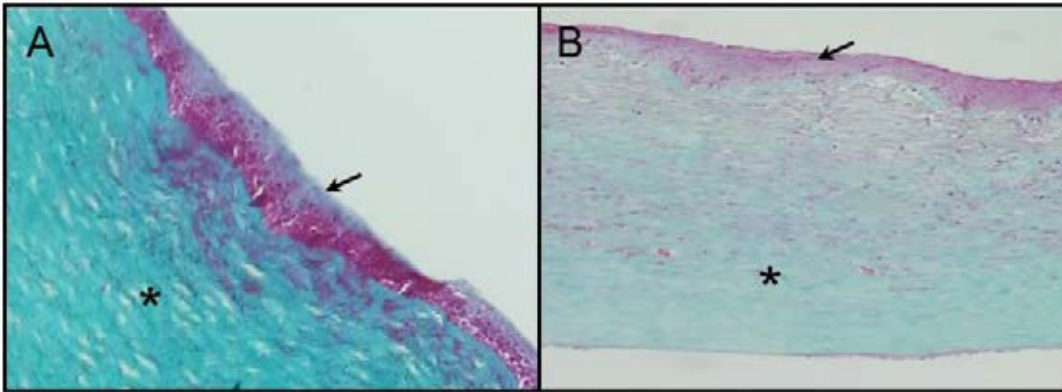
Apêndice 4. Imagens fotográficas ilustrando olhos de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em diferentes dias de pós-operatório, que receberam MA colonizada com células do omento (grupo OMC). Em A, ao 7^o dia, presença de secreção mucosa (→); em B, ao 14^o dia, presença de vascularização (→) e opacidade axial (*); em C, ao 30^o dia, presença de vascularização (→) e de fio de sutura (↔) e em D, ao 60^o dia, presença de vascularização (→) e opacidade, ambas em regressão. Fonte: Jaboticabal, SP (2014).



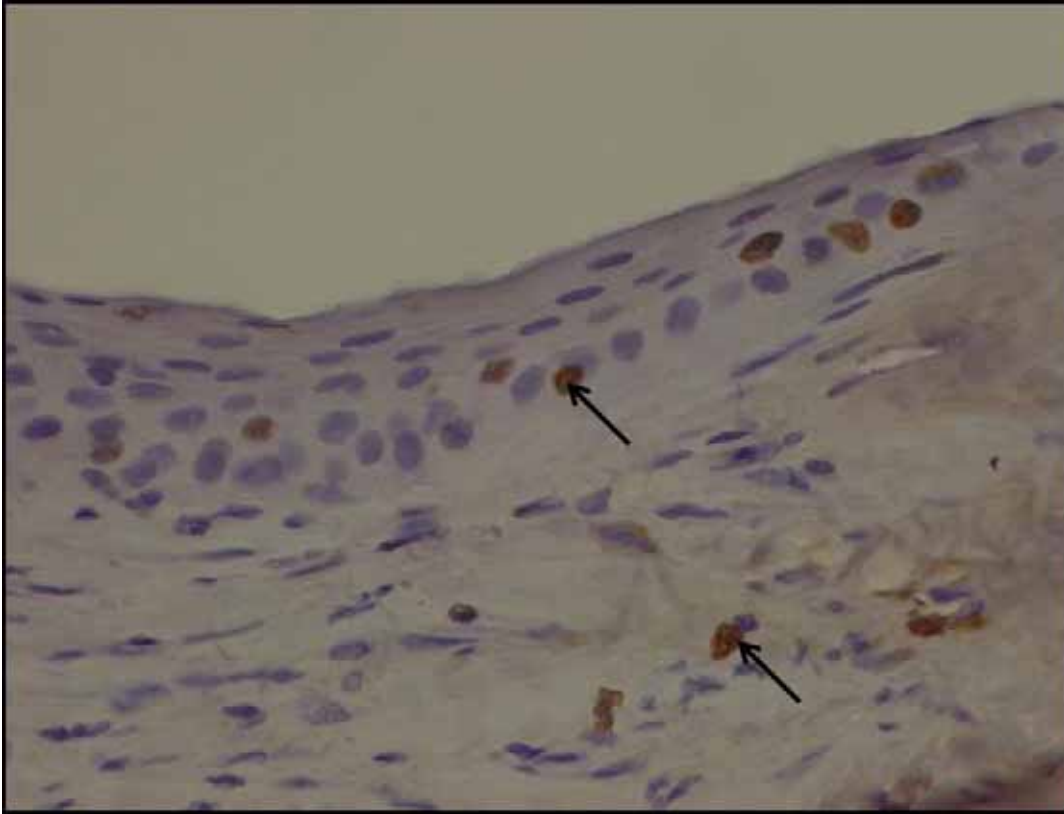
Apêndice 5. Fotomicrografias de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, do grupo OM, em diferentes dias de pós-operatório. Em A, ao 3^o dia, estroma desnudo (→) e desorganização estromal (*) (HE, 40x); em B, ao 7^o dia, epitélio hipertrófico (→), edema estromal e polimorfonucleares em quantitativo expressivo (*), (HE, 100X); em C, ao 14^o dia, epitélio hipertrófico (seta) desorganização estromal (*) (HE,100X); em D, ao 30^o dia, estratificação epitelial, organização estromal (HE,100X);



Apêndice 6. Fotomicrografias da córnea de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, do grupo OMC, em diferentes dias de pós-operatório. Em A , ao 3^o dia , membrana amniótica (#), estroma desnudo (→) e desorganização estromal (*) (HE, 100x); em B, ao 7^o dia, epitélio sem estratificação, ilhas de epitélio no estroma (→) (HE,400x); em C, ao 30^o dia, epitélio estratificado (→), vaso sanguíneo (◄) em meio a desorganização estromal (*) (HE, 100x); em D, ao 60^o vascularização (←) (HE, 400x). Fonte: Jaboticabal, SP (2014).



Apêndice 7. Fotomicrografia de córneas de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, aos 60^o dias. Nota-se, disposição das fibras colágenas (*) e área da lesão (-); em A, grupo OM (TG100X) e em B, grupo OMC (TG40X). Fonte: Jabotical, SP (2014).



Apêndice 8. Fotomicrografia de epitélio corneal de coelho da raça Nova Zelândia Branco, do grupo OMC, ao 3^o dia de pós-operatório. Notar distribuição das células imunomarcadas (Ki67), em coloração marrom, no epitélio e no estroma (→). (400X). Fonte: Jaboticabal, SP (2014).

