

ALINE CARDOSO PEREIRA

Biocompatibilidade do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) na córnea de coelhos

Araçatuba

2023

ALINE CARDOSO PEREIRA

Biocompatibilidade do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) na córnea de coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade

Araçatuba

2023

P436b Pereira, Aline Cardoso
Biocompatibilidade do polímero poli(butileno
adipato-co-tereftalato) (PBAT) na córnea de coelhos / Aline
Cardoso Pereira. -- Araçatuba, 2023
66 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Alexandre Lima de Andrade

1. Materiais biocompatíveis. 2. Teste de materiais. 3. Úlcera
da córnea. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

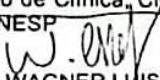
Biocompatibilidade do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) na córnea de coelhos

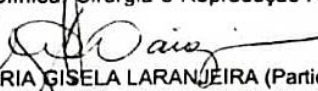
AUTORA: ALINE CARDOSO PEREIRA

ORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

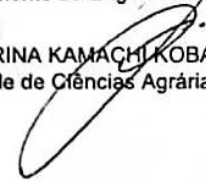
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciência Animal,
área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Prof. Associado ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Prof. Ass. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Ass. Dra. MARIA GISELA LARANJEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Associada ALESSANDRA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Materiais - DEMA / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR


Dra. KARINA KAMACHI KOBASHIGAWA (Participação Presencial)
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 24 de novembro de 2023.

*Aos meus pais, Pedro e Eliane, que já
me deixaram em vida a melhor herança
que poderia existir – a minha formação.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, FMVA, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, por ser minha casa de pós-graduação na profissão – residência, mestrado e doutorado.

Ao meu orientador, professor Alexandre Lima de Andrade, por todos os ensinamentos na oftalmologia veterinária, clínica cirúrgica de pequenos animais e docência - o senhor será sempre inspiração para mim. Agradeço imensamente pela confiança, incentivo e paciência durante todos esses anos de orientação.

À toda a equipe de pesquisa que possibilitaram o desenvolvimento desse projeto, a qual sou muito grata desde o meu mestrado. Em especial e pelo trabalho dessa tese, aos doutorandos Pedro Henrique Chaves de Oliveira e Flávio Duarte Faria, e professor Luciano Tavares Angelo Cintra, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, que cederam seu conhecimento, tempo e laboratório para o processamento das amostras. Ainda, agradeço à minha amiga Gabriela Gallo, pelos cortes histológicos que precisaram ser refeitos.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e ter um lugar no mercado de trabalho, com ética e comprometimento. Posso dizer que tenho orgulho do caminho profissional que tracei até aqui e não tenho dúvidas que quero continuar no aprendizado constante. Devo isso à educação que recebi de vocês.

Aos meus amigos que torceram por mim e me incentivaram a persistir. Vocês são a família que eu escolhi!

E, não menos importante, à Deus, que me deu força, resiliência e persistência nas adversidades do caminho.

“... Cantar e cantar e cantar, a beleza de ser um eterno aprendiz...”

Gonzaguinha

PEREIRA, A. C. **Biocompatibilidade do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) na córnea de coelhos**. 2023. 66 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar a biocompatibilidade da membrana do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) (mPBAT) na córnea de coelhos através de avaliação clínica e histopatológica. Foram utilizados doze coelhos da raça Nova Zelândia, que foram submetidos à tunelização interlamelar estromal em ambos os olhos, e em um dos olhos foi colocada a mPBAT (olho tratado = OT). O olho contralateral foi o olho controle (OC), submetido ao procedimento, mas sem o implante da mPBAT. A avaliação clínica foi realizada nos dias 1, 3, 7, 15, 30, 45 e 60 após o procedimento cirúrgico, e a avaliação histopatológica, com hematoxilina e eosina (HE), picrossirius (PSR) e tricrômico de masson (TM) aos 30 (M30) e 60 dias pós-operatórios (M60). Não houve diferença estatística nos parâmetros clínicos entre OC e OT em nenhum momento estudado, porém houve maior infiltrado inflamatório mononuclear, proliferação de fibroblastos e edema na córnea do OT no M30 e M60 ($p < 0.05$), ainda que essas variáveis tenham sido discretas em sua maioria. Na coloração de PSR, foi observada média de 60,02% de fibras colágenas imaturas no OT no M30, quando comparado a média de 28,05% no OC no M30 ($p = 0.002$). Na coloração com TM, foi observada a proliferação de fibroblastos em meio ao estroma corneal no OT, e maior intensidade da cor azul no OT, quando comparado ao OC, sugerindo maior deposição de colágeno no OT. Considerando a baixa reação inflamatória, associado à característica bioativa aos 30 dias pós-operatórios e bioinerte aos 60 dias pós-operatórios observadas com a coloração de PSR, conclui-se que a mPBAT é um potencial material para aplicação na córnea no tratamento de úlceras de córnea.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Teste de materiais. Úlcera da córnea.

PEREIRA, A. C. **Biocompatibility of the polymer poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) in the cornea of rabbits.** 2023. 66 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The objective of the present work was to study the biocompatibility of the polymer poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) membrane (PBATm) in the cornea of rabbits through clinical and histopathological evaluation. Twelve New Zealand rabbits were used, which underwent interlamellar stromal tunneling in both eyes, and PBATm was placed in one of the eyes (treated eye = TE). The contralateral eye was the control eye (CE), which underwent the procedure, but without PBATm implantation. Clinical evaluation was carried out on days 1, 3, 7, 15, 30, 45 and 60 after surgical procedure, and histopathological evaluation, with hematoxylin and eosin (HE), picrosirius (PSR), and masson's trichrome (MT) at 30 (M30) and 60 postoperative days (M60). There was no statistical difference in clinical parameters between CE and TE at any time studied, but there was greater mononuclear inflammatory infiltrate, fibroblasts proliferation and edema in the cornea of the TE at M30 and M60 ($p < 0.05$), although these variables were mostly discrete. In PSR staining, an average of 60.02% of immature collagen fibers was observed in the TE at M30, when compared to an average of 28.05% in the CE at M30 ($p = 0.002$). In staining with MT, the fibroblasts proliferation was observed in the corneal stroma in the TE, and greater intensity of the blue color in the TE, when compared to the CE, suggesting greater collagen deposition in the TE. Considering the low inflammatory reaction, associated with the bioactive characteristic at 30 postoperative days and bioinert at 60 postoperative days observed with PSR staining, it is concluded that PBATm is a potential material for application to the cornea in the treatment of corneal ulcers.

Keywords: Biocompatible materials. Materials testing. Corneal ulcer.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Poli(butileno adipato-co-tereftalato) - (PBAT)	11
1.2 A córnea	15
1.3 As colorações especiais de picrosirius e tricrômico de masson	16
2 CAPÍTULO 1 - BIOCOMPATIBILIDADE DO POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO) (PBAT) NA CÓRNEA DE COELHOS	23
2.1 Resumo	23
2.2 Abstract	24
2.3 Introdução	24
2.4 Materiais e métodos	26
2.4.1 Animais	26
2.4.2 Membrana de PBAT	26
2.4.3 Procedimento cirúrgico	28
2.4.4 Avaliação clínica	28
2.4.5 Avaliação histopatológica	29
2.4.6 Análise estatística	30
2.5 Resultados	30
2.6 Discussão	36
2.7 Conflitos de interesse	42
2.8 Referências	42
APÊNDICE A – Referências da Introdução Geral	49
ANEXO – Normas da <i>Veterinary Ophthalmology</i>	58

1 INTRODUÇÃO GERAL

A úlcera de córnea é uma lesão em que há perda do epitélio corneal e exposição do estroma. Quando envolve mais da metade da espessura da córnea é classificada como profunda, e além do tratamento clínico, os procedimentos cirúrgicos que envolvem técnicas de suporte são indicados. Muitos tecidos e materiais ainda são estudados para aplicação na córnea em busca da restauração da sua transparência. (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

O poli(butileno adipato-co-tereftalato), de sigla PBAT, é um poliéster biodegradável que ainda não foi estudado para uso na oftalmologia, no entanto, consideramos sua transparência e flexibilidade adequadas para aplicação na córnea. Com o estudo inédito contido nessa tese, acreditamos que o PBAT seja um material com potencial para aplicação na córnea como adjuvante na cicatrização corneana, na necessidade de reparação tectônica. Dessa forma, pode se tratar de uma opção de material sintético para ceratoplastia, de fácil obtenção e baixo custo, caso seja comercializada com esse fim futuramente.

1.1 Poli(butileno adipato-co-tereftalato) - (PBAT)

O PBAT é um copolímero composto dos grupos alifáticos e aromáticos; é degradável devido a presença de um grupo alifático e exibe boas propriedades mecânicas devido a presença de um anel aromático (KANWAL et al., 2022a).

O PBAT é um dos promissores poliésteres do mercado (JIAN; XIANGBIN; XIANBO, 2020), visto que possui benefícios na conservação do meio ambiente devido sua característica biodegradável; o uso indiscriminado de polímeros não biodegradáveis e suas consequências ambientais acarretou interesse pelos polímeros biodegradáveis (FERREIRA et al., 2017; JIAN; XIANGBIN; XIANBO, 2020).

Nos últimos 10 anos, o PBAT na forma de compósitos e blenda tem sido estudado a fim de melhorar suas propriedades mecânicas e diminuir seu custo de produção, o que melhora sua competitividade no mercado quando comparado a outros plásticos. Seus principais usos no mercado são por meio de sacolas de compras, sacolas de compostagem e filmes plásticos utilizados na agricultura, o que

aumenta o rendimento das culturas através da elevação da temperatura e conservação da umidade do solo (figura 1) (JIAN; XIANGBIN; XIANBO, 2020).

Figura 1: embalagens, filmes plásticos e talheres de PBAT



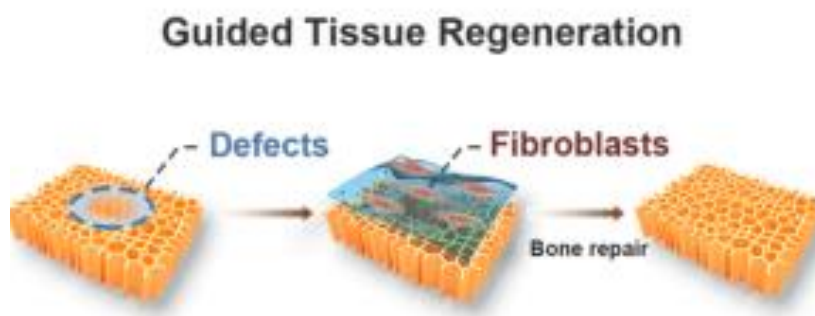
Fonte: JIAN; XIANGBIN; XIANBO, 2020.

No processo de biodegradação, a atividade dos microorganismos é um fator chave; existem dois tipos de mecanismos de biodegradação, degradação abiótica e biótica, podendo ser a biótica aeróbica ou anaeróbica (KANWAL et al., 2022a). Como o PBAT é biodegradável pelo sítio ativo das lipases excretadas pelos microorganismos, pode-se prever que também é degradável pela enzima lipase em condições *in vivo* (ARSLAN et al., 2016). Recentemente tem sido estudado o papel da degradação do PBAT no solo por alguns micro-organismos que aceleram sua biodegradação (AARTHY et al., 2018; JIA et al., 2021; KANWAL et al., 2022b; MUROI et al., 2017; SOULENTHONE et al., 2021; WALLACE et al., 2017).

A taxa de biodegradação é crítica para aplicações *in vivo* (ARSLAN et al., 2016), visto que os produtos da hidrólise do poliéster podem ter grau de toxicidade, sendo os compostos aromáticos mais nocivos que os alifáticos dependendo de suas concentrações (KIM et al., 2001).

Materiais à base de poliésteres também tem sido utilizados para aplicações médicas, como na engenharia de tecidos moles e duros (figura 2), curativos, implantes cirúrgicos, cirurgia reconstrutiva vascular e oftalmologia (DARIE-NIȚĂ; RÂPĂ; FRĂCKOWIAK, 2022).

Figura 2: desenho esquemático do reparo ósseo com um poliéster alifático.



Fonte: ZHANG et al., 2021.

Dos mais de 90 poliésteres conhecidos pelo homem, apenas alguns tipos apresentam aplicações no campo da engenharia de tecidos. Na maioria dos casos, isso se deve a grande variedade de tecidos nativos e suas propriedades, havendo necessidade de compatibilidade entre o tecido e o material introduzido. (DARIE-NIȚĂ; RÂPĂ; FRĂCKOWIAK, 2022).

Além de combinar propriedades mecânicas, o material selecionado precisa ser facilmente utilizável, deve resistir ao procedimento de esterilização e deve demonstrar comportamento pouco tóxico (ou preferencialmente não tóxico) em nível celular. A natureza inerte e biocompatibilidade do material é importante, pois um dispositivo destinado a ser utilizado em condições *in vivo* requer falta de resposta do sistema imunológico do paciente. Já a biodegradabilidade pode garantir que não haverá necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para retirada do dispositivo. (DARIE-NIȚĂ; RÂPĂ; FRĂCKOWIAK, 2022).

O PBAT possui propriedades promissoras para ser utilizado como suporte para crescimento de tecidos (ARSLAN et al., 2016), não apresentando toxicidade celular (LIU et al., 2021; NAR et al., 2014). Arslan et al. (2016) estudaram o PBAT puro, mas submetido a diferentes formas de confecção, em relação às suas características físicas e proliferação celular *in vitro*, e concluíram que todas as formas apresentaram propriedades adequadas para suporte tecidual.

O PBAT tem sido estudado *in vitro* para aplicações ósseas por diversos autores. Balbinot et al. (2021) adicionaram diferentes concentrações de vidros bioativos contendo nióbio ao PBAT, e concluíram que o material pode ser uma alternativa às membranas comercialmente disponíveis, sendo reabsorvível, facilmente

aplicável e bioativo. Nar et al. (2014) utilizaram a mistura do PBAT com PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)), visando combinar suas propriedades de resistência mecânica e osteocondutividade para apoiar a formação de colágeno pelos osteoblastos. Arslan, Çakmak e Gümüşderelioğlu (2018) utilizaram o PBAT puro e com hidroxiapatita, produzido por eletrofiação úmida em 3D, e foram estudadas a proliferação celular, deposição de colágeno e cálcio, e expressão de genes osteogênicos. Castro et al. (2016) utilizaram o PBAT adicionado de PPy (polipirrol) e nanohidroxiapatita, diminuindo a hidrofobicidade do PBAT puro, sua osteocondutividade e proliferação celular. Em relação à afinidade por água, os autores relataram que a gota de água foi totalmente absorvida pelo PBAT/PPy após 7 minutos, enquanto o PBAT puro levou 45 minutos. Rodrigues et al. (2016) estudaram o PBAT associado a nanotubos de carbono para regeneração óssea, e obtiveram por resultados o incremento nas propriedades mecânicas do PBAT, além de viabilidade celular. Branciforti et al. (2019) também estudaram o PBAT e PCL (poli(ϵ -caprolactona)) puros, e adicionados de nanocristais de celulose com bons resultados em relação a propriedades termomecânicas e proliferação e viabilidade celular para aplicações médicas.

Já *in vivo*, o estudo de Ribeiro Neto et al. (2015) utilizou o PBAT associado com hidroxiapatita no subcutâneo de ratos, sendo observada pouca resposta inflamatória aos 30 e 60 dias. Santana-Melo et al. (2017) utilizaram o PBAT associado com nanohidroxiapatita em ratos na regeneração óssea de lesões induzidas na tíbia, avaliadas após seis semanas, e concluíram por se tratar de um potencial material para essa aplicação. Silva et al. (2019) realizaram estudo semelhante ao de Santana-Melo et al. (2017), avaliando os defeitos na tíbia após 4 semanas, com resultados semelhantes.

O PBAT, associado ao PCL, e adicionado à sulfadiazina de prata foi estudado *in vitro* para aplicação em feridas. Além de suas propriedades físicas e mecânicas, foi descrita sua atividade antimicrobiana e tipo de liberação do fármaco, considerada bifásica - uma liberação inicial rápida seguida de uma liberação controlada e sustentada, com duração superior a quatro dias (HARDT et al., 2021). *In vivo*, Varshovaz et al. (2020) utilizaram o PBAT associado à gelatina e adicionado de doxiciclina e RGD (tripeptido composto por arginina-glicina e ácido aspártico, que aumenta a adesão celular) para tratamento de feridas, e obteve bons resultados em relação a proliferação de fibroblastos e viabilidade celular, produção de colágeno,

inibição de metaloproteinases e de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, resultando em rápida cicatrização de feridas induzidas em ratos.

O PBAT, associado a microfibras, e adicionado de polipeptídeos foi estudado *in vitro* para utilização no tratamento do câncer. Os autores concluíram que o material tem potencial valor no carregamento e liberação lenta de polipeptídeos (LIU et al., 2021). Também foi estudado adicionado a 5-fluorouracil e curcumina com o mesmo intuito por Varshosaz et al. (2018), com bons resultados na liberação desses agentes antineoplásicos e morte de células neoplásicas.

Até o presente, estudos versando sobre o PBAT na oftalmologia ainda não foram publicados.

1.2 A córnea

A córnea, junto com a esclera, compreende a túnica fibrosa do olho, e é a superfície de refração mais importante do olho, devido sua transparência e curvatura. Nos animais domésticos, possui quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. (MAGGS, 2008).

O estroma corneal compreende 90% da espessura total da córnea, e é composto de fibrilas de colágeno equidistantes por mucoproteínas e glicoproteínas, e ceratócitos (MAGGS, 2008). Os tipos de colágeno encontrados na córnea são o IV, VI e VII (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009). A córnea do coelho possui colágeno do tipo I em abundância (HASHIMOTO et al., 2016) e apresenta expressão de colágeno tipo III na cicatrização corneal (CINTRON et al., 1988; LORENZO-MARTÍN et al., 2019).

Após uma lesão, o colágeno estromal é substituído lentamente pelo crescimento fibrovascular do limbo adjacente (cicatrização vascular), ativação de ceratócitos em fibroblastos ativos (cicatrização avascular), ou uma combinação dos dois mecanismos. Os ceratócitos do estroma são capazes de se transformar em fibroblastos e sintetizar colágeno, glicosaminoglicanos e mucoproteína da substância fundamental (MAGGS, 2008).

As ceratites ulcerativas são lesões corneais em que há perda do epitélio e exposição do estroma. Quando envolve mais da metade da espessura da córnea é classificada como profunda, e além do tratamento clínico, os procedimentos cirúrgicos

que envolvem técnicas de suporte são indicados - as denominadas ceratoplastias. (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009).

São descritas muitas técnicas de ceratoplastias; dentre essas, podemos citar como técnicas bastante difundidas na especialidade da oftalmologia veterinária os enxertos conjuntivais autógenos (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009), a transposição córneo-conjuntival (CEBRIAN et al., 2021), e o uso de membranas biológicas, como a membrana amniótica (DOWER et al., 2022), a membrana de submucosa suína (CHOW; WESTERMEYER, 2015) e a membrana de submucosa intestinal suína (VANORE et al., 2007).

No entanto, muitos tecidos e materiais ainda são estudados para aplicação na córnea em busca da restauração da sua transparência (GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009); alguns exemplos são a membrana autóloga de fibrina rica em plaquetas (BRUUN et al., 2023), a membrana de colágeno (ANDREEV et al., 2021), a matriz corneal suína descelularizada (HASHIMOTO et al., 2019), a pele de tilápia (MELO et al., 2022) e a mucosa bucal autóloga (MEZZADRI et al., 2021).

Materiais a base de poliéster também tem sido investigados para utilização na córnea, como o PCL (poli(ε-caprolactona)) (BAKHSHANDEH et al., 2021; RAVANI et al., 2021; SALEHI et al., 2017; STAFIEJ et al., 2017), o PLGA (poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)) (RAMACHANDRAN et al., 2019) e o PLGA-PEG-PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico-polietilenoglicol-ácido láctico-co-ácido glicólico)) (PRATOOMSOOT et al., 2008).

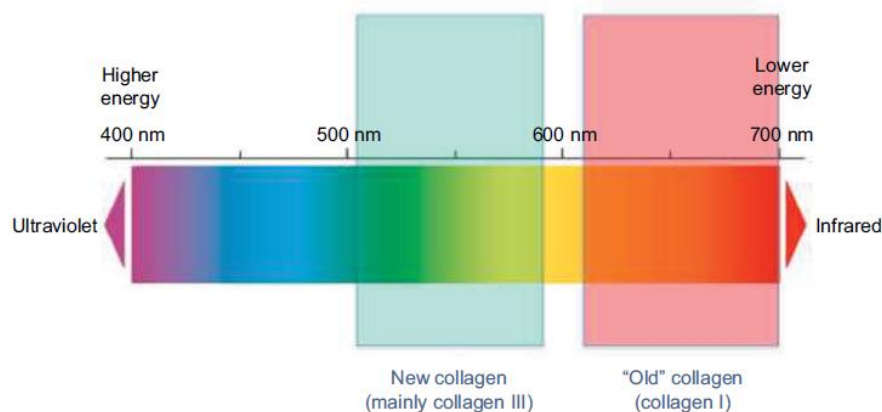
1.3 As colorações especiais de picrosirius e tricrômico de masson

A histopatologia da córnea é uma aliada da clínica oftálmica no estudo de diferentes materiais nessa estrutura, e a coloração picrosirius pode ser utilizada para avaliação do colágeno corneal (HASHIMOTO et al., 2019; LIU et al., 2012a). Essa é uma coloração ácida que se liga especificamente ao colágeno e distingue as fibras de colágeno tipo I e tipo III, e que tem sido extensivamente utilizada em pesquisas odontológicas e médicas (GOPINATHAN et al., 2020), incluindo a avaliação da cicatrização corneal (GRONKIEWICZ et al., 2016; HAKAMI et al., 2020; LORENZO-MARTÍN et al., 2019; XIA et al., 2014).

O material corado com picrosirius é visualizado sob microscopia de luz

polarizada e normalmente mostra fibras finas de colágeno tipo III, que são verdes a amarelo esverdeadas, enquanto fibras colágenas espessas, tipo I, variam de vermelhas a laranja amareladas (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; MONTES; JUNQUEIRA, 1991), como demonstrado na figura 3. A propriedade de birrefringência do colágeno permite essa característica observada sob microscopia de luz polarizada (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Figura 3: Espectro de cores observadas com picrossirius à microscopia sob luz polarizada



Fonte: ZERBINATI; CALLIGARO, 2018.

A seletividade dessa coloração pelo colágeno tem três exceções, observadas por Junqueira, Bignolas e Brentani (1979) no seu estudo com picrossirius em quinze espécies: grânulos querato-hialinos de epitélio cornificado, glândulas mucosas e o coração de peixes. Entretanto, em todas as três exceções mencionadas, nenhuma birrefringência foi observada quando estes materiais foram examinados sob microscopia de luz polarizada.

O uso da microscopia de polarização para identificar colágeno em material corado com picrossirius não somente é o responsável pela sua especificidade como, também, aumenta consideravelmente a eficácia e sensibilidade do método. Isso se deve ao fato de que fibrilas de colágeno muito finas, indetectáveis na microscopia normal, tornam-se visíveis com este método, com fonte de luz contra um fundo escuro (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Coleman (2011) defende que o picrossirius pode trazer mais informações do que a coloração de rotina com hematoxilina e eosina, sendo equivalente aos métodos mais complexos de coloração tricrômica; porém, o autor cita que o tipo específico de colágeno é determinado apenas por imuno-histoquímica com anticorpos específicos,

o que foi, também, afirmado anteriormente por Piérardi (1989).

Lattouf et al. (2014) realizaram um estudo com seis amostras de biópsias cutâneas humanas, sendo três de pacientes saudáveis, e três de pacientes com “Ehlers Danlos” tipo IV, utilizando a coloração de picrosírius. Os autores observaram que ao rotacionar a platina do microscópio em 90° as cores mudavam de vermelho a amarelo para verde, e de verde para amarelo. Ainda, observaram que ao comparar seus resultados com imuno-histoquímica para colágeno tipo III, houve divergência; houve pouca imunomarcagem nos pacientes com “Ehlers Danlos” tipo IV (um resultado esperado para a doença), porém inúmeras fibras verdes na coloração com picrosírius.

Outro trabalho semelhante foi idealizado por López de Padilla et al. (2021) com tendões de ratos. Os autores compararam as cores obtidas com a coloração de picrosírius sem polarização, e girando a platina do microscópio 45° e 90° sob microscopia de luz polarizada, e observaram também mudança nas cores, concluindo que a coloração picrosírius não consegue identificar com precisão o colágeno tipo I e o colágeno tipo III no tendão, o que também foi sustentado com imuno-histoquímica para colágeno tipo I e III.

Em suma, as cores observadas sob microscopia de luz polarizada com a coloração picrosírius dependem apenas da espessura e embalagem da fibra, e não do tipo de colágeno (COLEMAN, 2011; PIÉRARDI et al., 1989). É possível que uma fibra verde seja uma fibra do tipo I imatura e fina ou que um artefato mascare a espessura de uma fibra tipo I espessa (RICH; WHITTAKER, 2005). Coelho et al. (2018) descreveram detalhadamente a metodologia da avaliação de tecido cutâneo com a coloração de picrosírius observada sob microscopia de luz polarizada, para evitar erros de técnica e a ocorrência de artefatos.

Alguns autores seguem essa vertente ao interpretar seus resultados utilizando essa coloração, como Liu et al. (2012a), que consideraram no seu experimento as fibras verdes mais finas e quebradas e fibras vermelhas grossas e alinhadas, porém sem associar as primeiras ao colágeno tipo III e as segundas ao colágeno tipo I. Neste trabalho, o picrosírius foi utilizado para avaliar o colágeno após implante interlamelar de uma matriz dérmica acelular na córnea de coelhos, nos tempos de uma semana pós-operatória, 12 e 24 semanas. Houve predomínio de fibras verdes no grupo controle, em que não houve procedimento cirúrgico, e também nos diferentes tempos com a matriz dérmica acelular.

Diante dessa variação da forma como os resultados/colorações do picrosírius

são interpretadas pelos pesquisadores que utilizam essa técnica, alguns trabalhos de estudo da córnea serão aqui apresentados, e a interpretação dos resultados constarão conforme os próprios autores relataram – fibras maduras e imaturas, fibras espessas e finas, ou colágeno tipo I e tipo III.

Hashimoto et al. (2019) avaliaram a biocompatibilidade da matriz corneal suína descelularizada na córnea com o uso de picrosirius. Foi realizado o implante do material na córnea de coelhos pela combinação de duas técnicas, a realização de um túnel interlamelar de 6 mm e DALK (*deep anterior lamellar keratoplasty*) de 2 mm, o que permitiu avaliar a epiteliação e biocompatibilidade do material no mesmo olho, com histopatologia nos tempos de 8 e 24 semanas pós-operatórias. Com 8 semanas foi observado predomínio de fibras verde amareladas, interpretado como colágeno neoformado/imaturo pelos autores, e com 24 semanas predomínio de fibras vermelhas alaranjadas, sugerindo que houve amadurecimento gradual do colágeno.

Xia et al. (2014) realizaram duas técnicas para quantificar o colágeno corneal no seu experimento após o procedimento de *crosslinking* aos 3, 7, 15, 30, 90 e 180 dias pós-operatórios. No picrosirius, aos 30 dias houve predomínio de fibras de colágeno verdes, do tipo III, e aos 90 também. Com 180 dias houve predomínio de fibras de colágeno vermelhas, tipo I, semelhante ao controle. Os autores também conduziram a avaliação molecular por técnica de *western blot* para detecção do colágeno tipo III, corroborando com os resultados por eles obtidos pela técnica de picrosirius.

Outro experimento que os autores optaram por realizar mais de uma técnica para observação de colágeno foi o de Lorenzo-Martín et al. (2019). As análises foram realizadas 1, 3 e 6 meses para estudo da cicatrização corneal após submeter a córnea de coelhos à queimadura alcalina. Na coloração com picrosirius, com um mês, a região estromal cicatrizada apresentou predomínio de fibras vermelhas, porém com um número elevado de pequenas lacunas com fibras verdes. Aos três meses, foi observado mistura de fibras vermelhas, amarelas e verdes, e aos seis meses houve predomínio de fibras vermelhas, semelhante ao controle, que não foi submetido à queimadura. Os autores também realizaram coloração de impregnação pela prata (Gomori-Grocott) para identificar o colágeno tipo III, e PCR quantitativo para mRNA de colágeno tipo I e tipo III, com resultados semelhantes ao obtido com o picrosirius (LORENZO-MARTÍN et al., 2019).

Em outro trabalho relacionado à cicatrização corneal, foi realizado a coloração

de picrossirius para avaliar o colágeno no uso do antifibrótico ácido suberanolhidroxâmico após queimadura alcalina em córnea de cães, e observaram aos 14 dias, que houve predomínio de fibras verdes quando comparado ao controle, que não foi submetido à queimadura alcalina e mostrou predomínio de fibras vermelhas, uma transição típica de formação de cicatriz. Os autores observaram, também, que o colágeno tipo III se apresentou desorganizado, e clinicamente os animais apresentaram opacidade corneal importante (GRONKIEWICZ et al., 2016).

A quantificação (área/porcentagem) das fibras colágenas vermelhas a laranja amareladas, e verdes a amarelo esverdeadas na córnea pode ser realizada (GRONKIEWICZ et al., 2016; XIA et al., 2014), ou não (HAKAMI et al., 2020; HASHIMOTO et al., 2019; LIU et al., 2012a; LORENZO-MARTÍN et al., 2019). Gronkiewicz et al. (2016) realizaram a quantificação com aumento de 400x, e Xia et al. (2014) com aumento de 200x.

Em estudos *in vitro* também pode ser utilizada a coloração de picrossirius para estudo do colágeno, como os realizados para determinar a síntese de colágeno em uma córnea artificial de fibrina e agarose; nesses experimentos os autores não utilizaram a visualização sob microscopia de luz polarizada (GARZÓN et al., 2014; IONESCU et al., 2011).

Wei et al. (2023) e Sinha et al. (2021) também não observaram suas lâminas coradas com picrossirius sob microscopia de luz polarizada, talvez porque o principal objetivo foi de verificar a quantidade total de colágeno na córnea em modelos de córnea de coelhos para estudo de ceratocone, e em modelos de córneas suínas diabéticas, respectivamente. Entretanto, no estudo de Sinha et al. (2021), os autores utilizaram imuno-histoquímica para quantificar os colágenos tipo I, e PCR para os colágenos tipo III e IV, apesar de associarem a coloração vermelha do picrossirius no fundo branco com colágeno tipo I.

Hakami et al. (2020) realizaram picrossirius após queimadura alcalina em córneas de ratos com o intuito de avaliar o aumento de colágeno na fibrose, e apesar de obterem córneas com fibras vermelhas sob microscopia de luz polarizada aos 14 dias após a lesão, esses resultados não foram discutidos em relação a coloração observada.

O tricrômico de masson é outra coloração que pode ser aliada no estudo histopatológico da córnea (ABDO; HADDAD; EMAM, 2017; ALDAVE et al., 2007; AWWAD et al., 2008; FU et al., 2022; GRIFFITH et al., 2018; GRONKIEWICZ et al.,

2016; GUPTA et al., 2022; GUPTA et al., 2020; HASHIMOTO et al., 2019; KIM et al., 2008; LIU et al., 2012b; MANSOORI et al., 2014; MCLELLAN; ARCHER, 2000; MILMAN et al., 2015; PECORELLA et al., 2013; SINHA et al., 2021; SUBASINGHE et al., 2021; TAI et al., 2009; WERNER; CHEW; MAMALIS, 2006; WOO et al., 2001), uma vez que traz informação em relação à presença de células mesenquimais no estroma (GRONKIEWICZ et al., 2016), a organização das fibras de colágeno (GUPTA et al., 2022) e níveis de deposição de colágeno, que é visto pelo aumento da intensidade da cor azul no estroma corneano (GUPTA et al., 2020). Nessa coloração tricolor, o colágeno corneal fica na cor azul e o citoplasma celular na cor rosa/vermelho (SINHA et al., 2021).

Gupta et al. (2022) utilizaram essa coloração para avaliar a organização do colágeno corneal no seu estudo com a regulação da fibrilogenese corneal pelo proteoglicano decorina em ratos, e Subasinghe et al. (2021) no estudo comparativo da organização do colágeno corneal de coelhos, suínos e humanos. Gupta et al. (2020) estudaram os níveis de deposição de colágeno com o tricrômico de masson em córneas de coelhos submetidas à toxicidade com acroleína.

Gronkiewicz et al. (2016) estudaram a cicatrização corneal com o uso do antifibrótico ácido suberaniolhidroxâmico após queimadura alcalina em córnea de cães, e observaram a presença de células mesenquimais em meio ao estroma corneal na coloração com tricrômico de masson. Sinha et al. (2021) também fizeram observação semelhante em modelos de córneas suínas diabéticas. Liu et al. (2012b) também utilizaram o tricrômico de masson para avaliar o estroma corneal de humanos com ceratopatia bolhosa pseudofácica em relação a formação de cicatriz e presença de vasos. A cicatriz corneal também foi avaliada com essa coloração por Woo et al. (2001), em coelhos submetidos a ceratoplastia com membrana amniótica.

O tricrômico de masson também é uma coloração bastante utilizada na medicina para auxílio no diagnóstico de distrofias corneais, sendo os depósitos amilóides e hialóides observados na coloração vermelha em meio ao estroma corneal azul (ALDAVE et al., 2007; AWWAD et al., 2008; FU et al., 2022; KIM et al., 2008; YANOFF; SASSANI, 2009). Tai et al. (2009) também observaram deposição amilóide em coloração vermelha em pacientes humanos com ceratocone. Milman et al. (2015) fizeram estudo semelhante em pacientes humanos com ceratopatia paraproteinêmica, onde a imunoglobulina depositada na córnea aparece na cor vermelha na coloração com tricrômico de masson.

Hashimoto et al. (2016) utilizaram o tricrômico de masson com o intuito de verificar a presença de células corneais após produção de córneas descelularizadas suínas por diferentes métodos, e Hashimoto et al. (2019) para observar a epitelização ao utilizar o mesmo material na córnea de coelhos. McLellan e Archer (2000) relataram um sequestro corneal em um equino, que se apresentou vermelho à coloração com tricrômico de masson.

Pecorella et al. (2013) não correlacionaram a coloração rosa observada em meio ao colágeno azul da córnea que foi submetida ao procedimento de *crosslink* a nenhuma razão, considerando uma observação “obscura”, especialmente porque não foram observadas células viáveis capazes de secretar matriz extracelular na área.

Considerando essa breve revisão bibliográfica sobre o PBAT, a córnea e a histopatologia da córnea com as colorações especiais picrosirius e tricrômico de masson, no capítulo dois dessa tese encontra-se o artigo científico produzido sobre o assunto.

2 CAPÍTULO 1 - BIOCOMPATIBILIDADE DO POLÍMERO POLI(BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO) (PBAT) NA CÓRNEA DE COELHOS

2.1 Resumo

Objetivo: estudar a biocompatibilidade da membrana do polímero poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) (mPBAT) na córnea de coelhos através de avaliação clínica e histopatológica.

Animal estudado: doze coelhos da raça Nova Zelândia.

Procedimentos: tunelização interlamelar estromal em ambos os olhos, e em um dos olhos foi colocada a mPBAT (olho tratado = OT). O olho contralateral foi o olho controle (OC), submetido ao procedimento, mas sem o implante da mPBAT. A avaliação clínica foi realizada nos dias 1, 3, 7, 15, 30, 45 e 60 após o procedimento cirúrgico, e a avaliação histopatológica, com hematoxilina e eosina (HE), picrosirius (PSR) e tricrômico de masson (TM) aos 30 (M30) e 60 dias pós-operatórios (M60).

Resultados: não houve diferença estatística nos parâmetros clínicos entre OC e OT em nenhum momento estudado, porém houve maior infiltrado inflamatório mononuclear, proliferação de fibroblastos e edema na córnea do OT no M30 e M60 ($p < 0.05$), ainda que essas variáveis tenham sido discretas em sua maioria. Na coloração com PSR, foi observado média de 60,02% de fibras colágenas imaturas no OT no M30, quando comparado a média de 28,05% no OC no M30 ($p = 0.002$). Na coloração com TM, foi observada maior intensidade da cor azul no OT, quando comparado ao OC, sugerindo maior deposição de colágeno no OT.

Conclusões: considerando a baixa reação inflamatória, associado à característica bioativa aos 30 dias pós-operatórios e bioinerte aos 60 dias pós-operatórios observadas com a coloração de PSR, conclui-se que a mPBAT é um potencial material como adjuvante na cicatrização corneana no tratamento de úlceras de córnea.

Palavras-chave: poliéster, implante biodegradável, membrana sintética, ceratoplastia, biomaterial.

2.2 Abstract

Objective: to study the biocompatibility of the polymer poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) membrane (mPBAT) in the cornea of rabbits through clinical and histopathological evaluation.

Animal studied: twelve New Zealand rabbits.

Procedures: stromal interlamellar tunneling in both eyes, and mPBAT was placed in one of the eyes (treated eye = TE). The contralateral eye was the control eye (CE), which underwent the procedure, but without mPBAT implantation. Clinical evaluation was carried out on days 1, 3, 7, 15, 30, 45 and 60 after surgical procedure, and histopathological evaluation, with hematoxylin and eosin (HE), picrosirius (PSR) and masson's trichrome (TM) at 30 (M30) and 60 postoperatively days (M60).

Results: there was no statistical difference in clinical parameters between CE and TE at any time studied, but there was greater mononuclear inflammatory infiltrate, fibroblast proliferation and edema in the TE cornea at M30 and M60 ($p < 0.05$), although these variables were mostly discreet. In PSR staining, an average of 60.02% of immature collagen fibers was observed in the TE at M30, when compared to an average of 28.05% in the CE at M30 ($p = 0.002$). In staining with TM, a greater intensity of blue color was observed in the TE, when compared to the CE, suggesting greater collagen deposition in the TE.

Conclusions: considering the low inflammatory reaction, associated with the bioactive characteristic at 30 postoperative days and bioinert at 60 postoperative days observed with PSR staining, it is concluded that mPBAT is a potential material as an adjuvant in corneal healing in treatment of corneal ulcers.

Keywords: polyester, biodegradable implant, synthetic membrane, keratoplasty, biomaterial.

2.3 Introdução

O poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) é um copolímero composto dos grupos alifáticos e aromáticos; é degradável devido a presença de um grupo alifático e exibe boas propriedades mecânicas devido a presença de um anel aromático ¹. É

um dos mais promissores poliésteres do mercado, sendo seus principais usos por meio de sacolas de compras, sacolas de compostagem e filmes plásticos utilizados na agricultura ².

Materiais à base de poliésteres têm sido utilizados para aplicações médicas, como na engenharia de tecidos moles e duros, curativos, implantes cirúrgicos, cirurgia reconstrutiva vascular e oftalmologia ³.

O PBAT possui propriedades promissoras para ser utilizado como suporte para crescimento de tecidos ⁴, não apresentando toxicidade celular na sua forma pura ⁵⁻¹¹. Arslan et al. ⁴ estudaram o PBAT puro e submetido a diferentes formas de confecção, em relação às suas características físicas e proliferação celular *in vitro*, e concluíram que todas as formas apresentaram propriedades adequadas para suporte tecidual.

Dentre os estudos que tem investigado o PBAT para aplicações médicas sob diferentes protótipos ou adicionados a outros materiais, podemos citar os que envolvem aplicações ósseas ⁷⁻¹⁵, aplicações em feridas ^{16,17} e no tratamento do câncer através de liberação de drogas ^{5,8}. Destes, somente quatro realizaram parte do seu estudo *in vivo* ^{7,9,13,17}.

Dos mais de 90 poliésteres conhecidos pelo homem, apenas alguns tipos encontraram aplicações no campo da engenharia de tecidos; em sua grande maioria isso se deve a variedade das propriedades de cada tecido, sendo desafiador encontrar uma correspondência ideal entre o tecido e o material implantado ³. Até o presente, estudos versando sobre o PBAT na oftalmologia ainda não foram publicados. No entanto, consideramos sua transparência e flexibilidade adequadas para aplicação na córnea.

Dentre as propriedades dos polímeros para aplicações médicas, as mais importantes são a natureza inerte e biocompatibilidade do material ³. O design do material também influencia na sua biocompatibilidade, e este aspecto só pode ser testado *in vivo* ¹⁸.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a biocompatibilidade do PBAT puro na córnea de coelhos, por meio da avaliação clínica e histopatológica pelas colorações de hematoxilina e eosina, picrosírius e tricrômico de masson, a fim de investigar a hipótese de que esse biomaterial tenha potencialidade para aplicação na córnea e auxiliar na sua cicatrização. Com a coloração de picrosírius, ainda objetivamos avaliar se há indução da produção de colágeno pelo PBAT na córnea, visto que isso já foi bem descrito em estudos na regeneração óssea ^{4,9,11,15}.

2.4 Materiais e métodos

O estudo foi realizado nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Faculdade de Odontologia, UNESP, campus de Araçatuba. O referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da mesma instituição (protocolo número: FOA-1103-2015). Os animais foram tratados seguindo as orientações da *Guidelines for Ethical Research in Veterinary Ophthalmology* (GERVO).

2.4.1 Animais

Foram utilizados 12 coelhos brancos, fêmeas, da raça Nova Zelândia, com idade de 120 dias, saudáveis e sem alterações oftálmicas prévias, adquiridos do biotério da Fazenda Lageado da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Botucatu. Os animais foram mantidos confinados individualmente em gaiolas, com água e ração *ad libitum* para a espécie.

Todos os animais foram submetidos a exame físico geral e oftálmico clínico completo, que se constituiu do teste da lágrima de Schirmer I (teste de Schirmer Ophthalmos®, São Paulo, Brasil), tonometria de aplanção (Tono-pen XL®, Reichert®, Nova Iorque, EUA), biomicroscopia por lâmpada de fenda (Kowa SL-14®, Tóquio, Japão), teste de tingimento com fluoresceína (fluoresceína strips Ophthalmos®, São Paulo, Brasil) e oftalmoscopia indireta (Eyetec FOH-5.0®, Antuérpia, Bélgica), previamente aos procedimentos cirúrgicos de enxertia interlamelar.

2.4.2 Membrana de PBAT

A membrana de PBAT (mPBAT) foi desenvolvida pela equipe do Laboratório de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) a partir do PBAT comercializado pela empresa BASF®, sob o nome comercial de Ecoflex® F Blend C1200 (Ludwigshafen, Alemanha), por prensagem a quente (prensa hidráulica Marconi 098/A®, Piracicaba, São Paulo, Brasil), à 130°C, por 3 minutos, sob 5 toneladas, seguida de resfriamento com água circulante sob a mesma pressão até

atingir a temperatura ambiente. Informações adicionais sobre o produto são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Informações adicionais sobre a membrana de PBAT (mPBAT).

Propriedades	Mensurações
Espessura (micra)	75
Densidade (g/cm ³)	1,25 – 1,27
Índice de Fluidez (g/10min)	2,7 – 4,9
Temperatura de Amolecimento (°C)	110 – 120
Resistência à Tração (MPa)	35 – 44
Elongação (%)	560 - 710

As membranas foram recortadas em discos de 3,0 mm de diâmetro com auxílio de um *punch* (fig. 1), seguido de higienização com água destilada e posterior esterilização por radiação gama, visto que degradam em altas temperaturas ^{4,10}, inviabilizando a esterilização por autoclave.

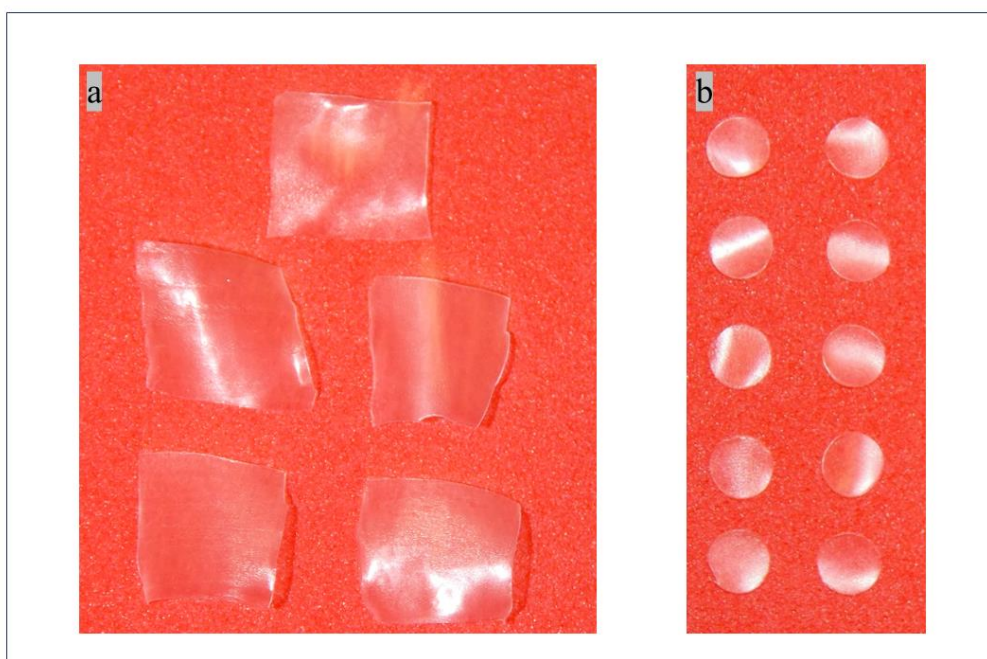


Fig. 1: Imagens fotográficas das membranas de PBAT (mPBAT) em cortes maiores, mostrando sua flexibilidade (a), e após cortes com 3,0 mm de diâmetro com auxílio de um punch (b).

2.4.3 Procedimento cirúrgico

Sob efeito de anestesia dissociativa balanceada - medicação pré-anestésica com acepromazina 0,2 mg/kg (Acepran®, Vetnil, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e indução com quetamina 15 mg/kg (Quetamina®, Vetnil, São Paulo, Brasil) e midazolan 2,5 mg/kg (Eurofarma, São Paulo, Brasil), por via intravenosa - associado à instilação de colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®, Novartis, São Paulo, Brasil), foi realizada tricotomia da região periocular, e antissepsia das pálpebras com iodopovidine 1% e da superfície ocular com iodopovidine 1% diluído em NaCl 0,9% na proporção de 1/50.

Ato contínuo, e com a utilização de microscópio cirúrgico para magnificação (DF Vasconcellos®, Valença, Rio de Janeiro, Brasil), ambos os olhos foram submetidos à incisão da córnea com bisturi na região perilábica, na localização das “doze horas”, e tunelização interlamelar estromal com auxílio de espátula cortante oftálmica de 3,0 mm, estendendo-se à região axial da córnea. Um disco de 3 mm da mPBAT foi introduzido no fundo da bolsa estromal em um dos olhos (olho tratado = OT), sem realização de nenhuma sutura. O olho contralateral foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, mas sem introdução da membrana (olho controle = OC).

No pós-operatório, os coelhos receberam colírios a base de tobramicina (Tobrex®, Novartis, São Paulo, Brasil) a cada seis horas, durante sete dias, e analgesia com cloridrato de tramadol (Tramal®, Grünenthal GmbH, Aachen, Alemanha) por via intramuscular a cada doze horas, na dose de 4,0 mg/kg, por três dias. O procedimento cirúrgico de todos os animais foi realizado pelo mesmo cirurgião com experiência cirúrgica.

2.4.4 Avaliação clínica

Os olhos foram avaliados clinicamente aos dias 1, 3, 7, 15, 30, 45 e 60 após a cirurgia (M1, M3, M7, M15, M30, M45 e M60, respectivamente). Foram estudadas as seguintes variáveis, com preenchimento de ficha individual e categorizadas em escores, segundo Andrade et al. ¹⁹ modificado: blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival (0-ausente, 1-discreta, 2-moderada, 3-intensa), vascularização corneal (2 -proliferação vascular até 2,0 mm distantes do limbo, 4 a 4,0 mm, 6 a 6,0 mm, 8 a 8,0 mm), defeito epitelial, quemose, conjuntivalização, descemetocelose,

perfuração corneal, sinéquia (0-ausente, 1-presente) e opacidade corneal (0-nenhuma dificuldade em observar os detalhes da íris; 1-discreta, detalhes da íris borrados; 2-moderada, difícil definir os detalhes da íris, 3-grave, não é possível observar detalhes da íris). As avaliações foram realizadas por dois avaliadores que computaram individualmente as pontuações dos parâmetros estudados.

2.4.5 Avaliação histopatológica

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada e submetidos à eutanásia humanitária após 30 (M30) e 60 (M60) dias pós-operatórios. A eutanásia foi realizada com quetamina 20 mg/kg (Quetamina®, Vetnil, São Paulo, Brasil) e xilazina 3 mg/kg (Xilazin®, Syntec, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e, após aproximadamente 5 minutos, propofol (Propovan®, Cristália, São Paulo, Brasil) por via intravenosa, seguido de cloreto de potássio (Farmace, Ceará, Brasil) (10 mL totais cada).

Ambos os olhos foram colhidos por meio de enucleação subconjuntival, e preservados em solução de Davidson por 24 horas, quando foram realizados os cortes sagitais da região contemplando a área referente à tunelização interlamelar estromal (sentido “doze-seis horas”), sendo colocados em formol tamponado 10% por mais 24 horas, e armazenados em álcool 70%. Foi realizado o processamento histopatológico rotineiro em blocos de parafina, cortes de 5 µm e confecção das lâminas, que foram posteriormente coradas com hematoxilina e eosina (HE), picrosirius (PSR) e tricrômico de masson (TM).

Na coloração com HE foram estudadas as seguintes variáveis histopatológicas, através de pontuação em escore (0-ausente, 1-discreto, 2-moderado, 3-intenso), segundo Andrade et al.¹⁹ modificado: vasos na córnea, infiltrado polimorfonuclear, infiltrado mononuclear, granuloma (macrófago/célula epitelióide/célula multinucleada), proliferação de fibroblastos, defeito epitelial, bactéria, inflamação supurativa, necrose, edema, fragmentação do colágeno, adelgaçamento epitelial, descontinuidade epitelial e perda do paralelismo entre as fibras colágenas.

Os níveis de maturação das fibras de colágeno foram analisados nas secções coradas por PSR sob microscopia de luz polarizada. O local de análise representativo padronizado foi o centro corneal no OC, e a porção estromal interna e central, adjacente à mPBAT no OT. O programa QWin foi utilizado (ampliação de 400x, Leica

QWin V3®, Leica Microsystems®), permitindo a seleção de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno na córnea. Após a seleção de cores, o programa calculou automaticamente a área marcada. As fibras verdes amareladas foram consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras vermelhas alaranjadas foram consideradas maduras e grossas ²⁰⁻²².

Os cortes histológicos corados com TM ²³ e observados em microscópio de luz foram avaliados de forma descritiva.

2.4.6 Análise Estatística

A análise estatística da avaliação clínica e da coloração de HE foi realizada com o programa SAS (Statistical Analysis System, Cary, USA). Foi realizado o teste de Wilcoxon para comparar as variáveis qualitativas ordinais (escore) entre os grupos em cada momento e o teste de Fisher para comparar as variáveis qualitativas nominais (presente e ausente) entre os grupos em cada momento.

A análise estatística da coloração de PSR foi realizada com o programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas contínuas foi feita pelo teste Shapiro-Wilk, e foram aplicados o teste ANOVA ou Kruskal-Wallis. O nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0.05$).

2.5 Resultados

A avaliação clínica no decorrer do estudo nos permitiu observar uma semelhança na recuperação pós-operatória entre o OC e OT: não houve diferença estatística entre os grupos para nenhuma variável clínica em nenhum dos momentos estudados ($p > 0.05$).

Blefarospasmo discreto (2/12) e hiperemia conjuntival discreta a moderada (4/12) foram observadas no OT no M3 e M7. A vascularização corneal foi observada na maioria dos animais de ambos os grupos (7/12 no OC e 10/12 no OT). A opacidade corneal não foi observada no OC, mas foi observada em todos os OT em todos os momentos de avaliação.

Não foi observado defeito epitelial, quemose, conjuntivalização, descemetocel, perfuração corneal e sinéquia no OC e OT, em nenhum dos momentos estudados.

No estudo histopatológico na coloração com HE, baixa intensidade de algumas variáveis foram observadas no OT (tabela 2), e não foram observados granuloma, bactérias, inflamação supurativa ou necrose.

Tabela 2 – Ocorrência das variáveis histopatológicas em HE no OC e OT, em todos os momentos estudados; maior intensidade de infiltrado mononuclear, proliferação de fibroblastos e edema no OT, quando comparado ao OC, no M30 e M60; p valor obtido com o teste Wilcoxon.

Variável	Momento	OC		OT		p
		Md	Min-Max	Md	Min-Max	
Vasos na periferia corneal	M30	0	0-0	0	0-1	0.3170
	M60	0	0-0	0	0-1	0.3173
Vasos no centro corneal	M30	0	0-0	0	0-0	-
	M60	0	0-0	0	0-2	0.3173
Infiltrado polimorfonuclear	M30	0	0-0	0	0-1	0.1797
	M60	0	0-0	0.5	0-2	0.1088
Infiltrado mononuclear	M30	0	0-0	1	0-1	0.0431
	M60	0	0-0	1	1-2	0.0277
Proliferação de fibroblastos	M30	0	0-0	1	0-2	0.0431
	M60	0	0-0	1	0-2	0.0431
Defeito epitelial	M30	0	0-0	0	0-0	-
	M60	0	0-0	0	0-1	0.3173
Edema	M30	0	0-0	1	0-2	0.0431
	M60	0	0-0	1.5	1-2	0.0277
Fragmentação do colágeno	M30	0	0-0	0.5	0-1	0.1088
	M60	0	0-0	0	0-0	-
Adelgaçamento epitelial	M30	0	0-0	0.5	0-1	0.1088
	M60	0	0-0	0	0-0	0.1797
Descontinuidade epitelial	M30	0	0-0	0	0-1	0.3173
	M60	0	0-0	0	0-1	0.3173
Perda do paralelismo entre as fibras colágenas	M30	0	0-0	0	0-1	0.3173
	M60	0	0-0	0	0-0	-

Legenda: OC: olho controle; OT: olho tratado; Md: mediana; Min: mínimo; Max: máximo; M30: 30 dias pós-operatórios; M60: 60 dias pós-operatórios; 0-ausente, 1-discreto, 2-moderado, 3-intenso.

No estudo histopatológico na coloração com PSR, a porcentagem de fibra maduras foi menor e de imaturas maior no OT no M30, quando comparado ao OC no M30 (tabela 3).

Tabela 3 – Porcentagem média de fibras maduras e imaturas no PSR sob microscopia de luz polarizada no OC e OT, seguido do desvio padrão, em todos os momentos estudados; menor porcentagem de fibras maduras e maior de fibras imaturas no OT no M30, quando comparado ao OC no M30; p valor* obtido com os testes Kruskal-Wallis e ANOVA.

Grupos	Tempos	Fibras maduras $\pm$ DP	Fibras imaturas $\pm$ DP
OC	M30	71.50% ^A $\pm$ 4.23	28.50% ^A $\pm$ 4.23
	M60	53.83% ^{AB} $\pm$ 15.97	46.17% ^{AB} $\pm$ 15.97
OT	M30	39.98% ^B $\pm$ 18.58	60.02% ^B $\pm$ 18.58
	M60	49.43% ^{AB} $\pm$ 27.24	50.57% ^{AB} $\pm$ 27.24

Legenda: OC: olho controle; OT: olho tratado; M30: 30 dias pós-operatórios; M60: 60 dias pós-operatórios; DP: desvio padrão. Letras iguais não diferem e letras diferentes diferem estatisticamente.

*p = 0.002 (Kruskal-Wallis) na comparação entre OC e OT no M30 para fibras maduras e imaturas; p = 0.762 (ANOVA) na comparação entre OC e OT no M60 para fibras maduras e imaturas; p = 0.065 (Kruskal-Wallis) na comparação entre OC no M30 e OC no M60 para fibras maduras e imaturas; p = 0.536 (ANOVA) na comparação entre OT no M30 e OT no M60.

As figuras 2 e 3 documentam as imagens fotográficas representativas do OC e de cada OT quanto à clínica e histopatologia com HE e PSR, no M30 (fig. 2) e M60 (fig. 3).

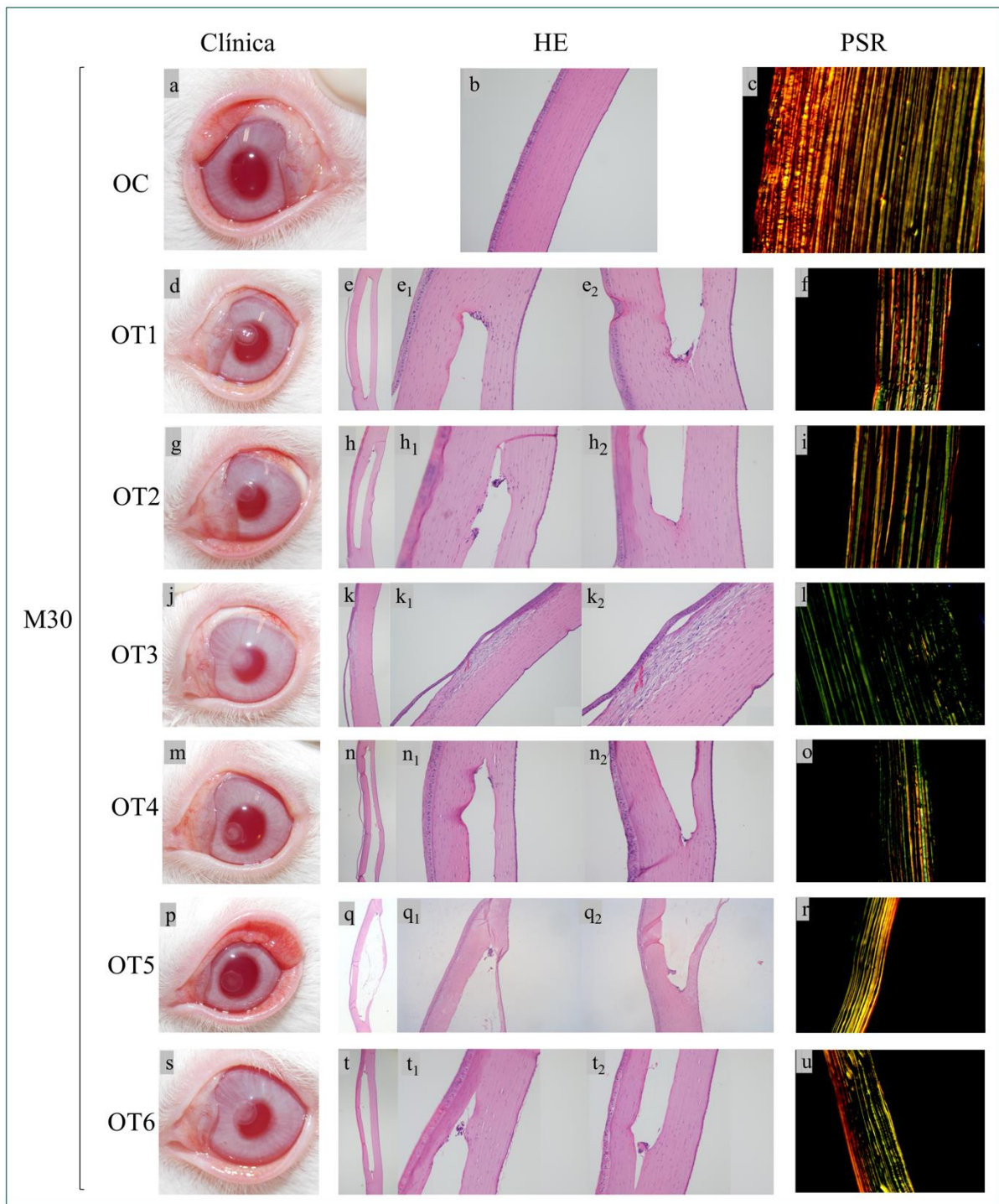


Fig. 2: Imagens fotográficas representativas do OC (a-c) quanto à avaliação clínica (a), histopatologia com HE (b) e histopatologia com PSR (c) aos 30 dias pós-operatórios. Imagens de cada OT (d-u) quanto à avaliação clínica (d, g, j, m, p, s), histopatologia com HE 100x (e, h, k, n, q, t), com detalhe das extremidades da mPBAT 400x (e₁, e₂, h₁, h₂, n₁, n₂, q₁, q₂, t₁, t₂), e histopatologia com PSR sob luz polarizada 400x (f, i, l, o, r, u). As imagens do OT3 (j,k,k₁-200x,k₂-400x,l) são do animal que ocorreu extrusão da mPBAT entre 21 e 25 dias pós-operatórios.

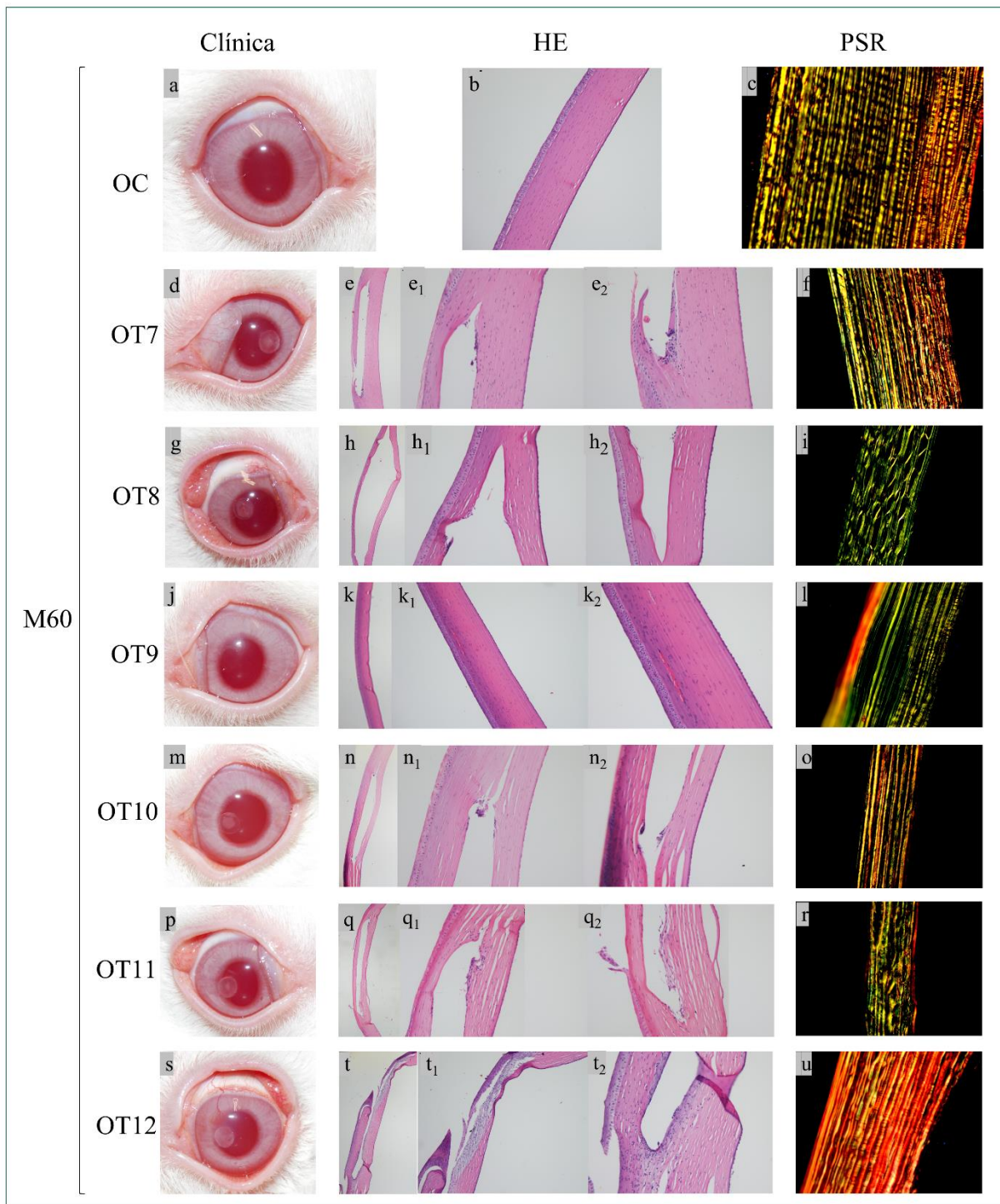


Fig. 3: Imagens fotográficas representativas do OC (a-c) quanto à avaliação clínica (a), histopatologia com HE (b) e histopatologia com PSR (c) aos 60 dias pós-operatórios. Imagens de cada OT (d-u) quanto à avaliação clínica (d, g, j, m, p, s), histopatologia com HE 100x (e, h, k, n, q, t), com detalhe das extremidades da mPBAT 400x (e₁, e₂, h₁, h₂, n₁, n₂, q₁, q₂, t₂), e histopatologia com PSR sob luz polarizada 400x (f, i, l, o, r, u). As imagens do OT9 (j,k,k₁-200x,k₂-400x,l) são do animal que ocorreu extrusão da mPBAT entre 15 e 30 dias pós-operatórios. As imagens do OT12 (s,t,t₁-200x,t₂-400x,u) são do animal que houve superficialização da mPBAT aos 37 dias pós-operatórios.

A figura 4 documenta as imagens fotográficas representativas do OC, OT aos 30 dias pós-operatórios e OT aos 60 dias pós-operatórios, da histopatologia na coloração com TM, que apresentou coloração rosa adjacente à mPBAT no M30 e mais difusa no M60. Isso se traduz à proliferação de fibroblastos e sua hiperplasia citoplasmática. Não foram observadas células endoteliais vasculares.

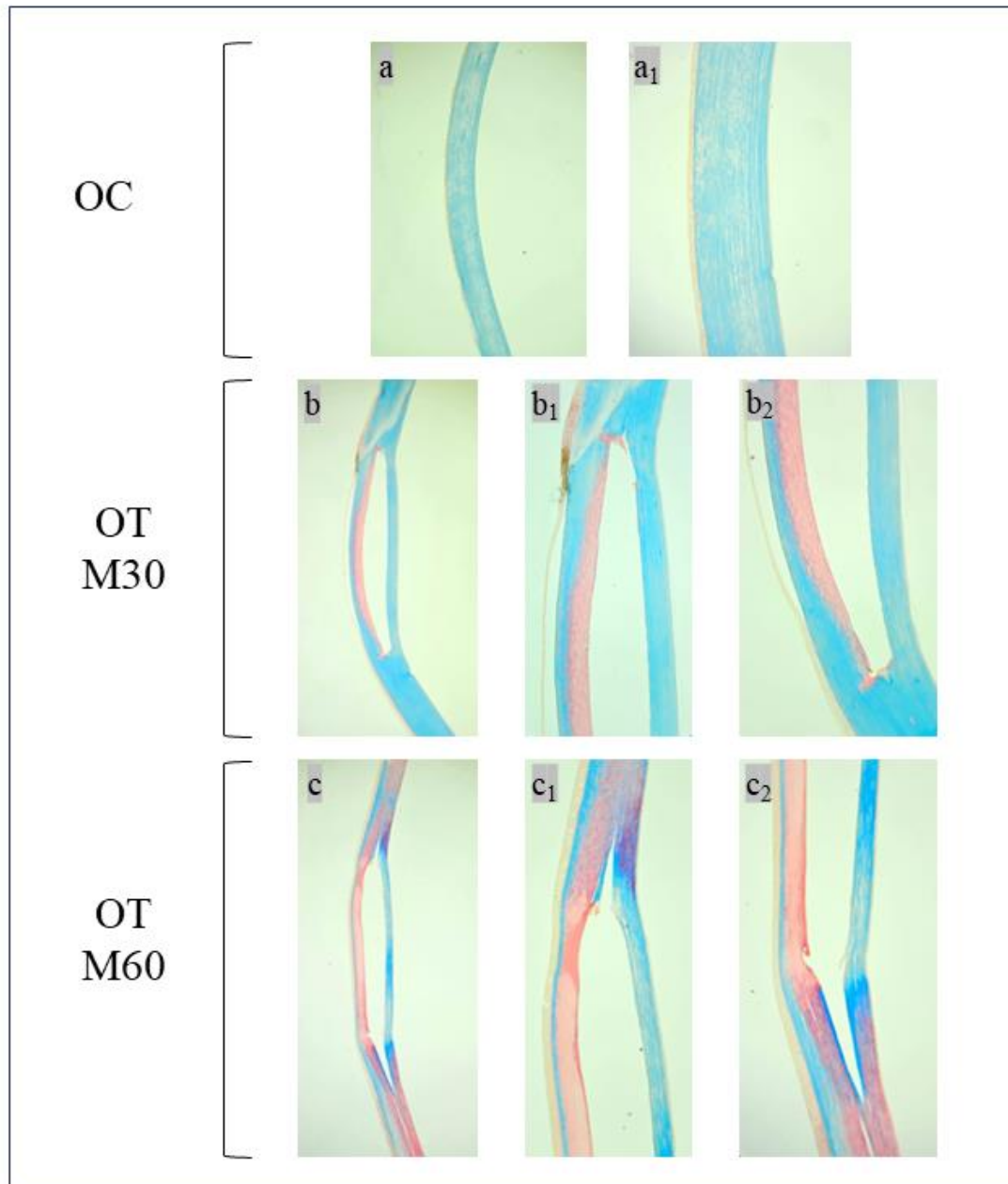


Fig. 4: Imagens representativas do OC (a, a₁), do OT aos 30 dias pós-operatórios (b, b₁, b₂), e do OT aos 60 dias pós-operatórios (c, c₁, c₂) da histopatologia na coloração com TM (a, b, c – 40x; a₁, b₁, b₂, c₁, c₂ – 100 x).

Como complicações, houve a extrusão da mPBAT em dois animais (fig. 2j e fig.

3j) entre 15 e 30 dias pós-operatórios, e a superficialização e exposição da mPBAT em um animal (fig. 3s) aos 37 dias pós-operatórios. Nos três animais houve progressão da vascularização corneal além de 2 mm do limbo, o que não ocorreu no OC e nos demais OT. Em um dos animais que houve extrusão da mPBAT (fig. 2j), a opacidade corneal foi severa, porém em todos os outros OT foi discreta. A avaliação histopatológica com PSR mostrou maior quantidade de fibras imaturas nos casos de extrusão da mPBAT (fig. 2l e fig. 3l), e maior quantidade de fibras maduras no caso da exposição da mPBAT (fig. 3u).

No OT8, que apresentou blefarospasmo, hiperemia conjuntival, secreção ocular e opacidade corneal discretos (fig. 3g) aos 60 dias pós-operatórios, notou-se a mPBAT mais superficial à biomicroscopia com lâmpada de fenda, e à avaliação histopatológica (fig. 3h), mas não houve exposição da mesma. Nesse animal, houve maior quantidade de fibras imaturas na coloração com PSR (fig. 3i). Ainda, o animal OT7, que apresentou descontinuidade epitelial à avaliação histopatológica (fig. 3e) não apresentou defeito epitelial à avaliação clínica ou nenhum outro sinal clínico, apesar de também ter sido observado a mPBAT mais superficial à biomicroscopia com lâmpada de fenda.

2.6 Discussão

Por meio da avaliação clínica e histopatológica com HE, PSR e TM, a mPBAT se mostrou biocompatível na córnea de coelhos. A baixa frequência e intensidade de sinais clínicos, que se restringiu aos primeiros dias de pós-operatórios, foi atribuída à ocorrência de ceratite inerente ao trauma cirúrgico ²⁴. A baixa intensidade do infiltrado inflamatório encontrado à avaliação histopatológica no OT no M30 e M60, e a semelhança da proporção de fibras colágenas maduras e imaturas entre o OT e OC no M60 sustentam que o material estudado é bioinerte na córnea de coelhos. Contudo, a média de 60,02% de fibras colágenas imaturas no OT no M30, quando comparado a média de 28,05% no OC no M30 ($p=0.002$), sugere que a mPBAT é bioativa nos períodos iniciais, estimulando a produção de colágeno, como sugerido anteriormente na regeneração óssea ^{4,9,11,15}, ainda que se trate de outro tecido.

O infiltrado mononuclear (tabela 2, $p=0.0431$ no M30 e $p=0.0277$ no M60) discreto (fig. 2e₁,e₂,h₁,h₂,n₁,n₂,q₁,q₂ e fig. 3e₁,e₂,h₁,h₂,n₁,n₂,t₁,t₂) a moderado (fig.

3q₁,q₂) e polimorfonuclear (tabela 2, $p>0.05$) discreto (fig. 2n₁,n₂ e fig. 3h₁,h₂) a moderado (fig. 3t₁,t₂) foi observado apenas nas extremidades da membrana, que se refere à região superior e inferior do túnel interlamelar. O fato da baixa resposta inflamatória e por não ter havido reação do tipo corpo estranho sustentam a hipótese da mPBAT ser biocompatível ¹³ na córnea de coelhos, e acreditamos ser parcialmente secundária a micromovimentação da mPBAT influenciada pelo movimento das pálpebras pelas incursões palpebrais. Por esse motivo, não optamos por realizar a análise das fibras colágenas com PSR nessa região, visto que os resultados poderiam estar influenciados por este estresse mecânico ³. Ribeiro Neto et al. ¹³ estudaram o infiltrado inflamatório no subcutâneo de ratos com o implante de PBAT aos 30 e 60 dias, e também documentaram baixa resposta inflamatória nos dois momentos estudados.

Houve proliferação de fibroblastos leve a moderada na maioria dos OT (10/12), aos 30 e 60 dias pós-operatórios (tabela 2, $p=0.0431$) observada na histopatologia com HE, indicando estimulação de crescimento tecidual, pois o PBAT pode estimular a proliferação celular e produção de matriz extracelular, especialmente a síntese de fibras de colágeno ^{4,9,11,15}.

Para estudar os tipos de fibras colágenas na córnea do OC e OT, utilizamos a coloração de PSR na microscopia sob luz polarizada. Ela consiste em uma técnica onde a coloração ácida se liga especificamente ao colágeno e distingue as fibras de colágeno tipo I e tipo III, e que tem sido extensivamente utilizada em pesquisas odontológicas e médicas ²⁵, incluindo a avaliação da cicatrização corneal ²⁶⁻²⁹. Porém, a interpretação relacionada ao tipo de colágeno I e III é polêmica entre os autores que utilizam a técnica, havendo a interpretação segundo Junqueira, Cossermelli e Brentani ³⁰ e Montes e Junqueira ³¹, onde o PSR normalmente mostra fibras finas de colágeno tipo III, que são verdes a amarelo esverdeadas, enquanto fibras colágenas espessas, tipo I, variam de vermelhas a laranja amareladas; ou segundo Coleman ³² e Piérardi et al. ³³, onde as cores observadas dependem apenas da espessura e embalagem da fibra, e não do tipo de colágeno.

Nós optamos por denominar as fibras verde amareladas como imaturas, enquanto as fibras vermelhas alaranjadas foram consideradas maduras ²⁰⁻²², e consideramos que o colágeno tipo III, imaturo, é altamente expresso na córnea em cicatrização ²⁷, onde normalmente há predomínio de fibras verde amareladas em

tempos iniciais, que passam a predominar nas cores vermelhas alaranjadas em períodos mais tardios, sugerindo o amadurecimento gradual do colágeno ³⁴.

À histopatologia com PSR, maior quantidade de fibras imaturas foi observada no OT no M30 (60,02%), quando comparado ao OC no M30 (28,05%) (tabela 3, $p=0.002$). Estudos na regeneração óssea observaram níveis de colágeno constantes por 14 dias, com aumento aos 28 dias ¹⁵, e aumento aos 21 dias, quando comparado a 7 e 14 dias ⁹; esses achados corroboram com os do presente estudo. No M60 não houve diferença estatística ao comparar OT com OC ($p=0.762$), porém a média de fibras imaturas permaneceu maior no OT (tabela 3), sugerindo que mesmo em tempos tardios parece haver estímulo de produção de colágeno na córnea.

A coloração com TM (fig. 4) foi realizada para observar a presença de células mesenquimais ²⁸ em meio ao colágeno corneal; o citoplasma se mostra na cor rosa e o colágeno na cor azul ³⁵. Não foram observadas células endoteliais vasculares, porém o corte realizado pode ter desfavorecido essa análise (sagital, contemplando o túnel interlamelar). Foi observado coloração rosa adjacente à mPBAT no M30 (fig. 4 b, b₁, b₂) e mais difusa no M60 (fig. 4 c, c₁, c₂) na maioria dos animais. Acreditamos que isso se deva à proliferação de fibroblastos e sua hiperplasia citoplasmática, como observado por Woo et al. ³⁶ nos olhos controle do seu estudo da cicatrização corneal de coelhos submetidos a lesões em ambos os olhos, onde um olho foi tratado com membrana amniótica e o outro foi o controle. Os autores observaram ceratócitos mais hiperplásicos na histologia com TM nos olhos controle, onde a cicatrização foi mais lenta, mas também apresentou maior produção de colágeno. Apesar da proliferação de fibroblastos ter sido semelhante no HE no M30 e M60 (tabela 2), a coloração com TM sugere que houve maior intensidade dessa variável aos 60 dias pós-operatórios (fig. 4 c, c₁, c₂). Também foi observado maior intensidade da cor azul nos OT (fig. 4 b, b₁, b₂, c, c₁, c₂) quando comparado ao OC (fig 4 a, a₁), o que pode sugerir maiores níveis de deposição de colágeno no OT ³⁷.

A discreta opacidade corneal na avaliação clínica foi observada apenas no local da mPBAT (fig. 2d,g,m,p,s e fig. 3d,g,m,p,s), apesar do material apresentar boa transparência. O PBAT puro é considerado hidrofóbico ⁴, e a hipótese de que, em meio ao estroma corneal, a mPBAT possa ter alterado a manutenção da deturgescência fisiológica da córnea ³⁸ é sugerida, uma vez que edema discreto a moderado, observado ao exame histopatológico com HE (tabela 2, $p=0.0431$ no M30 e $p=0.0277$ no M60), foi restrito à adjacência da mPBAT em todos os animais. Castro et al. ¹⁴

observaram que o PBAT puro demorou 45 minutos para absorver uma gota de água, o que sugere que a mPBAT provavelmente se tornou permeável à água nos tempos aqui estudados. Possivelmente, por esses dois motivos foi observada a opacidade corneal.

A vascularização corneal observada no OC e OT foi do tipo arborizada, visualizada apenas no polo superior da córnea (às "doze horas") e restrita ao local do trauma cirúrgico de tunelização, característico de vascularização superficial localizada no terço anterior do estroma e contígua à circulação conjuntival do limbo, que ocorre secundariamente a lesões superficiais da córnea ²⁴. Essa resposta inflamatória provavelmente está mais relacionada ao trauma cirúrgico do que à presença da mPBAT, já que essa variável foi observada em ambos os grupos e na maioria dos animais. Ramachandram et al. ³⁹ fizeram observação semelhante em seu estudo com a membrana de PLGA (poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)) e, também, a associaram ao próprio procedimento cirúrgico. Além disso, só houve progressão da vascularização além de 2 mm do limbo nos três animais que houveram complicações (fig. 2j e fig. 3j,s).

No presente estudo, não optamos pela analgesia anti-inflamatória por via local/oftálmica ou sistêmica para não comprometer as variáveis estudadas. Por esse motivo, o cloridrato de tramadol foi o único fármaco escolhido como princípio farmacológico para promover analgesia pós-operatória aos animais ⁴⁰.

A mPBAT não parece ser incorporada à córnea no período avaliado, por ser um polímero que não se degrada antes de oito semanas sob condições de hidrólise *in vitro* semelhante aos compartimentos biológicos ⁴¹. O tempo de avaliação pós-operatória por nós adotado (60 dias) se aproximou ao de oito semanas (= 56 dias), mas nenhum sinal de início de degradação foi observado, como Liu et al. ⁴² hipotetizaram no seu estudo. Os autores associaram uma lacuna entre a membrana de matriz dérmica acelular interestromal e a córnea, observada em uma semana, que foi diminuindo ao longo de 24 semanas, e as fibras imaturas observadas no PSR, à degradação do implante e síntese de colágeno – a degradação foi maior que a síntese nos tempos iniciais, o que explica a lacuna observada. Arslan, Çakmak e Gümüşderelioğlu ¹⁵ realizaram degradação enzimática e não enzimática *in vitro* com o PBAT por 5 semanas, e houve diminuição do peso em 10% e 3%, respectivamente, ao final de 5 semanas. A degradação enzimática equivale à degradação *in vivo*, segundo os autores.

Um período de observação mais longo poderia fornecer mais informações sobre as consequências do processo de degradação no microambiente celular corneal, incluindo a resposta imune e mecanismos modulatórios que podem afetar a formação de tecido ao longo do tempo ¹², que poderia cursar com características vantajosas em relação a proliferação celular ¹¹.

Em relação aos três animais em que houve complicações de extrusão da mPBAT (fig. 2j e fig. 3j) ou seu deslocamento para planos mais superficiais da córnea e sua exposição (fig. 3s), a espessura da mPBAT não constituiu um fator complicador que pudesse explicar a exposição do implante ⁴³, mas pode explicar o adelgaçamento epitelial observado no exame histopatológico em três animais do M30 (fig. 2e,h,n) e dois do M60 (fig. 3e,n), já que sua espessura, de 0,075 mm, corresponde a 20,8% da espessura total da córnea do coelho (0,36 mm) ⁴⁴. Tan et al. ⁴⁵ observaram adelgaçamento epitelial 3 meses após procedimento cirúrgico semelhante, mas relataram que o epitélio se apresentava em sua espessura normal, após 6 meses.

As intercorrências de extrusão e exposição da mPBAT foram atribuídas à variação de profundidade do túnel interlamelar estromal, que mesmo sendo realizado pelo mesmo cirurgião e com auxílio de microscópio cirúrgico, diferiu minimamente na localização do implante no estroma anterior ou intermediário. Acreditamos que os implantes localizados no estroma anterior são mais susceptíveis a esta intercorrência, e nesta situação específica, não caracterizam um fenômeno de rejeição da mPBAT, pois na análise histopatológica no HE não foram visualizadas alterações desta natureza ¹³ – os infiltrados inflamatórios polimorfonuclear e mononuclear foram considerados discretos a moderados e particularmente com baixo infiltrado neutrofílico, sem presença de granuloma ou inflamação supurativa (fig. 2k₁,k₂ e fig. 3k₁,k₂,t₁,t₂).

Em um dos animais em que houve a extrusão da mPBAT (fig. 3j), não foi observado nenhuma manifestação clínica do ocorrido: aos 15 dias pós-operatórios foi observado que a mPBAT estava superficial à biomicroscopia com lâmpada de fenda, e aos 30 dias pós-operatórios a mPBAT estava ausente. No outro animal (fig. 2j) houve sintomatologia clínica, e admite-se que no momento da avaliação histopatológica (5-9 dias depois da extrusão) a ceratite já havia se resolvido e talvez possa ter mascarado a observação de sinais de rejeição ou contaminação da mPBAT. Liu et al. ⁴² realizaram a mesma técnica cirúrgica por nós empregada em cinco coelhos, mas sem nenhum implante, e observaram cicatrização da córnea aos 8 dias pela coloração de HE, não

sendo possível visualizar o local do túnel e observando uma córnea semelhante a que não sofreu nenhum procedimento cirúrgico, o que sugere uma rápida cicatrização corneal nessa espécie, que é utilizada como modelo de cicatrização da córnea ¹⁸.

A avaliação histopatológica com PSR mostrou maior quantidade de fibras imaturas nos casos de extrusão da mPBAT (fig. 2l e fig. 3l), e no animal OT8 (fig. 3i) que apresentou sinais clínicos discretos no M60 (fig. 3g), e que se notou a mPBAT mais superficial à biomicroscopia com lâmpada de fenda e à avaliação histopatológica (fig. 3h), mas sem exposição da mesma. Nesses casos, a maior quantidade de fibras imaturas pode ser explicada pelo processo de cicatrização corneal ²⁷. No caso de exposição da mPBAT (fig. 3u), foi observado maior quantidade de fibras maduras. Como a exposição ocorreu aos 37 dias pós-operatórios, e a histopatologia foi realizada somente aos 60 dias pós-operatórios, acreditamos que excepcionalmente nesse animal o amadurecimento das fibras colágenas tenha ocorrido de forma rápida. Esses animais são os principais responsáveis pelo desvio padrão alto no OT aos 30 e 60 dias pós-operatórios (tabela 3).

Vale lembrar que dentre os animais acima citados, somente um (fig. 2j-l) pertence ao grupo OT M30, e poderia influenciar a única diferença estatística encontrada no PSR (tabela 3, $p=0.002$). Porém, excluindo esse animal, a diferença estatística permanece ($p<0.001$, teste ANOVA).

Ainda em relação ao desvio padrão alto nos dados referentes à coloração com PSR, no OC no M60 também foi observado alguma variação importante entre os animais (tabela 3). Nesse sentido, pode ser destacado o OC10, que na avaliação clínica no M45 foi observado um corte no terço médio da pálpebra superior, já cicatrizado no M60, mas que pode indicar uma lesão traumática que pode ter afetado a córnea, apesar de não ter apresentado positividade ao teste de tingimento com a fluoresceína no M45 e M60. Esse animal apresentou maior quantidade de fibras imaturas, que corrobora com um processo de cicatrização corneal ²⁷, e que contribuiu para o desvio padrão elevado nesse grupo.

A técnica da avaliação do PSR também pode ser aqui discutida. A metodologia e forma de avaliação dos resultados varia bastante nos estudos em que foi utilizado o PSR para avaliação do colágeno na córnea ^{26-29,34,35,42,46-48}, e dentre esses autores poucos utilizaram a técnica de quantificação numérica ^{28,29}. Nós preconizamos o aumento de 400x para avaliação das microfotografias e quantificação das fibras ^{20,21,28}, que foi realizada por um profissional com experiência com a técnica, e

mantendo um padrão na posição das fibras no microscópio (discretamente oblíqua), o que parece ser um detalhe que pode influenciar discretamente nas cores observadas ^{49,50} e na densidade de fibras observadas ⁴⁹.

Admite-se como fragilidade do nosso estudo o número de animais (n) aqui empregado. Se trabalhássemos com um n maior, os animais que cursaram com alguma intercorrência poderiam ser excluídos da análise estatística sem comprometê-la. Admite-se, também, a necessidade de novas e originais investigações clínicas no processo de reparo corneal frente a uma lesão corneana, admitindo-se períodos mais longos de observação.

Considerando a baixa reação inflamatória que a mPBAT desencadeou na córnea de coelhos nas condições aqui adotadas, associado à característica bioativa aos 30 dias pós-operatórios e bioinerte aos 60 dias pós-operatórios observadas com a coloração de picrosirius, conclui-se que a mPBAT é um material com potencial para aplicação na córnea como adjuvante na cicatrização corneana, na necessidade de reparação tectônica.

2.7 Conflitos de interesse

Nenhum dos autores tem conflito de interesse.

2.8 Referências

¹ Kanwal A, Zhang M, Sharaf F, Li C. Polymer pollution and its solutions with special emphasis on Poly (butylene adipate terephthalate (PBAT)). *Polym Bull.* 2022;1-28.

² Jian J, Xiangbin Z, Xianbo H. An overview on synthesis, properties and applications of poly (butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT. *Adv Ind Eng Polym.* 2020;3(1):19-26.

³ Darie-Niță RN, Râpă M, Frackowiak, S. Special features of polyester-based materials for medical applications. *Polymers.* 2022;14(5):951.

- ⁴ Arslan A, Çakmak S, Cengiz A, Gümüşderelioğlu M. Poly (butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses. *J Biomat Sci Polym Ed.* 2016;27:1841-1859.
- ⁵ Liu Y, Yang L, Chen G, Liu Z, Lu T, Yang Y, Yu J, Kang D, Yan W, He M, Qin S, Yu J, Ye C, Luo H. PBAT hollow porous microfibers prepared via electrospinning and their functionalization for potential peptide release. *Eng Mater Des.* 2021;207:1-9.
- ⁶ Varshosaz J, Jajanian-Najafabadi A, Soleymani A, Khajavinia A. Poly (butylene adipate-co-terephthalate) electrospun nanofibers loaded with 5-fluorouracil and curcumin in treatment of colorectal cancer cells. *Polym test.* 2018;65:217-230.
- ⁷ Silva AS, Rodrigues BVM, Oliveira FC, Carvalho JO, de Vasconcellos LMR, de Araújo JCR, Marciano FR, Lobo AO. Characterization and in vitro and in vivo assessment of poly (butylene adipate-co-terephthalate)/nano-hydroxyapatite composites as scaffolds for bone tissue engineering. *J Polym Res.* 2019;26:1-11.
- ⁸ Branciforti MC, Bellani CF, Morelli CL, Ferr A, Benkirane-Jessel N, Bretas RES. Poly (butylene adipate-co-terephthalate) and poly (ϵ -caprolactone) and their bionanocomposites with cellulose nanocrystals: thermo-mechanical properties and cell viability study. *J Renew Mater.* 2019;7(3):269-277.
- ⁹ Santana-Melo GF, Rodrigues BVM, Silva E, Ricci R, Marciano FR, Webster TJ, Vasconcellos LMR, Lobo AO. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. *Colloids Surf B.* 2017;155:544-552.
- ¹⁰ Rodrigues BV, Silva AS, Melo GF, Vasconcellos LM, Marciano FR, Lobo AO. Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers. *Mat Sci Eng C.* 2016;59:782-791.
- ¹¹ Nar M, Staufenberg G, Yang B, Robertson L, Patel RH, Varanasi VG, D'Souza NA. Osteoconductive bio-based meshes based on Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends. *Mat Sci Eng C.* 2014;38:315-324.

- ¹² Balbinot GS, Bahlis EAC, Visioli F, Leitune VCB, Soares RMD, Collares FM. Polybutylene-adipate-terephthalate and niobium-containing bioactive glasses composites: Development of barrier membranes with adjusted properties for guided bone regeneration. *Mat Sci Eng C*. 2021;125:112115.
- ¹³ Ribeiro Neto WAR, de Paula ACC, Martins TM, Goes AM, Averous L, Schlatter G, Bretas RES. Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polym Degrad Stab*. 2015;120:61-69.
- ¹⁴ Castro JG, Rodrigues BV, Ricci R, Costa MM, Ribeiro AF, Marciano FR, Lobo AO. Designing a novel nanocomposite for bone tissue engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition. *RSC Adv*. 2016;6(39):32615-32623.
- ¹⁵ Arslan A, Çakmak S, Gümüşderelioğlu M. Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix. *Artif cells nanomed biotechnol*. 2018;46(sup2):790-799.
- ¹⁶ Hardt JC, Pellá MCG, Meira ACR, Rosenberger AG, Caetano J, Dragunski DC. Potential wound dressings from electrospun medicated poly (butylene-adipate-co-terephthalate)/poly-(ϵ -caprolactone) microfibers. *J Mol Liq*. 2021;339:116694.
- ¹⁷ Varshosaz J, Arabloo K, Sarrami N, Ghassami E, Kachouei EY, Kouhi M, Jahanian-Najafabadi A. RGD peptide grafted polybutylene adipate-co-terephthalate/gelatin electrospun nanofibers loaded with a matrix metalloproteinase inhibitor drug for alleviating of wounds: an in vitro/in vivo study. *Drug Dev Ind Pharm*. 2020;46:484-497.
- ¹⁸ Werner L, Chew J, Mamalis N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. *Vet Ophthalmol*. 2006;9(5):281-291.
- ¹⁹ Andrade AL, Laus JL, Figueiredo F, Batista CM. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. *Vet Ophthalmol*. 1999;2(2):79-82.

- ²⁰ de Oliveira PHC, Gomes Filho JE, Rodrigues MJDS, da Silva CC, Cardoso CDBM, Cosme da Silva L, et al. Influence of supplement administration of omega-3 on the subcutaneous tissue response of endodontic sealers in Wistar rats. *Int Endod J*. 2022;55(10):1026-1041.
- ²¹ Cintra LTA, Ferreira LL, Benetti F, Gastélum AA, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Briso ALF. The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. *Int Endod J*. 2017;50(8):790-798.
- ²² Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*. 1982;74(1):153-156.
- ²³ Milligan M. Trichrome stain for formalin-fixed tissue. *Am J Clin Pathol*. 1946;16(11_ts):184-185.
- ²⁴ Maggs DJ. Cornea and esclera. In: Slatter D. *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. St. Louis: Saunders; 2008. 175-202 p.
- ²⁵ Gopinathan PA, Kokila G, Siddeeqh S, Prakash R, Pradeep L. Reexploring picrosirius red: A review. *Indian J Pathol Oncol*. 2020;7:196-203.
- ²⁶ Hakami NY, Disting GJ, Chan EC, Shah MH, Peshavariya HM. Wound healing after alkali burn injury of the cornea involves Nox4-type NADPH oxidase. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(12):20-28.
- ²⁷ Lorenzo-Martín E, Gallego-Muñoz P, Mar S, Fernández I, Ciudad P, Martínez-García MC. Dynamic changes of the extracellular matrix during corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2019;186:107704.
- ²⁸ Gronkiewicz KM, Giuliano EA, Kuroki K, Bunyak F, Sharma A, Teixeira LBC. Development of a novel in vivo corneal fibrosis model in the dog. *Exp eye res*. 2016;143:75-88.
- ²⁹ Xia Y, Liu B, Fan Z, Peng X. Corneal collagen fibril changes after ultraviolet A/riboflavin corneal crosslinking. *Cornea*. 2014;33(1):56-59.

- ³⁰ Junqueira LCU, Cossermelli WA, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch histol jpn.* 1978;41(3):267-274.
- ³¹ Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86:1-11.
- ³² Coleman R. Picrosirius red staining revisited. *Acta histochem.* 2011;3(113):231-233.
- ³³ Piérard GE. Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. *Matrix.* 1989;9(1):68-71.
- ³⁴ Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Negishi J, Hattori S, Honda T, Kimura T, Kobayashi H, Kishida A. Re-epithelialization and remodeling of decellularized corneal matrix in a rabbit corneal epithelial wound model. *Mater Sci Eng C.* 2019;102:238-246.
- ³⁵ Sinha NR, Balne PK, Bunyak F, Hofmann AC, Lim RR, Mohan RR, et al. Collagen matrix perturbations in corneal stroma of Ossabaw mini pigs with type 2 diabetes. *Mol. Vis.* 2021;27:666-678.
- ³⁶ Woo HM, Kim MS, Kweon OK, Kim DY, Nam TC, Kim JH. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(3):345-349.
- ³⁷ Gupta S, Fink MK, Martin LM, Sinha PR, Rodier JT, Sinha NR, Hesemann NP, Chaurasia SS, Mohan RR. A rabbit model for evaluating ocular damage from acrolein toxicity in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 2020;1480(1):233-245.
- ³⁸ Gilger BC, Bentley E, Ollivier FJ. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology.* Iowa: Blackwell; 2007. 690-752 p.
- ³⁹ Ramachandran C, Sangwan VS, Ortega I, Bhatnagar U, Mulla SMA, McKean R, MacNeil S. Synthetic biodegradable alternatives to the use of the amniotic

membrane for corneal regeneration: assessment of local and systemic toxicity in rabbits. *Br J Ophthalmol*. 2019;103:286-292.

⁴⁰ Dieckmann G, Goyal S, Hamrah P. Neuropathic corneal pain: approaches for management. *Ophthalmology*. 2017;124(11):S34-S47.

⁴¹ Fukushima K, Rasyida A, Yang M. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. *Appl Clay Sci*. 2013;80(81):291-298.

⁴² Liu Z, Ji J, Zhang J, Huang C, Meng Z, Qiu W, Liu X, Wang, W. Corneal reinforcement using an acellular dermal matrix for an analysis of biocompatibility, mechanical properties, and transparency. *Acta Biomater*. 2012;8(9):3326-3332.

⁴³ Morales A, Barros PSM, Neto JB, Gilberto C, Salvador CN, Migliati ER. Experimental use of a castor bean (*Ricinus communis* L.) oil derived polymer in lamellar, interlamellar and penetrating implant in rabbit's cornea. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2005;42:31-37.

⁴⁴ Holmberg BJ. Ophthalmology of exotic pets. In: Sllater D, 4 ed. *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. St. Louis: Elsevier; 2008. 427-441 p.

⁴⁵ Tan XW, Hartman L, Tan KP, Poh R, Myung D, Zheng LL, Waters D, Noolandi J, Beuerman RW, Frank CW, Ta CN, Tan DTH, Mehta JS. In vivo biocompatibility of two PEG/PAA interpenetrating polymer networks as corneal inlays following deep stromal pocket implantation. *J Mater Sci Mater Med* 2013;24:967-977.

⁴⁶ Wei J, He R, Wang X, Song Y, Yao J, Liu X, Yang X, Chen W, Li X. The Corneal Ectasia Model of Rabbit: A Validity and Stability Study. *Bioengineering*. 2023;10(4):479-492.

⁴⁷ Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez C, González-Andrades M, Carriel V, Martínez-Gómez C, Alaminos M. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(7):4073-4083.

⁴⁸ Ionescu AM, Alaminos M, Cardona JC, Durán JDDGL, González-Andrades M, Ghinea R, Campos A, Hita E, Del Mar Pérez M. Investigating a novel nanostructured fibrin–agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties. *J mech behav biomed mater*. 2011;4(8):1963-1973.

⁴⁹ López de Padilla CML, Coenen MJ, Tovar A, De la Vega RE, Evans CH, Müller SA. Picrosirius red staining: revisiting its application to the qualitative and quantitative assessment of collagen type I and type III in tendon. *J Histochem Cytochem*. 2021;69(10):633-643.

⁵⁰ Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, Changotade S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem*. 2014;62(10):751-758.

APÊNDICE A – Referências da Introdução Geral

- AARTHY, M.; PUHAZHSELVAN, P.; APARNA, R.; GEORGE, A. S.; GOWTHAMAN, M. K.; AYYADURAI, N.; MASAKI, K.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; KAMINI, N. R. Growth associated degradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Cryptococcus* sp. MTCC 5455. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 152, p. 20-28, 2018. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.03.021.
- ABDO, M.; HADDAD, S.; EMAM, M. Development of the New Zealand white rabbit eye: I. pre-and postnatal development of eye tunics. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 46, n. 5, p. 423-430, 2017. DOI: 10.1111/ahe.12284.
- ALDAVE, A. J.; SONMEZ, B.; FORSTOT, S. L.; RAYNER, S. A.; YELLORE, V. S.; GLASGOW, B. J. A clinical and histopathologic examination of accelerated TGFBIp deposition after LASIK in combined granular-lattice corneal dystrophy. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 143, n. 3, p. 416-419, 2007. DOI: 10.1016/j.ajo.2006.11.056.
- ANDREEV, A. Y.; OSIDAK, E. O.; GRIGORIEV, T. E.; KRASHENINNIKOV, S. V.; ZAHAROV, V. D.; ZARAITIANC, O. V.; BORZENOK, S. A.; DOMOGATSKY, S. P. A new collagen scaffold for the improvement of corneal biomechanical properties in a rabbit model. **Experimental Eye Research**, London, v. 207, artigo 108580, p. 1-10, 2021. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108580.
- ARSLAN, A.; ÇAKMAK, S.; CENGİZ, A.; GÜMÜŞDERELİOĞLU, M. Poly (butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, Abingdon, v. 27, n. 18, p. 1841-1859, 2016. DOI: 10.1080/09205063.2016.1239945.
- ARSLAN, A.; ÇAKMAK, S.; GÜMÜŞDERELİOĞLU, M. Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly (butylene adipate-coterephthalate) fibrous 3D matrix. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, Abingdon, v. 46, p. 790-799, 2018. Suplemento 2. DOI: 10.1080/21691401.2018.1470522.
- AWWAD, S. T.; DI PASCUALE, M. A.; HOGAN, R. N.; FORSTOT, S. L.; MCCULLEY, J. P.; CAVANAGH, H. D. Avellino corneal dystrophy worsening after laser in situ keratomileusis: further clinicopathologic observations and proposed pathogenesis. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 145, n. 4, p. 656-661, 2008. DOI: 10.1016/j.ajo.2007.12.008.
- BALBINOT, G. S.; BAHLIS, E. A. C.; VISIOLI, F.; LEITUNE, V. C. B.; SOARES, R. M. D.; COLLARES, F. M. Polybutylene-adipate-terephthalate and niobium-containing bioactive glasses composites: Development of barrier membranes with adjusted properties for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 125, artigo 112115, p. 1-8, 2021. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112115.
- BAKHSHANDEH, H.; ATYABI, F.; SOLEIMANI, M.; TAHERZADEH, E. S.; SHAHHOSEINI, S.; COHAN, R. A. Biocompatibility improvement of artificial cornea

using chitosan-dextran nanoparticles containing bioactive macromolecules obtained from human amniotic membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 169, p. 492-499, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.125.

BRANCIFORTI, M. C.; BELLANI, C. F.; MORELLI, C. L.; FERRAND, A.; BENKIRANE-JESSEL, N.; BRETAS, R. E. S. Poly (butylene adipate-co-terephthalate) and poly (ϵ -caprolactone) and their bionanocomposites with cellulose nanocrystals: thermomechanical properties and cell viability study. **Journal of Renewable Materials**, Henderson, v. 7, n. 3, p. 269-277, 2019. DOI: 10.32604/jrm.2019.01833.

BRUUN, L. B.; HARDON, T. A. W.; KROGH, A. K. H.; QVORTUP, K.; HEEGAARD, S.; KRISTENSEN, A. T.; LINDE HENRIKSEN, M. The use of a "horizontal centrifugation protocol" to prepare autologous platelet-rich fibrin membranes for corneal reconstruction surgery in dogs with complicated corneal ulcerations: a case series. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, 2023, p. 1-15, 2023. DOI: 10.1111/vop.13148.

CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V. M.; RICCI, R.; COSTA, M. M.; RIBEIRO, A. F. C.; MARCIANO, F. R.; LOBO, A. O. Designing a novel nanocomposite for bone tissue engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition. **RSC Advances**, Cambridge, v. 6, n. 39, p. 32615-32623, 2016. DOI: 10.1039/C6RA00889E.

CEBRIAN, P.; ESCANILLA, N.; LOWE, R. C.; DAWSON, C.; SANCHEZ, R. F. Corneo-limbo-conjunctival transposition to treat deep and perforating corneal ulcers in dogs: a review of 418 eyes and corneal clarity scoring in 111 eyes. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 48-58, 2021. DOI: 10.1111/vop.12833.

CHOW, D. W. Y.; WESTERMEYER, H. D. Retrospective evaluation of corneal reconstruction using ACell Vet™ alone in dogs and cats: 82 cases. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 357-366, 2015. DOI: 10.1111/vop.12294.

CINTRON, C.; HONG, B. S.; COVINGTON, H. I.; MACARAK, E. J. Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 29, n. 5, p. 767-775, 1988.

COELHO, P. G. B.; SOUZA, M. V.; CONCEIÇÃO, L. G.; VILORIA, M. I. V.; BEDOYA, S. A. O. Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. 415-418, 2018. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20187544.

COLEMAN, R. Picosirius red staining revisited. **Acta Histochemica**, Muenchen, v. 3, n. 113, p. 231-233, 2011. DOI: 10.1016/j.acthis.2010.02.002.

DARIE-NIȚĂ, R. N.; RÂPĂ, M.; FRĂCKOWIAK, S. Special features of polyester-based materials for medical applications. **Polymers**, Basel, v. 14, n. 5, artigo 951, p. 1-49, 2022. DOI: 10.3390/polym14050951.

DOWER, N. M. B.; RIBEIRO, A. P.; GOMES, L. G.; MARTINI, A. C.; TAQUES, I. I. G. G.; ALMEIDA, S. L. H.; SILVA, M. I. V.; AGUIAR, D. M. Concentrations of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and hyaluronic acid in canine amniotic membranes cryopreserved for different time points and its effects in dogs with complicated corneal ulcers. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 62-72, 2022. DOI: 10.1111/vop.12916.

FERREIRA, F. V.; CIVIDANES, L. S.; GOUVEIA, R. F.; LONA, L. M. F. An overview on properties and applications of poly (butylene adipate-co-terephthalate)–PBAT based composites. **Polymer Engineering and Science**, Hoboken, v. 59, n. 2, p. E7-E15, 2017. DOI: 10.1002/pen.24770.

FU, M.-J.; ZHAO, J.; DUAN, S.; ZHANG, H.-R.; ZHAO, J.-J.; ZENG, L.; WANG, R.; ZHOU, X.-T. Corneal histomorphology and electron microscopic observation of R124L mutated corneal dystrophy in a relapsed pedigree. **International Journal of Ophthalmology**, Xi'an, v. 15, n. 9, p. 1416-1422, 2022. DOI: 10.18240/ijo.2022.09.02.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J. L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. São Paulo: Rocca, 2009. p. 69-96.

GARZÓN, I.; MARTÍN-PIEDRA, M. A.; ALFONSO-RODRÍGUEZ, C.; GONZÁLEZ-ANDRADES, M.; CARRIEL, V.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; ALAMINOS, M. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 55, n. 7, p. 4073-4083, 2014. DOI: 10.1167/iovs.14-14304.

GOPINATHAN, P. A.; KOKILA, G.; SIDDEEQH, S.; PRAKASH, R.; PRADEEP, L. Reexploring picosirius red: a review. **Indian Journal of Pathology and Oncology**, New Delhi, v. 7, n. 2, p. 196-203, 2020. DOI: 10.18231/j.ijpo.2020.038.

GRIFFITH, G. L.; WIROSTKO, B.; LEE, H.-K.; CORNELL, L. E.; MCDANIEL, J. S.; ZAMORA, D. O.; JOHNSON, A. J. Treatment of corneal chemical alkali burns with a crosslinked thiolated hyaluronic acid film. **Burns**, Amsterdam, v. 44, n. 5, p. 1179-1186, 2018. DOI: 10.1016/j.burns.2018.01.016.

GRONKIEWICZ, K. M.; GIULIANO, E. A.; KUROKI, K.; BUNYAK, F.; SHARMA, A.; TEIXEIRA, L. B. C.; HAMM, C. W.; MOHAN, R. R. Development of a novel in vivo corneal fibrosis model in the dog. **Experimental Eye Research**, London, v. 143, p. 75-88, 2016. DOI: 10.1016/j.exer.2015.09.010.

GUPTA, S.; BUYANK, F.; SINHA, N. R.; GRANT, D. G.; SINHA, P. R.; IOZZO, R. V.; CHAURASIA, S. S.; MOHAN, R. R. Decorin regulates collagen fibrillogenesis during corneal wound healing in mouse in vivo. **Experimental Eye Research**, London, v. 216, artigo 108933, p. 1-50, 2022. DOI: 10.1016/j.exer.2022.108933.

GUPTA, S.; FINK, M. K.; MARTIN, L. M.; SINHA, P. R.; RODIER, J. T.; SINHA, N. R.; HESEMANN, N. P.; CHAURASIA, S. S.; MOHAN, R. R. A rabbit model for evaluating

ocular damage from acrolein toxicity in vivo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1480, n. 1, p. 233-245, 2020. DOI: 10.1111/nyas.14514.

HAKAMI, N. Y.; DUSTING, G. J.; CHAN, E. C.; SHAH, M. H.; PESHAVARIYA, H. M. Wound healing after alkali burn injury of the cornea involves Nox4-type NADPH oxidase. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 61, n. 12, p. 20-28, 2020. DOI: 10.1167/iovs.61.12.20.

HARDT, J. C.; PELLÁ, M. C. G.; MEIRA, A. C. R.; ROSENBERGER, A. G.; CAETANO, J.; DRAGUNSKI, D. C. Potential wound dressings from electrospun medicated poly (butylene-adipate-co-terephthalate)/poly-(ϵ -caprolactone) microfibers. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 339, artigo 116694, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116694.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S.; SASAKI, S.; NEGISHI, J.; HATTORI, S.; HONDA, T.; KIMURA, T.; KOBAYASHI, H.; KISHIDA, A. Re-epithelialization and remodeling of decellularized corneal matrix in a rabbit corneal epithelial wound model. **Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 102, p. 238-246, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.04.024.

HASHIMOTO, Y.; HATTORI, S.; SASAKI, S.; HONDA, T.; KIMURA, T.; FUNAMOTO, S.; KOBAYASHI, H.; KISHIDA, A. Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 1, artigo 27734, p. 1-9, 2016. DOI: 10.1038/srep27734.

IONESCU, A.-M.; ALAMINOS, M.; CARDONA, J. C.; DURÁN, J. D. G.-L.; GONZÁLEZ-ANDRADES, M.; GHINEA, R.; CAMPOS, A.; HITA, E.; PÉREZ, M. M. Investigating a novel nanostructured fibrin–agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 4, n. 8, p. 1963-1973, 2011. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2011.06.013.

JIA, H.; ZHANG, M.; WENG, Y.; ZHAO, Y.; LI, C.; KANWAL, A. Degradation of poly (butylene adipate-co-terephthalate) by *Stenotrophomonas* sp. YCJ1 isolated from farmland soil. **Journal of Environmental Sciences (China)**, Amsterdam, v. 103, p. 50-58, 2021. DOI: 10.1016/j.jes.2020.10.001.

JIAN, J.; XIANGBIN, Z.; XIANBO, H. An overview on synthesis, properties and applications of poly (butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, Beijing, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2020. DOI: 10.1016/j.aiepr.2020.01.001.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, Dordrecht, v. 11, p. 447-455, 1979. DOI: 10.1007/BF01002772.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W. A.; BRENTANI, R. Differential staining of

collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, Okayama, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978. DOI: 10.1679/aohc1950.41.267.

KANWAL, A.; ZHANG, M.; SHARAF, F.; LI, C. Polymer pollution and its solutions with special emphasis on Poly (butylene adipate terephthalate (PBAT)). **Polymer Bulletin**, Heidelberg, v. 79, p. 9303-9330, 2022a. DOI: 10.1007/s00289-021-04065-2.

KANWAL, A.; ZHANG, M.; SHARAF, F.; LI, C. Enzymatic degradation of poly (butylene adipate co-terephthalate)(PBAT) copolymer using lipase B from *Candida antarctica* (CALB) and effect of PBAT on plant growth. **Polymer Bulletin**, Heidelberg, v. 79, p. 9059-9073, 2022b. DOI: 10.1007/s00289-021-03946-w.

KIM, M.-N.; LEE, B.-Y.; LEE, I.-M.; LEE, H.-S.; YOON, J.-S. Toxicity and biodegradation of products from polyester hydrolysis. **Journal of Environmental Science and Health, part A: Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering**, New York, v. 36, n. 4, p. 447-463, 2001. DOI: 10.1081/ESE-100103475.

KIM, T.-I.; ROH, M. I.; GROSSNIKLAUS, H. E.; KANG, S. J.; HAMILTON, S. M.; SCHORDERET, D. F.; LEE, W. B.; KIM, E. K. Deposits of transforming growth factor- β -induced protein in granular corneal dystrophy type II after LASIK. **Cornea**, New York, v. 27, n. 1, p. 28-32, 2008. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318156d36d.

LATTOUF, R.; YOUNES, R.; LUTOMSKI, D.; NAAMAN, N.; GODEAU, G.; SENNI, K.; CHANGOTADE, S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 62, n. 10, p. 751-758, 2014. DOI: 10.1369/0022155414545787.

LIU, Y.; YANG, L.; CHEN, G.; LIU, Z.; LU, T.; YANG, Y.; YU, J.; KANG, D.; YAN, W.; HE, M.; QIN, S.; YU, J.; YE, C.; LUO, H. PBAT hollow porous microfibers prepared via electrospinning and their functionalization for potential peptide release. **Materials and Design**, London, v. 207, artigo 109880, p. 1-9, 2021. DOI: 10.1016/j.matdes.2021.109880.

LIU, Z.; JI, J.; ZHANG, J.; HUANG, C.; MENG, Z.; QIU, W.; LI, X.; WANG, W. Corneal reinforcement using an acellular dermal matrix for an analysis of biocompatibility, mechanical properties, and transparency. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 3326-3332, 2012a. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.05.004.

LIU, T.; XU, Y.; SUN, D.; XIE, L. Histological evaluation of corneal scar formation in pseudophakic bullous keratopathy. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, artigo e39201, p. 1-6, 2012b. DOI: 10.1371/journal.pone.0039201.

LÓPEZ DE PADILLA, C. M.; COENEN, M. J.; TOVAR, A.; DE LA VEGA, R. E.; EVANS, C. H.; MÜLLER, S. A. Picrosirius red staining: revisiting its application to the qualitative and quantitative assessment of collagen type I and type III in tendon.

Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Thousand Oaks, v. 69, n. 10, p. 633-643, 2021. DOI: 10.1369/00221554211046777.

LORENZO-MARTÍN, E.; GALLEGU-MUÑOZ, P.; MAR, S.; FERNÁNDEZ, I.; CIDAD, P.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M. C. Dynamic changes of the extracellular matrix during corneal wound healing. **Experimental Eye Research**, London, v. 186, artigo 107704, p. 1-9, 2019. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107704.

MAGGS, D. J. Cornea and esclera. In: SLATTER, D. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. St. Louis: Saunders; 2008. p. 175-202.

MANSOORI, F. S.; SATTARI, A.; KHEIRANDISH, R.; ASLI, M. A histological study of the outer layer of rabbit fish (*Siganus javus*) eye. **Comparative Clinical Pathology**, Hampshire, v. 23, p. 125-128, 2014. DOI: 10.1007/s00580-012-1582-7.

MCLELLAN, G. J.; ARCHER, F. J. Corneal stromal sequestration and keratoconjunctivitis sicca in a horse. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 3, n. 2-3, p. 207-212, 2000. DOI: 10.1046/j.1463-5224.2000.00121.x.

MELO, M. S.; VIEIRA-NETO, A. E.; WOUK, A. F. P. F.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; MORAIS, G. B.; MORAES, M. E. A.; MORAES FILHO, M. O. Enxerto de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em reparo de úlcera em cornea de cão: relato de caso. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 367-375, 2022. DOI: 10.34188/bjaerv5n1-030.

MEZZADRI, V.; CROTTI, A.; NARDI, S.; BARSOTTI, G. Surgical treatment of canine and feline descemetocoeles, deep and perforated corneal ulcers with autologous buccal mucous membrane grafts. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 599-609, 2021. DOI: 10.1111/vop.12907.

MILMAN, T.; KAO, A. A.; CHU, D.; GORSKI, M.; STEINER, A.; SIMON, C. Z.; SHIH, C.; ALDAVE, A. J.; EAGLE JR, R. C.; JAKOBIEC, F. A.; UDELL, I. Paraproteinemic keratopathy: the expanding diversity of clinical and pathologic manifestations. **Ophthalmology**, New York, v. 122, n. 9, p. 1748-1756, 2015. DOI: 10.1016/j.ophtha.2015.05.029.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 1-11, 1991. Suplemento 3. DOI: 10.1590/s0074-02761991000700002.

MUROI, F.; TACHIBANA, Y.; SOULENTHONE, P.; YAMAMOTO, K.; MIZUNO, T.; SAKURAI, T.; KOBAYASHI, Y.; KASUYA, K. I. Characterization of a poly (butylene adipate-co-terephthalate) hydrolase from the aerobic mesophilic bacterium *Bacillus pumilus*. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 137, p. 11-22, 2017. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.006.

NAR, M.; STAUFENBERG, G.; YANG, B.; ROBERTSON, L.; PATEL, R. H.; VARANASI, V. G.; D'SOUZA, N. A. Osteoconductive bio-based meshes based on

Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (butylene adipate-coterephthalate) blends. **Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 38, p. 315-324, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2014.01.047.

PECORELLA, I.; APPOLLONI, R.; TIEZZI, A.; PLATEROTI, P.; PLATEROTI, R. Histological findings in a failed corneal riboflavin–UVA collagen cross-linking performed for progressive keratoconus. **Cornea**, New York, v. 32, n. 2, p. 191-195, 2013. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3182553aac.

PIÉRARD, G. E. Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. **Matrix**, Stuttgart, v. 9, n. 1, p. 68-71, 1989. DOI: 10.1016/s0934-8832(89)80021-6.

PRATOOMSOOT, C.; TANIOKA, H.; HORI, K.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S.; TIGHE, P. J.; DUA, H.; SHAKESHEFF, K. M.; ROSE, F. R. A. J. A thermoreversible hydrogel as a biosynthetic bandage for corneal wound repair. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 272-181, 2008. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.031.

RAMACHANDRAN, C.; SANGWAN, V. S.; ORTEGA, I.; BHATNAGAR, U.; MULLA, S. M. A.; MCKEAN, R.; MACNEIL, S. Synthetic biodegradable alternatives to the use of the amniotic membrane for corneal regeneration: assessment of local and systemic toxicity in rabbits. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 103, n. 2, p. 286-292, 2019. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2018-312055.

RAVANI, R. D.; YADAV, S.; TAKKAR, B.; SEN, S.; KASHYAP, S.; GUPTA, D.; JASSAL, M.; AGRAWAL, A.; MOHANTY, S.; TANDON, R. Experimental evaluation of safety and efficacy of plasma-treated poly- ϵ -caprolactone membrane as a substitute for human amniotic membrane in treating corneal epithelial defects in rabbit eyes. **Indian Journal of Ophthalmology**, Mumbai, v. 69, n. 9, p. 2412-2416, 2021. DOI: 10.4103/ijo.IJO_2986_20.

RIBEIRO NETO, W. A.; PAULA, A. C. C.; MARTINS, T. M. M.; GOES, A. M.; AVEROUS, L.; SCHLATTER, G.; BRETAS, R. E. S. Poly (butylene adipate-coterephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 120, p. 61-69, 2015. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.009.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.

RODRIGUES, B. V. M.; SILVA, A. S.; MELO, G. F. S.; VASCONSCELLOS, L. M. R.; MARCIANO, F. R.; LOBO, A. O. Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-coterephthalate) fibers. **Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 59, p. 782-791, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2015.10.075.

SALEHI, S.; CZUGALA, M.; STAFIEJ, P.; FATHI, M.; BAHNERS, T.; GUTMANN, J. S.; SINGER, B. B.; FUCHSLUGER, T. A. Poly (glycerol sebacate)-Poly (ϵ -caprolactone) blend nanofibrous scaffold as intrinsic bio- and immunocompatible system for corneal repair. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 50, p. 370-380, 2017. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.013.

SANTANA-MELO, G. F.; RODRIGUES, B. V. M.; SILVA, E.; RICCI, R.; MARCIANO, F. R.; WEBSTER, T. J.; VASCONCELLOS, L. M. R.; LOBO, A. O. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 155, p. 544-552, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.053.

SILVA, A. S.; RODRIGUES, B. V. M.; OLIVEIRA, F. C.; CARVALHO, J. O.; VASCONCELLOS, L. M. R.; ARAÚJO, J. C. R.; MARCIANO, F. R.; LOBO, A. O. Characterization and in vitro and in vivo assessment of poly (butylene adipate-co-terephthalate)/nano-hydroxyapatite composites as scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Polymer Research**, Dordrecht, v. 26, artigo 53, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1007/s10965-019-1706-8.

SINHA, N. R.; BALNE, P. K.; BUNYAK, F.; HOFMANN, A. C.; LIM, R. R.; MOHAN, R. R.; CHAURASIA, S. S. Collagen matrix perturbations in corneal stroma of Ossabaw mini pigs with type 2 diabetes. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 27, p. 666-678, 2021.

SOULENTHONE, P.; TACHIBANA, Y.; SUZUKI, M.; MIZUNO, T.; OHTA, Y.; KASUYA, K.-I. Characterization of a poly(butylene adipate-co-terephthalate) hydrolase from the mesophilic actinobacteria *Rhodococcus fascians*. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 184, artigo 109481, p. 1-30, 2021. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2021.109481.

STAFIEJ, P.; KÜNG, F.; THIEME, D.; CZUGALA, M.; KRUSE, F. E.; SCHUBERT, D. W.; FUCHSLUGER, T. A. Adhesion and metabolic activity of human corneal cells on PCL based nanofiber matrices. **Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 71, p. 764-770, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2016.10.058.

SUBASINGHE, S. K.; OGBUEHI, K. C.; MITCHELL, L.; DIAS, G. J. Animal model with structural similarity to human corneal collagen fibrillar arrangement. **Anatomical Science International**, Tokyo, v. 96, n. 2, p. 286-293, 2021. DOI: 10.1007/s12565-020-00590-8.

TAI, T. Y. T.; DAMANI, M. R.; VO, R.; RAYNER, S. A.; GLASGOW, B. J.; HOFBAUER, J. D.; CASEY, R.; ALDAVE, A. J. Keratoconus associated with corneal stromal amyloid deposition containing TGFB1p. **Cornea**, New York, v. 28, n. 5, p. 589-593, 2009. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31818c9003.

VANORE, M.; CHAHORY, S.; PAYEN, G.; CLERC, B. Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 93-99, 2007. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2007.00515.x.

VARSHOSAZ, J.; ARABLOO, K.; SARRAMI, N.; GHASSAMI, E.; KACHOU EI, E. Y.; KOUHI, M.; JAHANIAN-NAJAFABADI, A. RGD peptide grafted polybutylene adipate co-terephthalate/gelatin electrospun nanofibers loaded with a matrix metalloproteinase inhibitor drug for alleviating of wounds: an in vitro/in vivo study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, London, v. 46, n. 3, p. 484-497, 2020. DOI: 10.1080/03639045.2020.1730397.

VARSHOSAZ, J.; JAJANIAN-NAJAFABADI, A.; SOLEYMANI, A.; KHAJAVINIA, A. Poly (butylene adipate-co-terephthalate) electrospun nanofibers loaded with 5-fluorouracil and curcumin in treatment of colorectal cancer cells. **Polymer Testing**, London, v. 65, p. 217-230, 2018. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2017.11.020.

XIA, Y.; LIU, B.; FAN, Z.; PENG, X. Corneal collagen fibril changes after ultraviolet A/riboflavin corneal crosslinking. **Cornea**, New York, v. 33, n. 1, p. 56-59, 2014. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000017.

WALLACE, P. W.; HAERNVALL, K.; RIBITSCH, D.; ZITZENBACHER, S.; SCHITTMAYER, M.; STEINKELLNER, G.; GRUBER, K.; GUEBITZ, G. M.; BIRNER-GRUENBERGER, R. PpEst is a novel PBAT degrading polyesterase identified by proteomic screening of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 101, p. 2291-2303, 2017. DOI: 10.1007/s00253-016-7992-8.

WEI, J.; HE, R.; WANG, X.; SONG, Y.; YAO, J.; LIU, X.; YANG, X.; CHEN, W.; LI, X. The corneal ectasia model of rabbit: a validity and stability study. **Bioengineering**, Basel, v. 10, n. 4, p. 479-492, 2023. DOI: 10.3390/bioengineering10040479.

WERNER, L.; CHEW, J.; MAMALIS, N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 281-291, 2006. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2006.00495.x.

WOO, H. M.; KIM, M. S.; KWEON, O. K.; KIM, D. Y.; NAM, T. C.; KIM, J. H. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 85, n. 3, p. 345-349, 2001. DOI: 10.1136/bjo.85.3.345.

YANOFF, M.; SASSANI, J. W. **Ocular pathology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2009. 802 p.

ZERBINATI, N.; CALLIGARO, A. Calcium hydroxylapatite treatment of human skin: evidence of collagen turnover through picosirius red staining and circularly polarized microscopy. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Auckland, v. 11, p. 29-35, 2018. DOI: 10.2147/CCID.S143015.

ZHANG, H.; ZHANG, Q.; CAI, Q.; LUO, Q.; LI, X.; LI, X.; ZHANG, K.; ZHU, W. In-reactor engineering of bioactive aliphatic polyesters via magnesium-catalyzed polycondensation for guided tissue regeneration. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 424, artigo 130432, p. 1-9, 2021. DOI: 10.1016/j.cej.2021.130432.

ANEXO – Normas da *Veterinary Ophthalmology*

23/10/2023, 15:33

Veterinary Ophthalmology Author Guidelines

Advertisement



AUTHOR GUIDELINES

Sections

1. [Submission and Peer Review Process](#)
2. [Article Types](#)
3. [After Acceptance](#)

Veterinary Ophthalmology is a peer-reviewed, online, international journal that welcomes submission of manuscripts whose target audience includes Diplomates of the American College of Veterinary Ophthalmologists (ACVO) and the European College of Veterinary Ophthalmologists (ECVO), members of international ophthalmic societies and associations, academic researchers with interests in veterinary or comparative ophthalmology, specialists and general practitioners with an ophthalmology interest.

Veterinary Ophthalmology strives to serve as the primary journal for all articles pertaining to veterinary and comparative ophthalmology published worldwide. *Veterinary Ophthalmology* publishes original material relating to all aspects of clinical and investigational veterinary and comparative ophthalmology.

1. Submission and Peer Review Process

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/vop>

For help with submissions, please contact the journal's Editorial Office at VOP.office@wiley.com

This journal does not charge submission fees.

Article Preparation Support

Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Free Format submission

Veterinary Ophthalmology offers **Free Format submission** for a simplified and streamlined submission process. Before you submit, you will need:

- Your manuscript: this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files—whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. If the figures are not of sufficiently high quality, your manuscript may be delayed. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for revision. Your manuscript will be sent back to you for revision if the quality of English language is poor.
- An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. *(Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.)*
- The title page of the manuscript, including:
 - Your co-author details, including affiliation and email address. *(Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.)*
 - Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following *(Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication):*
 - Data availability statement
 - Funding statement
 - Conflict of interest disclosure
 - Ethical approval statement

Important: Veterinary Ophthalmology operates a double-anonymized peer review policy. Please anonymize your manuscript and supply a separate title page file.

Open Access

Veterinary Ophthalmology is a subscription journal that offers an Open Access option. You'll have the option to make your article open access after acceptance, which will be subject to an APC unless a waiver applies. Read more about [APCs here](#).

Preprint Policy

Please find the Wiley preprint policy [here](#).

Veterinary Ophthalmology will consider for review articles previously available as preprints. You may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. You are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

This journal operates a double-anonymized peer review process. Authors are responsible for anonymizing their manuscript in order to remain anonymous to the reviewers throughout the peer review process (see "Main Text File" below for more details). Since the journal also encourages posting of preprints, however, please note that if authors share their manuscript in preprint form this may compromise their anonymity during peer review.

Data Sharing and Data Availability

Veterinary Ophthalmology expects data sharing. Review Wiley's [Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

Data Citation

Please review Wiley's [Data Citation policy](#).

Data Protection

By submitting a manuscript to or reviewing for *Veterinary Ophthalmology*, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication. Please review [Wiley's Data Protection Policy](#) to learn more.

Funding

You should list all funding sources in the Acknowledgments section. You are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the [Open Funder Registry](#) for the correct nomenclature.

Authorship

All listed authors should have contributed to the manuscript substantially and have agreed to the final submitted version. Review [editorial standards](#) and scroll down for a description of authorship criteria.

Author Pronouns

Authors may now include their personal pronouns in the author bylines of their published articles and on Wiley Online Library. Authors will never be required to include their pronouns; it will always be optional for the author. Authors can include their pronouns in their manuscript upon submission and can add, edit, or remove their pronouns at any stage upon request. Submitting/corresponding authors should never add, edit, or remove a coauthor's pronouns without that coauthor's consent. Where post-publication changes to pronouns are required, these can be made without a correction notice to the paper, following Wiley's Name Change Policy to protect the author's privacy. Terms which fall outside of the scope of personal pronouns (e.g. proper or improper nouns), are currently not supported.

ORCID

This journal requires ORCID. Please refer to [Wiley's resources on ORCID](#).

Reproduction of Copyright Material

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is your responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit [Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ](#).

The corresponding author is responsible for obtaining written permission to reproduce the material "in print and other media" from the publisher of the original source, and for supplying Wiley with that permission upon submission.

Title Page

The title page should contain:

- i. A brief informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see [Wiley's best practice SEO tips](#));
- ii. A short running title of less than 50 characters;
- iii. The full names of the authors;
- iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- v. Acknowledgments;
- vi. Conflicts of interest (if declared);
- vii. Ethical approval statement.

Important: *Veterinary Ophthalmology* operates a double-anonymized peer review policy. Please anonymize your manuscript and prepare a separate title page containing author details.

Main Text File

The main text file should be in Word or PDF format. As *Veterinary Ophthalmology* operates a double-anonymized peer review process, authors are required to provide an anonymized main text file upon initial submission. The anonymized version should have no obvious references or hints as to the authors' country or region. The laboratory/ institution/practice information should be removed from the anonymized version and written as "XXXX -anonymized for review-". Authors of manuscripts which proceed to revision stage will be asked to provide a de-anonymized version, in addition to their anonymized version, upon submission of their revision.

Please note: It is no longer required to include the location of the manufacturer when providing manufacturer information (equipment, devices, and reagents).

Your main document file should include:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations;
- Abstract structured (Objective; Animal Studied, Procedure(s), Results, and Conclusions);
- Six keywords (please ensure these are not already included within your title guidance on keywords creation is available on [Wiley Author Services](#));
- Main body: formatted as introduction, materials & methods, results, discussion and/or conclusion;
- References;
- Tables (each table complete with title and footnotes);
- Figure legends: Legends should be supplied as a complete list in the text. Figures should be uploaded as separate files (see below).

Reference Style

This journal uses AMA reference style. Review your [reference style guidelines](#) prior to submission. As *Veterinary Ophthalmology* offers Free Format submission, however, this is for information only and you do not need to format the references in your article. This will instead be taken care of by the typesetter.

Figures and Supporting Information

Figures, supporting information, and appendices should be supplied as separate files. You should review the [basic figure requirements](#) for manuscripts for peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements. View [Wiley's FAQs](#) on supporting information.

Embedded Rich Media

Veterinary Ophthalmology has the option for authors to embed rich media (i.e. video and audio) within their final article. These files should be submitted with the manuscript files online, using either the "Embedded Video" or "Embedded Audio" file designation. If the video/audio includes dialogue, a transcript should be included as a separate file. Maximum file size is 300 MB, and **the combined manuscript files, including video, audio, tables, figures, and text must not exceed 350 MB**. For full guidance on accepted file types and resolution please see [here](#).

Ensure each file is numbered (e.g. Video 1, Video 2, etc.). Legends for the rich media files should be placed at the end of the article.

The content of the video should not display overt product advertising. Educational presentations are encouraged.

Any narration should be in English, if possible. A typed transcript of any speech within the video/audio should be provided. An English translation of any non-English speech should be provided in the transcript.

All embedded rich media will be subject to peer review. Editors reserve the right to request edits to rich media files as a condition of acceptance. Contributors are asked to be succinct, and the Editors reserve the right to require shorter video/audio duration. The video/audio should be high quality (both in content and visibility/audibility). The video/audio should make a specific point; particularly, it should demonstrate the features described in the text of the manuscript.

Participant Consent: It is the responsibility of the corresponding author to seek informed consent from any identifiable participant in the rich media files. Masking a participant's eyes, or excluded head and shoulders is not sufficient. Please ensure that a consent form (<https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/licensing-info-faqs.html>) is provided for each participant.

Peer Review

This journal operates under a double-anonymized **peer review model**. Except where otherwise stated, manuscripts are peer reviewed by at least two anonymous reviewers and an Editorial Board Member. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Authors may suggest potential reviewers that have expertise in the field and can provide an unbiased evaluation. Previous or current mentors, mentees, collaborators, colleagues, or personal relations are not suitable recommendations. Authors can also oppose reviewers who would have a conflict of interest in reviewing their manuscripts.

The reviewers' comments are reviewed by an Editorial Board Member who makes a recommendation on the suitability of the report for publication to the Editor-in-Chief, who makes the final decision. The editors reserve the right to seek consultation on appropriateness of study design, survey instruments, and methods used for statistical analysis of data.

Manuscripts that report studies that are otherwise scientifically sound may be rejected before or after peer review because they lack breadth of appeal, impact, or are outside the interest area of the journal. Likewise, studies that are simply additive to the literature and do not provide substantial discovery, mechanistic insight, challenge dogma, or highlight novel understanding are not likely to be considered suitable for publication.

Manuscripts that are poorly prepared or written or do not follow ethical guidelines will be returned without peer review. It is the authors' responsibility to submit manuscripts that are written in a style that enhances readability (clear, direct, concise, with appropriate grammar and spelling). Authors with limited experience in scientific writing in English are encouraged to seek assistance from professional editing services.

In-house submissions, i.e. papers authored by Editors or Editorial Board members of the title, will be sent to Editors unaffiliated with the author or institution and monitored carefully to ensure there is no peer review bias.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available [here](#).

Appeals and Complaints

Authors may appeal an editorial decision if they feel that the decision to reject was based on either a significant misunderstanding of a core aspect of the manuscript, a failure to understand how the manuscript advances the literature or concerns regarding the manuscript-handling process. Differences in opinion regarding the novelty or significance of the reported findings are not considered as grounds for appeal. To

raise an appeal, please contact the journal by email, quoting your manuscript ID number and explaining your rationale for the appeal. The editor's decision following an appeal consideration is final.

To raise a complaint regarding editorial staff, policy or process please contact the journal in the first instance. If you believe further support outside the journal's management is necessary, please refer to Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics.

Refer and Transfer Program

Wiley believes that no valuable research should go unshared. *Veterinary Ophthalmology* participates in Wiley's Refer & Transfer program. If your manuscript is not accepted, you may receive a recommendation to transfer your manuscript to another suitable Wiley journal, either through a referral from the journal's editor or through our Transfer Desk Assistant.

Guidelines on Publishing and Research Ethics in Journal Articles

Veterinary Ophthalmology requires that you include in the manuscript details of ethical review board approvals, ethical treatment of human and animal research participants, and gathering of informed consent, as appropriate. You will be expected to declare all conflicts of interest, or none, on submission. Please review Wiley's policies surrounding human studies, animal studies, clinical trial registration, biosecurity, and research reporting guidelines.

This journal follows the core practices of the Committee on Publication Ethics (COPE) and handles cases of research and publication misconduct accordingly (<https://publicationethics.org/core-practices>).

This journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors and Wiley's Publication Ethics Guidelines.

Guidelines for Ethical Research in Veterinary Ophthalmology (GERVO)

The Journal reserves the right to decline to publish manuscripts that do not comply with the Guidelines for Ethical Research in Veterinary Ophthalmology (GERVO), such as the appropriate regulatory approval is not reported, the Journal has concerns about the welfare or treatment of animals used in the study, there is reason to believe that animals have been subjected to unnecessary or avoidable pain or distress or the Journal has concerns about involvement of people in the study.

The Journal is not obliged to reveal the basis for such a decision.

The Journal may request further information about care and use of animals, or involvement of people, including evidence of regulatory approval or compliance with local regulations.

Ethical Approval Statement

We require that authors indicate during submission of their manuscript if the study required institutional or governmental approval in the jurisdiction in which it was conducted, and whether such approval was granted.

To confirm adherence to the journal's ethical policies, including compliance with the Guidelines for Ethical Research in Veterinary Ophthalmology (GERVO), authors must provide an Ethical Approval Statement. Please select (and edit accordingly) the most suitable Ethical Approval Statement from our templated statements available here: [Templates for Ethical Approval Statements](#). The finalized statement should be included in the Title Page.

Conflict of Interest

Veterinary Ophthalmology requires that all authors include a conflict of interest statement (this should be included in the Title Page). Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company.

If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, they can query the editorial office at vop.office@wiley.com. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. **If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this in the manuscript and at submission.** It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to list in the manuscript, and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

2. Article Types

Article Type	Description	Word Guide (this is a suggested range and not prescriptive)	Abstract / Structure	Other Requirements
Original Articles	Including clinical studies (prospective and retrospective)	4,000 - 5,000	Yes, structured	Ethical Approval Conflict of Interest Statement
Review Articles	Papers which clarify, summarize and critically evaluate the current literature	4,000 - 5,000	Yes, unstructured	Conflict of Interest Statement
Case Reports	Case reports making a substantial contribution to ophthalmic knowledge	2,000 – 2,500 (with a recommendation of around 4 figures and between 18-20 references)	Yes, structured	Ethical Approval Conflict of Interest Statement
Viewpoint	Papers which challenge existing concepts or	2,000 – 2,500	Yes, unstructured	Conflict of Interest Statement

	present an alternative interpretation of available information			
Brief Communications	Brief communications are used when the extent of the investigation or the findings do not warrant a full paper, but are still considered of value to the ophthalmic community	1,500 – 2,000 (with a recommendation of around 2 figures and between 10 - 12 references)	Yes, structured	Ethical Approval Conflict of Interest Statement
Letter to the Editor	Letters may cover a variety of topics	750 – 1,000 (including references and a recommendation of around 1-2 figures/tables)	No	Conflict of Interest Statement

3. After Acceptance

Wiley Author Services

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with **Wiley Author Services**. You will be asked to sign a publication license at this point as well as pay for any applicable APCs.

Copyright & Licensing

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License.

Standard re-use and licensing rights vary by journal. Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND Creative Commons License.

Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions.

Early View

Upon publication, articles are available as full text HTML or PDF in Early View prior to inclusion in an issue and can be cited as references using their Digital Object Identifier (DOI) number.

Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email.

Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

Correction to Authorship

In accordance with Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics and the Committee on Publication Ethics' guidance, *Veterinary Ophthalmology* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the Request for Changes to a Journal Article Author List Form and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in Wiley's Best Practice Guidelines under "Author name changes after publication."]

Sign up for email alerts

Enter your email to receive alerts when new articles and issues are published.

Email address*

[Continue](#)

 [Submit an article](#)

 [Browse free sample issue](#)

 [Subscribe to this journal](#)