

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/07/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA COM
CÉLULAS EPITELIAIS LIMBAIS CULTIVADAS EM
SANDUÍCHE: ESTUDOS CLÍNICOS E DE VIABILIDADE EM
CÓRNEAS DE COELHOS**

Karina Kamachi Kobashigawa

Médica Veterinária

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA COM
CÉLULAS EPITELIAIS LIMBAIS CULTIVADAS EM
SANDUÍCHE: ESTUDOS CLÍNICOS E DE VIABILIDADE EM
CÓRNEAS DE COELHOS**

Karina Kamachi Kobashigawa

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Aldrovani

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

2018

K74t Kobashigawa, Karina Kamachi
Transplante de membrana amniótica com células epiteliais limbais cultivadas em sanduíche: estudos clínicos e de viabilidade em córneas de coelhos / Karina Kamachi Kobashigawa. -- Jaboticabal, 2018
iv, 57 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: José Luiz Laus

Banca examinadora: Bruno Watanabe Minto, Annelise Carla Camplesi, João Antônio Tadeu Pigatto, Alexandre Lima de Andrade

Bibliografia

1. Olho - Células tronco do limbo. 2. Coelho – transplante – córnea 3. Membrana amniótica. 3. Reparação corneal. 4. Superfície ocular. 5. Terapia celular. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617.7- 089:599.325.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TRANSPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA COM CÉLULAS EPITELIAIS LIMBAIS CULTIVADAS EM SANDUÍCHE: ESTUDOS CLÍNICOS E DE VIABILIDADE EM CÔRNEAS DE COELHOS

AUTORA: KARINA KAMACHI KOBASHIGAWA


ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ LAUS

COORIENTADORA: MARCELA ALDROVANI RODRIGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Pesquisadora MARCELA ALDROVANI RODRIGUES
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Universidade Estadual de Campinas


Prof. Dr. JOAO ANTONIO TADEU PIGATTO
Departamento de Medicina Animal / Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Porto Alegre/RS


Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO
Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de janeiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KARINA KAMACHI KOBASHIGAWA – nasceu em 23 de outubro de 1987, na cidade de Piracicaba, São Paulo, filha de Massayoshi Kobashigawa e de Kimiko Kamachi Kobashigawa. Iniciou a Graduação em Medicina Veterinária em 2007, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Unesp - Campus de Jaboticabal, sendo concluída em fevereiro de 2012. Durante a Graduação realizou dois trabalhos de Iniciação Científica, ambos contemplados por bolsa FAPESP nos anos de 2010 e 2011, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus. Em 2014, tornou-se mestre em Cirurgia Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV - Unesp, do qual, atualmente, é aluna regular do curso de Doutorado e atuante do Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus.

Dedico este trabalho para toda a minha família,
de sangue ou não,
de escolha ou não.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por me permitir chegar onde cheguei e como cheguei!

Ao Prof. Laus, por todas as oportunidades, pelos ensinamentos e pela dedicação.

À Profa Marcela Aldrovani, por todo companheirismo, pela boa vontade em ajudar e pela visão científica. Obrigada pela oportunidade e confiança neste projeto, e assim criar em mim este carinho pela pesquisa.

Ao Prof. Joaquim Mansano Garcia, por me permitir usar todas as instalações sem pestanejar. Ao Prof. Fernando Chahud, por aceitar me ajudar com a imunohistoquímica. Ao Prof. José Álvaro Pereira Gomes e à Dra. Priscila Cardoso Cristovam, por fornecerem as membranas amnióticas e nos ajudarem sempre que precisamos.

Aos meus pais, Massayoshi e Kimiko, pelo apoio incondicional, mesmo sem palavras, e pela paciência. Obrigada por tudo que me ensinaram, que me permitiram aprender e o mais importante, pelo exemplo. Sou quem eu sou graças a vocês. Mãe, obrigada por se preocupar e sempre zelar tanto por mim! Pai, você é meu porto seguro, obrigada pela força!

Ao Renato Furlan, meu grandão, por tentar me ensinar, dia após dia, como viver cada momento. Obrigada por ser tão companheiro e gentil. Por saber que te tenho do lado, eu tenho coragem de ir além.

Ao Marcelo Kamachi, por sempre me mostrar como manter a sua criança interior viva! Obrigada por segurar as pontas em casa e me permitir terminar essa obra prima! Obrigada pelos marcadores de página!!!! Obrigada Thaiza Silva, por me ensinar tanto em tão pouco tempo, por ser quem você é e por estar na família.

À minha Wodi, por me ajudar nas minhas crises, por me consolar quando preciso, me atrapalhar quando não dá, não consigo imaginar a vida sem você! É inexplicável o que eu sinto por você.

À minha linda família: meus tios: Keiko, Paulino e Paula, Jocimar e Silvia, Lucas e Neusa, Paulo, Mitio e Heloísa, Massao, Mario e Bete, Isaura e Helena (*in memoriam*). Meus primos: Hélio, Mayumi, Kimie, Heloísa, Matheus, Tiemy, Daniela, Riuji, Carol, Melissa, Paloma, Juliana, Mariana e Satoshi. Não esquecendo dos meus avós: dona

Vicentina, Vó Maria, Yoshico (*in memoriam*) e Katsuye (*in memoriam*), batcham como eu sinto a sua falta, você está sempre presente nos meus pensamentos.

À minha nova família, que sempre me acolhe tão bem: Walter, Lurdinha, Renan e Lucas. E obrigada para a minha família mais nova ainda: dona Odete, Débora, Renato e pequenos.

Ao Fausto Marinho Neto, por me salvar quando precisei, me acolher e cuidar de mim. Obrigada por me mostrar que faço sentido, que não sou doida e que não estamos sós. Apesar da estrada, a nossa amizade nunca vai se distanciar!

À Paloma Silva, pelas aulas de determinação, você faz muita falta no meu dia-a-dia. E não importa o tamanho do seu erro, EU ESTAREI LÁ POR VOCÊ. Obrigada mãe Teresa Moretti por todas as conversas e por toda a preocupação, sei que você cuida de mim de longe! Obrigada Luiz. Ao Tiago Prada, por sempre ter algo engraçado pra contar e surpreender. Aos meus pais de Jaboticabal, Marly Prada e Toca, que sempre tiveram tanto carinho por mim! É recíproco viu!

À Thaís Morato, por me ensinar o significado da palavra bondade e gratidão. Obrigada por estar do meu lado sempre, eu sei disso e você sabe que estou do seu. À Gabriela Madruga, nunca tive uma amiga que a cada conversa conseguisse se superar nos desastres! E a cada conversa eu vejo o quão batalhadora você é, obrigada pelo exemplo. Ao Alexandre Sobrinho, você tem um coração de ouro, parabéns pelo altruísmo e pelo caráter, obrigada pela amizade e pelas boas risadas, vamos sempre marcar de comer algo bonzão!! Obrigada aos agregados Pedro Rossignoli, Fernando Garbin e Fernanda Acre.

À toda equipe que a Oftalmologia me apresentou. Ao Luciano Conceição, pelos ensinamentos, brincadeiras e companheirismo, ainda seremos ricos, Lu!. À Bianca Martins, meu eterno exemplo, graças a você estou aqui!. À Flor Chacaltana, adoro te ter do lado, sempre me lembrando do que eu esqueço, me incentivando e me apoiando nas empreitadas, obrigada pela bondade e pela sinceridade. Ao Alexandre Sobrinho, por todos os galhos quebrados e fogueiras feitas com eles!! Ainda vamos atender juntos. À Thaís Morato, minha dupla de b****, você fez meus dias mais leves e divertidos, obrigada pela confiança. À Gabriela Madruga por todas as risada, pelo

companheirismo e pela sua sinceridade!! Obrigada pelo incentivo nos casos impossíveis e nas fases difíceis, tudo vai dar certo!. À Daniela Moura, pelas parcerias na sua época de estagiária... de mestranda.. e quem sabe no doc?! Fico muito feliz que vc tenha vindo, ainda mais porque vai sempre ter um email pra eu zuar. À Marcella Fillezio, como acreditar que você está se formando só agora? Como eu te disse, tenho vontade de ficar mais só porque você está entrando no mestrado. À Roberta Crivelaro, pela amizade, pelas florestas quebradas e pela parceria. À mamis Ana Pascoli, por todo o exemplo de caráter e de generosidade, tenho um carinho muito grande por você. Ao Tiago Barbalho, pela parceria nas pesquisas, nos casos e no happy hour. À Roberta Renzo, por toda paciência. À Camila Balthazar, por eu não me sentir pequena sozinha. Ao Ivan Martinez, pelo bullying! E pelo companheirismo sempre. À Germana Silva, pelo apoio mesmo que de longe. À Karina Herencia pelo exemplo de esforço. Ao Beto Thiesen, nosso agregado sempre disposto a ajudar. À Fran, seja bem vinda!! Obrigada aos de outras datas, mas sempre queridos: Adriana Morales, Patrícia Jordão, Alexandre Ribeiro, Alexandre Andrade, Dúnia Trujillo, João Pigatto, Cristiane Honsho e Adriana Torrecilhas Jorge.

Ao Nathan Cruz, por me mostrar que a vida tem sempre mais um lado e que todo mundo tem sempre algo de bom! Obrigada por todos os cafés e tardes de dona Florinda! Ao Paulo Marcusso, por todas as ciladas e ajudas! À Andresa Matsui, pelo exemplo de profissional e pela amizade. Ao Carlos Terra, apesar da distância, sempre presente e pronto pra me tirar risadas. À Amanda Figueiredo, por cuidar e orar por mim. À Elcí Moreira Araújo (Mel), pelas boas histórias e pela preocupação.

Aos meus queridos amigos de longa data: Marcela Gava, Maurício Massano e Mariana Motta por ainda estarem na minha vida, sempre com palavras queridas. À Tatiane Ishizawa e Larissa Vali pelas longas conversas e pela amizade incontestável. Ao Leonardo e Manu Kairalla, por manter nossa amizade sempre próxima. Ao Eros Tanaka Silva (*in memoriam*) por toda a bondade e clínica médica que me ensinou.

Às minhas lindas Regina Ferreira Mello e Sibelle Pereira Gonçalves por todos os desabafos e pela irmandade. Obrigada Raquel Castro pelas palavras de apoio e de

carinho. Obrigada Claudia Nagatsuyu, minha primeira orientada. Obrigada Rafael Parras, que apesar da correria, sempre se faz presente.

Aos queridos: Fábio Nelson Gava, Marcelo Augusto Koury, Cléber Ido, Igor Salardani, Diego Yamada, Júlio Hough, Maria Alessandra Del Barrio, Fabiana Rocha, Aline Kawanami, Amanda Leal, Paulo Henrique Leal Bertolo, Livia Perles, Elizabeth Carvalho, Edna Ortiz, Fernanda Paes, Fernando Kawamoto, Julielton Barata, Nazilton Reis Filho, Rozana Wendler, Helena Brito, Thuanny Lopes, Ana Paula Gering, Gabriela Toledo, Gustavo Oda, Camila Pinho, Renato Silveira.

Aos professores da Faculdade, em especial: prof. Áureo Evangelista Santana, prof. Bruno Watanabe Minto, profa. Marileda Bonafim Carvalho, prof. Estevam Lux Hoppe, profa. Kênia Cardoso Bicego, profa. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, profa. Mirela Tinnucci Costa, profa. Adolorata Ap. Bianco Carvalho, profa. Karina Paes Burger, prof. Luiz Augusto do Amaral, profa. Luciane H. Gargaglione Batalhão, profa. Annelise Camplesi.

Aos funcionários da Faculdade, em especial: Wilson (UAD), Roberta (laboratório de Reprodução Animal), Edson, Carlos, Matheus, Juliana, Evelin, Flávia, Cacilda, Bertanha, Rose, Isildinha, Lauro César, Ana, Ana Panosso, Josiane, Marcelo, Isaías, Eugênio, Aloisio, Laerte, Márcia, Fábio, Miguel, Baiano, Rosângela, Rosa, Isabel, Cirlene, Rosane (Hospital Veterinário), Fernanda (Funep), Diego, Antonio, Branca, Márcia, Hugo (pós graduação).

À todos os estagiários que passaram pelo Setor.

Aos amigos que fiz na profissão! No 016: Rogério Marin, Mayra Baldassa, Cíntia Bassoli, Grasielle Silva, Renata, Ana Maria Di Madeu, Maurício Menezes, Janine, Adriana, Jéssica, Carla, Cristiano Oliveira Rodrigues, Juliana, seu João, Carla Bonafini, Angelita Cacemiro, Jonathan, Dona Silvia, Lene, Bia, Higor Pitol, Alexandra Garcia, Carla Stivaletti, Bruna, Ângela Camargo, Mariana Lima, Patrícia, Paulo Garcia, Érika Cristina Longo, Ana, Raquel D'Avila, Carolina Milani, Débora e André Dias, Isabella, Rogério e Tica, Pedro, Carla D'Amato, Maurício, Thalita Fonseca, Nathália e Thainá, Carina Felipe. No 017: Ricardo Ferraz, Ludmila Ribeiro, Rosane Pinto Figueira, Marcela Neves, Marcus Buelta, Amanda, Patrícia Monteiro de Barros, Oneir Caçador Jr., Luiz

Henrique, Fábio e Sérgio Fernandes, Tatiana Suleiman Gouveia e Carlos Sartori de Carvalho, Jorge Andrade, Monica Flamingo.

Aos que já eram amigos e a profissão nos uniu, Ana Paula Grisólio, Júlio Pace, Cyro Mode Neto, Mariana Miziara, Ana Paula Simões, Guilherme Sembenelli, Monica Wittmaack, Milena Gondin, Ivan Moura Lapera, João Augusto Leonel Souza.

Aos novos amigos e não menos importantes: Rodrigo Ludovico, Geisa Ribeiro, Igor Spadoni, André Tribst Piffer, Vinícius Grippa, Guilherme Botamede, Lívia Zanin, Daniel Sala, Paulo Eduardo, Rubiana, Vinícius Ferreira, Marcelo Sani, Felipe Ducati, Marcelo Delamagna, Karen Sita, Murilo Lapola, Marcelo Benevides, Fábio Miani.

Aos amigos que fiz na Contabilidade (Faculdade de Educação São Luís, Jaboticabal - 2016): Renan Scheler, Danilo Pires, Flávia Gazeta, Tiago Andrade, Ana Elisa Ferreira, Nathan Godoi, Bia Schinaider, Jessica Camassutti, Pamela Lopes, Renan Scavoni, Gaby Facco, Marcela Rodrigues, Milton, Gabriel Mello, Patrícia, Mirian.

Ao Júlio Cesar, por me ajudar com análises laboratoriais. Ao Renato Gonçalves Ferreira por me fornecer os animais da pesquisa e por sempre me ajudar com os eventuais imprevistos. Ao Antônio (Patologia Animal) por me salvar com os blocos.

À FAPESP pela bolsa e pelo auxílio indispensáveis para a realização da pesquisa (Processo 2014/18007-4), á Capes, pela bolsa de estudos e ao CNPq, pelo auxílio concedido (Chamada CNPq/MS/SCTIE/DECIT Nº 28/2014, edital em Medicina Regenerativa, Processo 467289/2014-0).

Ao Bito, Mário e Tiririca, que apesar da distância, fazem um bem danado!! Obrigada Titi (*in memoriam*) e Zuzi (*in memoriam*), vocês fazem falta.

A todos os animais que contribuíram com o meu conhecimento, minha eterna gratidão. E a todos os proprietários, clínicos e responsáveis que confiaram e confiam em mim.

O estudo sobre “Transplante de membrana amniótica com células epiteliais limbais cultivadas em sanduíche: estudos clínicos e de viabilidade em córneas de coelhos” foi fomentado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP, bolsa de Doutorado Proc. No. 14/18007-4), pelo **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (Chamada CNPq/MS/SCTIE/DECIT Nº 28/2014, edital em Medicina Regenerativa, Proc. No. 467289/2014-0), e a **Pró-Reitoria de Pesquisa da Unesp**.



SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – Unesp.....	i
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA - Unifesp	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE MEDIDAS	vi
1.Introdução.....	1
2.Revisão de Literatura.....	2
2.1.Superfície Ocular.....	2
2.2.Deficiência de Células Tronco Limbais (LSCD).....	3
2.3.Principais Conduas para o Tratamento de LSCD.....	4
2.3.1.Desbridamento e Transplantação do Enxerto de Enxerto Conjuntival Limbal.....	4
2.3.2.Membrana Amniótica (MA).....	5
2.3.3.Terapia Celular.....	7
2.4.Expansão “Ex-vivo” de Células Epiteliais Limbais.....	7
2.5.Hipóteses.....	11
2.6.Objetivos.....	11
3.Material e Métodos.....	12
3.1. Considerações Quanto à Ética.....	12
3.2.Animais e Delineamento Experimental.....	12

3.3. Protocolo para Indução da LSCD.....	14
3.4. Protocolo para Obtenção do Explante de Limbo.....	15
3.5. Obtenção e Preparação de MA Humana.....	16
3.6. Cultura de Explante.....	17
3.7. Transplantação de MA com Células “Ex-vivo” para a Córnea com LSCD.....	18
3.8. Pós-Transplante e Análise da Intenção-de-Tratar.....	19
3.9. Confecção de Lâminas para Histologia.....	20
3.10. Morfometria de Tecido Corneal.....	21
3.11. Imuno-Histoquímica.....	21
3.12. Teste de TUNEL.....	22
3.13. Análises dos Dados.....	23
4. Resultados.....	23
4.1. Condições Clínicas dos Olhos de G-mono e G-Sand.....	23
4.2. Análise da Intenção-de-Tratar.....	29
4.3. Morfometria Tecidual.....	29
4.4. Imuno-Histoquímicas e Teste de TUNEL.....	31
4.4.1. Avaliação das Culturas Celulares Quanto à Presença de Células Progenitoras e de Células em Proliferação.....	31
4.4.2. Células Progenitoras, em Proliferação e Apoptóticas nas Córneas de G-Mono e G-Sand.....	32
5. Discussão.....	34
6. Conclusões.....	42
6. Referências.....	43

7.Implicações.....	55
Apêndice A.....	56
Apêndice B.....	57

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – Unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 05429/14 do trabalho de pesquisa intitulado **“Avaliação Clínica e viabilidade celular no transplante de membrana amniótica contendo células do limbo cultivadas em sanduíche”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de abril de 2014.

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA - Unifesp



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comissão de Ética Médica
Hospital São Paulo Universidade Federal de São Paulo


São Paulo, 07 de maio de 1998

Ilmo. Sr.

JOSÉ ALVARO PEREIRA GOMES
Disciplina de Oftalmologia
Departamento de Oftalmologia da UNIFESP

A Comissão de Ética Médica do Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo analisou e aprovou o protocolo de pesquisa nº 227/98, intitulado
mebrana amniótica na reconstrução da superfície ocular

Atenciosamente,


Prof. Dr. Mauricio M. A. Alchorne
Presidente da Comissão de Ética Médica do
Hospital São Paulo / Universidade Federal de São Paulo

cc ./ Prof. Dr. Rubens Belfort Jr
Chefe do Depto. de Oftalmologia da UNIFESP

Rua Pedro de Toledo, 947 - CEP 04039-032 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 576.4368 - FAX (011) 549.2127

TRANSPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA COM CÉLULAS EPITELIAIS LIMBAIS CULTIVADAS EM SANDUÍCHE: ESTUDOS CLÍNICOS E DE VIABILIDADE EM CÓRNEAS DE COELHOS

RESUMO – Visando ao estudo de técnicas para a expansão “ex-vivo” de células destinadas à reconstrução de superfícies oculares com deficiência de células tronco limbais (LSCD), explantes superficiais obtidos do limbo de coelhos foram cultivados sobre membrana amniótica (MA) humana. Dois grupos, diferindo quanto à configuração do sistema de cultivo celular, foram concebidos: G-mono, contendo células epiteliais expandidas sobre a face de uma camada de MA (sistema de cultivo bidimensional), e G-Sand, composto por células “ensanduichadas” entre duas MAs (sistema de cultivo tridimensional). Seis culturas celulares de cada grupo foram avaliadas por imunohistoquímica quanto à presença de células progenitoras ou indiferenciadas e a de células em proliferação (avaliação pré-transplante), enquanto 21 foram transplantadas para olhos de coelhos com LSCD (n=10). Os olhos receptores de células cultivadas foram clinicamente avaliados, por até 63 dias. A terapia limbal adotada na pesquisa foi autógena. Após avaliações clínicas, os coelhos foram aleatoriamente distribuídos em parcelas e submetidos à eutanásia, para colheita de córneas (dias 14 e 63 após o transplante) que foram avaliadas quanto à morfometria tecidual e à expressão qualitativa de imunomarcadores de indiferenciação celular (fator de transcrição nuclear delta p63), de proliferação celular (antígeno nuclear da proliferação celular, PCNA) e de apoptose (teste de TUNEL). Diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas significativas. As culturas do G-Sand apresentaram menos células imunopositivas para delta p63 e mais células positivas para PCNA, do que as culturas do G-mono. Relativamente ao tratamento da LSCD, os resultados mostraram que o protocolo adotado em G-Sand induziu neovascularização corneal menos acentuada e houve redução importante das áreas corneais ulceradas. Não se encontraram diferenças em relação à opacidade corneal entre os grupos ($P > 0,05$). As córneas do G-mono apresentaram menos células progenitoras do que as do G-Sand. A proliferação celular não diferiu entre as córneas do G-Sand e as do G-mono. Células apoptóticas não foram detectadas pelo teste de TUNEL. Os resultados do presente estudo sugerem que modificações na configuração do sistema de cultivo, de bi- para tridimensional, empregando-se MA como substrato, elevaram a proliferação celular, mas ensejaram perda de células progenitoras intensamente imunomarcadas para delta p63. Ademais, que elas não são decisivas para o desfecho terapêutico, pois os achados clínicos do G-Sand foram equiparáveis aos do G-mono. Única vantagem do G-Sand é que ele foi associado com maior quantidade de células progenitoras na córnea, o que pode influenciar a viabilidade ou a sobrevida dos transplantes, a longo prazo.

Palavras-chave: células tronco; membrana amniótica; reparação corneal; superfície ocular; terapia celular.

TRANSPLANTATION OF AMNIOTIC MEMBRANE CONTAINING LIMBAL EPITHELIAL CELLS CULTURED IN SANDWICH CONFIGURATION: CLINICAL STUDY AND VIABILITY IN RABBIT CORNEA

ABSTRACT – In order to study techniques for the ex vivo expansion of cells for the reconstruction ocular surfaces with limbal stem cell deficiency (LSCD), superficial explants obtained from rabbit limbus were cultured on human amniotic membrane (MA). Two groups, differing in the configuration of the cell culture system, were designed: G-mono, containing expanded epithelial cells on an MA layer (two-dimensional culture system), and G-Sand, composed of cells "sandwiched" between two MAs (three-dimensional culture system). Six cell cultures of each group were processed by immunohistochemistry to identify the presence of progenitor or undifferentiated cells and for proliferating cells (pre-transplant evaluation), and 21 constructs were transplanted onto rabbit eyes with LSCD. The limbal therapy adopted in the research was autogenous and the transplanted eyes were clinically evaluated for up to 63 days. After clinical evaluations, the rabbits were randomly distributed into subgroups and submitted to euthanasia, to harvest corneas (days 14 and 63 post-transplant) that were evaluated for tissue morphometry and the qualitative-quantitative expression of immunomarkers of indifferntiated cells (delta-p63 transcriptional factor), proliferative cells (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) and apoptosis (TUNEL assay). Differences with $P < 0.05$ were considered significant. G-Sand cultures showed fewer cells immunopositives to delta p63 and more PCNA-positive cells than did G-mono cultures. Regarding the treatment of LSCD, the results showed that the protocol adopted in G-Sand induced a less pronounced corneal neovascularization and there was a significant reduction of the ulcerated corneal areas. No differences were found in corneal opacity between G-mono and G-Sand ($P > 0.05$). The G-mono corneas had fewer progenitor cells than the G-Sand corneas. Cell proliferation did not differ between G-Sand corneas and G-mono corneas. Apoptotic cells were not detected by the TUNEL assay. The results of the present study suggest that modifying the configuration of the culture system from bi- to three-dimensional, with MA as substrate, does not cause increase in cell proliferation but causes loss of progenitor cells highly immunolabelled for delta p63. In addition, the results also suggest that modification in the configuration of the culture system is not decisive for the therapeutic outcome, since the clinical findings of G-Sand were comparable to those of G-mono. The only advantage of G-Sand is that it has been associated with a greater amount of progenitor cells in the cornea, which may influence the viability or survival of transplants in the long term.

Keywords: stem cell; amniotic membrane; corneal repair; ocular surface; cell therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da variância
CTs	Células tronco
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
KSFM	Meio queratinócito livre de soro (Keratinocyte serum-free medium)
LSCD	Deficiência limbal (Limbal stem cell deficiency)
MA	Membrana amniótica
MEC	Matriz extracelular
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
SHEM	Meio epitelial suplementado com hormônio (Supplemental hormonal epithelial medium)
TACs	Células amplificadoras transitórias (Transient amplifying cells)
TdT	Deoxinucleotidil transferase terminal
vs	Em comparação com (Vesus)

LISTA DE MEDIDAS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
Kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mcg	Micrograma
mL	Mililitros
pH	Potencial hidrogeniônico
UI	Unidade internacional

1. Introdução

A superfície ocular é constantemente renovada por células tronco (CTs) adultas e oligopotentes localizadas na camada basal do epitélio limbal, e cuja depleção resulta em deficiência de células tronco limbais (LSCD, “limbal stem cell deficiency”), uma condição desafiadora, cujos aspectos fisiopatológicos permanecem sob investigação. Conduas atuais para casos de LSCD podem envolver procedimentos em terapia celular e em bioengenharia tecidual, que visam a restauração do estroma corneolimbais e a reposição de CTs perdidas, ou seja, a reconstrução da superfície ocular. Constructos para reconstrução de superfície ocular podem ser obtidos a partir de explantes limbais cultivados sobre membranas amnióticas (MAs). Para grupos selecionados de pacientes, em que as condutas cirúrgicas conservadoras estão contraindicadas para tratar LSCD, emprega-se o procedimento de reconstrução da superfície ocular com células cultivadas; todavia, dado o custo elevado e a sofisticação da terapia celular, os benefícios terapêuticos do método estão aquém do desejável. Trata-se de técnica em evolução, cujo aprimoramento está mobilizando pesquisadores de todo o mundo. Para melhorar os resultados da terapia limbal, diferentes sistemas de cultivo celular estão sendo avaliados e comparados. Uma característica importante dos sistemas de cultivo celular é a configuração. Os sistemas podem ser bidimensionais, formados por monocamada de um substrato contactando uma das faces da célula; ou tridimensionais, onde as células ficam contidas ou “ensanduichadas” em um microambiente que estimula suas faces dorsal e ventral. Os métodos atuais para expansão de células epiteliais limbais sobre MA configuram sistemas bidimensionais. Sistemas tridimensionais formados por células epiteliais limbais “ensanduichadas” entre duas MAs não foram, até o presente, tentados.

Na presente pesquisa, avaliaram-se e compararam-se sistemas bidimensionais e tridimensionais para a expansão de células destinadas ao tratamento da LSCD experimentalmente induzida em olhos de coelhos. O sistema tridimensional, como configurado neste estudo, é também designado de cultivo sanduíche.

6. Conclusões

Os resultados do presente estudo sugerem que modificações na configuração do sistema de cultivo, de bi- para tridimensional, quando envolvem MA como substrato, elevam a proliferação celular, mas ensejam perda de células progenitoras intensamente imunomarcadas para delta p63. Ademais, que elas não são decisivas para o desfecho terapêutico, pois os achados clínicos do G-Sand foram equiparáveis aos do G-mono. Como vantagem do G-Sand, ele foi associado com maior quantidade de células progenitoras na córnea, o que teoricamente pode influenciar a viabilidade ou a sobrevida dos transplantes.

7. Referências*

- AFHARKHAMSEH, N.; GHAHARI, E.; ESLANI, M.; DJALILIAN, A.R. A simple mechanical procedure to create limbal stem cell deficiency in mouse. **Journal of Visualized Experiments**, n.117, e54658, 2016. Disponível em: <10.3791/54658>
- AHMAD, S.; FIGUEIREDO, F.; LAKO, M. Corneal epithelial stem cell: Characterization, culture and transplantation. **Regenerative Medicine**, v.1, n.1, p.29-44, 2006. Disponível em: <10.2217/17460751.1.1.29>.
- AHMAD, S.; KOLLI, A.; LAKO, M.; FIQUEIREDO, F.; DANIELS, J.T. Stem cell therapies for ocular surface disease. **Drug Discovery Today**, v.15, n.7/8, p.306-313, 2010. Disponível em: <10.1016/j.drudis.2010.02.001>.
- ALDROVANI, M.; LAUS, J.L. Membranas amnióticas nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular. **Investigação**, v.4, n.2, p.10-20, 2015.
- ALDROVANI, M.; LIMA, T.B.; PADUA, I.R.M.; KOBASHIGAWA, K.K.; VALDETARO, G.P.; FILEZIO, M.R.; CRISTOVAM, P.C.; GOMES, J.A.P.; LAUS, J.L.. Remodeling of higher order chromatin-DNA structure in rabbit corneal limbal epithelial progenitor cells grown on human intact and denuded amniotic membrane. In: **Conference of the European College of Veterinary Ophthalmologists – ECVO**. Helsinki, Finland, p.24, 2015.
- ALDROVANI, M.; FILEZIO, M.R.; LAUS, J.L. A supramolecular look at microenvironmental regulation of limbal epithelial stem cells and the differentiation of their progeny. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.80, n.4, p.268-272, 2017. Disponível em: <10.5935/0004-2749.20170066>
- 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.127-42, 2009.
- ANDRADE, A.L.; CAMPOS, M.Q.; GOMES, J.A.P.; BERTO, A.G.A.; MICHELACCI, Y.M. Effect of amniotic membrane transplantation on corneal healing and proteoglycan expression in a experimental model of limbal deficiency in rabbits. **European Journal of Ophthalmology**, v 20, n.2, p.290-299, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967677>
- ARTYM, V.V.; MATSUMOTO, K. Imaging cells in three-dimensional collagen matrix. **Current Protocols in Cell Biology**, v.10.18, n.10, p.1-20, 2010. Disponível em: <10.1002/471143030.cb1018s48>

* De acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT – NBR 6023/2002; <http://www.abntcolecao.com.br>

ATALLAH, M.R.; PALIOURA, S.; PEREZ, V.L.; AMESCUA, G. Limbal stem cell transplantation: current perspectives. **Clinical Ophthalmology**, v.10, p.593-602, 2016. Disponível em: <10.2147/OPHTH.S83676>.

AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C.T.; DUA, H.S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **British Journal of Ophthalmology**, v.83, n. 4, p.399-402, 1999.

BALLESTER-BELTRÁN, J.; LÉBOURG, M.; RICO, P.; SALMERON-SÁNCHEZ, M. Cell migration within confined sandwich-like nanoenvironments. **Nanomedicine**, v.10, n.5, p.815-828, 2015. Disponível em: <10.2217/nnm.14.217>.

BAN, Y.; COOPER, L.J.; FULLWOOD, N.J.; NAKAMURA, T.; TSUZUKI, M.; KOIZUMI, N.; DOTA, A.; MOCHIDA, C.; KINOSHITA, S. Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. **Experimental Eye Research**, v.76, n.6, p.735-743, 2003. Disponível em: <10.1016/S0014-4835(03)00033-2>

BARACHETTI, L.; GIUDICE, C.; MORTELLARO, C.M. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.5, p.326-330, 2010. Disponível em: <10.1111/j.1463-5224.2010.00821.x>.

BARROS, P.S.M.; GARCIA, J.A.; LAUS, J.L, FERREIRA AL, SALLES GOMES TL. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, p.119-123, 1998. Disponível em: <10.1046/j.1463-5224.1998.00026.x>.

BAYLIS, O.; FIGUEIREDO, F.; HENEIN, C.; LAKO, M.; AHMAD, S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review 510 of the outcomes. **Journal Cell Biology**, v.112, p.993-1002, 2011. Disponível em: <10.1002/jcb.23028>.

BEHAEGEL, J.; DHUBHGHAILL, S.N.; KOPPEN, C.; ZAKARIA, N. Safety of cultivated limbal epithelial stem cell transplantation for human corneal regeneration. **Stem Cells International**, v.2017, id.6978253, 2017. Disponível em: <10.1155/2017/6978253>.

BERTHIAUME, F.; MOGHE, P.V.; TONER, M.; YARMUSH, M.L. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. **FASEB J**, v.10, p.1471-83, 1996.

BRIGHTBILL, F.S. **Corneal Surgery: Theory, Technique and Tissue**. Elsevier. USA. 945p, 2009

BROOKS, D.E.; OLLIVIER, F.J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.611-622, 2004. Disponível em: <10.1016/j.cvsm.2003.12.005>.

BRUNELLI, A.T.J.; VICENTE, F.A.M.; CHAHUD, F.; ORIÁ, A.P.; BOLZAN, A.A.; CAMPOS, C.F.; DORIA NETO, F.A.; LAUS, J.L. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1194-1204, 2007. Disponível em: <10.1590/S0102-09352007000500015>.

CHATTERJEE, S. Artefacts in histopathology. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.18, n.suppl.1, s11-s116, 2014. Disponível em: <10.4103/0973-029X.141346>

CHEN, B.; MI, S.; WRIGHT, B.; CONNON, C.J. Differentiation status of limbal epithelial cells cultured on intact and denuded amniotic membrane before and after air-lifting. **Tissue Engineering Part A**, v.16, n.9, p.2721-29, 2010. Disponível em: <10.1089/ten.tea.2009.0711>.

CONNON, C.J.; DOUTCH, J.; CHEN, B.; HOPKINSON, A.; METHAN, J.S.; NAKAMURA, T.; KINOSHITA, S.; MEEK, K.M. The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration. **British Journal of Ophthalmology**, v.94, n.8, p.1057-1061, 2010. Disponível em: <10.1136/bjo.2008.153064>.

CRISTOVAM, P.C.; GLÓRIA, M.A.; MELO, G.B.; GOMES, J.A.P. Importância do co-cultivo com de fibroblastos de camundongo 3T3 para estabelecer cultura de suspensão de células epiteliais do limbo humano. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.71, n.5, p. 689-694, 2008. Disponível em: <10.1590/S0004-27492008000500015>.

CROSSON, C.E.; KLYCE, S.D.; BEUERMAN, R.W. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process, **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.27, p.464-473, 1986.

DANIELS, J.T.; DART, J.K.G.; TUFT, S.T.; KHAW, P.T. Corneal stem cell in review. **Wound Repair Regeneration**, v.9, n.6, p.483-494, 2001. Disponível em: <10.1046/j.1524-475x.2001.00483.x>.

DE ROTH, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. **Archives of Ophthalmology**. v.23, p.522-5, 1940.

DUA, H.S.; JOSEPH, A.; SHANMUGANATHAN, V.A.; JONES, R.E. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. **Eye**, v.17, n.8, p.877-885, 2003. Disponível em: <10.1038/sj.eye.6700573>.

DUA, H.S.; GOMES, J.A.; KING, A.J.; MAHARAJAN, V.S. The amniotic membrane in ophthalmology; **Survey of Ophthalmology**; v.49, n.1, v.51-77, 2004.

DUA, H.S.; SHANMUGANATHAN, V.A.; POWEL-RICHARDS, A.O.; TIGHE, P.J.; JOSEPH, A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. **British Journal Ophthalmology**, v.89, n.5, p.529-532, 2005. Disponível em: <10.1136/bjo.2004.049742>.

DUA, H.A.; MIRI, A.; ALOMAR, T.; YEUNG, A.M.; SAIND, D.G. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: Testing of dogma. **Ophthalmology**, v.116, n.5, p.856-863, 2009. Disponível em: <10.1016/j.optha.2008.12.017>.

DUA, H.S.; MIRI, A.; SAID, D.G. Contemporary limbal stem cell transplantation – a review. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.38, p.104-117, 2010. Disponível em: <10.1111/j.1442-9071.2010.02229.x>.

ESPANA, E.M.; KAWAKITA, T.; ROMANO, A.C.; DI PASCUALE, M.; SMIDDY, R.; LIU, C.Y.; TSENG, S.C. Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.44, n.12, p.5130-5135, 2003.

FISHER AS, TAM RY, SHOICHET MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. **Tissue Engineering Part A**, v.20, n.5, p.895-898, 2014. Disponível em: <10.1089/ten.tea.2013.0765>.

GAN, L.; Van SETTEN, G.; SEREGARD, S.; FAGERHOLM, P. Proliferating cell nuclear antigen colocalization with corneal epithelial stem cells and involvement in physiological cell turnover. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.73, p. 491-495, 1995.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; KIM, H. Effect of leukocytes on corneal cellular proliferation and wound healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.40, n.3, p.575-581, 1999.

GHOUBAY-BENALLAOUA, D.; SANDALI, O.; GOLDSCHMIDT, P.; BORDERIE, V. Kinetics of expansion of human limbal epithelial progenitor cells in primary culture of explants without feeders. **PLoS One**, v.8, n.12, p.e81965, 2013. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0081965>.

GIACOMINI, C.; FERRARI, G.; BIGNAMI, F.; RAMA, P. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal neovascularization. **Experimental Eye Research**, v.121, p.1-4, 2014. Disponível em: <10.1016/j.exer.2014.02.005>.

GOEL, H.L.; UNDERWOOD, J.M.; NICKERSON, J.A.; HSIEH, C.; LANGUINO, L.R. β_1 integrins mediate cell proliferation in three-dimensional cultures by regulating expression of the sonic hedgehog effector protein, GLI1. **Journal of Cell Physiology**, v.224, n.1, p.210-217, 2010. Disponível em: <10.1002/jcp.22116>

GOKTAS, S.; ERDOGAN, E.; SAKARYA, R.; SAKARYA, Y.; YILMAZ, M.; OZCIMEN, M.; UNLUKAL, N.; ALPFIDAN, I.; TAS, F.; ERDOGAN, E.; BUKUS, A.; IVACIK, S.. Inhibition of corneal neovascularization by topical and subconjunctival tigecycline. **Journal of Ophthalmology** 2014 (2014): article ID 452685, 6 pages, 2014. Disponível em: <10.1155/2014/452685>.

GOMES, J.A.P.; KOMAGOME, C.M.; SANTOS, N.; CHAVES, A.P.; CUNHA, M.C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular nas ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.62, n.5, p.562-576, 1999. Disponível em: <10.1590/S0004-27491999000500004>.

GOMES, J.A.P. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n.1, p. 91-96, 2000. Disponível em: <10.1590/S0004-27492000000100018>

GOMES, J.A.P.; PAZOS, H.S.B.; SILVA, A.B.E.; CRISTOVAM, P.C.; BELFORT JÚNIOR, R. Transplante de células-tronco epiteliais límbicas alógenas expandidas ex vivo sobre membrana amniótica: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**; v.72, n.2, p.254-256, 2009. Disponível em: <10.1590/S0004-27492009000200025>.

GONZÁLEZ, S.; CHEN, L.; DENG, S.X. Comparative study of xenobiotic-free media for the cultivation of human limbal epithelial stem/progenitor cells. **Tissue Engineering Part C**, v.23, n. 4, p.219-227, 2017. Disponível em: <10.1089/ten.tec.2016.0388>.

GRIEVE, K.; GHOUBAY, D.; GEORGEON, C.; THOUVENIN, O.; BOUHERAOUA, N.; PAQUES, M.; BORDERIE, V.M. Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche. **Experimental Eye Research**, v.140, p.75-84, 2015. Disponível em: <10.1016/j.exer.2015.08.003>.

GRIFFITH, M.; OSBORNE, R.; MUNGER, R.; XIONG, X.; DOILLON, C.J.; LAYCOCK, N.L.; HAKIM, M.; SONG, Y.; WATSKY, M.A.. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. **Science**, v.286, n.5447, p.2169-2172, 1999.

GRUETERICH, M.; ESPANA, E.M.; TOUHAMI, A. Phenotypic study of a case with successful transplantation of ex vivo expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v.109, p.1547-1552, 2002.

GRUETERICH, M.; ESPANA, E.; TSENG, S.C.G. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact denuded amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**; v.43, n.1, p.63-71, 2002.

HAAS, V.R. **Análise do comportamento de células Vero em géis de colágeno tipo I utilizando a técnica de cultivo em sanduíche.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, 2000, p 51.

HASHEMI, H.; SALEHNIA, M.; KAMALI, M.; BOROUJENI, M.B. The histological characteristic of cultured oral epithelium in diferente culture conditions. **Iranian Biomedical Journal**, v.13, n.2, p.109-15, 2009.

HAY, E.D. Cell biology of the extracellular matrix. 1st. New York: **Plenum Press**, p. 468, 1991.

HIGA, K.; SHIMMURA, S.; KATO, N.; KAWAKITA, T.; MIYASHITA, H.; ITABACHI, Y.; FUKUODA, K.; SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane Carrier. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.48, n.2, p.597-604, 2007. Disponível em: <10.1167/iovs.06-0664>.

HOLLAND, E.J.; MANNIS, M.; BARRY LEE, W. **Doenças da Superfície Ocular**. Saunders Elsevier Rio de Janeiro, p. 317, 2015.

HOLMES, D.F.; GILPIN, C.J.; BALDOCK, C.; ZIESE, U.; KOSTER, A.J.; KADLER, K.E. Corneal collagen fibril structure in three dimensions: structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization. **Cell Biology**, v.98, n.13, p.7307-7312, 2001.

JEON KW. International Review of Cell and Molecular Biology. In: **International Review of Cytology**, Elsevier. 3 edição. Volume 319, 2015.

KAWAKITA, T.; ESPANA, E.M.; 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. **American Journal of Pathology**, v.167, p.381-393, 2005. Disponível em: <10.1016/S0002-9440(10)62983-5>.

KIM, J.C.; TSENG, S.C.G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v.14, n.5, p.473-84, 1995.

KOBASHIGAWA, K.K.; ALDROVANI, M.; LIMA, T.B.; PADUA, I.R.M.; CRIVELARO, R.M.; SOBRINHO, A.A.F.B.; SILVA, P.E.S.; CRISTOVAM, P.C.; GOMES, J.A.P.; LAUS, J.L. Human amniotic membrane promotes ex vivo expansion of rabbit limbal epithelial cells, without air-lifting or feed layer. In: **Conference of the European College of Veterinary Ophthalmologists** – ECVO. Helsinki, Finland, p.17, 2015.

KOIZUMI, N.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N.J.; KAWASAKI, S.; TANIOKA, H.; KOIZUMI, K.; KOCIOK, 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 Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.245, n.1, p.123-134, 2007. Disponível em: <10.1007/s00417-005-0095-3>.

LAI, C.; YAO, W.; LIN, S.; LIU, H.; CHANG, H.; HU, F.; CHEN, W. Changes of ocular surface and inflammatory response in a rabbit modelo f short-term exposure keratopathy. **PLoS ONE**, v.10, n. 9, p. e0137186. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0137186>.

LAUS, J.L.; ORIÁ, A.P. Doenças corneanas em pequenos animais. **Revista de Educação Continuada do CRMV SP**, v.2, n.1, p.26-33, 1999.

LE, Q.; YANG, Y.; DENG, S.X.; XU, J. Correlation between the existence of the palisades of Vogt and limbal epithelial thickness in limbal stem cell deficiency. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.45, n.3, p.224-231, 2016. Disponível em: <10.1111/ceo.12832>.

LEVIS, H.J.; MASSIE, I.; DZIASKO, M.A.; KAASI, A.; DANIELS, J.T. Rapid tissue engineering of biomimetic human corneal limbal crypts with 3D niche architecture. **Biomaterials**, v.34, n.35, p.:8860-8868, 2013. Disponível em: <10.1016/j.biomaterials.2013.08.002>.

LI, F.; XU, Y.; XU, X.; XU, B.; ZHAO, J.; ZHANG, X. Fms-related tyrosine kinase 3 ligand promotes proliferation of placenta amnion and chorion mesenchymal stem cells in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v.10, n.1, p.322-328, 2014. Disponível em: <10.3892/mmr.2014.2220>.

LI, W.; HAYASHIDA, Y.; CHEN, Y.T.; TSENG, S.C.G. Niche regulation of corneal epithelial stem cell at the limbus. **Cell Research**, v.17, n.1, p.26-36, 2007. Disponível em: <10.1038/sj.cr.7310137>.

LOUREIRO, R.R.; CRISTOVAM, P.C.; MARTINS, C.M.; COVRE, J.L.; SOBRINHO, J.A., RICARDO, J.R.; HAZARBASSANOV, R.M.; HÖFLING-LIMA, A.L.; BELFORT, R.JR.; NISHI, M.; GOMES, J.A. Comparison of culture media for ex vivo expansion of limbal epithelial progenitor cells. **Molecular Vision**, v.19, p.69-77, 2013.

MALHOTRA, C.; JAIN, A.K. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. **World Journal Transplantation**. V.4, n.2, p.111-21, 2014. Disponível em: <10.5500/wjt.v4.i2.111>.

MARIAPPAN, I.; KACHAM, S.; PURUSHOTHAM, J.; MADDILETI, S.; SANGWAS, V.S. Spatial distribution of niche and stem cells in ex vivo human limbal cultures. **Stem Cells Translational Medicine**, v.3, n.11, p.131-41, 2014. Disponível em: <10.5966/sctm.2014-0120>.

MEI, H.; GONZALES, S.; DENG, S.X. Extracellular Matrix is an Important Component of Limbal Stem Cell Niche. **FASEB Journal**, v.3, n.4, p.879-894, 2012. Disponível em: <10.3390/jfb3040879>.

MEIER, S.; HAY, E.D. Stimulation of corneal differentiation by interaction between cell surface and extracellular matrix. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, n.2, p.275-291, 1975.

MEYER-BLAZEJWSKA, E A; KRUSE, FE; BITTERER, K; MEYER, C; HOFMANN-RUMMELT, C; WÜNSCH, P; SCHLÖTZER-SCHREHARDT, U. Preservation of the limbal stem cell phenotype by appropriate culture techniques. **Cornea**, v.51, n.2, p.765-774, 2010. Disponível em: <10.1167/iovs.09-4109>.

MIRI, A.; AL-AQUABA, M.; OTRI, A.M.; FARES, U.; SAID, L.A.; DUA, H.S. In vivo confocal microscopic features of normal limbus. **British Journal of Ophthalmology**, v.96, n.4, p.530-536, 2012. Disponível em: <10.1136/bjophthalmol-2011-300550>.

NAKAMURA, T.; INATOMI, T.; SOTOZONO, C.; KOIZUMI, N.; KINOSHITA, S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.51, p.187-207, 2016. Disponível em: <10.1016/j.preteyeres.2015.07.003>.

PARENTE, D.R.; MORAES SILVA, M.R.B.; SILVA Jr, R.G.; MARQUES, M.A. Modelos experimentais de deficiência limbar em coelhos – análise clínica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.65, n.2, p.153-160, 2002. Disponível em: <10.1590/S0004-27492002000200002>

PARENTE, D.R.; MORAES SILVA, M.R.B.; SILVA Jr, R.G.; MARQUES, M.A. Modelos de neovascularização corneana em coelhos – Análise morfológica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, n.5, p.659-666, 2003. Disponível em: <10.1590/S0004-27492003000500021>

PATHAK., M.; OLSTAD, O.K.; DROLSUM, L.; MOE, M.C.; SMORODINOVA, N.; KALASOVA, S.; JIRSOVA, K.; NICOLAISSEN, B.; NOER, A.; The effect of culture medium and carrier on explant culture of human limbal epithelium: A comparison of ultrastructure, keratin profile and gene expression. **Experimental Eye Research**, v.153, p.122-132, 2016. Disponível em: <10.1016/j.exer.2016.09.012>

PELLEGRINI, G.; TRAVERSO, C.E.; FRANZI, A.T.; ZINGIRIAN, M.; CANCEDDA, R.; DE LUCA, M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. **Lancet**, v.349, n.9057, p.990-993, 1997. Disponível em: <10.1016/S0140-6736(96)11188-0>.

PUANGSRICHARERN, V.; TSENG, S.C. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v.102, n.10, p.1476-1485, 1995.

PRABHASAWAT, P.; TESAVBIBUL, N.; KOMOLSURADEJ, W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. **British Journal of Ophthalmology**, v.85, n.12, p.1455-1463, 2001.

RAMA, P.; MATUSKA, S.; PAGANONI, G.; SPINELLI, A.; DE LUCA, M.; PELLEGRINI, G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. **New England Journal of Medicine**, v.363, p.147-155, 2010. Disponível em: <10.1056/NEJMoa0905955>.

REILLY, G.C.; ENGLER, A.J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **Journal of Biomechanics**; v.43, n.1, p.55-62. 2010. Disponível em: <10.1016/J.JBIOMECH.2009.09.009>.

RENDAL-VASQUEZ, M.E.; SAN-LUIZ-VERDES, A.; YEBRA-PIMENTEL-VILAR, M.T.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, I.; DOMENECH-GARCÍA, N.; ANDIÓN-NÚÑEZ, C.; BLANCO-GARCÍA, F. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. **Cell and Tissue Banking**, v.13, n.3, p.513-519, 2012. Disponível em: <10.1007/s10561-012-9300-x>.

ROHAINA, C.M.; THEN, K.Y.; NG, A.M.; WAN ABDUL HALIM, W.H.; ZAHIDIN A.Z.; SAIM, A.; IDRUS, R.B. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. **Translational Research**; v.163, n.3, p.200-210, 2014. Disponível em: <10.1016/j.trsl.2013.11.004>.

SAMPAIO, R.L.; RANZANI, J.J.T.; RODRIGUES JUNIOR, V.; STACCIARINI, M.S.; BRAGA, E.M.; CORREZZI, C. Aspectos clínicos e imunopatológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenóloga fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1077-1085, 2006. Disponível em: <10.1590/S0102-09352006000600016>.

SANGWAN, V.S.; BASU, S.; MACNEIL, S.; BALASUBRAMANIAN, D. A simple epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. **British Journal of Ophthalmology**, v.96, n.7, p.931-934, 2012. Disponível em: <10.1136/bjophthalmol-2011-301164>.

SCHERMER, A.; GALVIN, S.; SUN, T.T. Differentiation related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. **Journal Cell Biology**, v.103, n.1, p.49-62, 1986.

SCHLÖTZER-SCHREHARDT, U.; KRUSE, F.E. Identification and characterization of limbal stem cells. **Experimental Eye Research**, v.81, n.3, p.247-264, 2005. Disponível em: <10.1016/j.exer.2005.02.016>.

SELVER, O.B.; DURAK, I.; GÜRDAL, M.; BAYSAL, K.; ATES, H.; OZBEK, Z.; WANG, Z.; WU, A.; WOLOSIN, J.M. Corneal recovery in a rabbit limbal stem cell deficiency model by autologous grafts of tertiary outgrowths from cultivated limbal biopsy explants. **Molecular Vision**, v.22, p.138-49, 2016.

SHORTT, A.J.; SECKER, G.A.; MUNRO, P.M.; KHAW, P.T.; TUFT, S.J.; DANIELS, J.T. Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells. **Stem Cells**, v.25, n.6, p.1402-1409, 2007. Disponível em: <10.1634/stemcells.2006-0580>.

SILVA, M.L.; TRUJILLO, D.Y.T.; RIBEIRO, A.P.; LAUS, J.L. Topical 1% nalbuphine on corneal sensivity and epitheilization after experimental lamellar keratectomy in rabbits. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.679-684, 2012.

SOLOMON, A.; ELLIES, P.; ANDERSON, D.F.; TOUHAMI, A; GRUETERICH, M.; ESPANA, E.M.; GOTO, E.; FEUER, W.J.; TSENG, S.C. Long-term outcome of keratolimbial allograft with or without keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v.109, n.6, p.1159-1166, 2002.

SUZUKI, K.; SAITO, J.; YANAI, R.; YAMADA, N.; CHIKAMA, T.; SEIKI, K.; NISHIDA, T. Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. **Retinal and Eye Research**, v.22, p.113-133, 2003.

SWIFT, B.; PFEIFER, N.D.; BROUWER, K.L.R. Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. **Drug Metabolism Review**, v.42, n.3, p.446-471, 2010. Disponível em: <10.3109/03602530903491881>.

TANIOKA, H.; KAWASAKI, S.; YAMASAKI, K.; ANG, L.P.; KOIZUMI, N.; NAKAMURA, T.; YOKOI, N.; KOMURO, A.; INATOMI, T.; KINOSHITA, S. Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.47, n.9, p.3820-3827, 2007.

THOFT, R.A. Conjunctival transplantation. **Archives of Ophthalmology**, v.195, p.1425-1427, 1977.

TI, S.; ANDERSON, D.; TOUHAMI, A.; KIM, C.; TSENG, S.C.G. Factors affecting outcome follong transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.43, p.2584-2592, 2002.

TOWNSEND, W.M. The limbal palisades of Vogt. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v.89, p.721-756, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1298638/pdf/taos00010-0740.pdf>>.

TSENG SCG, PRABHASAWAT P, BARTON K. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Archives of Ophthalmology**, v.116, n.4, p.431-41, 1998. Disponível em: <10.1001/archopht.116.4.431>.

TRCIN, M.T.; DEKARIS, I.; MIJOVIC, B.; BUJIC, M.; ZDRAVEVA, E.; DOLENEC, T.; PAUK-GULIC, M.; PRIMORAC, D.; CRNJAC, J.; SPOLJARIC, B.; MRSIC, B.; KUNA, K.; SPOLJARIC, D.; POPOVIC, M. Synthetic vs natural scaffolds for human limbal stem cells. **Croatian Medical Journal**, v.56, n.3, p.246-56, 2015. Disponível em: <10.3325/cmj.2015.56.246>.

TRIEF, D.; CHODOSH, J.; COLBY, K.; WOODWARD, M.A. **Chemical (alkali and acid) injury of the conjunctiva and cornea**. American academy of ophthalmology, 2017. Disponível em: <[http://eyewiki.aao.org/Chemical_\(Alkali_and_Acid\)_Injury_of_the_Conjunctiva_and_Cornea#Dry_eye](http://eyewiki.aao.org/Chemical_(Alkali_and_Acid)_Injury_of_the_Conjunctiva_and_Cornea#Dry_eye)>. Acesso em: 10 fev. 2018.

TSAI, R.J.; TSAI, R.Y. From stem cell niche environments to engineering of corneal epithelium tissue. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.58, n.2, p.111-119, 2014. Disponível em: <10.1007/s10384-014-0306-8>.

VALDETARO, G.P.; ALDROVANI, M.; PADUA, I.R.M.; CRISTOVAM, P.C.; GOMES, J.A.P.; LAUS, J.L. Supra-organization and optical anisotropies of the extracellular matrix in the amniotic membrane and limbal stroma before and after explant culture. **Biomedical Optics Express**, v.7, n.12, p.4982-4994, 2016. Disponível em: <10.1364/BOE.7.004982>.

VAN DER LOOS. Multiple Immunoenzyme Staining: Methods and Visualizations for the Observation with Spectral Imaging. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**; 56(4):313–328, 2008.

VAN BUSKIERK, E.M. The anatomy of the limbus. **Eye**, v.3, n.2, p.101-108, 1989.

VAZIRANI, J.; ALI, M.H.; SHARMA, N.; GUPTA, N.; MITTAL V.; ATALLAH, M.; AMESCUAR, G.; CHOWDHURY, T.; ABDALA-FIGUEROLA, A.; RAMIREZ-MIRANDA, A.; NAVAS, A.; GRAUE-HERNÁNDEZ, E.O.; CHODOSH, J. Autologous simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency: multicentre results. **British Journal of Ophthalmology**, v.0, p.1-5, 2016. Disponível em: <10.1136/bjophthalmol-2015-307348>.

VOGT A. The limbus. In: Bonn-Bad G. **Textbook and Atlas of Slit Lamp Microscopy of the Living Eye**. 3 ed. Wayenborgh: p.52-53, 1921.

XU, B.; FAN, T.; ZHAO, J.; SUN, A.; WANG, R.; HU, X.; YU, H.; FAN, X.; XU, X. Transplantation of tissue-engineered human corneal epithelium in limbal stem cell deficiency rabbit models. **International Journal of Ophthalmology**, v.5, n.4, p.424-429, 2012. Disponível em: <10.3980/j.issn.2222-3959.2012.04.04>

WANG, X.; SUI, S.; Pulsatile culture of a poly(DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) sandwiched cell/hydrogel construct fabricated using a step-by-step mold/extraction method. **Artificial Organs**, v.35, n.6, p.645-655, 2011. Disponível em: <10.1111/j.1525-1594.2010.01137.x>.

WIED, G.L. In Introduction to quantitative cytochemistry. **New York: Academic Press**, p.557-600, 1966.

YELLAND, L.N.; SULLIVAN, T.R.; VOYSEY, M.; LEE, K.J.; COOK, J.A.; FORBES, A.B. Applying the intention-to-treat principle in practice: Guidance on handling randomisation errors. **Clinical Trials**; 12(4):418–423, 2015.

YOON, J.J.; ISMAIL, S.; SHERWIN, T. Limbal stem cells: central concepts of corneal epithelial homeostasis. **World Journal of Stem Cells**, v.6, n.4, p.391-403, 2014. Disponível em: <10.4252/wjsc.v6.i4.391>

ZAMUDIO, A.; WANG, Z.; CHUNG, S.; WOLOSIN, J.M. Inhibition of TGF beta cell signaling for limbal explants culture in serumless defined xeno-free conditions. **Experimental Eye Research**, v.145, p.48-57, 2016. Disponível em: <10.1016/j.exer.2015.10.021>.

ZHANG, S. Beyond the Petri dish. **Nature Biotechnology**, v.22, n.2, p.151-152, 2004.

ZHANG, H.; BROWN, K.D.; LOWE, S.P.; LIU, G.; STEELE, D.; ABBERTON, K.; DANIELL, M. Acrylic acid surface-modified contact lens for the culture of limbal stem cells. **Tissue engineering Part A**, v.20, n.11, p.:1593-1602, 2014. Disponível em: <10.1089/ten.tea.2013.0320>.

ZHAO, Y.; MA, L. Systematic review and meta-analysis on transplantation of ex vivo cultivated limbal epithelial stem cell on amniotic membrane in limbal stem cell deficiency. **Cornea**, v.34, n.5, p.592-600, 2015. Disponível em: <10.1097/ICO.0000000000000398>.