# UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

# EFEITOS DO FUCOIDAM DE *Fucus vesiculosus* SOBRE A MORFOLOGIA, A PLOIDIA E O METABOLISMO DO ENDOTÉLIO CORNEAL DE COELHOS

Germana Alegro da Silva

Médica Veterinária

# UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

# EFEITOS DO FUCOIDAM DE *Fucus vesiculosus* SOBRE A MORFOLOGIA, A PLOIDIA E O METABOLISMO DO ENDOTÉLIO CORNEAL DE COELHOS

Discente: Germana Alegro da Silva Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus Coorientador: Prof. Dr. Alvio Isao Shiguematsu

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

# Silva, Germana Alegro da Efeitos do fucoidam de Fucus vesiculosus sobre a morfologia, a ploidia e o metabolismo do endotélio corneal de coelhos / Germana Alegro da Silva. -- Jaboticabal, 2019 43 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: José Luiz Laus Coorientador: Alvio Isao Shiguematsu 1. Córnea. 2. Algas marinhas. 3. Cicatrização de ferimentos. 4. Cromatina. 5. Medicina regenerativa. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



#### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DO FUCOIDAM DE *Fucus vesiculosus* SOBRE A MORFOLOGIA, A PLOIDIA E O METABOLISMO DO ENDOTÉLIO CORNEAL DE COELHOS

AUTORA: GERMANA ALEGRO DA SILVA ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ LAUS COORIENTADOR: ALVIO ISAO SHIGUEMATSU

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

Prof. Dr. ALVIO ISÃO SHIGUEMATSU Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço / FM/Botucatu - Unesp

/ Profa. Dra. ANDREIA VITOR COUTO DO AMARAL (Videoconferência) Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFG / Jataí/SP

the

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI Depto. de Patologia Veterinária / FCAV/UNESP

m

Prof. Dr. JAYTER SIŁVA DE PAULA Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço-FMRP-USP / Ribeirão Preto/SP

homen

Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA Depto. de Clínica Veterinária / FMVZ/Botucatu - Unesp

Jaboticabal, 10 de janeiro de 2019





Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal -Via Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, Km 5, 14884900, Jaboticabal - São Paulo http://www.fcav.unesp.br/#!/pos-graduacao/programas-pg/cirurgia-veterinaria/CNPJ: 48.031.918/0012-87.

### DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Germana Alegro da Silva nascida na cidade de Sorocaba, São Paulo, no dia 21 de outubro de 1985. Concluiu o ensino fundamental e médio, no Colégio Objetivo de Sorocaba, onde se formou no ano de 2004. Em conjunto, nos anos 2002 e 2003 cursou Técnico em Nutrição em Dietética, obtendo seu título em 2004, pela Escola Técnica Estadual Rubens de Faria e Souza - Centro Paula Souza. Ingressou na Universidade Federal de Lavras, do estado de Minas Gerais, no ano 2005, instituição que lhe outorgou o título de Médica Veterinária no ano de 2011. Depois, realizou Treinamento Técnico, com bolsa de estudos financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) no ano 2011, na Unidade de Oftalmologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP de Jaboticabal) sob a supervisão do Prof. Dr. José Luiz Laus. Em 2012 ingressou à pós-graduação na mesma Instituição, titulada Mestra em 2014, cujo projeto, financiado pela Fapesp, fora realizado em conjunto com o Prof. Ron Ofri da Universidade Hebraica de Jerulasem e resultou em artigo publicado no periódico "Current Eye Research" intitulado "Functional and Structural Evaluation of Sildenafil in a Rat Model of Acute Retinal Ischemia/Reperfusion Injury". Atualmente cursa o doutorado na mesma instituição, ainda sob orientação do Prof. José Luiz Laus e coorientação do Dr. Alvio Isao Shiguematsu (FMB/UNESP/Botucatu). O período de pós graduação resultou em 11 artigos publicados como autora/ coautora. Ademais, realizou treinamento no Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", da FCAV/UNESP de Jaboticabal sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus, treinamento e desenvolvimento de pesquisa nos Laboratórios de Histologia e Imuno-histoquímica do Setor de Patologia Veterinária, da FMVZ/UNESP de Botucatu, sob supervisão da Profa. Dra. Reneé Laufer Amorim e treinamento e desenvolvimento de pesquisa nos Biotérios e Laboratórios de Microcirurgia e Imunofluorescência, da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNIPEX/FMB), sob supervisão do Dr. Alvio Isao Shiguematsu.

"A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria; O que você sente, você atrai; O que você acredita Torna-se realidade"

Buda

Dedico à minha família, amo vocês. Tudo o que eu sei e sou é graças à educação e carinho que sempre tive.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Luiz Laus pela oportunidade oferecida na pós-graduação, por compreender minhas aflições e me manter perseverante.

Ao Doutor Alvio Isao Shiguematsu, primeiramente, por me receber com tanto carinho e me acolher em sua clínica e na FMB, pela colaboração em meu trabalho, pelos aprendizados profissionais, e principalmente pelo empenho e entusiasmo em nossos projetos. À Dra. Marcela Aldrovani por toda colaboração, empenho e amizade.

Aos Professores que gentilmente aceitaram meu convite para participarem das bancas de qualificação e de defesa do doutorado, e que cujas sugestões contribuíram com a melhoria de meu trabalho, Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, Prof. Dr. Jayter Silva de Paula, Profa. Dra. Andreia Vitor Couto do Amaral, Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi, Prof. Dr. Ivan Ricardo Martinez Pádua.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio regular à pesquisa recebido (processo nº 2017/02908-8).

Ao Sr. Silvio Tonissi, da Eyetec, pelo fornecer suporte e software para as análises das fotomicrografias da alizarina. Ao Sr. Acácio Lima e à farmacêutica Marcia Massako, da Eyepharma por confeccionar e doar os colírios empregados no estudo.

Ao pessoal de serviços de Oftalmologia Veterinária da FCAV/UNESP Jaboticabal e de Oftalmologia da FMB/UNESP Botucatu, por todo apoio e amizade recebidos.

Aos amigos Luis Gabriel Rivera Calderon por ser meu braço direito em todo experimento, ser meu companheiro imprescindível para esta conclusão, ao Diogo Sousa Zanoni por não desistir da oftalmologia e sempre que possível estar presente e à Gabriela Sasdelli por toda ajuda durante o experimento.

Agradeço, imensamente, a todos os técnicos, funcionários e demais professores de ambas Instituições, que de maneira direta ou indireta contribuíram ao sucesso da pesquisa e ao meu crescimento. Em especial à Vickeline Namba, Leandro Alves dos Santos, Fabio Henrique Fernandes e Profa Daisy Maria Fávero Salvadori, da Unidade Experimental de Pesquisa (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu. Ao Elton Luiz Scudeler, à Carol Massucci Marciano da Silva, ao Tiago dos Santos Tardivo e a Profa. Daniela Carvalho dos Santos, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu. À Maria Dolores Ferreira e ao José Maulim, do Centro de Microscopia Eletrônica da Medicina da USP Ribeirão Preto.

Ao Hospital das Clínicas de Botucatu e à Faculdade de Medicina Botucatu, em nome do Prof. André Luis Balbi pelo empréstimo do microscópio especular e, em nome da Dra. Eloisa Paschoalinotte, pelo suporte nas análises estatísticas.

A todos o meu muito obrigada!

# SUMÁRIO

		Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS		
R	ESUMO	v
A	BSTRACT	vi
LI	STA DE ABREVIATURAS	vii
LI	STA DE TABELAS	viii
LI	STA DE FIGURAS	x
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	2
3.	MATERIAL E MÉTODOS	8
	3.1 Considerações quanto à ética	8
	3.2 Obtenção do colírio de fucoidam e regime de tratamento	8
	3.3 Animais e delineamento experimental	9
	3.4 Procedimento anestésico e cirúrgico	10
	3.5 Tonometria de rebote	11
	3.6 Paquimetria ultrassônica	11
	3.7 Microscopia especular	11
	3.8 Eutanásia e coleta das córneas	12
	3.9Morfologia, morfometria e vitalidade celular por dupla	40
	coloração vital com Alizarina vermelha e Azul de tripan	13
	3.10 Imunofluorescência	15
	3.11 Microscopia de varredura e de transmissão	16
	3.12 Topoquímica para detecção de cromatina/DNA	17
	3.13 Estatística	19
4	RESULTADOS	20
	4.1 Tonometria de rebote	20
	4.2 Paquimetria ultrassônica	22
	4.3 Microscopia especular	24
	4.4 Histopatologia e morfologia por coloração vital	30
	4.5 Imunofluorescência	32

i

	4.6 Microscopia de varredura e de transmissão	42
	4.7 Topoquímica para detecção de cromatina/DNA	46
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÃO	52
7.	REFERÊNCIAS	53

••

ii



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Jabolicaba!



# CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos do fucoidam de Fucus vesículosus sobre a morfologia, a ploidia e o metabolismo do endotélio corneal de coelhos", protocolo nº 16.799/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de novembro de 2016.

Vigência do Projeto	10/11/2016 a 10/11/2018
Espécie / Linhagem	Coelhos (Oryctolagus cuniculus) / Nova Zelándia Albino
Nº de animais	48
Peso / Idade	3 kg
Sexo	Machos e Fémeas
Origem	Biotério Unesp Botucatu.

Jaboticabal, 04 de novembro de 2016.

Prof\* Dr\* Lizandra Amoroso Coordenadora - CEUA



iv

# EFEITOS DO FUCOIDAM DE *Fucus vesiculosus* SOBRE A MORFOLOGIA, A PLOIDIA E O METABOLISMO DO ENDOTÉLIO CORNEAL DE COELHOS

**RESUMO** – A córnea atua como principal elemento refrativo do olho, para tal tem que manter-se transparente. O endotélio corneal é um peça chave para essa manutenção, possuindo mecanismos como a bomba de Na+ e K+ que ajudam a garantir a desturgescência corneal. Descompensações endoteliais constituem uma importante indicação de transplante da córnea, uma vez que as células endoteliais corneais apresentam limitada capacidade proliferativa. Entretanto, transplantes são procedimentos cirúrgicos complicados e de elevado custo. Alternativas e coadjuvantes medicamentosos vêm sendo estudadas. O fucoidam é uma substância que, dentre outras propriedades, promove migração e proliferação celular, portanto objetivou-se, com a presente pesquisa, avaliar seus efeitos sobre a morfologia, a ploidia e o metabolismo de células endoteliais da córnea de coelhos, após criolesão experimental. Para tal, foram realizadas avaliações guanto à morfologia e viabilidade celular empregando-se dupla marcação com corantes vitais (alizarina vermelha e azul de tripan) e ultraestrutural pela microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Outrossim, avaliou-se a morfometria in vivo e in vitro de seguintes parâmetros: número de células, densidade, hexagonalidade e coeficiente de variação celulares. Estudouse o metabolismo dessas células empregando-se a imunofluorescência com observação em confocal dos anticorpos Ki-67, Na+K+/ATPase, n-Caderina e Zo-1, conjugados com Alexafluor-488. Visando-se a conseguirem conhecimentos adicionais relativos à atividade nuclear durante o processo de cicatrização do endotélio corneal na presença de fucoidam foram analisados, a partir da reação de feulgen, perímetro e área nucleares, além da supraorganização da cromatina. A criolesão ensejou piora de todos parâmetros morfométricos, com diminuição das células, densidade celular, do percentagem de células padrão com 6 lados e aumento no coeficiente de variação, a retomada aos valores normais com o decorrer do tempo foi melhor em olhos tratados com fucoidam. Nas córneas que não receberam fucoidam observou-se células desvitalizadas em todo decorer do tempo de avaliação. Houve diminuição da expressão das proteínas de junção celular (n-Caderina e Zo-1) logo após a lesão e aumento progressivo no decorrer do tempo, em contrapartida o contrário ocorreu com Ki-67, revelando aumento na proliferação celular após lesão e baixa das expressão das demais proteínas, com notável estimulação na presença do fucoidam. As características do comportamento nuclear, como descompactação da cromatina na presença do fucoidam puderam ratificar essa proliferação. O fucoidam atuou na modulação à reparação cicatricial, revelando cicatrizes menos opacas, estimulando a proliferação celular e mediando a expressão das proteínas de ligação e atuando na proteção contra morte celular.

**Palavras-chave:** criolesão, polissacarídeo sulfato, reparação cicatricial, cromatina nuclear, proliferação celular.

## FUCOIDAM OF *Fucus vesiculosus* EFFECTS ON MORPHOLOGY, PLOIDY AND METABOLISM OF RABBIT CORNEAL ENDDOTHELIUM

**ABSTRACT** – The cornea as the main refractive element of the eye, which has to remain transparent. The corneal endothelium is a key piece for this maintenance, having mechanisms such as the Na + and K + pump that help to ensure corneal dysurgescence. Endothelial decompensations are an important indication for corneal transplantation, since the corneal endothelial cells have limited proliferative capacity. However, transplants are complicated and expensive surgical procedures. Alternatives and drug coadjuvants have been studied. Fucoidam is a substance that, among other properties, promotes cell migration and proliferation, therefore, the objective of this research was to evaluate its effects on the morphology, ploidy and metabolism of rabbit cornea endothelial cells after experimental cryoinjury. For this, evaluations were made for morphology and cell viability using double labeling with vital dye (alizarin red and tripan blue) and ultrastructural analysis by transmission and scanning electron microscopy. Morphometry (in vivo and in vitro) of the following parameters were also evaluated: cell number, cell density, hexagonality and coefficient of variation. The metabolism of these cells was studied using immunofluorescence with confocal observation of the Ki-67, Na + K + / ATPase, n-Caderin and Zo-1 antibodies, conjugated to Alexafluor-488. In order to obtain additional knowledge regarding the nuclear activity during the healing process of the corneal endothelium in the presence of fucoidam were analyzed, from the feulgen reaction, nuclear perimeter and area, in addition to the chromatin supraorganization. Cryoinjury resulted in worsening of all morphometric parameters, with cell decrease, cell density, the percentage of standard cells with 6 sides and increase in coefficient of variation, the recovery to normal values with time was better in eyes treated with fucoidam. In the corneas that did not receive fucoidam devitalised cells were observed throughout the evaluation time. There was a decrease in the expression of the cellular junction proteins (n-Caderin and Zo-1) shortly after injury and progressive increase over time, whereas the opposite occurred with Ki-67, revealing increased cell proliferation after injury and low expression of the other proteins, with remarkable stimulation in the presence of fucoidam. The characteristics of nuclear behavior, such as the decomposition of chromatin in the presence of fucoidam, could confirm this proliferation. Fucoidam has been involved in modulation of scar repair, revealing less opaque scars, stimulating cell proliferation and mediating the expression of binding proteins, and acting to protect against cell death.

**Keywords:** cryoinjury, sulphate polysaccharide, wound healing, nuclear chromatin, cell proliferation.

## LISTAS DE ABREVIATURAS

- BCL- Proteínas linfoma células B
- BSS- Solução Salina balanceada
- CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
- CME- Centro de Microscopia Eletrônica
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- DO- Densidade óptica, níveis de condensação ou compactação da cromatina
- EGF- Fator de crescimento epidérmico
- FCAV- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
- FGF- Fator de crescimento fibroblástico
- FMB- Faculdade de Medicina de Botucatu
- GF- Grupo tratado com fucoidam 1% sob forma de colírio
- GV- Grupo tratado com veículo sob forma de colírio
- IBB- Instituto de Biociências de Botucatu
- IOD- Densidade óptica integrada, valores Feulgen-DNA
- MRNA- Ácido ribonucleico mensageiro
- NA/KATPASE- Bomba de sódio e potássio
- OD- Olho direito
- OE- Olho esquerdo
- PBS- Tampão Fosfato Salino
- PDGF-Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PFA- Paraformaldeído
- PI3/AKT- Fosfoinositide 3 quinase/ Proteína quinase B
- PIO Pressão Intraocular
- PROX- Proteína prospero homeobox
- ROCK- Rho quinase
- UNIPEX- Unidade de Pesquisa Experimental
- VEGF- Fator de crescimento endotélio-vascular
- VEGFR- Receptor de fator de crescimento endotélio-vascular
- VIP- Peptídeo vasoativo intestinal
- ZO1- Zônulas de oclusão

# LISTA DE TABELAS

# Página

Tabela 1.	Resultado da avaliação da PIO em olhos de coelhos com criolesão em olho esquerdo tratados com fucoidam 1% ou controles (tratados comente com veículo). Avaliação realizada a cada 2 dias por um período de 28 dias, com auxílio de tonometria de rebote (Tonovet, Icare). Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2018	21
Tabela 2.	Resultados da avaliação da espessura corneal, por Paquimetria ultrassônica (PachPen, Accutume), em coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo. Em A, região da Lesão, em B, perilesão. Avaliações realizadas no período da manhã, a cada dois dias, durante o período de 28 dias. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2018	23
Tabela 3.	Gráficos dos resultados quanto ao nº celular e à densidade celular celular do endotélio corneal de coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo, à microscopia especular de não contato (Microscópio Especular SP-3000P, Topcon) e à coloração com alizarina vermelha, nos diferentes períodos de avaliação (0, 7, 14, e 28 dias), nas regiões de criolesão e perilesão. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/FMB/UNESP, Botucatu, SP, 2018.	26
Tabela 4.	Gráficos dos resultados quanto à hexagonalidade celular e ao coeficiente de variação celular do endotélio corneal de coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo, à microscopia especular de não contato (Microscópio Especular SP-3000P, Topcon) e à coloração com alizarina vermelha, nos diferentes períodos de avaliação (0, 7, 14, e 28 dias), nas regiões de criolesão e perilesão. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2018	27
	2010	

viii

### **LISTA DE FIGURAS**

# Página

- Figura 3. Imagens ilustrativas do procedimento de coloração histológica vital de dupla marcação com azul de tripan, em A, e vermelho de alizarina, em B. Em C, endotélio corneal de coelhos hígido negativo para tripan com membranas celulares coradas com alizarina. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 14

- Figura 6. Em A e B, fotomicrografias representativas da coloração nuclear por reação Feulgen no endotélio corneal de coelhos, analisados em microscópio de luz, objetiva de 40 acrescida de optovar de 1,25, em A, sem filtro e em B, com filtro interferencial com comprimento de onda de 546. Observar o formato e tamanho característico do núcleo, assim com sua densidade. Régua 50µm. Em C, curva de hidrólise ácida da reação de Feulgen, em endotélio corneal hígido de coelho para padronização do tempo ótimo de hidrólise 100 min. Laboratório de Oftalmologia Veterinária da FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, 2019.
- Figura 7. Resultados da avaliação da PIO, por tonometria de rebote, em coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo. Avaliações realizadas no período da manhã, a cada dois dias, durante o período de 28 dias. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 21

- Figura 10. Gráficos dos resultados da análise morfométrica de contagem de número de células, densidade celular, hexagonallidade celular (pleomorfismo) e coeficiente de variação celular (polimegatismo), empregando-se а microscopia especular de não contato in vivo e a marcação com corante vital de alizarina vermelha in vitro, do endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar que a presença da lesão central impossibilitou a realização do exame de microscopia especular aos 7 e 14 dias no grupo veículo. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ UNESP, Botucatu, SP, 2019. 28
- Figura 11. Gráficos dos resultados da análise morfométrica de contagem de número de células, densidade celular, hexagonallidade celular (pleomorfismo) e coeficiente de (polimegatismo), variação celular empregando-se а microscopia especular de não contato in vivo e a marcação com corante vital de alizarina vermelha in vitro, do endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias, na região perilesão. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 29
- Figura 12. Fotomicrografias representativas do padrão de marcação no endotélio corneal de coelhos submetidos à dupla coloração vital com Vermelho de Alizarina (A5533, Sigma-Aldrich) como marcador de membrana, e com Azul de Tripan (0,1% Evepharma) como marcador nuclear. Observar а característica tecidual de monocamada de células hexagonais reveladas pela marcação da membrana com a Alizarina, e a ausência ou mínima marcação nuclear com Tripan em endotélio hígido. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 30

- Figura 13. Fotomicrografias representativas da marcação à dupla marcação com corante vital com Vermelho de Alizarina (A5533, Sigma-Aldrich) como marcador de membrana, e com Azul de Tripan (0,1% Eyepharma) como marcador nuclear, em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar o desarranjo tecidual nos períodos iniciais pós indução da lesão, com células alongadas pleomorficas, notadamente no grupo veículo, com aumento rearranjo tecidual ao passar do tempo em ambos os grupos. Presença de marcação nuclear com tripan, notadamente no grupo éículo, revelando maior quantidade de desvitalidade celular em todos os períodos avaliados. Régua 20µ. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.....
- Figura 14. Fotomicrografias representativas do padrão de marcação à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, das proteínas Ki-67 (nuclear, 1:200, Dako clone MIB1), NaKATPase (membrana, 1:200, 05-369 clone c464-6, Millipore), n-Caderina, (membrana, 1:200, CDH2 3B9 333900, Termofisher) e Zo-1 (membrana, TJP1, ZO1-1A12 RC2344461:200, Termofisher) respectivamente, conjugados com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul), em endotélio corneal de coelho. Observar que o Ki-67 em endotélio corneal sem lesão é pouco expresso, revelando sua expressão na região periférica, local da transição córneo-escleral. As proteínas de membrana revelando a estrutura do endotélio corneal. Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 33
- Figura 15. Fotomicrografias representativas da marcação nuclear, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína Ki-67 (1:200,Dako clone MIB1) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul) em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar maior marcação no grupo fucoidam, em todos os momentos, notadamente aos 7 e 14 dias de avaliação, sendo que houve diminuição da expressão aos 28 dias de avaliação. Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

- Figura 17. Fotomicrografias representativas da marcação em membrana, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína da bomba de sódio e potássio Na+/K+ATPase (1:200, 05-369 clone c464-6, Millipore) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde), em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, avaliados aos 7, 14 e 28 dias. Observar maior expressão da proteína no grupo fucoidam aos 7 e 28 dias, em relação ao veículo, maior no dia 14 no grupo veículo e em ambos os grupos há diminuição da expressão aos 28 dias Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 36
- Figura 18. **Fotomicrografias** representativas da marcação em membrana, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína da bomba de sódio e potássio Na+/K+ATPase (1:200, 05-369 clone c464-6, Millipore) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul), em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, avaliados aos 7, 14 e 28 dias. Observar maior expressão da proteína no grupo fucoidam aos 7 e 28 dias, em relação ao veículo, e maior no dia 14 no grupo veículo, em ambos os grupos há diminuição da expressão aos 28 dias Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 37
- Figura 19. Fotomicrografias representativas da marcação em membrana, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína da bomba de sódio e n-Caderina, (1:200, Termofisher, CDH2 3B9 potássio 333900) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde), em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, avaliados aos 7, 14 e 28 dias. Observar aumento da expressão no decorrer do tempo, sem diferença significante entre os grupos. Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 38

- Figura 20. **Fotomicrografias** representativas da marcação em membrana, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína da bomba de sódio e potássio n-Caderina, (1:200, Termofisher, CDH2 3B9 333900) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul), em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, avaliados aos 7, 14 e 28 dias. Observar aumento da expressão no decorrer do tempo, sem diferença significante entre os grupos. Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.....
- Figura 21. Fotomicrografias representativas da marcação em membrana, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína ZO-1 (Termofisher, TJP1 ZO1-1A12 RC2344461:200) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde), em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar que há um aumento na expressão no decorrer do tempo, sendo mais expressa aos 28 dias, notadamente no grupo fucoidam, também possível observar a estrutura do tecido com menor pleomorfismo no grupo fucoidam, com a manutenção da adesão célula a célula. Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 40
- Figura 22. Fotomicrografias representativas da marcação em membrana, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína ZO-1 (Termofisher, TJP1 ZO1-1A12 RC2344461:200) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul) em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar que a marcação é menor nos momentos pós indução da lesão e aumenta progressivamente, há maior homogeneidade na estrutura da membrana celular aos 28 dias, notadamente no grupo fucoidam. Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019. 41 Figura 23. Fotomicrografias representativas do padrão ultraestrutural do endotélio corneal de coelhos, à microscopia eletrônica de
- endotélio corneal de coelhos, à microscopia eletrônica de varredura. Observar a estrutura característica do tecido, uma monocamadas de células hexagonais. Centro de Microscopia Eletrônica/ IBB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019...... 42

- Figura 24. Fotomicrografias representativas da análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura, do endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar a alteração na estrutura característica do tecido, notadamente no grupo veículo, onde foi possível obervar aos 7 dias a ausência de células, aos 14 e 28 dias presença de células com lesão da membrana e exposição do conteúdo nuclear (estrelas). No grupo foicoidam, aos 28 dias, observaram-se células multinucleadas com maior número de lados (asterisco). Centro de Microscopia Eletrõnica/ IBB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019....
- Figura 25. Fotomicrografias representativas do padrão ultraestrutural do endotélio corneal de coelhos, à microscopia eletrônica de transmissão. Observar em A, as camadas da córnea, destacando-se o endotélio como uma monocamda de células com núcleos ligeiramente alongados (seta), o estroma como tecido homogêneo acelular (asterisco) e o epitélio, multiicamada de células (estrela). Em B, as organelas celulares tais como núcleo (asterisco), mitocôndria (cabeça de seta), retículo endoplasmático (seta), complexo de golgi (estrela) e vesícula (seta grossa). Em C, junções celulares dos tipos de oclusão, como Tight junction (*zônulas ocludens*, como Zo-1) (asterisco) e de adesão (caderinas como n-Caderina) (seta). Centro de Microscopia Eletrônica/ IBB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 44
- Figura 26. Fotomicrografias representativas da análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de transmissão, do endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar as alterações na morfologia celular pós indução da lesão, notadamente no grupo veículo, com a presença de projeções de membrana (asterisco), vesículas (estrela), degeneração do citoplasma com rompimento da membrana (seta) e presença de material eletrondenso semelhante à matriz extracelular entre as células degeneração núcleo arredondado em com característico de necrose e transformação tecidual (cabeça de seta). No grupo fucoidam observou-se menor quantidade de alterações morfológicas com a presença de algumas vesículas, e imagem sugestiva de fusão celular com surgimento célula mulinucleada (seta grossa). Centro de Microscopia Eletrônica/ IBB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019..... 45

### 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) 253 milhões de pessoas têm deficiência visual. Destas, 36 milhões tem diagnostico de cegueira (IAPB, 2015). Dentre as causas ensejantes destacam-se as opacidades da córnea, que ocupam o 4º lugar (1,7%) entre a população em geral e 25,8% dos pacientes cegos são devidos a catarata (2ºlugar) (IAPB, 2015), portanto, é razoável estimar que numeroso pacientes serão submetidos à cirurgia de catarata no futuro próximo, e que uma parcela desses pacientes sofrerão dano significativo ao endotélio corneal durante a cirurgia, podendo necessitar futuramente de transplantes de córnea ou endotélio para restauração visual.

Estimativas da WHO apontam que aproximadamente 80% da cegueira mundial é evitável (WHO, 2007, IAPB, 2015), entretanto o tratamento atual na maioria dos casos é cirúrgico e dispendioso. O desenvolvimento de tratamentos farmacêuticos tem carácter urgente e necessário.

Muitos autores na área de Medicina Regenerativa dedicam-se a cultivar células endoteliais da córnea, no entanto, o método ainda está em evolução e, por enquanto, não conseguiu-se obter, de forma consistente, células morfologicamente saudáveis e em alta densidade (Koizumi *et al.,* 2012). O desafio é estudar e desenvolver alternativas clínicas de tratamentos à lesão endotelial, as quais forneçam um endotélio corneal saudável e com elevada densidade celular.

O grupo de pesquisa em Oftalmologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Câmpus de Jaboticabal, implementou linha de pesquisas, cuja meta é potencializar a evolução da tríade custo-risco-benefício que acompanha o emprego de células progenitoras, de biomembranas e de polímeros na prática oftálmica, com ênfase em manejo de afecções corneais, notadamente na reparação de danos epitélio-estromais. Dentre esses estudos, destaca-se o de Aldrovani *et al.*, (2014) que verificaram que membranas sintéticas de alginato e quitosana contendo fucoidam promovem expansão *ex vivo* de células epiteliais do limbo corneoescleral de coelhos, sem, contudo, afetar sua condição de célula tronco. Percebeu-se a necessidade de se estudar o endotélio corneal. Ressalta-se que

devido à relativa inacessibilidade, há menos estudos de reparação cicatricial e comportamento celular nesta camada da córnea.

Como aventado por Dithmer et al. (2014) o fucoidam é uma substância não nociva para retina, que reduz o VEGF e a angiogênese *in vitro*. Outrossim, promove migração e proliferação de células *in vivo* ou em cultura, como demonstrado por estudos prévios (Giraux *et al.*, 1998, Cui *et al.*, 2014, Bouvard *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2016), objetivou-se, com a presente pesquisa, avaliar seus efeitos sobre a morfologia, a ploidia e o metabolismo de células endoteliais da córnea de coelhos, após criolesão experimental provocada por nitrogênio líquido (Koizumi *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2015, Okumura *et al.*, 2016).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A córnea atua como principal elemento refrativo do olho. Isto exige transparência óptica e curvatura ideal, regular e lisa. Na maioria das espécies, ela é composta por cinco camadas: o epitélio, a camada de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet, e o endotélio (Kaye e Pappas, 1962, Cintron et al., 1982, Hayashi et al., 2002). Um estudo definiu uma nova camada na córnea humana, caracterizando-a como bem definida, acelular, localizada na região pré-Descemet, e denominada de Dua (Dua *et al.,* 2013).

A córnea se mantém transparente por apresentar características como ausência de vasos sanguíneos (com exceção do limbo), espaçamento e organização regulares de fibras colágenas estromais e pelas funções de bomba e de barreira exercidas pelo endotélio (Bonanno *et al.*, 2012).

O endotélio corneal é uma monocamada de células dispostas em forma de mosaico hexagonal regular, que reveste a face posterior da córnea. Sua principal função é preservar a deturgescência do estroma corneal (Srinivas *et al.*, 2012), ou seja, manter a hidratação correta da córnea. Este controle é dependente de um complexo mecanismo conhecido como "Pump-Leak" (bomba e vazamento), sendo que as propriedades de transporte ativo do endotélio representam a "bomba" e a

pressão de enchimento estromal representa o "vazamento". O funcionamento da bomba é dependente da ativação da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase, da presença de HCO3<sup>-</sup> e de Cl<sup>-</sup>, e da atividade de anidrase carbônica (Bonanno *et al.,* 2012). A barreira física, responsável pelo enchimento estromal, relaciona-se à integridade das junções de adesão, "tight junction", como exemplo, no endotélio corneal, têm-se as zônulas de oclusão (ZO-1), as quais exercem função de vedação ao limitar a difusão de substâncias e de portão ao bloquear o refluxo das mesmas (Srinivas *et al.,* 2012).

A perda de transparência corneal, secundária a alterações endoteliais, constitui importante indicação de transplante da córnea (Srinivas *et al.,* 2012). A distrofia corneal endotelial de Fuchs e descompensação decorrente de cirurgia de catarata (ceratopatia bolhosa) são as principais causas de disfunção endotelial da córnea (Okumura *et al.,* 2016b).

Conquanto as células endoteliais corneais apresentam elevada quantidade de mitocôndrias, elas apresentam limitada capacidade proliferativa e raramente exibem mitose (Okumura *et al.*, 2016), quando a replicação ocorre, a taxa de divisão celular é lenta e insuficiente no intuito de substituir as células perdidas (Joyce *et al.*, 2003). A cicatrização de feridas do endotélio corneal decorre de migração compensatória, propagação das células remanescentes (Okumura *et al.*, 2015) e poliploidização do genoma por endo-replicação de DNA, o que implica no surgimento de células tetraploides e octaploides (Losick, 2016). Por conseguinte, danos críticos induzem insuficiência na cicatrização da ferida e perda de função (Okumura *et al.*, 2016a).

Estudos a respeito das características morfológicas, morfométricas e biomoleculares do endotélio corneal têm sido desenvolvidos com para avaliarem-se parâmetros relacionados às diferentes espécies (Ubels et al., 2000, Berchet et al., 2015, He at al., 2016, Faganello et al., 2016), às disfunções endoteliais (Koizume et al., 2012, Okumura et al., 2016), à reparação cicatricial deste tecido frente aos insultos (Petroll et al., 2001, Nakano et al., 2008, Han et al., 2013, Kim et al., 2014, Choi et al., 2015, Kwon et al., 2015, Okumura et al., 2015, Okumura et al., 2016), à qualidade do tecido doador (Canais et al., 1999, Schroeter e Rieck, 2009), dentre outros.

Notadamente, corantes vitais associados a métodos histológicos são empregados para avaliar a morfologia endotelial, os graus de danos à superfície e a

viabilidade celular (Sperling, 1977). O vermelho de alizarina é um corante intercelular que cora a membrana de Descemet (Ignacio *et al.*, 2005). Células lesionadas, com alteração na membrana plasmática, se tornam permeáveis ao azul de tripan, mostrando coloração azul em seus núcleos (Taylor e Hunt, 1981). Dupla coloração do endotélio da córnea com azul de tripan e vermelho de alizarina é o método mais comum para diferenciar células viáveis e não viáveis em áreas onde as células não podem ser identificadas pela microscopia especular (Sperling, 1977; Taylor e Hunt, 1981, Park et al., 2012).

As diferentes modalidades de transplante de córnea, ceratoplastias penetrante e ceratoplastias endoteliais, permanecem como única opção terapêutica definitiva para o tratamento da disfunção endotelial da córnea. Tratam-se de procedimentos cirúrgicos relativamente complexos e de elevado custo, cujo sucesso depende diretamente da biocompatilidade doador-receptor, da preservação da córnea doada, da higidez das córneas doada e receptora e da resposta inflamatória e imunológica do paciente (Coster *et al.*, 1981, Tan *et al.*, 2012, Koudouna et al., 2017), além da habilidade do cirurgião. Questões como a escassez de córneas (dados estatísticos revelam que no mundo existe uma córnea disponível para cada 70 necessárias) (Gain *et al.*, 2016) e a rejeição do enxerto, permanecem por ser resolvidas. É necessário, portanto, desenvolverem-se métodos e terapias que estimulem a regeneração das células endoteliais corneais (Ho *et al.*, 2015).

Nenhuma terapia medicamentosa foi aprovada para a prática clínica, embora agentes farmacêuticos estudados, tais como EGF (Hoppenreijis *et al.*, 1992), PDGF (Hoppenreijis *et al.*, 1994), FGF-2 (Lu *et al.*, 2006), conexina 43 (Nakano *et al.*, 2008) e mais recentemente os inibidores de ROCK (Ripasudil, Y-27632) (Okumura *et al.*, 2015a, Okumura *et al.*, 2016b) promoveram capacidade de induzir proliferação de células endoteliais corneais.

Diferentes modelos experimentais de lesão do endotélio corneal são descritos na literatura, alguns buscam mimetizar a perda gerada durante a cirurgia de catarata empregando o facoemulsificador na câmara anterior por um período de tempo (Okumura *et al.,* 2015), outras dão-se por indução de uma lesão por escarificação diretamente ao endotélio através de um acesso à câmara anterior (Petroll *et al.,* 2001, Nakano *et al.,* 2008, Okumura *et al.,* 2011, Okumura *et al.,* 2016) e outras

buscam gerar lesões que mimetizam doenças do endotélio como a ceratopatia bolhosa, como na indução por contato com nitrogênio líquido (Koizume *et al.*, 2012, Han *et al.*, 2013, Kim *et al.*, 2014, Okumura *et al.*, 2016).

O fucoidam foi inicialmente identificado por Kylin (1913), definido como uma classe de sulfatados ricos em fucose (polissacarídeos fucolisados), encontrados, principalmente, em algas marinhas marrons, em equinodermas (Hu *et al.*, 2015) e ervas marinhas (Kannan *et al.*, 2013). As atividades biológicas do fucoidam variam de acordo com a espécie, o peso molecular, a composição, a estrutura e o método de obtenção (Fitton *et al.*, 2015). Esses polissacarídeos apresentam propriedades terapêuticas, podendo atuar como agentes anti-inflamatórios (Carvalho *et al.*, 2014, Lean *et al.*, 2015), imunomoduladores (Zhang *et al.*, 2014), antitumorais (Kwak *et al.*, 2014), antiangiogênicos (Koyanagi *et al.*, 2003, Dithmer *et al.*, 2014, Bouvard *et al.*, 2015), antioxidantes (Yuan e Macquarrie, 2015), anticoagulantes (Ozaltin *et al.*, 2016), antivirais (Synytsya *et al.*, 2014), antibacterianos (Besednova *et al.*, 2015) e osteogênicos (Hwang *et al.*, 2016).

Há estudos sobre a ação do fucoidam em células endoteliais de diferentes tecidos. Giraux *et al.* (1998) demonstraram que ele pode regular mecanismos de proliferação e de migração das células do endotélio vascular humano. Aparentemente, o fucoidam promove migração celular endotelial por atuar na via PI3K/AKT (Bouvard *et al.*, 2015). Outro estudo revelou haver proteção do endotélio vascular, mediante estímulos de agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, com consequente redução na pressão sanguínea basal, em modelo animal de diabetes tipo 2, tratado com fucoidam (Cui *et al.*, 2014). Recentemente, Yang *et al.* (2016) mostraram a ação do fucoidam ao inibir a linfangiogênese, por meio diminuição da expressão de VEGFR3 e PROX1 nas células do endotélio linfático.

Atualmente há poucos relatos sobre utilização do fucoidam em Oftalmologia. Gan *et al.* (1999) demonstraram que o fucoidam foi capaz de modular infiltração leucocitária na córnea de coelhos. Dithmer *et al.* (2014) demonstraram que ele é capaz de reduzir a angiogênese no epitélio pigmentar da retina *in vitro,* por atuar sobre a expressão do VEGF sem ensejar toxicidade.

A injúria ao endotélio corneal provoca a diminuição na densidade de células endoteliais, uma vez que o mecanismo de reparação cicatricial cursa com apoptose

das células atingidas, e migração e distribuição das células remanescentes, dada a limitada capacidade de proliferação deste tipo celular (Joyce, 2003). Adicionalmente danos severos podem suscitar transformação fibroblástica, que é um tipo de transformação endotélio-mesênquima (Lee *et al.*, 2004).

Em alguns casos é o tipo de estímulos e/ou o grau de estímulos que determina se as células morrem por apoptose ou necrose. Em doses baixas, uma variedade de estímulos nocivos, tais como calor, radiação, hipóxia e drogas citotóxicas podem induzir apoptose, mas estes mesmos estímulos pode resultar em necrose em doses mais elevadas. O modo de morte gera impacto sobre o resultado do tecido lesado, pois células necróticas aumentam as respostas inflamatórias, enquanto que as apoptóticas inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Bruewer et al., 2003). Além disso, as células que morrem por apoptose, podem ser resgatadas por estímulo à secreção de fatores que exerçam função neurotrófica e antiapoptótica (Koh *et al.,* 2009). Finalmente, a apoptose é fundamental para manutenção da homeostase e cicatrização de feridas, assim como ocorre no processo de proliferação e organização do tecido corneal (Wilson *et al.,* 1996).

As mitocôndrias desempenham um papel importante no processo de apoptose. Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca convergem ao nível mitocondrial e desencadeiam a permeabilização da membrana mitocondrial. O grupo Bcl (*B-cell lymphoma-2-*), da família de genes da leucemia de células B/linfoma-2, representa proteínas ancoradas na membrana celular mitocondrial, encarregadas de inibir a apoptose. Tais proteínas expressam-se, preponderantemente, em condições homeostáticas normais (Pinazo-Dura *et al.*, 2013). Entretanto, podem apresentar elevada expressão em situações em que haja estímulos anti-apoptóticos. Koh *et al.* (2009) demonstraram altos níveis de mRNA de Bcl-2, em endotélio corneal de olhos com lesão por estresse oxidativo, tratados com peptídeo intestinal vasoativo (VIP). O mesmo estudo revelou que pacientes tratados com VIP também apresentaram aumento na expressão de N-caderina, comparativamente aos não tratados.

A N-caderina ou caderina 2 (CDH2) é uma proteína de adesão que pertence a uma superfamília. Entre as caderinas clássicas, N-caderina é a de maior expressão no endotélio corneal (Derycke e Bracke, 2004). Vassilev *et al.* (2012) observaram que ela é essencial para a manutenção da estrutura normal do endotélio corneal em ratos

adultos.

Numerosas mutações afetam mediadores de fases específicas da apoptose (Wilson *et al.*, 1996). Assim como iimportantes afecções oftálmicas cursam com mudanças no epigenoma e na cromatina (Cvekl e Mitton, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2014; Agardh *et al.*, 2015).

A diferenciação, proliferação e homeostase dos tecidos e células relacionadas com o segmento anterior do olho são processos dinâmicos que dependem não apenas da sequência de DNA, mas também das alterações sobre químicas em nucleotídeos individuais. De fato, o padrão de expressão do gene não é diretamente ditado por uma sequência primária de DNA, mas também depende de outros mecanismos, tais como atividade pós-transdução do miRNA, metilação no DNA ou modificações nas histonas reguladas pela epigenética (Bonnin *et al.*, 2014).

O termo epigenética foi originalmente atribuído a eventos biológicos não explicáveis por princípios genéticos. Conrad Waddington (1942), a quem foi dado crédito de cunhar o termo, definiu epigenética como "o ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos, os quais trazem o fenótipo para o ser". Representa uma ciência de vanguarda e refere-se às marcações herdáveis (por exemplo, heterocromatização) na expressão gênica (i.e., marcas epigenéticas), sem mudanças na sequência primária do DNA.

Portanto, através da modulação da expressão dos genes, a epigenética promove mecanismos para se produzirem fontes adicionais de conhecimento das informações genéticas envolvidas em diferentes processos. A análise das alterações ensejadas pelo tratamento com fucoidam sobre a supraorganização da cromatina e o conteúdo de DNA em núcleos interfásicos de células endoteliais da córnea, poderá permitir o entendimento de flutuações em atividade gênica e em progressão de ciclo celular, as quais podem interferir (positiva ou negativamente) na homeostasia do endotélio corneal, e consequentemente na transparência corneal.

Estudaram-se as condições clínicas do endotélio corneal, notadamente a transparência e a espessura corneais, e a morfologia das células endoteliais. Avaliou-se, por imuno-histoquímica, se o fucoidam atua na reparação do tecido endotelial lesado, mantendo-o ou restaurando-o. Ademais, avaliou-se se o fucoidam altera o metabolismo nuclear das células endoteliais, promovendo alterações na ploidia e

no estado de funcionalidade da cromatina.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Considerações quanto à Ética

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO). Outrossim, sob a expressa autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) das Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) (protocolo nº 16.799/16) e de Medicina (FMB) (certificado n° 1203/2017), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal e Câmpus de Botucatu, respectivamente. Todos os procedimentos *in vivo* foram realizados na Unidade Experimental (UNIPEX) da FMB. E os procedimentos *in vitro* no Laboratório de Oftalmologia Veterinária da FCAV, em laboratórios da UNIPEX e em centros especializados terceirizados. Os princípios éticos estabelecidos pelo "Canadian Council on Animal Care (Principles of Laboratory Care, NIH publication no 85-23, revised 1996)" foram obedecidos.

### 3.2 Obtenção do colírio de fucoidam e regime de tratamento

O extrato de fucoidam de *Fucus vesiculosus* (Shaanxi Jintai Biological Engineering) foi enviado a Eye Pharma (São Paulo, Brasil) para a manipulação sob a forma de colírio. Para se obter a máxima concentração, possível, na formulação do colírio, concentrações entre 0,5% (Aldrovani *et al.*, 2014) e 5% (Gan *et al.*, 1999) foram testadas. A concentração 1% colírio foi a escolhida por ser a maior concentração em que obteve-se uma suspensão homogênea e estável, sem deposição de material sólido no fundo do frasco. Foram também realizados testes primários para escolha da metilcelulose como veículo na formulação do colírio de fucoidam 1%. As substâncias testadas foram água para injetáveis, solução fisiológica e metilcelulose 0,5%. As duas primeiras resultaram em suspensão turva com a matéria-prima se sedimentando

rapidamente, a última resultou numa suspensão turva, na qual a matéria-prima fica dispersa e estável.

Outrossim, metilcelulose é um agente viscoelástico com propriedades emolientes e lubrificantes que, além de reduzir o atrito entre pálpebra e córnea dando conforto ao paciente na utilização do colírio, também possibilita um leve aumento da viscosidade podendo prolongar a permanência do princípio ativo na superfície do olho.

Foram confeccionados dois tipos de colírios, um contendo fucoidam 1% acrescido do veículo (metilcelulose 0,5%) e um apenas de veículo. Os colírios foram armazenados em frascos protegidos da luz, estéreis, em refrigerador com temperatura entre 6 e 10°C.

O início do tratamento deu-se 24 horas pós-indução da lesão, cumprindo-se o regime de 1 gota, em ambos os olhos, a cada 12 horas, por até 28 dias consecutivos (Okumura *et al.,* 2015b, Okumura *et al.,* 2016b).

#### 3.3 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 48 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos ou fêmeas, com peso médio de 3,00 kg, mantidos em biotério controlado (com temperatura mantida entre 16-22°C), separados individualmente, em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, dieta à base de ração comercial e de água potável, *ad libitum*.

Previamente à inclusão na pesquisa, eles foram avaliados à semiotécnica oftálmica balizada no teste lacrimal de Schirmer, na biomicroscopia com lâmpada de fenda, na tonometria de rebote, na oftalmoscopia binocular indireta e na prova do tingimento pela fluoresceína. Apenas os livres de alterações oculares e em aparente higidez sistêmica foram utilizados.

Os coelhos foram distribuídos em dois grupos principais. O grupo Controle **(GV)** composto por 18 animais (n=18), tratados com veículo sob forma de colírio e o grupo Tratado **(GF)** composto por 30 animais (n=30), tratados com colírio de fucoidam na concentração 1%. Todos os animais sofreram indução experimental de criolesão do endotélio corneal em seus olhos esquerdos (OE).

Consideraram-se como valores de referência, para cada técnica, a média dos

resultados obtidos em olhos direitos (OD) (sem lesão) do grupo Controle.

### 3.4 Procedimento anestésico e cirúrgico

A anestesia dissociativa foi induzida pela associação de xilazina (5mg/kg) e cetamina (20mg/kg), via intramuscular. Realizou-se a antissepsia empregando-se solução aquosa de iodopovidona 10% nas pálpebras. Empregou-se, em complementação à anestesia geral, colírio de tetracaína contendo 0,1% de Fenilefrina (Alcon, São Paulo, Brasil). Realizou-se a antissepsia da córnea e da conjuntiva com solução de iodopovidona 10%, na diluição 1:50, v/v, em solução salina. Após isolamento do campo operatório, foi realizada uma blefarostase mecânica (Blefarostato de Barraquer, Steel inox, São Paulo, Brasil).

A indução da lesão do endotélio corneal deu-se por criolesão, conforme descrito na literatura (Okumura *et al.*, 2011, Okumura *et al.*, 2016b). A cabeça de uma crioprobe, de aço inoxidável, medindo 7 mm de diâmetro e 1,5 cm de comprimento (HR Instrumental, SP), foi imersa em nitrogênio líquido durante 3 minutos, em seguida posicionou-se a probe em contato com o centro da córnea de coelho durante 15 segundos (Fig.1). Este procedimento não provoca cegueira completa ou qualquer efeito adverso grave geral. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo cirurgião (G.A.S.).



Figura 1. Imagens ilustrativas da indução de criolesão na área central da córnea de coelho. Em A, cabeça da crioprobe imersa em nitrogênio líquido, em B, contato da face côncava da crioprobe com face convexa central da córnea, em C, aspecto imediato após a indução da lesão. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

Realizaram-se estudos *in vivo* visando-se avaliar as alterações clínicas ensejadas do processo de reparação de lesão no endotélio corneal, pós-lesão induzida empregando-se criolesão, mormente aquelas relacionadas à transparência
corneal, bem como observar as ações do colírio de fucoidam na modulação da lesão. Para tal, realizou-se a aferição da pressão intraocular, a aferição da espessura corneal, além da captura e análise de imagens do olho e do endotélio corneal.

## 3.5 Tonometria de rebote

A pressão intraocular (PIO) foi avaliada antes das cirurgias (momento 0) e nos pós- operatórios a cada 2 dias, até o 28°dia. Tomaram-se medidas centrais (lesão) empregando-se tonometria de rebote (Tonovet, Icare, Finlandia), mediante contenção física delicada, evitando-se compressão do pescoço e jugular. Considerou-se, para cada olho, em cada avaliação, a média, calculada automaticamente pelo aparelho, de seis medidas consecutivas.

As avaliações foram realizadas sempre no mesmo horário, para minimizar possíveis erros relativos a oscilações naturais do ritmo circadiano.

## 3.6 Paquimetria ultrassônica

A espessura corneal foi avaliada antes das cirurgias (momento 0) e nos pósoperatórios a cada 2 dias. Tomaram-se medidas centrais (lesão) e periféricas (perilesão), empregando-se paquimetria ultrassônica (PachPen, Accutome, PA, EUA), mediante contenção física delicada, evitando-se compressão do pescoço e jugular. Considerou-se, para cada olho, em cada avaliação, a média de nove medidas consecutivas, calculada automaticamente pelo aparelho.

#### 3.7 Microscopia especular

Avaliou-se a evolução cicatricial da córnea, por meio de fotografias dos olhos, capturadas pelo exame de microscopia especular de não contato (Microscópio Especular Tomey EM 3000, Japão). Outrossim, a partir deste exame avaliarem-se a morfologia e morfometria das células do endotélio corneal. Dentre os parâmetros avaliados a partir de imagens do geradas pelo exame, destacam-se o número de células contadas, o coeficiente de variação (CV), a densidade e o plemomorfismo

(hexagonalidade) celulares. A avaliação deu-se antes das cirurgias (momento 0) e nos pós- operatórios de 7, 14, 28 dias, tomando-se medidas centrais (região da lesão) e periféricas (região perilesão).

## 3.8 Eutanásia e coleta das córneas

Foram empregados os seguintes tempos experimentais, 7, 14 e 28 dias, de acordo com os estudos previos de Okumura et al. (2015b), Okumura et al. (2015a) e Koizume et al. (2012), respectivamente. Em cada um dos períodos experimentais, um terço dos animais (n=16) de ambos os grupos (GV n=6/ GF n=10), foi sorteada e os animais sofreram eutanásia mediante overdose anestésica com Tiopental sódico 100 mg/kg (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil) intravenoso. Após esta anestesia profunda, injetou-se cloreto de potássio (Samtec, Ribeirão Preto, SP, Brasil) 5 ml por animal via intravenosa, pela veia marginal da orelha.

Para ressecção e coleta da córnea realizou-se uma incisão 360° perilimbar (cerca de 0,2 cm do limbo) com auxílio de lâmina de bisturi n°15. As córneas foram delicadamente lavadas com solução salina balanceada (BSS, EyePharma, São Paulo, SP, Brasil) (Fig.2).

Procedeu-se, então, os estudos microestruturais *ex vivo*, que visaram caracterizar as respostas das células endoteliais da córnea à lesão provocada por criolesão, com ênfase à morfometria, morfologia, vitalidade, proliferação, migração e adesão celular. Ademais, avaliou-se o impacto, ensejado pelo tratamento, à supraorganização cromatínica e à ploidia nestas células.



Figura 2. Imagens ilustrativas da coleta da córnea de coelhos, em A olho apoiado com um "cachecol" feito com gaze, em B a ressecção cirurgia da córnea a partir de uma incisão perilimbal 360°, em C a córnea apoiada em uma base de trépano Coronet. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

# 3.9 Morfologia, morfometria e vitalidade celular por dupla coloração vital com Alizarina vermelha e Azul de tripan

Primeiramente a alizarina vermelha (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich, A5533, Missouri, EUA), foi preparada em concentração 0,2% pH 4,2, mediante diluição em água deionizada e acerto do pH com HCl 1:1 (HCl diluído em partes iguais de ácido e água destilada). O azul de tripan utilizado foi o pronto para uso a 0,1% (Azul de Tripano 0,1% Ophthalmos, Eyepharma, SP, Brasil).

Após a excisão das córneas as mesmas foram lavadas delicadamente com BSS (solução salina balanceada), colocadas em base de trépano da marca Coronet,) com a face endotelial voltada para cima, e em seguida preenchidas com azul de tripano, por 120 segundos. Terminado o tempo, foram lavadas com BSS e após coradas sob imersão, com vermelho de alizarina, durante 90 segundos (Fig.3A).

Retiradas do corante, as córneas foram rapidamente lavadas com BSS e fixadas em paraformaldeído (PFA) 2%, por 15 min, em seguida trepanadas na área central, com trépano corneal com diâmetro de 8,75 mm (Katena, NJ, EUA). Os botões corneais foram montados em lâminas histológicas com gotas de BSS, com o endotélio voltado para cima e lamínula fixada com fita adesiva, tipo micropore (técnica "flat-mounted").

Para as análises morfológicas e morfométricas das membranas celulares do endotélio corneal marcadas pelo corante de alizarina, e da desvitalidade celular revelada pela marcação nuclear do corante azul de trypan, as lâminas foram observadas em microscopia de luz (LMD 650, Leica, Wetzlar, Alemanha) e capturaram-se imagens de seis diferentes campos da amostra, uma da área central (lesão), quatro imagens da região perilesão, com magnificação de 20x. E uma imagem da área total do botão corneal, com magnificação de 1,25x.

Obtiveram-se valores referentes ao número de células contadas, ao coeficiente de variação (CV), à densidade e ao plemomorfismo (hexagonalidade) celulares (Fig.3C). Para tanto, as fotomicrografias digitalizadas, convertidas para escala em tons de cinza e processadas empregando-se o software VorocellPlus1.0 (Eyetec, São Carlos, Brasil). Outrossim, valores referentes à área de desvitalidade celular, marcada pelo corante nuclear, foram obtidos a partir do cálculo de percentagem da área com

marcação nuclear pela área total do botão corneal (Fig.4), empregando-se o software ImageJ (1.51J8).



Figura 3. Imagens ilustrativas do procedimento de coloração histológica vital de dupla marcação com azul de tripan, em A, e vermelho de alizarina, em B. Em C, endotélio corneal de coelhos hígido negativo para tripan com membranas celulares coradas com alizarina. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.



Figura 4. Imagens ilustrativas, em A, da fotomicrografia do endotélio corneal de coelho corado com alizarina e morfometricamente avaliado com auxílio do software Vorocell. Em B e C, análise pelo software ImageJ da área relativa ao dano endotelial resultante da criolesão, corada com azul de tripan. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

#### 3.10 Imunofluorescência

Avaliou-se a distribuição, nas células endoteliais da córnea, da marcação dos anticorpos primários relativos à proliferação celular Ki-67 (Dako, clone MIB1), à função de bomba do endotélio Na+/K+ATPase (Millipore, 05-369 clone c464-6), à adesão celular n-Caderina (Termofisher, CDH2 3B9 333900) e à junção celular ZO-1 (Termofisher, TJP1 ZO1-1A12 RC234446).

As córneas coletadas foram colocadas em base de trépano Coronet e fixadas em PFA 0,5% por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida elas foram apoiadas em lâmina de cera ortodôntica (Cera Rosa nº7 Lysanda, SP, Brasil) e cortadas em quadrantes com navalha, de alto perfil, para micrótomo (Dura Edge, Easy path). Cada quadrante, foi destinado a avaliação de um dos anticorpos primários, citados no parágrafo anterior.

As amostras foram colocadas, separadamente, em "Eppendorf" de 2ml, no qual foi realizada toda a reação de imunofluorescência.

Primeiramente, acrescentou-se, no "Eppendorf" contendo a amostra, tampão PBS por 5 minutos. Após descartado o PBS, adicionou-se Triton X-100 1% durante 5 minutos, em temperatura ambiente; em seguida, lavaram-se as amostras, com tampão PBS 3 vezes e realizou-se o bloqueio de proteína com BSA (soro albumina bovina) a 4%, durante 30 minutos, a 37° C. As amostras foram então incubadas em anticorpo primário, na diluição 1:200, por 60 minutos, a 37°C. Decorrido esse tempo, elas foram lavadas em tampão PBS por 3 vezes, e incubadas em anticorpo secundário, na diluição 1:500 (Alexafluor 488, Invitrogen, A11001), durante 60 minutos, a 37°C. Prosseguiu-se à lavagem com tampão PBS por 3 vezes, seguida de contracoloração nuclear com emprego de DAPI (46Diamidino2fenilanina) 1:500, por 15 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas com PBS e montadas em lâminas histológicas, com gotas de PBS e lamínulas fixadas com fita adesiva, tipo Micropore (técnica "flat-mounted"), com o endotélio voltado para cima. Como controle negativo, empregou-se, sob as mesmas condições de reação, o anticorpo primário E-caderina (Zymed, 33-4000), proteína ausente no endotélio corneal (Forest, et al., 2005; He, et. al., 2016).

A imunomarcação de Na/KATPase, n-Caderina e Zo-1 foi avaliada em

Microscópio Confocal de Varredura a Laser (SP5 Leica, Wetzlar, Alemanha), obtendose imagens resultantes da varredura completa de toda espessura do endotélio corneal, de cada área de interesse (Centro de Microscopia Eletronica- CME, IBB, UNESP, Botucatu). As amostras foram fotografadas em duas regiões distintas, uma na lesão corneal e outra na região perilesão. Logo depois, transmitidas ao computador, onde foram digitalizadas e analisadas em "software" (ImageJ, National Institute of Health, USA), convertidas com ajuste 58/255 e, a partir da área total, calculou-se a percentagem de área marcada (Fig.5). Para a análise das células em proliferação marcadas pelo anticorpo primário Ki-67 avaliou-se, em todas as amostras, toda a extensão do quadrante corneal destinado à essa proteína, fazendo-se a contagem das células com presença fluorescência nuclear (conjugado Ki-67/Alexa fluor 488 positivo).



Figura 5. Imagem Ilustrativa da análise das fotomicrografias de imunofluorescência, do endotélio corneal de coelho, pelo software ImageJ. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

#### 3.11 Microscopia de varredura e de transmissão

Córneas destinadas à análise morfológica descritiva ultraestrutural, foram seccionadas ao meio, sendo meia córnea avaliada por microscopia eletrônica de varredura e meia córnea por microscopia eletrônica de transmissão.

As amostras avaliadas por varredura foram fixadas em glutaraldeído 3%; após a fixação as amostras foram tratadas com tetróxido de ósmio e desidratadas em soluções crescentes de etanol. Em seguida, foram secadas em câmara de dióxido de carbono (37°C e sob pressão de 1500 PSI), metalizadas em ouro e montadas com fita adesiva. As imagens foram obtidas de microscópio modelo FEI QUANTA 2000 (Centro de Microscopia Eletrônica IBB UNESP, Botucatu), em aceleração 12,5Kv, em aumentos de 800, 1000 e 2000x.

Para microscopia eletrônica de transmissão, empregou-se como fixador a solução de Karnovsky (Mistura de Glutaraldeído e Paraformaldeído) (Karnovsky, 1965). O material foi recortado em fragmentos de até 2 mm<sup>3</sup> de lado, esse procedimento foi realizado sobre cera de dentista com algumas gotas de fixador, com lâmina de micrótomo. Foi escolhido, para análise, o fragmento situado cerca de 4 mm do centro da córnea, representando a região de transição da lesão. Após as amostras serem retiradas do fixador, elas foram lavadas 3 vezes, de 5 minutos cada, em tampão fosfato 0,1M pH7,3. Em seguida, colocou-se o material imerso em tetróxido de ósmio 2% por duas horas. Prosseguiu-se lavando o material 3 vezes, de 10 minutos, em água destilada e colocou-se o material imerso em acetato de uranila 0,5% por cerca de 2 horas, a desidratação foi realizada em série crescente de acetona. Para a inclusão em resina colocou-se, inicialmente, o material em uma mistura 1:2 de resina Araldite® + Acetona 100%, descansando 12 horas em temperatura ambiente. O material foi, então, colocado em resina pura por cerca de 1 hora em estufa a 37°C. As amostras foram incluidas e adicionadas cataisador em molde apropriado e armazenadas em estufa a 60°C por 3 dias para cura. O bloco passou pelo procedimento de obtenção de cortes ultrafinos (aproximadamente 90nm) colocados em grades apropriadas. Finalizando o processamento com o contraste em solução saturada de acetato de uranila em álcool 50%, por cerca de 20 minutos e em citrato de chumbo por 10 minutos. As imagens foram obtidas de microscópio modelo JEOL JEM-100CXII (Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica FMRP, USP, Ribeirão Preto), em aumentos de 10000 e 20000x.

## 3.12 Topoquímica para detecção de cromatina/DNA

As córneas foram apoiadas em base de trépano tipo coronet e fixadas com PFA 0,5%, por 15 minutos e, então, foram cortadas, na região central, com trépano de 8,75 mm. Os cortes foram submetidos à reação de Feulgen, método clássico para detecção de DNA

nuclear (BIESTERFELD et al., 2011).

A hidrólise ácida da reação de Feulgen foi feita com HCl4M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), em temperatura ambiente de 25°C (VIDAL *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 2005; MELLO *et al.*, 2009). Primeiramente, o tempo ótimo de hidrólise (que promove depurinação do DNA, sem remoção de pirimidinas), de 100 minuos, foi estabelecido para os olhos controles, por meio da construção de curvas de hidrólise de Feulgen (tempos com variação entre 30 a 120 minutos, com intervalos de dez minutos) (Fig. 6). O material hidrolisado foi exposto, por 40 minutos, ao reativo de Schiff (Merck, *Darmstadt*, Alemanha), as amostras foram lavadas e montadas em lâminas histológicas com lamínulas fixadas com fita adesiva, tipo micropore.

As lâminas coradas com Feulgen foram avaliadas em seguida em microscopia de luz.



Figura 6. Em A e B, fotomicrografias representativas da coloração nuclear por reação Feulgen no endotélio corneal de coelhos, analisados em microscópio de luz, objetiva de 40 acrescida de optovar de 1,25, em A, sem filtro e em B, com filtro interferencial com comprimento de onda de 546. Observar o formato e tamanho característico do núcleo, assim com sua densidade. Régua 50µm. Em C, curva de hidrólise ácida da reação de Feulgen, em endotélio corneal hígido de coelho para padronização do tempo ótimo de hidrólise-100 min. Laboratório de Oftalmologia Veterinária da FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, 2019.

Para a avaliação da supraorganização cromatínica e conteúdo de DNA, os núcleos celulares corados com Feulgen foram analisados em microscópio de luz (BX-53, Olympus, Tóquio, Japão) munido de objetiva de 40x, optovar de 1,25, lâmpada de halogênio de 100 Watts, iluminação de Köhler e filtro interferencial com comprimento de onda de 546 nm. Com vídeo-câmera, as imagens nucleares foram transmitidas do microscópio para um computador, onde foram digitalizadas e analisadas em "software" (ImageJ, National Institute of Health, USA). As imagens digitalizadas, em cores, foram convertidas para sistema binário com até 256 pixels, com variação de zero a 255. As condições de operação do microscópio, com especial atenção para a intensidade de emissão da luz pela lâmpada de halogênio e o ângulo de abertura do diafragma do condensador, foram idênticas para todas as amostras estudadas. Núcleos sobrepostos ou "sem foco" não foram analisados.

Após calibração espacial do sistema de video-análise de imagens (com régua milimetrada, dividida em 100 partes) e segmentação semi-automática dos núcleos, parâmetros geométricos, densitométricos e texturais, de consoante com os que seguem, foram quantificados para se estabelecerem fenótipos nucleares e estados morfofuncionais de cromatina (Moraes *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2009; Felisbino et al., 2011):

área nuclear total, em μm<sup>2</sup>;

• perímetro nuclear, em μm;

• densidade óptica (DO) do núcleo inteiro, que informa sobre os níveis de condensação ou compactação da cromatina[para calcular a DO, níveis de cinza médio foram convertidos para absorbância, empregando-se função logarítmica de base dez;

densidade óptica integrada (DOI) do núcleo inteiro, que informa sobre os valores Feulgen-DNA;

## 3.13 Estatística

Foi realizado um teste de Normalidade dos dados e para aqueles que apresentaram uma distribuição assimétrica dos dados foi ajustado um Modelo Linear generalizado com distribuição gamma para comparação de grupo versus momento em cada olho, seguido de comparações múltiplas, já para as variáveis que apresentaram uma distribuição simétrica, ajustou-se um modelo misto seguido de Tukey para as comparações múltiplas considerando grupo versus momento em cada olho. E para as variáveis que representam contagens, foi ajustado um Modelo Linear generalizado com distribuição binomial negativa para comparação de grupo versus momento em cada olho, seguido de comparações múltiplas. Considerou-se p<0,05 como nível de significância. O programa utilizado para realizar as análises foi o programa SAS versão 9.4.

## 4. RESULTADOS

## 4.1 Tonometria de rebote

Os valores relativos à análise da PIO estão apresentados na tabela 1. O valor de referência foi de 12,07 (DP 0,87) mmHg. Os olhos esquerdos, com lesão, do grupo controle, representado por animais tratados com colírio somente com veículo apresentou, no período de 28 dias, uma média de 10,27 mmHg, semelhante à média encontrada no grupo tratado com fucoidam (10,11 mmHg) não havendo diferença estatística entre os tratamentos.

Para olhos esquerdos, com lesão, a avaliação de ambos os grupos de tratamento, a cada dois dias, revelaram padrão semelhante de flutuação da pressão, não havendo influência do tratamento para este parâmetro. As diferenças encontradas (p<0,05) foram entre os períodos de avaliação, observando-se os menores valores de PIO (GV 6,93/ GF 7,12 mmHg) no dia 3 pós indução da criolesão.

A partir do sétimo dia as pressões, em ambos os tratamentos, atingiram cerca de 10 mmHg e, com exceção de pequenos picos de aumento nos dias 7, 14 e 18, mantiveram-se nessa média até o final da avaliação, aos 28 dias, sendo que o grupo controle estava com uma pressão ligeiramente maior que fucoidam (GV11,00/GF10,27 mmHg). Não obstante, ambos controle e fucoidam permaneceram abaixo do valor de referência (p<0,05) (Fig.7).

#### Tabela 1.

Resultado da avaliação da PIO em olhos de coelhos com criolesão em olho esquerdo tratados com fucoidam 1% ou controles (tratados comente com veículo). Avaliação realizada a cada 2 dias por um período de 28 dias, com auxílio de tonometria de rebote (Tonovet, Icare). Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, Método Dias Variável

		Pressão	Intraocular (mm	n Hg)	
		FUCOIDAM		VEÍCULO	
		OE	OD	OE	OD
		média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)
	0	13,39 (±1,90) <sup>abcde</sup>	12,06 (±2,30)	11,53 (±2,45) <sup>abc</sup>	11,73 (±2,25)
T o	1	8,97 (±2,83) <sup>a</sup>	12,61 (±2,56)	8 (±1,96) <sup>ade</sup>	12,8 (±2,68)
n	3	7,12 (±2,15) <sup>bfghijklmno</sup>	12,18 (±1,83)	6,93 (±2,49) <sup>bfghijkl</sup>	11,53 (±1,60)
o m	5	7,94 (±1,95) <sup>cpqrst</sup>	11,52 (±1,80)	7,87 (±1,88) <sup>cmn</sup>	12,2 (±2,37)
e	7	10,24 (±2,29) <sup>dfp</sup>	13,03 (±2,31)	9,93 (±1,75) <sup>fg</sup>	13,8 (±2,96)
t r	9	9,14 (±1,13) <sup>e</sup>	10,73 (±1,88)	9 (±0,94)	11 (±1,94)
i	11	10,64 (±1,87) <sup>gq</sup>	11,55 (±1,87)	10,9 (±2,08) <sup>h</sup>	11,5 (±1,84)
a	14	10,68 (±1,55) <sup>hr</sup>	11,5 (±1,65)	12,1 (±2,88) <sup>dim</sup>	12,4 (±2,63)
d	16	10,64 (±1,63) <sup>is</sup>	11,55 (±2,21)	10,6 (±0,89)	11,4 (±1,14)
е	18	10,36 (±1,36) <sup>j</sup>	11,91 (±1,14)	12,6 (±2,97) <sup>ejn</sup>	13,8 (±2,49)
R	20	10,27 (±2,10) <sup>k</sup>	11,27 (±1,79)	10,6 (±1,67)	12,2 (±1,92)
b	22	10,18 (±1,60) <sup>1</sup>	10,73 (±2,20)	10,8 (±2,05)	11,2 (±1,48)
0 +	24	11,45 (±2,34) <sup>mt</sup>	11,27 (±2,00)	10,8 (±1,64)	11,8 (±0,84)
e	26	10,45 (±1,37) <sup>n</sup>	10,55 (±1,37)	11,4 (±1,52) <sup>k</sup>	12,2 (±1,10)
	28	10,27 (±1,68)°	11,36 (±1,96)	11 (±1,22) <sup> </sup>	11,6 (±2,88)

OE, olho esquerdo com criolesão central; OD, olho direito sem lesão; DP, desvio padrão. Referência, 12,07 (±0,84) mmHg.

Letras iguais na mesma coluna representam as diferenças estatísticas (p<0,05).





## 4.2 Paquimetria ultrassônica

Os valores relativos à análise da espessura corneal por paquimetria ultrassônica estão apresentados na tabela 2 e figura 8. O valor de referência para espessura corneal de coelhos foi de 378,54 µm.

Observou-se impossibilidade de realização do exame padrão, no centro da córnea, nos períodos iniciais de avaliação pós indução da lesão, revelando que os valores de espessura apresentavam-se acima do limite superior de leitura do aparelho que é de 999 µm.

Ambos grupos apresentaram diminuição progressiva da espessura corneal, entretanto, observou-se que essa diminuição foi mais rápida no grupo tratado com fucoidam, podendo ser aferida aos 7º dia, e o grupo veículo só obteve mensuração a partir do 9º dia de avaliação. Durante os períodos de impossibilidade do exame na região central da córnea, aferiu-se a espessura na região perilesão.

Ao final do período de avaliação as córneas de ambos os grupos ainda estavam mais espessas comparativamente ao valor referência (GV 402,80 /GF 419,91µm), sem diferença entre eles (p>0,05).

As diferenças encontradas baseiam-se na comparação entre o momento 0 (GV 367,13/GF 383,73  $\mu$ m) (pré lesão), e os períodos posteriores à indução da lesão, com aumento da espessura da córnea (p<0,05), havendo diferença estatística até o dia 14 no GV (449,30  $\mu$ m) e dia 16 no GF (459,27).



Figura 8. Resultados da avaliação da espessura corneal, por Paquimetria ultrassônica (PachPen, Accutume), em coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo. Em A, região da Lesão, em B, perilesão. Avaliações realizadas no período da manhã, a cada dois dias, durante o período de 28 dias. Observar que no local da lesão a espessura não foi aferida pelo paquímetro atingindo valores superiores à 999µm e que a partir de 20 dias a espessura retorna aos valor padrão. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

	i 5		28 dias. Unidade	e de Pesquisa Expe	erimental UNIPEX/	FMB/ UNESP, Botu	catu, SP, 2018.		
Método	Dias				Variáv	eis			
			Espessura Cornea	il Central (µm)			Espessura Corn	eal Perilesão (μm)	
		FUCOIDA	Σ	VEIC	ULO	FUCOI	DAM	VEICI	ТО
		OE	8	R	8	OE	8	OE	Ð
		média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)
۵	0	383,73 (±20,41) <sup>abcde</sup>	381,67 (±21,53)	367,13 (±18,81) <sup>abc</sup>	366,93 (±20,42)	380,39 (±15,18) <sup>abcd</sup>	378,78 (±15,68)	380,11 (±14,93) <sup>abcd</sup>	375,56 (±14,16)
- ന	-	*	391,70 (±21,28)	*	386,87 (±21,64)	498,97 (±44,18) <sup>aefg</sup>	391,31 (±18,26)	508,33 (±68,62) <sup>aef</sup>	385,27 (±20,95)
σ⊐	e	*	395,65 (±17,40)	*	376,67 (±14,44)	490,30 (±48,32) <sup>bhij</sup>	385,95 (±18,31)	510,54 (±59,50) <sup>bghi</sup>	379,76 (±20,74)
E	2	*	389,70 (±15,41)	*	380,80 (±12,38)	449,76 (±31,75) <sup>ceh</sup>	385,31 (±39,78)	448,60 (±22,75) <sup>cg</sup>	385,00 (±18,89)
e +	7	835,00 (±63,64) <sup>afghijkImno</sup>	390,09 (±19,86)	*	377,27 (±26,31)	451,36 (±40,63) <sup>dfi</sup>	387,09 (±20,03)	442,60 (±31,01) <sup>deh</sup>	374,33 (±22,98)
	6	456,25 (±38,59) <sup>bf</sup>	376,15 (±25,09)	468,40 (±143,39) <sup>a</sup>	374,30 (±17,61)	428,00 (±34,43) <sup>gj</sup>	426,00 (±14,14)	433,40 (±23,07) <sup>fi</sup>	375,00 (±21,02)
- a	7	474,68 (±45,51) <sup>cg</sup>	389,41 (±16,63)	483,30 (±51,27) <sup>b</sup>	380, 70 (±19, 13)				
∍	14	440,73 (±31,76) <sup>dh</sup>	386,95 (±22,17)	449,30 (±52,57) <sup>c</sup>	383,30 (±13,10)				
	16	459,27 (±77,45) <sup>ei</sup>	386,64 (±20,94)	451,80 (±71,04)	381,60 (±22,03)				
·	18	434,27 (±44,91) <sup>j</sup>	385,45 (±24,61)	428,60 (±58,23)	375,20 (±12,93)				
νσ	20	416,00 (±30,60) <sup>k</sup>	392,18 (±20,07)	404,80 (±46,14)	375,00 (±15,56)				
o, s	22	430,18 (±35,71) <sup> </sup>	398,73 (±21,08)	413,80 (±42,49)	376,00 (±14,65)				
c	24	420,00 (±34,66) <sup>m</sup>	392,73 (±17,01)	405,40 (±37,21)	384, 20 (±16, 18)				
<b>ა</b> ო	26	426,18 (±49,50) <sup>n</sup>	396,09 (±14,13)	412,20 (±25,98)	378,80 (±13,48)				
5	28	419,91 (±37,81) <sup>0</sup>	391,36 (±17,63)	402,80 (±18,79)	380,60 (±14,64)				
* Valores OE, olho	não o esquei	obtidos devido ao intenso eder rdo com criolesão central; OD,	ma ocular que impede olho direito sem lesã	a realização do exame. to; DP, desvio padrão.					

Resultados da avaliação da espessura corneal, por Paquimetria ultrassônica (PachPen, Accutume), em coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo. Em A, região da Lesão, em B, perilesão. Avaliações realizadas no período da manhã, a cada dois dias, durante o período de

Tabela 2.

Referência, 378,54 (±4,89) µm

Letras iguais na mesma coluna representam as diferenças estatísticas (p<0,05).

Perilesão nos olhos direitos sem lesão corresponde às margens do botão corneal analisado e nos olhos direitos corresponde às bordas da crioinjúria.

#### 4.3 Microscopia especular

Nas fotos das córneas capturadas pelo microscópio especular, para analisar o endotélio, foi possível observar que a área central de lesão de olhos tratados com veículo, ao final do período de avaliação de 28 dias, ficou demarcada, revelando uma cicatriz mais opaca, em comparação aos animais com olhos tratados com fucoidam (Fig.9).

Os resultados da microscopia especular quanto à quantidade de células avaliadas, densidade celular, hexagonalidade celular e coeficiente de variação celular, tanto na região da lesão quanto perilesão, estão apresentados contíguos aos valores, para as mesmas variáveis, encontradas na coloração por alizarina vermelha, nas tabelas 3 e 4 e figuras 10 e 11.

Os achados para valores referência do presente estudo foram: células avaliadas (262,68 céls.), densidade (2652,02 céls./mm<sup>2</sup>), hexagonalidade (61,37 %) e coeficiente de variação (25,53 %).

No primeiro dia de avaliação, pós indução da lesão, observou-se dificuldade em se executar o exame padrão, na região central da córnea em olhos com lesão, em decorrência do edema corneal. Observando-se uma baixa quantidade de células, de densidade e hexagonalidade celulares com alto grau de variação da morfologia das células no grupo fucoidam, com p<0,05, comparativamente ao momento 0. No GV o exame central apresentou-se inexequível aos 7 e 14 dias (Fig.10).

Observou-se melhora em todos os parâmetros analisados no decorrer do período de análise (p<0,05), não havendo diferença entre os tratamentos (p>0,05).



Figura 9. Imagens de córneas de olhos esquerdos de coelhos, que sofreram criolesão, obtidas de microscópio especular. Revelando a reparação cicatricial da criolesão Animais tratados com colírio de fucoidam à 1% ou com veículo, fotos registradas aos 7, 14 e 28 dias pós indução da lesão. Observar a diferente evolução da lesão central corneal em ambos os grupos. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

			14, e 28 dias), nas	: regiões de criolesão	o e perilesão. Unidad	le de Pesquisa Exp	erimental UNIPEX/FN	AB/ UNESP, Botucat	tu, SP, 2018.	
Méto	do Local	Dias				Vari	áveis			
				N° Cế	ls.			Densidade celula	ar (cells/mm2)	
			FUCO	IDAM	VEC	ЛГО	FUCOI	DAM	VEC	JLO
			g	Q	B	8	OE	Q	OE	0
			média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)
Σ	Lesão	0	282,43 (±43,60) <sup>Aefg</sup>	266,75 (±23,90) <sup>ab</sup>	248,40 (±18,24) <sup>A</sup>	248,00 (±26,51) <sup>b</sup>	2813,57 (±218,86)	2611,00 (±165,23)	2770,20 (±197,80)	2751,00 (±186,44)
.– c	ши	7	72 <sup>eh</sup>	294,25 (±20,13) <sup>ac</sup>	*	253,00 (±71,36) <sup>d</sup>	1184	2742,75 (±182,68)	*	2662,00 (±93,00)
, L	, Q	14	90,00 (±22,34) <sup>fi</sup>	288,13 (±26,76) <sup>b</sup>	*	272,25 (±28,72) <sup>e</sup>	1971,33 (±145,76)	2664,53 (±147,90)	*	2729,50 (±154,09)
0 0	e u	28	183,67 (±50,90) <sup>ghi</sup>	248,40 (±43,56) <sup>Ac</sup>	119,00 (±123,04)	316,50 (±2,12) <sup>Abde</sup>	2621,67 (±180,54)	2772,00 (±154,05)	2336,50 (±570,64)	2860,00 (±24,04)
<b>о</b> 0	u Perilesã	0 .0	250,22 (±27,11) <sup>ab</sup>	249,78 (±43,46)	218	238,75 (±48,75)	2464,67 (±198,17)	2495,44 (±215,94)	2651	2556,00 (±123,84)
0 0		7	113,14 (±48,44) <sup>a</sup>	266,90 (±33,64)	198	252,50 (±42,26)	1911,29 (±443,92)	2546,50 (±144,07)	2077	2569,50 (±81,54)
L		14	165,92 (±52,81) <sup>b</sup>	253,08 (±34,93)	180,29 (±46,65)	250,50 (±44,17)	2158,31 (±411,41)	2524,67 (±94,46)	2194,57 (±231,97)	2516,17 (±212,97)
a		28	191,25 (±32,72)	268,50 (±18,01)	230,00 (±8,49)	270,00 (±11,31)	2430,2 (±264,09)	2555,50 (±48,62)	2482,50 (±92,63)	2572,00 (±212,13)
	Referênc	sia		262,68 (±	±24,42)			2652,02 (:	±119,54)	
	Lesão	0	* *	* *	* *	* *	* *	* *	**	* *
٩		7	279,33 (±155,95) <sup>Acd</sup>	859,67 (±99,16)	81,00 (±12,73) <sup>Aa</sup>	882,50 (±17,68)	954,00 (±491,87) <sup>ab</sup>	2762,33 (±312,72)	211,50 (±33,23) <sup>ac</sup>	2833,00 (±62,23)
	> 0	14	713,67 (±264,31) <sup>Ac</sup>	879,67 (±37,85)	100,00 (±2,83) <sup>Ab</sup>	816,00 (±83,44) <sup>a</sup>	$2141,00(\pm 782,55)^{a}$	2700,00 (±18,52)	527,50 (±81,32) <sup>bc</sup>	2520,00 (±376,18)
- N	-	28	814,67 (±247,27) <sup>Bd</sup>	939,00 (±43,31)	404,00 (±7,07) <sup>Aab</sup>	938,00 (±53,74) <sup>a</sup>	2430,33 (±725,59) <sup>b</sup>	2819,00 (±109,09)	1130,00 (±183,85) <sup>ab</sup>	2826,00 (±93,34)
a	m e Perilesã	0 .0	* *	* *	*	* *	* *	*	**	* *
L		7	493,00 (±307,71)	133,67 (±20,23) <sup>Aab</sup>	488,50 (±219,91) <sup>c</sup>	859,00 (±15,56) <sup>A</sup>	1995,00 (±373,03) <sup>ab</sup>	2548,00 (±219,10)	2096,50 (37,48) <sup>c</sup>	2760,00 (±41,01)
5	ته ۲	14	809,33 (±19,35) <sup>A</sup>	342,33 (±398,09) <sup>a</sup>	182,00 (±25,46) <sup>Acd</sup>	887,00 (±137,18)	2595,33 (±60,54) <sup>a</sup>	2586,33 (±100,07)	2386,00 (±91,92)	3077,50 (±140,71)
a		28	717,00 (±419,42)	630,67 (±450,02) <sup>b</sup>	844,50 (±58,69) <sup>d</sup>	917,00 (±24,04)	3003,00 (±170,67) <sup>b</sup>	2727,67 (±271,29)	2925,00 (±107,48) <sup>c</sup>	2928,50 (±89,80)
	Referênc	ia.		883,25 (±	±43,03)			2824, 16 (	±185,35)	
* Valc ** Val	rres não obtido ores não obtid	os devid. los, uma	o ao intenso edema ocular vez que as colorações e	que impede o exame trac analises histológicas da	dicional de microscopia e Alizarina foram realizada	especular. as após a eutanásia e c	oleta das córneas.			

Gráficos dos resultados quanto ao nº celular e à densidade celular do endotélio corneal de coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo, à microscopia especular de não contato (Microscópio Especular SP-3000P, Topcon)e à coloração com alizarina vermelha, nos diferentes períodos de avaliação (0, 7,

Tabela 3.

v aures nau ouvuos, una vez que as colorações e analises instologicas da Alizarma roram realizadas apos a eutanasta e coleta das OE, olho esquerdo com criolesão central; OD, olho direito sem lesão; DP, desvio padrão. Letras matúsculas iguais na mesma linha representam diferenças estatísticas(p<0,05) no mesmo momento, em tratamentos diferentes. Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam diferenças estatísticas (p<0,05) no mesmo olho, em diferentes momentos.

26

Tabela 4.

		i								
Metodo	Local	Dias				Varié	aveis			
				Hexagonalidad	de celular %			Coeficiente de	Variação CV%	
			FUCOID	DAM	VEC	NLO	FUCOI	DAM	VEICI	JLO
			OE	8	IJ	8	GE	8	OE	8
			média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)
2	Lesão	0	61,57 (±2,70) <sup>abc</sup>	63,25 (±3,41)	59,20 (±5,07)	60,00 (±3,61)	24,29 (±2,21) <sup>cde</sup>	22,13 (±2,75) <sup>Aa</sup>	23,80 (±1,10) <sup>a</sup>	26,33 (±2,31) <sup>A</sup>
ш з		٢	15 <sup>ade</sup>	63, 75 (±4,10)	*	60,67 (±4,04)	60 <sup>cf</sup>	22,88 (±2,70) <sup>b</sup>	*	25,33 (±3,79)
s : c		14	32,33 (±11,72) <sup>bd</sup>	62,73 (±4,35)	*	61,00 (±7,46)	49,00 (±11,00) <sup>d</sup>	24,53 (±4,78)	*	25,63 (±6,19)
- 0		28	40,33 (±7,09) <sup>ce</sup>	60,20 (±3,27)	38,00 (±14,14)	63,00 (±1,41)	47,33 (±4,16) <sup>ef</sup>	26, 20 (±3,56) <sup>ab</sup>	42,00 (±5,56) <sup>a</sup>	25,00 (±2,83)
ບ ຮຸດ	Perilesão	0	63,33 (±4,44) <sup>fg</sup>	61, 11 (±4,01)	57	62,50 (±8,06)	20,44 (±3,54) <sup>ab</sup>	23,11 (±2,67)	25	24,50 (±6,40)
 		2	40,57 (±10,63) <sup>f</sup>	59,80 (±4,59)	39	59,50 (±2,65)	41,14 (±9,72) <sup>a</sup>	25,40 (±3,06)	38	26,50 (±3,32)
с. а		14	36,15 (±6,20) <sup>g</sup>	61,83 (±4,61)	39,67 (±6,50)	63,33 (±5,72)	46,54 (±9,80) <sup>b</sup>	23,42 (±3,99)	46,43 (±15,02)	23,50 (±5,75)
- -		28	50,00 (±4,24)	59,50 (±2,52)	47,50 (±7,78)	61,00 (±0,00)	34,25 (±5,32)	25,75 (±3,20)	30,00 (±2,83)	27,50 (±0,71)
	Referência			61,37 (±	±1,40)			25,53 (	±1,25)	
	Lesão	0	* *	* *	* *	*	* *	*	* *	* *
۲ ۲		2	28,67 (±6,51)	62,33 (±2,08)	24,50 (±3,54)	62,00 (±62,23)	42,67 (±6,66) <sup>A</sup>	17,67 (±1,15)	163,00 (±4,24) <sup>Ab</sup>	21,50 (±2,12)
> v 		14	35,33 (±1,53)	67,33 (±1,53) <sup>A</sup>	39,00 (±9,90)	56,00 (±5,66) <sup>A</sup>	47,67 (±7,09) <sup>C</sup>	$15,00(\pm 1,00)^{\rm B}$	158,50 (±12,02) <sup>Cc</sup>	29,50 (±2,12) <sup>Ba</sup>
- N		28	37,00 (±2,65)	62,00 (±3,61)	36,00 (±5,66)	55,50 (±3,54)	48,67 (±6,43) <sup>A</sup>	19,67 (±3,51)	75,00 (±2,83) <sup>Abc</sup>	$18,00(\pm 2,83)^{a}$
e B	Perilesão	0	* *	* *	*	*	* *	* *	* *	* *
 		٢	36,33 (±4,04) <sup>h</sup>	65,67 (±2,08)	30,50 (2,12) <sup>ab</sup>	63,00 (±2,83) <sup>ab</sup>	44,33 (±6,66) <sup>gh</sup>	17,00 (±4,00)	47,5 (±3,54)	19,50 (±0,71) <sup>b</sup>
ھ _ _		14	44,00 (±2,00)	66,67 (±4,51)	44,00 (±0,00) <sup>a</sup>	57,50 (±7,78) <sup>Ba</sup>	30, 33(±0,58) <sup>g</sup>	16,00 (±1,73) <sup>C</sup>	32,00 (±2,24)	29,50 (±0,71) <sup>Cbc</sup>
a		28	50,67 (±0,58) <sup>h</sup>	63,67 (±3,21)	49,00 (±2,83) <sup>b</sup>	60,50 (±0,71) <sup>b</sup>	31,67 (±1,53) <sup>h</sup>	18,00 (±0,00)	30,50 (±0,71)	30,50 (±0,71) <sup>c</sup>
	Referência			59,09 (1	±3, 18)			24,75 (	±5,68)	
* Valores	s não obtidos	devido	ao intenso edema ocular q	que impede o exame tra	dicional de microscopia	especular.				

\*\* Valores não obtidos, uma vez que as colorações e analises histológicas da Alizarina foram realizadas após a eutanásia e coleta das córneas.

OE, olho esquerdo com criolesão central; OD, olho direito sem lesão; DP, desvio padrão. Letras maiúsculas iguais na mesma linha representam diferenças estatisticas(p<0,05) no mesmo mmomento, em tratamentos diferentes. Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam diferenças estatisticas (p⊲0,05) no mesmo olho, em diferentes momentos.



Figura 10. Gráficos dos resultados da análise morfométrica de contagem de número de células, densidade celular, hexagonallidade celular (pleomorfismo) e coeficiente de variação celular (polimegatismo), empregando-se a microscopia especular de não contato *in vivo e a* marcação com corante vital de alizarina vermelh*a in vitro*, do endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar que a presença da lesão central impossibilitou a realização do exame de microscopia especular aos 7 e 14 dias no grupo veículo. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.



Figura 11. Gráficos dos resultados da análise morfométrica de contagem de número de células, densidade celular, hexagonallidade celular (pleomorfismo) e coeficiente de variação celular (polimegatismo), empregando-se a microscopia especular de não contato *in vivo* e a marcação com corante vital de alizarina vermelha *in vitro*, do endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias, na região perilesão. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

## 4.4 Histopatologia e morfologia por coloração vital

A dupla marcação com alizarina vermelha 0,2% pH4,2 e azul de tripan 0,1% foi efetiva para observação, tanto da morfologia da membrana celular das células do endotélio corneal revelando a estrutura do mesmo, quanto da vitalidade pela integridade do tecido.

Olhos direitos, sem lesão, revelaram o padrão hexagonal característico do endotélio corneal, ao ser corado pela alizarina vermelho e ausência de coloração nuclear pelo azul de tripan, demonstrando a integridade celular (Fig. 12).



Figura 12. Fotomicrografias representativas do padrão de marcação no endotélio corneal de coelhos submetidos à dupla coloração vital com Vermelho de Alizarina (A5533, Sigma-Aldrich) como marcador de membrana, e com Azul de Tripan (0,1% Eyepharma) como marcador nuclear. Observar a característica tecidual de monocamada de células hexagonais reveladas pela marcação da membrana com a Alizarina, e a ausência ou mínima marcação nuclear com Tripan em endotélio hígido. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

Aos 7 dias de avaliação, olhos lesados, tanto tratados com veículo, quanto tratados com fucoidam, demonstraram um desarranjo tecidual. Em olhos do grupo veículo observou-se expressivos pleomorfismo e polimegatismo celulares, com a presença de células se projetando, com lados alongados (Fig.13).

Olhos tratados com fucoidam revelaram maior homogeneidade celular, com menor distorção na morfologia nos diferentes períodos de avaliação (7, 14, 28 dias), e aumento progressivo na organização celular ao decorrer do tempo (Fig.13).

Olhos tratados com veículo revelaram desvitalidade celular, com presença de núcleos corados pelo azul de tripan, em todos os períodos de avaliação (Fig.13). Houve diferença percentual da área de lesão (área com marcação nuclear, em relação a área total do botão corneal analisado) entre os grupos veículo e fucoidam aos 7 e

aos 28 dias (p>0,05). Sendo, aproximadamente, duas vezes maior em olhos tratados somente com veículo (GV 3,76/ GF 1,49 %) (Tab. 5).

#### Tabela. 5

Resultados quanto a percentagem de área com lesão, corada com azul de tripan, em relação a área total do botão corneal corado pela tecnica de dupla coloração com corante vital, no endotélio corneal de coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo, nos diferentes períodos de avaliação (7, 14, e 28 dias). Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2018.

Dias		Vai	riável	
	Área	com desv	italidade celul	ar%
	Fucoida	im OE	Veícul	o OE
	Média	DP	Média	DP
7	11,88 <sup>Aab</sup>	4,01	19,62 <sup>Aab</sup>	1,56
14	6,42 <sup>ac</sup>	1,63	5,67 <sup>a</sup>	0,9
28	1,49 <sup>Abc</sup>	1,32	3,76 <sup>Ab</sup>	0,46



Figura 13. Fotomicrografias representativas da marcação à dupla marcação com corante vital com Vermelho de Alizarina (A5533, Sigma-Aldrich) como marcador de membrana, e com Azul de Tripan (0,1% Eyepharma) como marcador nuclear, em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar o desarranjo tecidual nos períodos iniciais pós indução da lesão, com células alongadas pleomorficas, notadamente no grupo veículo, com aumento rearranjo tecidual ao passar do tempo em ambos os grupos. Presença de marcação nuclear com tripan, notadamente no grupo éículo, revelando maior quantidade de desvitalidade celular em todos os períodos avaliados. Régua 20µ. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

#### 4.5 Imunofluorescência

A microscopia confocal em varredura permitiu a construção de imagens planas e nítidas do endotélio corneal, mediante formação da imagem a partir da varredura do endotélio corneal no sentido apical-basal, aproximadamente, a cada 50 µm. Sendo que todos os anticorpos avaliados foram marcados em OD do grupo controle, demonstrado o padrão de marcação (Fig.14).

A marcação com Ki67 permitiu a observação de células em proliferação em ambos os grupos, conquanto a contagem de células marcadas revelou maior expressão no GF e por um período de tempo mais prolongado (Tab. 6 e Fig. 15).

Relativamente a imuno-marcação dos anticorpos primários de bomba de sódio e potássio Na+/K+ATPase, de adesão celular n-Caderina e da proteína de junção celular ZO-1, não foi possível a comparação estatística, entre os diferentes momentos de avaliação, uma vez que houve diferenças na espessura e edema corneais no decorrer dos 28 dias, necessitando uma adaptação na intensidade do laser do microscópio confocal para obterem-se as imagens.

Referente à marcação do anticorpo primário de bomba de sódio e potássio (Na+/K+ATPase), observou-se, na área da lesão, menor expressão no GV em comparação ao GF em todos os momentos de avaliação, notadamente aos 7 e 28 dias. O GV apresentou maior expressão no dia 7, relativamente aos diferentes momentos avaliados. Não obstante, o GF apresentou aumento progressivo em sua marcação (Fig. 16, 17 e 18).

Observou-se que a marcação da proteína de adesão celular n-Caderina apresentou expressão progressiva em ambos os grupos, sendo que no momento inicial de avaliação da região da lesão (7 dias), essa proteína foi menos expressa nos olhos tratados com fucoidam em comparação aos tratados com veículo (Fig. 16, 19, e 20).

A proteína de junção celular ZO-1 teve progressiva marcação no decorrer do tempo de avaliação, entretanto, foi possível analisar teve maior expressão no grupo GV em relação ao GF, com exceção do dia 28, onde a expressão maior no GF. Houve um aumento expressivo na marcação aos 28 dias, em relação aos 7 e 14 dias em ambos os grupos, sendo maior no GF (Fig. 16, 21 e 22).



1:200,Dako clone MIB1), NaKATPase (membrana, 1:200, 05-369 clone c464-6, Millipore), n-Caderina, (membrana, 1:200, CDH2 3B9 333900, Termofisher) e Zo-1 (membrana, TJP1, ZO1-1A12 RC2344461:200, Termofisher) respectivamente, conjugados com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul), em endotélio corneal de coelho. Observar que o Ki-67 em endotélio corneal sem lesão é pouco expresso, revelando sua expressão na região periférica, local da transição córneo-escleral. As proteínas de membrana revelando a estrutura do endotélio corneal, sendo que Régua 50 μm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

#### Tabela 6.

Resultados quanto ao nº de células marcadas à Imunofluorescência para marcador de proliferação celular, Ki-67, no endotélio corneal de coelhos com criolesão corneal em olho esquerdo, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo, nos diferentes períodos de avaliação (7, 14, e 28 dias). Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/EMB/UNESP. Botucatu, SP. 2018

Método	Local	Dias		Variá	iveis	
			С	ontagem céls.	Marcadas Ki-67	
			FUCOID	AM	VECU	LO
			OE	OD	OE	OD
			média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)	média (±DP)
Imunofluorescência	total do botão	7	30,66 (±2,08) <sup>Aab</sup>	1,66 (±1,15)	21,00 (±1,41) <sup>Aab</sup>	2,50 (±0,70)
Confocal	corneal	14	24,33 (±5,85) <sup>Aa</sup>	0,33 (±0,57)	11,50 (±0,70) <sup>Aa</sup>	1,00 (±1,41)
		28	22,00 (±2,00) <sup>Ab</sup>	0,33 (±0,57)	10,00 (±0,00) <sup>Ab</sup>	0
		Referência		1,16 (	±1,32)	

OE, olho esquerdo com criolesão central; OD, olho direito sem lesão; DP, desvio padrão.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha representam diferenças estatísticas(p<0,05) no mesmo mmomento, em tratamentos diferentes. Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam diferenças estatísticas (p<0,05) no mesmo olho, em diferentes momentos.



Figura 15. Fotomicrografias representativas da marcação nuclear, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína Ki-67 (1:200,Dako clone MIB1) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul) em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar maior marcação no grupo fucoidam, em todos os momentos, notadamente aos 7 e 14 dias de avaliação, sendo que houve diminuição da expressão aos 28 dias de avaliação. Régua 50 μm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019



Figura 16. Gráficos dos resultados de % de área marcada (distribuição de marcação), à imunofluorescência das proteínas Na+/K+ATPase, n-Caderina e ZO-1, em endotélio corneal de coelho com criolesão, tratados com colírio de fucoidam a 1% ou com veículo e analisados, nas regiões da lesão e perilesão, aos 7, 14 e 28 dias, pelo software ImageJ. Régua 50 μm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.























Figura 22. Fotomicrografias representativas da marcação em membrana, à imunofluorescência com observação em microscopia confocal, da proteína ZO-1 (Termofisher, TJP1 ZO1-1A12 RC234461:200) conjugada com anticorpo secundário alexafluor-488 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul) em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar que a marcação é menor nos momentos pós indução da lesão e aumenta progressivamente, há maior homogeneidade na estrutura da membrana celular aos 28 dias, notadamente no grupo fucoidam. Régua 50 µm. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

#### 4.6 Microscopia de varredura e de transmissão

#### Varredura

As amostras fotografadas por varredura revelaram o padrão de monocamada de células hexagonais, característica do endotélio corneal em olhos direitos, sem lesão (Fig.23).



Figura 23. Fotomicrografias representativas do padrão ultraestrutural do endotélio corneal de coelhos, à microscopia eletrônica de varredura. Observar a estrutura característica do tecido, uma monocamadas de células hexagonais. Centro de Microscopia Eletrônica/ IBB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

No momento 7 o local de indução da criolesão apresentava maior descaracterização tecidual no GV, em relação ao GF.

Ademais, no dia 14 foi possível visibilizar, na região da criolesão, em animais do grupo controle (GV) uma área com células de maior heterogeneidade do tecido que gera diferentes reflexões do eixo de elétrons, correspondente com a ruptura da membrana e exposição do conteúdo degenerado dentro da célula (Fig. 24).

Os olhos que sofreram criolesão apresentaram maior variabilidade na morfologia celular, com acréscimo ou decréscimo no número de lados pleomorfismo celular observados, mormente, nas avaliação aos 14 e 28 dias. A instilação de colírio de fucoidam 1% ensejou maior número de imagens com células menores, com menor número de lados (<6), perceptível, principalmente nos olhos avaliados aos 28 dias, em contrapartida, olhos tratados apenas com veículo apresentaram células maiores, com maior número de lados (>6) tanto na região da lesão quanto perilesão, observando-se células com até 12 lados (sinalizado por uma estrela na figura 24).





#### Transmissão

Obtiveram-se micrografias de células do endotélio corneal de coelho morfologicamente normais (olhos direito do GV) (Fig.25).



Figura 25. Fotomicrografias representativas do padrão ultraestrutural do endotélio corneal de coelhos, à microscopia eletrônica de transmissão. Observar em A, as camadas da córnea, destacando-se o endotélio como uma monocamda de células com núcleos ligeiramente alongados (seta), o estroma como tecido homogêneo acelular (asterisco) e o epitélio, multiicamada de células (estrela). Em B, as organelas celulares tais como núcleo (asterisco), mitocôndria (cabeça de seta), retículo endoplasmático (seta), complexo de golgi (estrela) e vesícula (seta grossa). Em C, junções celulares dos tipos de oclusão, como Tight junction (*zônulas ocludens,* como Zo-1) (asterisco) e de adesão (caderinas como n-Caderina) (seta). Centro de Microscopia Eletrônica/ IBB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

Alterações ultra-estruturais decorrentes da lesão e do processo cicatricial encontradas foram: presença organelas celulares como mitocôndrias em maior expressão, menor expressão das junções e adesões celulares, presença de vesículas com debris celulares, projeções da membrana e alterações nucleares (Fig.26).

Notou-se quantidade aumentada de vesículas em olhos pós lesão, em todos os momentos de avaliação, notadamente nos olhos tratados com veículo. No mesmo grupo observou-se endotélios com citoplasma em clara evidência de degeneração, apresentando rompimento da membrana plasmática com extravasamento de conteúdo, rarefação citoplasmática e nuclear, sugestivas de necrose celular. Houve, também, a neoformação de material eletrondenso semelhante à matrix extracelular, observado por entre as células em degeneração (Fig.26).

Em contrapartida células do GF apresentou características relacionadas à reciclagem da membrana, como moderada presença de vesículas, formação de células multinucleadas, observando-se, no momento 28 dias, imagens que sugerem o fusionamento entre núcleos vizinhos, além de manter a estrutura tecidual



comparativamente aos olhos referência (Fig. 25 e 26).

Figura 26. Fotomicrografias representativas da análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de transmissão, do endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Observar as alterações na morfologia celular pós indução da lesão, notadamente no grupo veículo, com a presença de projeções de membrana (asterisco), vesículas (estrela), degeneração do citoplasma com rompimento da membrana (seta) e presença de material eletrondenso semelhante à matriz extracelular entre as células em degeneração com núcleo arredondado característico de necrose e transformação tecidual (cabeça de seta). No grupo fucoidam observou-se menor quantidade de alterações morfológicas com a presença de algumas vesículas, e imagem sugestiva de fusão celular com surgimento célula mulinucleada (seta grossa). Centro de Microscopia Eletrônica/ IBB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

#### 4.7 Topoquímica para detecção de cromatina/DNA

A reação de Feulgen foi efetiva na detecção das alterações nucleares em cromatina. Foram realizadas 5 fotomicrografias, das quais uma foi da área central do do botão corneal, região da lesão e as outras da região perilesão, com filtro passa banda com comprimento de onda de 546 nm (Fig. 27), para posterior análise nuclear.

Os valores de média, com desvios padrão, para as áreas e os perímetros nucleares das células endoteliais corneais que compuseram os diferentes grupos da pesquisa estão apresentados na Tabela 7.

Valores de área e de perímetro observados para núcleos celulares endoteliais em córneas sem lesão que receberam fucoidam 1% por 7, 14, ou 28 dias não diferiram daqueles observados para amostras controle (valores de referência, correspondendo ao conjunto de dados obtidos de todas células em córneas sem lesão que receberam veículo) (p>0,05 para todos, pós-teste de Tukey)

Na área central da criolesão, o endotélio em amostras tratadas com fucoidam apresentou núcleos celulares menores, comparativamente ao controle (p<0,05). Núcleos na área central da criolesão em córneas tratadas com veículo, na avaliação do dia 7, apresentaram área elevada e perímetro reduzido. Todavia, esses núcleos diminuíram em tamanho e a partir da avaliação de 14 dias foram menores do que aqueles do controle sem lesão (p<0,05).

Nas amostras tratadas com fucoidam, os tamanhos dos núcleos na periferia/bordas da criolesão não diferiram dos observados nos controles, após 14 e 28 dias de tratamento (p > 0,05). Tal achado contrasta com o observado nas córneas tratadas com veículo, em que os valores de área nuclear para células endoteliais nas bordas da criolesão foram menores que os dos controles (p<0,05).

A instilação de fucoidam ensejou descompactação cromatínica em células endoteliais da córnea sem lesão. Valores reduzidos de DO foram observados nas células endoteliais ocupando a área central da criolesão do dia 7 até o dia 28 de avaliação (p<0,05 vs. referência/controle) (Tab. 8).


Figura 27. Fotomicrografias representativas da Reação de Feulgen com filtro de interferência com comprimento de onda de para 546 nm, empregados para análise da área e perímetro nucleares e para avaliação densidade cromatinica, em endotélio corneal de coelho, com criolesão, tratados com fucoidam à 1% ou veículo, aos 7, 14 e 28 dias. Aumento 20x. Unidade de Pesquisa Experimental UNIPEX/ FMB/ UNESP, Botucatu, SP, 2019.

## Tabela 7

Parâmetros de vídeo análise de imagens relacionados à geometria (área e perímetro) das células endoteliais corneais

		ear (µm²		Perímetro Nuclear (µm)								
	Região Central			Periferia			Região Central			Periferia		
Amostras	$\overline{X}$	DP	P <sub>(Anova)</sub>	$\overline{X}$	DP	P <sub>(Anova)</sub>	X	DP	P <sub>(Anova)</sub>	X	DP	P <sub>(Anova)</sub>
			0.001			0.001			0.001			0.001
Sem lesão Fucoidam												
7 dias	9,99ª	1,87		8,66ª	1,33		18,66ª	1,73		17,87ª	0,91	
14 dias	9,76ª	1,13		8,17ª	0,67		18,59ª	1,53		17,55ª	1,86	
28 dias	9,28ª	1,38		8,34ª	1,03		18,58ª	1,77		17,03ª	1,00	
Placebo												
7 dias	9,79ª	1,45		8,16ª	1,64		18,50ª	1,60		17,39ª	1,10	
14 dias	9,40ª	1,53		8,79ª	0,83		18,40ª	1,89		17,58ª	2,92	
28 dias	9,64ª	1,89		8,18ª	1,24		18,12ª	1,57		17,30ª	1,90	
Após lesão Fucoidam												
7 dias	6,65 <sup>b</sup>	1,10		7,63 <sup>b</sup>	1,07		17,40ª	2,64		15,69 <sup>b</sup>	1,98	
14 dias	8,20°	1,20		8,75ª	1,36		18,58ª	1,08		17,20ª	0,35	
28 dias	5,27d	1,04		8,19ª	1,11		16,86 <sup>b</sup>	2,59		18,09ª	2,29	
Placebo				!								
7 dias	10,66°	1,03		7,18	1,14		13,53°	1,50		15,91°	0,85	
14 dias	8,54°	0,91		/,11º	1,63		15,940.0	0,97		17,08ª	1,53	
28 dias	5,44ª	1,04		5,97°	1,04		15,600.0	1,44		16,40 <sup>a,b</sup>	2,03	
Referência	9,64ª	1,89		8,39ª	1,53		18,32ª	1,70		17,43ª	1,46	

X, média; DP, desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna representam as diferenças estatísticas (Tukey).

Diferenças com P < 0,05 foram consideradas significativas.

Periferia no grupo sem lesão corresponde às margens do botão corneal analisado. Após lesão, periferia corresponde às bordas da crioinjúria.

Nas córneas com criolesão, o tratamento com fucoidam foi associado com mudanças significativas (redução) em DO na avaliação do dia 28 (p<0,05). Diferentemente, o veículo ensejou flutuações nos valores de DO, notadamente nas células endoteliais no centro da criolesão, sugerindo um aumento no estado de compactação da cromatina no dia 7, seguido por afrouxamento de cromatina no dia 14 das avaliações.

No dia 28 das avaliações os valores de DO estavam reduzidos nos núcleos das células endoteliais na periferia da criolesão corneal tratada com fucoidam (p<0,05 vs. referência), e elevados nas amostras que receberam veículo (p<0,05) (Tab. 8).

Os valores Feulgen-DNA (IOD) mostraram-se elevados em núcleos de córneas sem lesão tratadas com fucoidam por 7 ou 14 dias (p<0,05). Nas córneas injuriadas, 28 dias de tratamento com fucoidam, bem como com veículo, foram associados com redução nos valores Feulgen-DNA das células ocupando o centro da criolesão (p<0,05 vs. referência). A perda de DNA foi mais significativa nas amostras que receberam veículo (valor de IOD 48% menor que aquele encontrado nos controles), do que nas tratadas com fucoidam (34%).

Nas bordas da criolesão, nenhuma diferença em IOD foi observada entre células endoteliais em córneas que receberam fucoidam ou veículo por 28 dias (p>0,05).

Parâmetros de vídeo análise de imagens relacionados ao estado de compactação da cromatina (OD) e aos valores Feulgen-DNA (IOD) das células endoteliais corneais

		(UA)		IOD								
	Região C	entral	Periferia			Região Central		Periferia				
Amostras	$\overline{X}$	DP	P <sub>(Anova)</sub>	X	DP	P <sub>(Anova)</sub>	$\overline{X}$	DP	P <sub>(Anova)</sub>	$\overline{X}$	DP	P <sub>(Anova)</sub>
Sem lesão Fucoidam			0.001			0.001			0.001			0.001
7 dias 14 dias 28 dias	0,78 <sup>b,c</sup> 0,74° 0,76°	0,02 0,04 0,03		0,81ª,b 0,78⁵ 0,73°	0,03 0,01 0,01		9,05 <sup>b</sup> 9,40 <sup>b,c</sup> 7,21ª	1,42 1,53 1,75		7,46 <sup>b</sup> 7,84 <sup>b</sup> 6,26ª	1,04 0,94 0,52	
Placebo												
7 dias 14 dias 28 dias	0,83ª 0,82ª 0,80 <sup>a,b</sup>	0,02 0,02 0,05		0,81 <sup>a, b</sup> 0,84 <sup>a,d</sup> 0,83 <sup>a</sup>	0,03 0,03 0,02		7,79ª.º 7,29ª 7,15ª	1,47 1,17 1,79		6,84ª 6,90ª 6,29ª	0,90 1,09 1,03	
Após lesão Fucoidam												
7 dias 14 dias 28 dias	0,83ª 0,84ª 0,74°	0,02 0,03 0,05		0,85 <sup>a,d</sup> 0,83 <sup>a</sup> 0,77 <sup>b</sup>	0,03 0,02 0,02		8,69 <sup>b.c</sup> 7,15ª 5,00 <sup>d</sup>	1,07 0,93 0,93		6,02ª 5,97° 4,73 <sup>d,e</sup>	0,76 0,85 0,77	
Placebo												
7 dias 14 dias 28 dias	0,78 <sup>a,b,c</sup> 0,93 <sup>d</sup> 0,84ª	0,04 0,02 0,03		0,77 <sup>b</sup> 0,86 <sup>d</sup> 0,86 <sup>d</sup>	0,05 0,02 0,01		5,85 <sup>d</sup> 7,34ª 3,96°	1,08 0,98 0,91		6,80ª 6,25ª 5,30 <sup>c,e</sup>	0,72 0,54 1,05	
Referência	0,83ª	0,03		0,83ª	0,03		7,65ª	1,71		6,13ª	1,00	

X, média; DP, desvio padrão; UA, unidades arbitrárias; OD, densidade óptica; IOD, densidade óptica integrada. Letras diferentes na mesma coluna representam as diferenças estatísticas (Tukey).

Diferenças com P < 0,05 foram consideradas significativas.

Periferia no grupo sem lesão corresponde às margens do botão corneal analisado. Após lesão, periferia corresponde às bordas da crioinjúria.

## 5. DISCUSSÃO

Coelhos adultos da raça Nova Zelândia representam um modelo adequado para a pesquisa de engenharia do endotélio corneal humano, uma vez que compartilham semelhanças estruturais e fisiológicas (Valdez-Gacia *et al.*, 2015). No presente estudo foi possível realizar diferentes avaliações. Em olhos sem lesão, obtiveram-se respostas claras e semelhantes aos padrões observados na literatura para espécies em geral. Não obstante, é importante ressaltar que córneas de coelhos apresentam capacidade de regeneração natural após 4 semanas ().

A indução da criolesão demostrou-se eficiente em mimetizar afecções de cursam com descompensação do entoléio corneal, com características como

alteração na morfologia das células e alteração do metabolismo com disfunção de proteínas que agem na manutenção da deturgescência corneal, instrínsecas do endotélio corneal como a Na+/K+ATPase, o Zo-1 e a n-Caderina (Bonano *et al.*, 2012, Srinivas *et al.*, 2012), de consoante com os métodos de criolesão encontrados na literatura (Koizume *et al.*, 2012, Okumura *et al.*, 2016a, Han *et al.*, 2013). Trata-se de um modelo que mantem a maior padronização e reprodutibilidade, dentro os descritos na literatura. A limitação desse modelo experimental é que a permeabilidade da córnea ao colírio pode estar aumentada uma vez que a lesão não se limita ao endotélio, se extendendo desde o epitélio (Okumura *et al.*, 2015).

Com esse modelo tem-se a manutenção da membrana de Descemet e das células da períferia (perilimbais), fatores importantes para que haja migração e proliferação da células do endotélio corneal (Choi *et al.*, 2015, Soh *et al.*, 2015).

Aventa-se a teoria de que proteínas de ligação célula-célula podem atuam inibindo a proliferação celular no endotélio corneal, mantendo as células quiescentes na fase G1 do ciclo celular. Após um desequilíbrio há um gatilho para estímulo da atividade celular desencadeando a continuação do ciclo com consequente mitose e proliferação celular (Joyce, 2003). De consoante com resultados observados por He *et al.* (2012) nos quais em olhos sem lesão a proliferação foi quase nula, iniciando apenas na região marginal da córnea com migração centrípeta após a indução de uma lesão central. Esta teoria mostrou-se plausível em nosso estudo ao observarmos que, após a lesão, há diminuição com aumento progressivo da marcação de proteínas de junção celular (n-Caderina e Zo-1) e, concomitantemente, o contrário acontece com o quantitativo de células em proliferação (marcadas com Ki-67).

O fudoidam demonstrou-se capaz de aumentar o estimulo a proliferação de células do endotélio corneal.

Notou-se evidência da ação do fucoidam no controle da apoptose ao observar-se atenuação de alterações nuleares e citoplasmáticas, com tentativa de adequação ao novo ambiente, corroborando com estudos encontrados na literatura para outras partes do olho, como a ação dessa substância na proteção contra o estresse oxidativo as células da retina em vitreoretinopatia progressiva (Zhang *et al.*, 2018) e em retinopatia diabética (Xi *et al.*, 2015). A formação de tecido semelhante à matrix extracelular em olhos não tratados com fucoidam é explicado pois danos

severos ao endotélio corneal induzem a transformação fibroblástica (transformação endotélio-mesênquima) (Lee *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2006).

À microscopia eletrônica de transmissão observou-se, também, núcleos normais característicos da fase de interfase do ciclo celular, no qual a maior parte da cromatina está no estado descondensado (eucromatina). Nos endotélios do GV notouse a presença de núcleos com formatos irregulares, com certa dissolução da cromatina e perda da coloração do núcleo, característicos de necrose celular. À marcação de Feulgen a presença de núcleos menores com cromatina frouxa (descondensada) pode-se admitir que este fato deveu-se à proliferação celular, sendo essas características atribuídas à célula jovem, uma vez que confirmou-se à imunohistoquímica a presença de proliferação celular maior nesse grupo.

A reparação cicatricial decorre essencialmente de um estímulo inflamatório inicial. Essa inflamação pode culminar em dois fechamentos como resultado à injuria: a remodelação com regeneração tecidual, ou a fibrose tecidual (Vidmar *et al.*, 2017). Descobrirem-se fatores que estimulem a remodelação/regeneração e inibam a necrose/fibrose tecidual é o foco de estudos que visam alternativa de tratamentos para diferentes tipos de descompensação do endotélio corneal.

Neste sentido, observa-se que autores como Okumura, Koizume e seus colaboradores acreditam que os inibidores de Rock atuam nessa modulação ao atuarem na adesão e proliferação celular e inibirem a apoptose (Koizume et al., 2012, Okumura et al., 2015a, Okumura et al., 2015b, Okumura et al., 2016, Okumura et al., 2017). Sustentando-se essa mesma hipótese, o fucoidam foi escolhido para nosso estudo com base em estudos preliminares do nosso Grupo.

Obtivemos dados semelhantes aos encontrados na literatura, da ação protetora exercida pela substância em diferentes tecidos (Fitton *et al.*, 2015). Em seu trabalho, Meekins et al. (2016), concluíram que o inibidor de Rock H-1152 estimulou significativamente a migração e proliferação de células do endotélio corneal, resultados similares aos ensejados pelo fucoidam.

O estudo com dupla marcação de coloração vital, com alizarina vermelha e azul de tripan, é amplamente empregada para avaliação da higidez do tecido para transplantes corneais, todavia pouco empregada em estudos de reparação cicatricial em modelos de lesão (Canais *et al.,* 1999, Schroeter e Rieck 2009, Koizume *et al.* 

2012. Em nosso trabalho a ação protetora do fucoidam também pôde ser visibilizada à marcação nuclear com o azul de tripan, no qual observou-se menor área de células marcadas, ou seja, manutenção da membrana sem exposição do núcleo. A técnica revelou-se adequada, de baixo custo e fácil execução.

Koh *et al.* (2009) demonstraram que o estímulo à alta expressão de n-Caderina mediante um estresse tecidual pode indicar uma ação antiapoptótica. Achados do presente estudo revelaram que houve maior expressão dessa proteína aos 14 e 28 dias em olhos tratados com fucoidam, e que nos olhos-controle a maior expressão foi somente na resposta imediata até 7 dias pós-lesão, revelando maior estímulo antiapoptótico durante a modulação da reparação cicatricial nos olhos tratados com fucoidam.

Observou-se que a maioria dos padrões avaliados, como a espessura corneal, a hexagonalidade celular e as expressões de proteínas de ligação, da enzima da bomba de sódio e potássio e de proliferação celular, evoluíram com o tempo, notadamente nos olhos tratados com fucoidam.

Avanços nos estudos da fisiopatologia de afecções que cursam com descompensação do endotélio corneal permitem compreender como alternativas terapêuticas podem se mostrar promissoras, uma vez que a cirurgia permanece como sendo única alternativa para importante doenças como a Distrofia Corneal Endotelial de Fuchs (Okumura et al., 2018) e a ceratopatia bolhosa pós-facectomia.

Nossa pesquisa sustenta que três principais fatores induziram a regeneração corneal corroborando com dados da literatura.

Primeiramente a presença da lesão diminuiu a expressão de proteínas de ligação, como ZO-1 e n-Caderina, desencadeando a ativação do ciclo celular (Joyce, 2003). Outro fator foi a manutenção das células da periferia corneal, dada a lesão ser central, essas possuem uma atividade celular constante do tipo centrípeta (Bogerd *et al.*, 2018). Finalmente, a influência do fucoidam na modulação da reparação cicatricial ao estimular a bomba de sódio e potássio e na inibição da necrose celular ao estimular a reciclagem da membrana e, ultraestruturalmente, características celulares que indicaram a tentativa de readequação à uma situação fisiológica.

## 6. CONCLUSÃO

Portanto, conclui-se que o fucoidam pode ser uma substância promissora na restauração da transparência corneal em descompensação endotelial, ao modular a cicatrização estimulando a proliferação celular e controlando alterações de correntes do estresse tecidual, como transformação fibroblástica e necrose.

## 7. REFERÊNCIAS

Agardh E, Lundsting A, Perfilyev A, Volkov P, Freiburghaus T, Lindholm E, Ling C (2015) Genome-wide analysis of DNA methylation in subjects with type 1 diabetes identifies epigenetic modifications associated with proliferative diabetic retinopathy. **BMC medicine** 13: 1.

Aldrovani M, Valdetaro GP, Lima TB, Padua IRM, Chacaltana FDYC, Cristovam PC, Gomes JAP, Laus JL (2014) Chitosan-alginate biomembrane containing fucoidan for corneal surface reconstruction. **Veterinary Ophthalmology** 17: E 40.

Bercht BS<sup>1</sup>, Albuquerque L, Araujo AC, Pigatto JA (2015) Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (Chinchilla lanigera) in vivo. **Vet Ophthalmol.** 1:137-42.

Besednova NN. Zaporozhets TS, Somova LM, Kuznetsova TA (2015) Review: Prospects for the use of extracts and polysaccharides from marine algae to prevent and treat the diseases caused by helicobacter pylori. **Helicobacter** 20: 89–97.

Biesterfeld S, Beckers S, Cadenas MCV, Schramm M (2011) Feulgen stain in gremains the Gold Stardard for precise DNA ImageCytometry **Anticancer Research** 31: 53-58.

Bogerd BVD, Dhubhghaill SN, Koppen C, Tassignon MJ, Zakaria N (2018) A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. **Surv Ophthalmol.** 63:149-165.

Bonanno JA (2012) Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump **Experimental Eye Research** 95: 2-7.

Bonnin N, Belville C, Chiambaretta F, Sapin V, Blanchon L (2014) DNA methyl transferases are differentially expressed in the human anterior eye segment **Acta Ophthalmol** 92: 366-371.

Bouvard C, Glay-Fauroux I, Grelac F, Carpentier W, Lokajczyk A, Gandrille S, Colliec-Jouault SFA, Helley D (2015) Low-Molecular-Weight Fucoidam induce endothelial cell migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. **Marine Drugs** 13: 7446-7462.

Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. (2003) Proinflammatoy Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. **The Journal of Immunology** 171: 6164-6172.

Canais M, Costa-Vila J, Potau JM, Merindano MD, Ruano D (1999). Morphological study os cryopreserved human corneal endothelium **Cells Tissues Organs** 164:37—45.

Carvalho AC, Sousa RB, Franco AX, Costa JV, Neves LM, Ribeiro RA, Sutton R, Criddle DN, Soares PM, De Souza MH (2014) Protective effects of fucoidan, a p- and I-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis. **Pancreas** 43: 82–87.

Choi SD, Jeon HS, Hyon JY, Oh YJ,Wee WR, Chung TY Shin, Kim JW (2015) Recovery of corneal endothelial cells from periphery after injury **PlosOne** 17: 1-16.

Cintron C, Szamier RB, Hassinger LC, Kublin CL (1982) Scanning electron microscopy of rabbit corneal scars. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 23:50–63.

Coster DJ (1981). Factors affecting the outcome of corneal transplantation. Annals of the Royal College of Surgeons of England, *63*(2): 91-97.

Cui W, Zheng Y, Zhang Q, Wang J, Wang L, Yang W, Guo C, Gao W, Wang X, Luo D. (2014) Low-Molecular-Weight Fucoidam protects endothelial function and ameliorates basal hypertension in diabetic Goto-Kakizaki rats **Laboratory Investigation** 94: 382- 393.

Cvekl A, mitton KP (2010) Epigenetic regulatory mechanisms in vertebrate eye development and disease. **Hereditary** 105: 135-151.

Derycke LD, bracke ME (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. **The international of developmental biology** 48: 463-476.

Dithmer M, Fuchs S, Shi Y, Schmidt H, Richert E, Roider J, Klettner A (2014) Fucoidam reduce secretion and expression vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium and reduce angiogenesis In Vitro. **PlosOne** 9.

Dua Hs, Faraj La, Said Dg, Gray T, Lowe J (2013) Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). **Ophthalmology** 120:1778-1785.

Faganello CS, Silva VRM, Andrade MCC, Carissimi AS, Pigatto JAT (2016). Morphology of endothelial cells from different regions of the equine cornea. **Ciência Rural**, 46: 2223-2228.

Felisbino MB, tamashiro WMSC, mello MLS (2011) Chromatin Remodeling, Cell Proliferation and Cell Death in ValproicAcid-TreatedHeLa Cells, **PlosOne** 19.

Fitton JH, stringer DN, karpiniec SS (2015) Therapies from Fucoidam: An Update. **Marine drugs** 13: 5920-5946.

Forest F, Thuret G, Gain P, Dumollard J, Peoc'h M, Perrache C, He Z (2015) Optimization of immunostaining on flat-mounted human corneas. **Molecular Vision** 21:1345-1356.

Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, Thuret G (2016) Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. **JAMA Ophthalmol** 134: 167-173.

Gan L, Fagerholm P, Kim H (1999) Effect of Leukocytes on Corneal Cellular Proliferation and Wound Healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 40: 575-581.

Giraux J, Matou S, Bros A, Tapon-Bretaudiere J, Letourneur D, Fischer A (1998) Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidam and heparin. **European Journal of Cell Biology** 77: 352-359.

Giraux J, Tapon-Bretaudiere J, Matou S, Fischer A (1998) Fucoidam, as Heparin, Induces tissue factor pathway inhibitor release from cultures human endothelial cells.Thrombosis and Haemostasis **International Journal for Vascular Biology and Medicine** 80: 692-695.

Han SB, Aug B, Balchosur D, Peh G, Chaurasia SS, Tan DTH, Mehta JS (2013) A mouse model of corneal endothelial decompensation using cryoinjury **Molecular Vision** 19: 1222-1230.

Hayashi S, Osawa T, Tohyama K (2002) Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians **J Morphol**. 254: 247-58.

He Z, Forest F, Gain P, Rageade D, Bernard A, Acquart S, Peoc'h M, Defoe DM, Thuret G (2016) 3D map of the human corneal endothelial cell. **Sci Rep.** 6: 29047.

He Z, Campolmi N, Gain P, Ha Thi BM, Dumollard JM, Duband S, Peoc'h M, Piselli S, Garraud O, Thuret G (2012) Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. **Stem Cells** 30:2523-34.

Ho W, Chang J, Su C, Hu F, Jou T, Wang I (2015) Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity Reverses Corneal Endothelial-Mesenchymal Transition. **The American Journal of Pathology** 185: 2158-2167.

Hoppenreijs VP, Pels E, Vrensen GF, Oosting J, Treffers WF (1992) Effects of human epidermal growth factor on endothelial wound healing of human corneas. Invest Ophthalmol **Vis Sci.** 33: 1946–1957.

Hoppenreijs VP, Pels E, Vrensen GF, Treffers WF (1994) Effects ofplatelet-derived growth factor on endothelial wound healing of human corneas. Invest Ophthalmol **Vis Sci.** 35: 150–161.

Hu Y, Li S, Li J, Ye X, Ding T, Liu D, Chen J, Ge Z, Chen S (2015) Identification of a highly sulfated fucoidamfrom sea cucumber Pearsonothuriagraeffei with well-repeated tetrasaccharides units. **Carbohydr. Polym.** 134: 808–816.

Hwang P, Hung Y, Phan Nn, Hieu B, Chang P, Li K, Lin Y (2016) The in vitro and in vivo effects of the low molecular weight fucoidam on the bone osteogenic differentiation properties. **Cytotechnology** 68: 1349-1359.

IAPB (International Agency for the Prevention of Blindness). The Global Burden of Vision Impairment: An overview based on 2015 data. **IAPB Vision Atlas**. Disponível em: http://atlas.iapb.org/global-burden-vision-impairment/

Ignacio TS, Nguyen TT, Sarayba MA, Sweet PM, Piovanetti O, Chuck RS, Behrens A (2005) A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. **Am J Ophthalmol** 139: 325-330.

Joyce NC (2003) Proliferative capacity of the corneal endothelium.Progress in **Retinal** and **Eye Research** 22: 359-389.

Kannan RR, Arumugam R, Anantharaman P (2013) Pharmaceutical potential of a fucoidam-like sulphated polysaccharide isolated from Halodulepinifolia. International **Journal of Biology Macromol.** 62: 30–34.

Kaye GI, Pappas GD (1962) Studies on the cornea. I. The fine structure of the rabbit cornea and the uptake and transport of colloidal particles by the cornea in vivo. **J Cell Biol**. 12: 457-79.

Kim JA, Ko JH, Ko AY, Lee HJ, Kim MK, Wee WR, Fulcher SE, Oh JY (2014) TSG-6 Protecs Corneal Endothelium from Transcorneal Cryoinjury in Rabbits **Cornea** 55: 4906-4912.

Koh SW, Cheng J, Dodson RM, Ku CY, Abbondandolo CJ (2009) VIP down-regulates the inflammatory potential and promotes survival of dying (neural crest-derived) corneal endothelial cells ex vivo: necrosis to apoptosis switch and up-regulation of Bcl-2 and N cadherin. **Journal of Neurochemistry** 109: 792 –806.

Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S (2012) Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells

using animal models. **Experimental eye research** 95: 60-67.

Koudouna E, Okumura N, Okazaki Y, Nakano S, Inoue R, Fullwood NJ, Hori J, Kinoshita S, Koizumi N (2017) Immune Cells on the Corneal Endothelium of an Allogeneic Corneal Transplantation Rabbit Model. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**.58:242-251.

Kwon J, Heo JH, Kim HM, Song JS (2015)Comparison of cytotoxic effects on rabbit corneal endothelium between preservative-free and preservative-cotaining dorzolamide/timolol **Korean J Ophthalmol** 29: 344-350.

Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, Soeda S, Shimeno H (2003) Oversulfation o fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem Pharmacol**. 65: 173-179.

Kwak JY (2014) Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. **Marine Drugs** 12: 851-870.

Kylin, H (1913) ZurBiochemie der Meeresalgen. **Hoppe-**Seyler'sZeitschriftfu"rphysiologische Chemie 83: 171–197.

Lean QY, Eri RD, Fitton JH, Patel RP, Gueven N (2015) Fucoidan extracts ameliorate acute colitis. **Plos one** 10: e0128453.

Lee HT, Lee JG, Na M and Kay EDP (2004) FGF-2 Induced by Interleukin-1β through the Action of Phosphatidylinositol 3-Kinase Mediates Endothelial Mesenchymal Transformation in Corneal Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry** 279, 32325-32332.

Lee JG, Kay EDP (2006) FGF-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells **Experimental Eye Research** 83: 6, 1309-1316.

Lee JH, Lee SH, Choi SH, Asahara T, Kwon S (2015) The Sulfated polysaccharide Fucoidam recues senescence of endothelial colony-forming cell for ischemic repair. **Stem Cells** 33: 1939-1951.

Losick VP, Jun AS, Spradling AC (2016) WoundInduced Polyploidization: Regulation by Hippo and JNK Signaling and Conservation in Ma mmals. **PLoS One** 11: e0151251.

Lu J, Lu Z, Reinach P et al. (2006) TGF-beta2 inhibits AKT activationand FGF-2induced corneal endothelial cell proliferation. **Exp.Cell Res**. 312: 3631–3640.

Meekins LC, Rosado-Adames N, Maddala R, Zhao JJ, Rao PV, Afshari NA (2016) Corneal Endothelial Cell Migration and Proliferation Enhanced by Rho Kinase (ROCK) Inhibitors in In Vitro and In Vivo Models. **Investigative ophthalmology & visual**  science, 57: 6731-6738.

Mello MLS, Aldrovani M, Moraes AS, Guaraldo AMA, Vidal BC (2009) DNA content, chromatin supra organization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes, **Micron**, 40: 577-585.

Moraes AS, Vidal BC, Guaraldo AMA, Mello MLS (2005) Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes following starvationandre feeding, **Cytometry PartA**, 63: 94-107.

Nakano Y, Oyamada M, Dai P, Nakagami T, Kinoshita S, Takamatsu T (2008) Connexin43 knockdown accelerates wound healing but inhibits mesenchymal transition after corneal endothelial injury in vivo. **Investigation & Visual Science**, 49: 93-104.

Okumura N, Koizumi N, Ueno M, *et al* (2011) Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops **British Journal** of **Ophthalmology**;95:1006-1009.

Okumura N, Inoue R, Okazaki Y, Nakano S, Nakagawa H, Kinoshita S, Koizumi N (2015a) Effect of the Rho kinase inhibitor Y-27632 on corneal endothelial wound healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 56: 6067-6074.

Okumura N, Kakutani K, Inoue R, Matsumoto D, Shimada T, Nakahara M, Kiyanagi Y, Itoh T, Koizumi N (2016a).Generation and feasibility assessment of a new vehicle for cell-based therapy for treating corneal endothelial dysfunction. **Plos one** 11.

Okumura N, Okazaki Y, Inoue R, Nakano S, Fullwood NJ, Kinoshita S, Koizumi N (2015b). Rho-associated kinase inhibitor eye drop (Ripasudil) transiently alters the morphology of corneal endothelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 56: 7560-7567.

Okumura N, Okazaki Y, Inoue R, Katutani K, Nakano S, Kinoshita S, Koizumi N (2016b).Effect of the Rho-associated kinase inhibitor eye drop (Ripasudil) on corneal endothelial wound healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 57: 1284-1292.

Okumura, N., Kinoshita, S., Koizumi, N. (2017). Application of Rho Kinase Inhibitors for the Treatment of Corneal Endothelial Diseases. **Journal of ophthalmology**, *2017*, 2646904.

Okumura, N., Hayashi, R., & Koizumi, N. (2018). Perspective of Future Potent Therapies for Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. **The open ophthalmology** *journal*, 12: 154-163.

Ozaltin K, Lehocký M, Humpolícek P, Pelková J, Sáha P (2016) A new route of Fucoidam immobilization on low density polyethylene and its blood compatibility and

anticoagulation activity. International Journal of Molecular Sciences 17: 1-12.

Park S, Fong AG, Cho H, Zhang C, Gritz DC, Mian G, Herzlich AA, Gore P, Morganti A, Chuck RS (2012) Protocol for Vital Dye Staining of Corneal Endothelium Cells **Cornea** 31:1476-1479.

Petroll W, Matthew D, Lisha D, Jester JV, Cavanagh HD, Bean JBS (2001). Organization of Junctional Proteins in Proliferating Cat Corneal Endothelium During Wound Healing **Cornea** 20:1,73-80.

Pinazo-Duran MD, Moreno VZ, Medina JJG, Gallego-Pinaz R (2013) Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. **Current Opinion in Pharmacology** 13: 98–107.

Puzzolo D, Pisani A, Malta M, Santoro G, Meduri A, Abbate F, Montalbano G, Wylegala E, Rana RA, Bucchieri F, Ieni A, Aragona P, Micali A (2018) Structural, ultrastructural, and morphometric study of the zebrafish ocular surface: a model for human corneal diseases?, **Current Eye Research**, 43:2, 175-185.

Schroeter J, Rieck P (2009) Endotheial evaluation in the cornea bank Dev Ophthalmology Basel 43: 47-62.

Sperling, S (1977) Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypan blue. **Acta Ophthalmologica** 55: 573-580.

Srinivas SP (2010). Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. **Optometry and vision science** 87:4, E239-54.

Synytsya A, Bleha R, Synytsya A, Pohl R, Hayashi K, Yoshinaga K, Nakano T, Hayashi T (2014) Mekabu fucoidan: Structural complexity and defensive effects against avian influenza a viruses. **Carbohydr. Polym**. 111: 633–644.

Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL, Vicenti FAM, Pigatto JA, Abib FC (2009). Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. **Ciência Rural** 39(1): 117-122.

Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S (2012) Corneal transplantation. **The Lancet** 379: 1749-1761.

Taylor MJ, Hunt CJ (1981) Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. **Br J Ophthalmol.** 65: 815-819.

Ubels JL, Pruis RM, Sybesma JT, Casterton PL (2000) Corneal opacity, hydration, and endothelial morphology in the bovine cornea opacity and permeability assay using reduced treatment times **Toxicology** 14:379-3386.

Valdez-Garcia JE, Lozano-Ramirez JF, Zavala J (2015). Adult white New Zealand

rabbit as suitable model for corneal endothelial engineering. **BMC research notes**, 8, 28

Vassilev VS, Mandai M, Yonemura S, Takeichi M (2012) Loss of N-Cadherin form the endothelium causes stromal edema and ephitelial dysgenesis in the mouse cornea, 53: 7183-7193.

Vidmar J, Chingwaru C, Chingwaru W (2017) Mammalian cell models to advance our understanding of wound healing: a review **Journal of surgical research** 210: 269-280.

Vidal BC (1984) Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of therat, **Biology of the Cell** 50: 137-146.

Vidal BC, Russo J, Mello MLS (1998) DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis **Experimental Cell Research** 244: 77-82.

WHO (World Healthy Organization). Blindness: Vision 2020 - The Global Initiative for the Elimination of Avoidable Blindness 2007. **Fact sheet** N°213. Disponível em: https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs213/en/

Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, Wordinger RJ (1996) The Fas-Fas Ligand System and Other Modulators of Apoptosis in the Cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 37: 1582-1592.

Yan B, Yao J, Tao ZF, Jiang Q (2014) Epigenetics and ocular diseases: from basic biology to clinical study. **Journal of Cell Physiology** 229: 825-833.

Yang Y, Gao Z, Ma Y, Teng H, Liu Z, Wei H, Lu Y, Cheng X, Hou L, Zou X (2016) Fucoidam inhibits lymphagiogenesis by downregulation the expression. Of VEGFR3 and PROX1 in human lymphatic endothelial cells. **Oncotarget** 7: 38025-38035.

Yuan Y, Macquarrie D (2015) Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidam) from ascophyllum nodosum and its antioxidant activity. **Carbohydr.Polym.** 129: 101–107.

Li, X., Zhao, H., Wang, Q., Liang, H., & Jiang, X. (2015). Fucoidan protects ARPE-19 cells from oxidative stress via normalization of reactive oxygen species generation through the Ca2+-dependent ERK signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, 11, 3746-3752.

Zhang W, Du Jy, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q, Jin JO (2014) Ascophyllan puriefied from ascophyllum nodosum induces th1 and tc1 immune responses by promoting dendritic cell maturation. **Marine Drugs** 7: 4148-4164.

Zhang Y, Zhao D, Yang S, Yao H, Li M, Zhao C, Zhang J, Xu G, -T, Li H, Wang F (2018) Protective Effects of Fucoidan on Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal

Pigment Epithelial Cells and Progression of Proliferative Vitreoretinopathy. **Cell Physiol Biochem** 46:1704-1715.

Zhao S, Fei X, Liu T, Liu Y (2015) Low temperature induces cryoinjury in mouse corneal endothelial cells by stimulating the Stk11-p53 signal pathway. **Molecular Medicine Reports** 12: 6612-6616.

Zhou P, Lu Y, Sun Xh (2011) Zebularine suppresses TGF-beta-induced lens epithelial cell myofibroblast transdifferentiation by inhibiting MeCP2. **Molecular Vision** 17: 2717-2723.