

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
UNESP**

Juliana Ravelli Baldassarre Martins

**Avaliação do desempenho de colírio usando soro alogênico  
e fatores de crescimento derivados de plaquetas em cultura  
de células do anel córneo-escleral**

Botucatu - SP

2014

Juliana Ravelli Baldassarre Martins

**Avaliação do desempenho de colírio usando soro alogênico  
e fatores de crescimento derivados de plaquetas em cultura  
de células do anel córneo-escleral**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Pesquisa e  
Desenvolvimento – Biotecnologia Médica

**Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune**

Botucatu - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Martins, Juliana Ravelli Baldassarre.

Avaliação do desempenho de colírio usando soro alogênico e fatores de crescimento derivados de plaquetas em cultura de células do anel córneo-escleral /  
Juliana Ravelli Baldassarre Martins. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina de Botucatu

Orientador: Elenice Deffune

Capes: 20100000

1. Soluções oftálmicas. 2. Células - Cultura e meios de cultura. 3. Síndromes  
do olho seco. 4. Imunohistoquímica.

Palavras-chave: Colírio de soro autólogo; Cultura de células; Fatores de  
crescimento derivados de plaquetas; Imunohistoquímica; Olho seco.

# *Dedicat6ria*



Àqueles que me ensinaram o significado  
do verdadeiro amor e que me fazem senti-lo:  
meus pais e meu irmão

Aos doadores de córnea e seus familiares

# *Agradecimientos*



A **Deus**, que está sempre ao meu lado, nos momentos felizes e tristes, por sempre me ouvir. Agradeço pelas oportunidades que já tive e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho para que este trabalho pudesse ser concluído.

À **Dra. Elenice Deffune**, profissional admirável pela inteligência e dom de ter ideias geniais. Obrigada por me receber de forma tão gentil em seu laboratório e me transmitir sua paixão pelo trabalho, o que me motivou todos os dias a seguir em frente. Norteou o meu caminho profissional no Aprimoramento, apresentando a mim a Hemoterapia, que se tornou tão importante em minha vida. No Mestrado, me fez crescer e aprender algo novo todos os dias. Muito obrigada pela confiança, pelo carinho e por me permitir fazer parte de sua equipe.

Ao **Dr. Alvio Isao Shiguematsu**, que desde o início foi muito prestativo e solícito, sempre me ajudando em todos os momentos que precisei. Agradeço pelos ensinamentos e contribuição essenciais, que permitiram que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos meus pais, **Ozília Baldassarre dos Santos e Cláudio Manoel Martins dos Santos** pela educação e formação de caráter que me permitiram seguir em frente e enfrentar as adversidades da vida. Obrigada pelo incentivo em meus estudos e por me proporcionar tudo o que precisei para alcançar meus objetivos. Esta conquista é de vocês. Obrigada mãe, por ser minha melhor amiga e por fazer o impossível por mim. Obrigada pai, pelos cuidados e apoio que me fizeram chegar até aqui. Amo vocês.

Ao meu irmão **Gustavo Ravelli Baldassarre Martins**, exemplo de pessoa honesta e generosa, por me incentivar nas minhas escolhas e por ser um irmão tão especial. Amo você.

À minha cunhada **Débora Nunes de Campos Martins**, que chegou à nossa família para nos trazer mais vida e momentos divertidos. Obrigada por preencher no meu coração o espaço de uma irmã.

A todos os envolvidos neste trabalho: **doadores de córnea e seus familiares, pacientes** que utilizam o auto colírio, os quais me incentivaram a estudar e trabalhar nesta pesquisa para tentar melhorar a qualidade de vida das pessoas que sofrem de olho seco, **funcionários do centro-cirúrgico** do Hospital das Clínicas de Botucatu que sempre foram muito gentis e

prestativos, **Aline** do Banco de Olhos que me recebeu muito bem e me ajudou tão gentilmente e **Lais** da Assistência Social que foi muito simpática e gentil quando precisei.

À **Profa. Dra. Amélia Kamegasawa** pela disponibilidade em ajudar neste trabalho.

À **Dra. Rosana Rossi-Ferreira**, exemplo de profissional, que sempre me transmitiu paz e tranquilidade. Agradeço muito os seus conselhos que foram de extrema importância para mim, além da ajuda neste trabalho com suas ideias e materiais que permitiram um melhor andamento do projeto.

À **equipe do Laboratório de Engenharia Celular**: Ana Carolina Pasian, Ana Cláudia Simões, Andrei Moroz, Caroline Mitiká Watanabe, Helga Caputo Nunes, Heloísa Vicente Garcia, Henrique de Souza Vieira, Isabele Silveira Rosa, Josy Campanhã Vicentini de Oliveira, Nathália Melo de Carvalho, Ondina Silvia Cotrim, Simone da Silva Ferreira, Thaiane Cristine Evaristo, Aparecida Vitória e Woner Mion. Sem dúvida, a melhor equipe que já conheci, pois todos sabem o verdadeiro valor e significado da palavra equipe e amizade. Muito obrigada a todos pelas ajudas e apoio neste trabalho e também pelos momentos de descontração.

À **Thaiane Cristine Evaristo**, minha amiga querida, meu anjo da guarda, que sempre me ajudou em todos os momentos. Saber que você faz parte dos meus dias sempre me trouxe paz e serenidade, mesmo nos dias em que nada dava certo. Obrigada por me ouvir, me aconselhar, me acompanhar quando mais precisei, enfim, por existir. Sem você tudo teria sido muito mais difícil. Faltam palavras para expressar o enorme carinho que sinto por você. Muito obrigada!

À **Josy Campanhã Vicentini de Oliveira**, profissional essencial do laboratório, que admiro pela competência e humildade. Obrigada por estes anos de amizade, bons conselhos, ensinamentos e pelo preparo dos meios de cultura, o que foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço muito por ser também meu anjo da guarda e por me apoiar e acompanhar em decisões importantes. Muito obrigada!

À **Helga Caputo Nunes**, sempre prestativa e educada, pela amizade e companheirismo nestes anos em que trabalhamos juntas. Muito obrigada pelas conversas, conselhos e ajudas com ideias e materiais que permitiram que este trabalho se tornasse melhor.

Ao **Henrique de Souza Vieira, Marcos Aurélio Bernardo de Oliveira e Rodrigo de Almeida** pelas coletas de sangue realizadas com tanta boa vontade. Vocês foram essenciais neste trabalho, muito obrigada!

À **Isabele Silveira Rosa** pela amizade e momentos felizes que vivemos juntas. Seu otimismo e alegria me contagiam, seja nos momentos de alegria ou de desânimo.

Ao **Henrique de Souza Vieira**, companheiro desde que cheguei ao laboratório. Sempre de bom humor e prestativo, me ajudou em tudo o que precisei. Muito obrigada por tudo!

À **Caroline Mitiká Watanabe**, que em tão pouco tempo se tornou uma pessoa muito importante em minha vida. Por conhecer meus sonhos, me incentivou de forma que passei a me sentir mais forte e otimista, o que fez toda a diferença. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado.

À **Ana Claudia Simões**, pessoa tranquila e agradável, que trouxe aos meus dias mais alegria. Obrigada por me ajudar sempre com um sorriso no rosto.

Ao **Rodrigo Almeida**, amigo querido, que me entende como ninguém e sabe quais são as palavras certas nos momentos incertos. Obrigada pelas ideias que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho e pela sua amizade, que torna minha vida muito mais feliz.

À **Heloísa Vicente Garcia** por me ajudar nos momentos mais difíceis, de maneira tão calma e solícita. Agradeço muito pelas fotos das células tiradas para este trabalho. Ter uma pessoa de bom coração como você no laboratório é um privilégio.

À **Aparecida Vitória Gonçalves de Souza**, a pessoa mais amiga, prestativa e compreensiva que já conheci. Obrigada pelos ensinamentos e conselhos valiosos.

Ao **Woner Mion**, por sempre estar disposto a ajudar com suas ideias inteligentes e boa vontade.

À **Ondina Silvia Cotrim**, que está sempre disposta a ajudar e que tem o dom de encontrar a solução quando tudo parece difícil. Agradeço a preocupação e amizade que tornaram os dias mais alegres. Sua presença no laboratório é fundamental e sua vontade de aprender me incentiva cada vez mais. Muito obrigada!

Ao **Dr. Andrei Moroz** pelas ideias fundamentais para este trabalho, pela ajuda com a imunohistoquímica e pelos ensinamentos que foram importantes para que eu pudesse aprender a pensar diante dos experimentos.

À **Dra. Jaqueline Rinaldi** do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu pela ajuda fundamental com a imunohistoquímica e por me receber sempre com um sorriso no rosto e disposição para me ajudar.

Ao **Prof. Dr. Luis Sérgio Felisbino** do Departamento de Morfologia pela disponibilidade do laboratório.

À **Priscila Murador**, que me recebeu no laboratório com tanto carinho e me ensinou com tanta gentileza e profissionalismo os primeiros passos fundamentais para a execução de trabalhos em laboratório de pesquisa. Levarei seus ensinamentos para sempre comigo. Muito obrigada.

Ao meu amigo **Fernando Aparecido de Oliveira**, sempre tão disposto a me ajudar. Exemplo de profissional de caráter e justiça. É um grande privilégio conhecer alguém como você. Agradeço muito sua força e coragem a mim transmitidas quando desanimei de meus sonhos.

À **Janisse Pena Bispo**, que sempre de forma tão alegre, educada e gentil me ajudou em tudo o que foi preciso.

À **Cleonice De Pieri**, a primeira pessoa do Hemocentro com quem tive contato quando solicitei estágio na Graduação. Desde então, nossa ligação aumentou cada vez mais e hoje nossa amizade é essencial para mim. Muito obrigada pelos conselhos, pelas sábias palavras e pela energia positiva que você transmite.

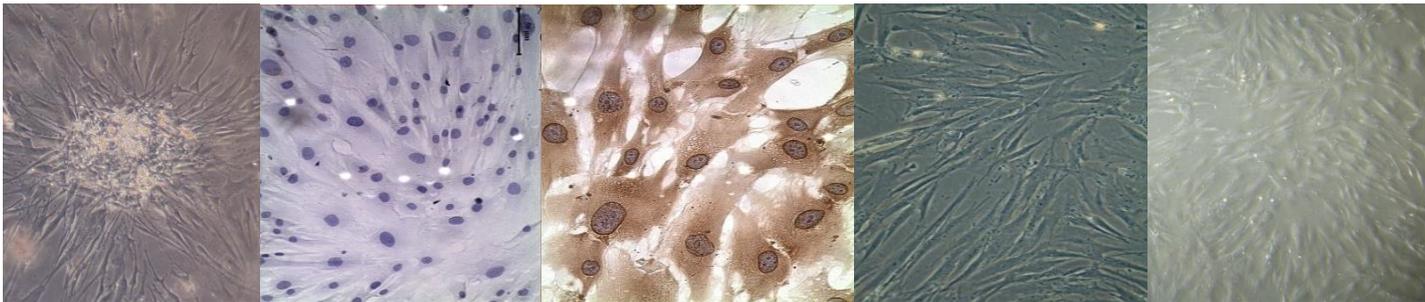
Ao **Esmite Eloi Faria**, pela disponibilidade em ajudar sempre e pelo bom humor de todos os dias.

Aos **professores da Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica** pelos ensinamentos preciosos e fundamentais

Aos colegas de trabalho do Setor de Citologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas de Botucatu: **Marta Regina Prado Matera, Melissa Ágatha Salemme, Carina de Fátima Sibia, Fábila Guilina, Marcos Aurélio Bernardo de Oliveira e Ivana Rosa Loli Georgete**. Agradeço pela paciência e colaboração para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos **funcionários do Hemocentro de Botucatu**, em especial: **Ângela Aparecida Dorini, Priscila Vieira Lima, Amauri Benedito de Paula, José Roberto Correia Toledo, Valdir Cruz, Daniela Quevem, Adaíze da Silva Garcia, Denise Hernandes Francisco, Regina Celia Firmiano de Assis, Mariza dos Santos Pedroso, Gislene Mastranjo de Oliveira, Giovana Silva Sobrinho, João Carlos de Moraes, Fernando Aparecido de Oliveira** que me ensinaram com tanta dedicação e carinho nos anos de Aprimoramento em Hemoterapia, pela força nos anos de Mestrado e pelas ajudas fundamentais que me incentivaram a sempre seguir meus objetivos. Meu carinho por vocês é muito especial.

# *Επίγραφε*



“Pedras no caminho tenho várias... um dia vou construir um castelo!”

**Fernando Pessoa**

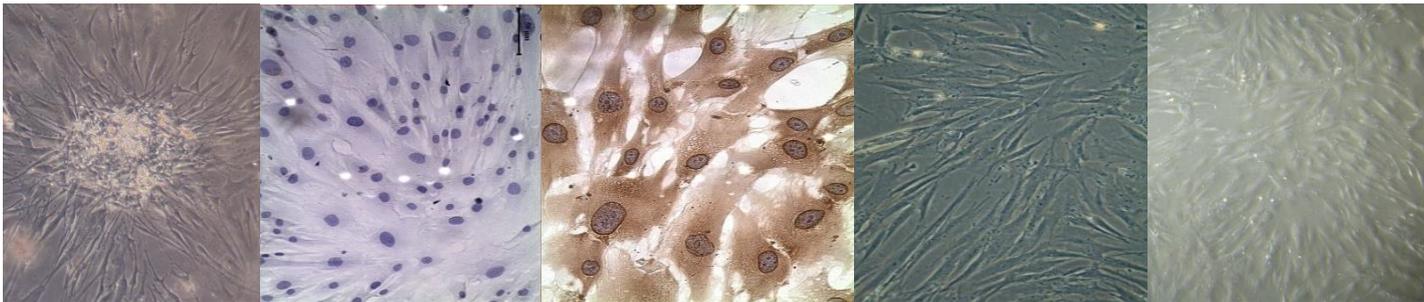
“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui; nunca desista de seus sonhos, mesmo que esses pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

**Albert Einstein**

“Sempre faço o que não consigo fazer para aprender o que não sei.”

**Pablo Neruda**

# *Resumo e Abstract*



Martins, JRB. **Avaliação do desempenho de colírio usando soro alogênico e fatores de crescimento derivados de plaquetas em culturas de células do anel córneo-escleral**. 2014. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica) - Universidade Estadual Paulista – UNESP

## Resumo

**Introdução:** Muitas patologias podem acometer a córnea, entre elas a síndrome do olho seco e as doenças relacionadas. Tratamentos inovadores para a síndrome do olho seco têm surgido, entre eles, o uso de colírio produzido com soro autólogo de uso ocular, soro de sangue de cordão umbilical, meio condicionado obtido pela expansão de células tronco do epitélio limbal (modelo *ex vivo*), entre outros. Pacientes com provável indicação do colírio de soro autólogo podem ter a contra-indicação na produção oriunda do status imune para doenças virais como HIV, hepatites B e C, sífilis, doença de Chagas e HTLV I e II, que do ponto de vista de produção do autocolírio, encontram barreiras. Para estes casos, o colírio de soro alogênico, oriundo de doadores saudáveis, é uma alternativa viável.

**Objetivos:** Analisar o efeito *in vitro* da ação de colírio alogênico em cultura de células da região córneo-escleral, estabelecer a cultura e expansão de células aderentes obtidas da região córneo-escleral, comparar a cultura das células aderentes em meio de cultura contendo colírio e fatores de crescimento derivados de plaquetas, avaliar as células por meio da técnica de imunohistoquímica e analisar os dados médicos dos pacientes que utilizam autocolírio por meio de prontuários. **Casuística e Métodos:**

Os anéis córneo-esclerais foram obtidos no centro cirúrgico após cirurgia de doação de córnea, sendo que estes anéis são materiais de descarte após a cirurgia. Em seguida, o tecido foi encaminhado ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu, onde foi fragmentado em pequenas partes e digerido com colagenase tipo I. As células foram plaqueadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> com meio DMEM Knockout, em uma primeira parte do experimento, e em meio Keratinocyte na segunda parte do trabalho. Após confluência de 80%, as células passaram pelo processo de tripsinização para desprendimento das células do frasco de cultura. Foi realizada a montagem da placa do experimento, onde foram colocadas as células para controle, ou seja, não tratadas, células tratadas com colírio produzido a partir de soro e células tratadas com fatores de crescimento derivados de plaquetas. Após 5 dias foi realizada a técnica de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-vimentina (marcador de células mesenquimais), anti-beta catenina (marcador epitelial) e anti-PCNA (marcador de proliferação). Com relação aos prontuários médicos, foram feitas as análises dos dados dos pacientes com olho seco encaminhados ao Hemocentro de Botucatu

para produção de colírio de soro autólogo. Os exames oftalmológicos analisados foram: presença de puntatas, acuidade visual e tempo de quebra do filme lacrimal (*break up time*). **Resultados:** As células tratadas com colírio produzido com soro e as tratadas com fatores de crescimento derivados de plaquetas foram marcadas com o anticorpo anti-vimentina e não foram marcadas com o anticorpo anti-beta catenina. Com relação ao anticorpo anti-PCNA, apenas foram marcadas as células que estavam em locais da placa onde havia grandes colônias celulares. Nos prontuários médicos, observou-se que em 37,5% dos pacientes houve melhora do quadro de puntatas após o início do uso de colírio de soro autólogo, em 37,5% houve piora e em 25% deles não houve alteração. Na análise do tempo de ruptura do filme lacrimal, em 50% dos casos não houve diferença após o início do uso do colírio, em 25% houve melhora e em 25% houve piora. Na acuidade visual, houve uma melhora significativa nos pacientes em ambos os olhos. **Conclusões:** Pode-se concluir que o uso do meio DMEM Knockout permitiu o crescimento principalmente das células-tronco mesenquimais, o que foi constatado na imuno-histoquímica na marcação com anti-vimentina. Além disso, o uso do colírio produzido a partir do soro leva a uma melhora significativa do quadro clínico do paciente com olho seco.

**Palavras Chave:** Colírio de soro autólogo; Cultura de células, Fatores de crescimento derivados de plaquetas; Imunohistoquímica; Olho seco

Martins, JRB. **Evaluation of eye drops using allogeneic serum and platelet-derived growth factors in cultured cells of the corneal scleral ring.** 2014. Dissertation (Master in Research and Development: Medical Biotechnology) - Universidade Estadual Paulista - UNESP

### **Abstract**

**Introduction:** Many diseases can affect cornea, including dry eye syndrome and related diseases. Innovative treatments for dry eye syndrome have emerged, among them the use of autologous serum eye drops produced with the use of eye serum, umbilical cord blood, conditioned medium obtained by expansion of limbal epithelial stem cells (ex vivo model) among others. Patients with probable indication of autologous serum eyedrops may be contraindicated in production originating immune status for viral diseases such as HIV, hepatitis B and C, syphilis, Chagas disease and HTLV I and II, from the point of view of eye drops's production, have barriers. For these cases, eye drops from healthy donors allogeneic serum can be an alternative. **Objectives:** Evaluate in vitro effect of the action of allogeneic eye drops in corneal-scleral cell culture, established the culture and expansion of adherent cells obtained from the corneal-scleral region, compare the culture of adherent cells in culture medium containing eye drops and platelets derived growth factors, evaluating the cells by immunohistochemistry and analyze medical data of eye drops's patients. **Materials and Methods:** The corneal-scleral rings were obtained in the operating room after surgery of tissue donor, and these rings were discarded after surgery. Then, tissue was sent to the Laboratory of Cell Engineering of Botucatu Blood Center, which was fragmented into small pieces and digested with collagenase type I. Cells were plated in 25 cm<sup>2</sup> flasks with DMEM Knockout in the first part of the experiment, and Keratinocyte in the second part of the experiment. After 80% confluence, cells passed through the trypsinization procedure for detachment of the cells from the culture flask. Mounting plaque experiment, cells were placed to control, or untreated cells, treated cells with eye drops and cells treated with platelets derived growth factors was performed. After 5 days, immunohistochemistry technique with anti-PCNA (proliferation marker) anti-vimentin (a marker of mesenchymal cells), anti-beta catenin (epithelial marker) was performed. Relative to medical records, patients's data analyzes with dry eye submitted to Botucatu Blood Center for production of autologous serum eye drops were made. Ophthalmic examinations were analyzed: presence of punctas,

visual acuity and length of the tear film break (break up time). **Results:** Cells treated with eye drops produced with the treated serum and growth factors derived from platelets were labeled with anti- vimentin antibody and were not labeled with the anti -beta catenin antibody. With respect to anti - PCNA were only marked cells that were in places where there were large plate of cell colonies. The medical records, it was observed that in 37.5 % of patients experienced clinical improvement after initiation of punctatas the use of autologous serum eyedrops in 37.5 % and worsened in 25 % of them did not change. In the analysis of the breakup time of the tear film, in 50% of cases there was no difference after the first use of eye drops, 25 % had improved and 25 % worsened. In visual acuity, a significant improvement in patients in both eyes.

**Key words:** autologous serum eye drops; Cell culture, platelets derived growth factors; Immunohistochemistry; Dry Eye

# *Lista de Figuras*



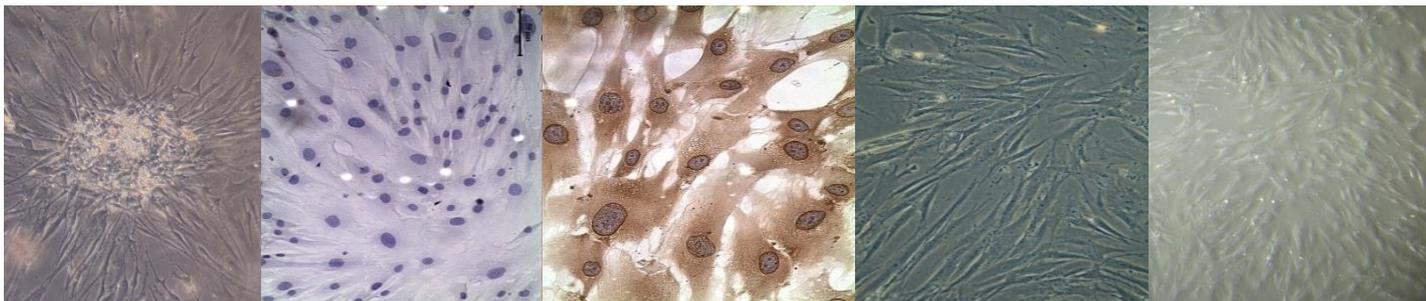
<b>Figura 1:</b> Camada externa do olho humano.....	3
<b>Figura 2:</b> Localização do limbo no olho humano.....	4
<b>Figura 3:</b> Anatomia do olho humano.....	5
<b>Figura 4:</b> Causas da Síndrome do Olho Seco.....	7
<b>Figura 5:</b> Imunofisiopatologia da DEVH: respostas aferente e eferente.....	10
<b>Figura 6:</b> Imunofisiopatologia da DEVH.....	11
<b>Figura 7:</b> Resultados da superfície ocular em casos típicos de DEVH ocular crônica. ....	12
<b>Figura 8:</b> Atividades desenvolvidas desde a indicação do SAUOC até sua liberação para paciente.....	19
<b>Figura 9:</b> Interpretação clínica do <i>break up time</i> test.....	20
<b>Figura 10:</b> Anel córneo-escleral.....	21
<b>Figura 11:</b> Microscópio invertido Axiovert 200 Zeiss®.....	22
<b>Figura 12:</b> Representação da placa de experimento.....	23
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografia de microscopia invertida das células cultivadas. (A) Células epiteliais em aumento de 10x; (B) Colônia de células aderentes, de aspecto fibroblástico em aumento de 10X; (C) Células-tronco do anel córneo-escleral com confluência de 100% em aumento de 10X; (D) Células controle. Em (E) e (F), células cultivadas por Li <i>et al</i> , sendo que em (E) visualiza-se colônia de células epiteliais normais do limbo após 14 dias de cultura. No bordo inferior destaque para população de células fibroblasto- <i>like</i> do microambiente do limbo (LNCs). Em (F) o autor destaca o cultivo de células tronco adultas do limbo.....	36
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografia de microscopia invertida das células cultivadas. (A) Células tratadas com FCDP em aumento de 10x. (B) Células controle em aumento de 10x. (C) Células tratadas com colírio em aumento de 20x. (D) Células tratadas com FCDP em aumento de 10x.....	37
<b>Figura 15:</b> (A) Células epiteliais em aumento de 10x. (B) Células controle em aumento de 5x. (C) Células controle em aumento de 10x. (D) Células controle em aumento de 20x.....	39
<b>Figura 16:</b> (A) Células tratadas com FCDP em aumento de 20x. (B) Células controle em aumento de 10x. (C) Células controle em aumento de 5x. (D) Células tratadas com colírio em aumento de 20x. (E) Células tratadas com FCDP em aumento de 10x. (F) Células tratadas com FCDP em aumento de 20x.....	40
<b>Figura 17:</b> (A) Anti-mouse em aumento de 40x. (B) Anti-rabbit em aumento de 40x.....	41

**Figura 18:** (A) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (B) Marcação com anti-betacatenina em aumento de 40x. (C) Marcação com anti-PCNA em aumento de 10x.

(D) Marcação com anti-PCNA em aumento de 20x. (E) Marcação com anti-PCNA em aumento de 10x. (F) Marcação com anti-PCNA em aumento de 40x.....42

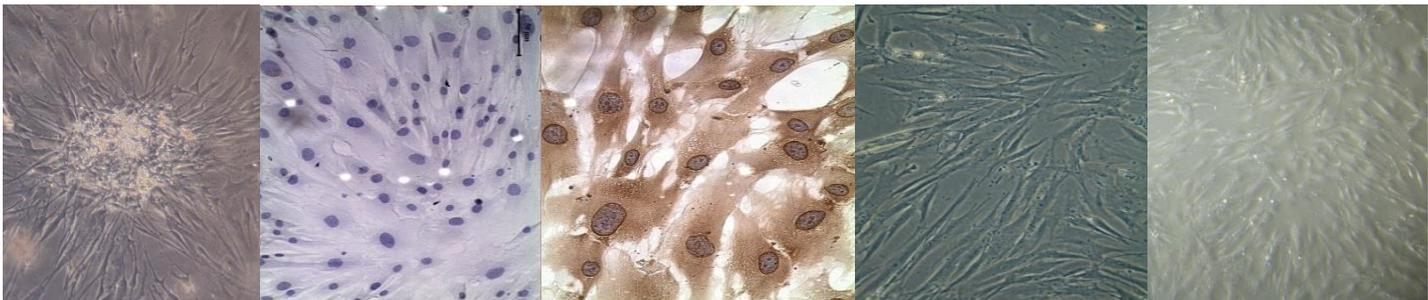
**Figura 19:** (A) Marcação com anti-betacatenina em aumento de 20x. (B) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (C) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (D) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (E) Marcação com anti-PCNA em aumento de 40x. (F) Marcação com anti-PCNA em aumento de 40x.....43

# *Lista de Tabelas*



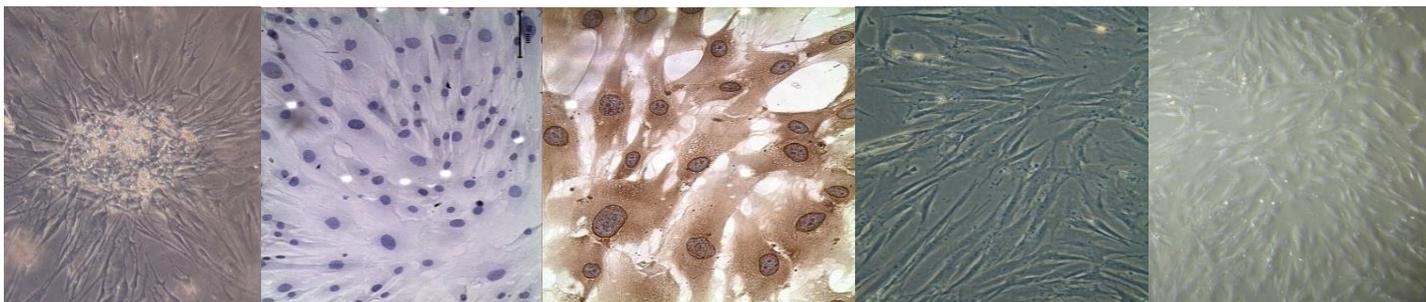
<b>Tabela 1</b> - Escala de gravidade da DEVH ocular crônica segundo <i>International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus, 2013</i> .....	11
<b>Tabela 2</b> - Diagnóstico da DEVH ocular crônica, segundo <i>International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus, 2013</i> .....	12
<b>Tabela 3</b> - Comparação entre componentes da lágrima e do soro.....	14
<b>Tabela 4</b> - Doenças de base dos pacientes e resultados de sorologia.....	29

# *Lista de Gráficos*



<b>Gráfico 1:</b> Distribuição dos pacientes quanto ao sexo.....	25
<b>Gráfico 2:</b> Distribuição dos pacientes com indicação de soro autólogo de uso ocular, por faixa etária.....	26
<b>Gráfico 3:</b> Produção de autocolírio, em número de frascos de 8ml, por paciente.....	27
<b>Gráfico 4:</b> Quantidade de frascos de colírio liberada por paciente desde o início do Tratamento.....	28
<b>Gráfico 5:</b> Comparação entre os tempos de quebra do filme lacrimal pré e pós Tratamento.....	31
<b>Gráfico 6:</b> Acuidade visual do paciente 1.....	32
<b>Gráfico 7:</b> Acuidade visual do paciente 2.....	32
<b>Gráfico 8:</b> Acuidade visual do paciente 3.....	32
<b>Gráfico 9:</b> Acuidade visual do paciente 4.....	32
<b>Gráfico 10:</b> Acuidade visual do paciente 5.....	33
<b>Gráfico 11:</b> Acuidade visual do paciente 6.....	33
<b>Gráfico 12:</b> Acuidade visual do paciente 7.....	33
<b>Gráfico 13:</b> Acuidade visual do paciente 8.....	33
<b>Gráfico 14:</b> Representação gráfica da evolução das puntatas.....	34

# *Lista de Abreviaturas*



APABO: Associação Panamericana de Banco de Olhos  
APCs: células apresentadoras de antígenos  
BUT: *break up time*  
CTA: células-tronco adultas  
CTE: células-tronco embrionárias  
CTH: células-tronco humanas  
CT-TE: células-tronco tecido específicas  
DEVH: doença do enxerto *versus* hospedeiro  
DMEM: Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium  
D-PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline  
EGF: fatores de crescimento epidermais  
FCDP: fatores de crescimento derivados de plaquetas  
HEPES: Hydroxyethyl Piperazineethnesulfonic  
IFN- $\gamma$ : interferon gama  
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina  
IL-1: interleucina 1  
IL-2: interleucina 2  
IL-12: interleucina 12  
KSFM: Keratinocyte serum free medium  
LES: lúpus eritematoso sistêmico  
NK: células natural Killer  
PCNA: Proliferating cell nuclear antigen  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta  
POP: Procedimento Operacional Padrão  
PRP: plasma rico em plaquetas  
SAUOC: soro autólogo de uso ocular  
SOS: Síndrome do Olho SEco  
TGF- $\beta$ : fator  $\beta$  de crescimento e transformação  
TMO: transplante de medula óssea  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

# *Sumário*



## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>I.1 Anatomia do olho humano</b> .....	2
<b>I.1.1 Limbo</b> .....	3
<b>I.2 Propriedades Fisiológicas da Lágrima</b> .....	5
<b>I.3 Síndrome do OlhoSeco (SOS)</b> .....	6
<b>I.3.1 Síndrome de Sjögren</b> .....	7
<b>I.3.2 Artrite Reumatóide</b> .....	8
<b>I.3.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico</b> .....	9
<b>I.3.4 Doença Enxerto-<i>versus</i>-Hospedeiro (DEVH)</b> .....	9
<b>I.3.5 Síndrome de Stevens Johnson</b> .....	12
<b>I.4 Tratamento</b> .....	13
<b>I.5 Exames Oftalmológicos</b> .....	13
<b>I.6 Produção de Colírio a Partir de Soro Autólogo e Sangue de Cordão umbilical</b> .....	13
<b>I.7 Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas</b> .....	16
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>II.1 Objetivo Geral</b> .....	17
<b>II.2 Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>III. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	18
<b>III.1 Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (<i>Break up time</i> – BUT)</b> .....	20
<b>III.2 Presença de Puntatas</b> .....	20
<b>III.3 Acuidade Visual</b> .....	20
<b>III.4 Preparo do Colírio Produzido com Soro Autólogo</b> .....	20
<b>III.5 Preparo dos Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas</b> .....	21
<b>III.6 Obtenção do Anel Córneo-escleral</b> .....	21
<b>III.7 Cultivo de Células</b> .....	22
<b>III.8 Preparo das Placas do Experimento</b> .....	23
<b>III.9 Análises Morfológicas</b> .....	24

<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>IV.1</b> Análise dos Dados dos Pacientes.....	25
<b>IV.2</b> Análise dos Prontuários.....	30
<b>IV.2.1</b> Tempo de Quebra do Filme Lacrimal ( <i>Break up time</i> – BUT).....	31
<b>IV.2.2</b> Acuidade Visual.....	31
<b>IV.2.3</b> Presença de puntatas.....	33
<b>IV.3</b> Cultura Celular.....	35
<b>IV.3.1</b> Células cultivadas em meio DMEM <i>Knockout</i> .....	35
<b>IV.3.2</b> Células cultivadas em meio <i>Keratinocyte</i> .....	38
<b>IV.3.3</b> Imunohistoquímica.....	40
<b>IV.3.3.1</b> Controle negativo da reação.....	40
<b>IV.3.3.2</b> Células cultivadas em meio DMEM <i>Knockout</i> .....	41
<b>IV.3.3.3</b> Células cultivadas em meio <i>Keratinocyte</i> .....	42
<b>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45

# *Introdução*



## I. INTRODUÇÃO

Este trabalho foi delineado a partir de uma parceria com o Serviço de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Esta parceria foi formada em 2008 pela necessidade de se abordar pacientes com a síndrome do olho seco (SOS) com propostas terapêuticas alternativas, em função da ausência de resultados com tratamentos convencionais. Diante disto, e sob a aprovação do Comitê de Ética, o serviço de oftalmologia passou a encaminhar casos refratários de SOS para o Hemocentro, com intuito de produzir o soro autólogo de uso ocular que passou a ser denominado de SAUOC.

De 2008 a 2013, doze pacientes foram encaminhados para o serviço. Como se trata de uma forma inovadora de abordar a SOS e apesar dos testes de controle de qualidade durante o processo de produção, optou-se por analisar a efetividade dos colírios autólogos que estão sendo produzidos e analisar a eficácia dos mesmos em cultura de células oriundas do anel córneo-escleral.

Esta possibilidade surgiu em função da análise dos profissionais da oftalmologia que encaminhavam os pacientes para o Hemocentro. Fundamentalmente dois oftalmologistas: Dr. Alvio Isao Shiguetatsu e Profa. Dra. Amélia Kamegasawa. Dr Alvio assumiu a partir de novembro de 2012 como presidente, no Brasil, da Associação Panamericana de Banco de Olhos (APABO). A escolha aconteceu durante o encontro anual da Academia Americana de Oftalmologia, em Chicago. A indicação leva em consideração aspectos como: posição do membro na direção técnica de um banco de olhos, participação nas reuniões e cursos, conhecimento técnico, relacionamento com os demais membros diretores de bancos de olhos, além de disposição e disponibilidade. A APABO tem como propósitos: incentivar a correta estruturação e o aperfeiçoamento dos Bancos de Olhos já em funcionamento; estabelecer procedimentos uniformes para o funcionamento dos Bancos de Olhos; proporcionar controle de qualidade no processamento dos tecidos oculares doados; propiciar a aprovação de uma legislação adequada para o funcionamento dos Bancos de Olhos; estimular a realização de campanhas educativas e de divulgação para conscientizar a população sobre a importância da doação de córneas e promover o aumento do número de doações, entre outros. O Banco de Tecidos Oculares do HC-FMB existe desde 2005, estando atualmente sob a coordenação do Dr. Alvio. Desde o início de suas atividades, já captou mais de 3.000 córneas, sendo classificado como um dos melhores bancos do país pelo número de doadores por milhão de habitantes.<sup>1</sup>

Após o processo de captação da córnea, o material, já no Banco de Tecidos Oculares sofre processamento, onde o anel córneo-escleral, rico em células, é retirado e desprezado. Delineou-se então o presente trabalho com foco no controle da qualidade do soro autólogo de uso ocular, mas

utilizando as células do anel córneo-escleral, em condições de cultura celular, na presença de soro alogênico, nas mesmas condições de preparo do SAUOC. A decisão de se utilizar o soro alogênico está relacionada ao fato de que quando o doador vai ter as córneas retiradas, isto ocorre com “coração parado”, ou seja, quando já ocorreu uma reversão completa no perfil das citocinas, as quais poderiam dar resultados negativos para a pesquisa.

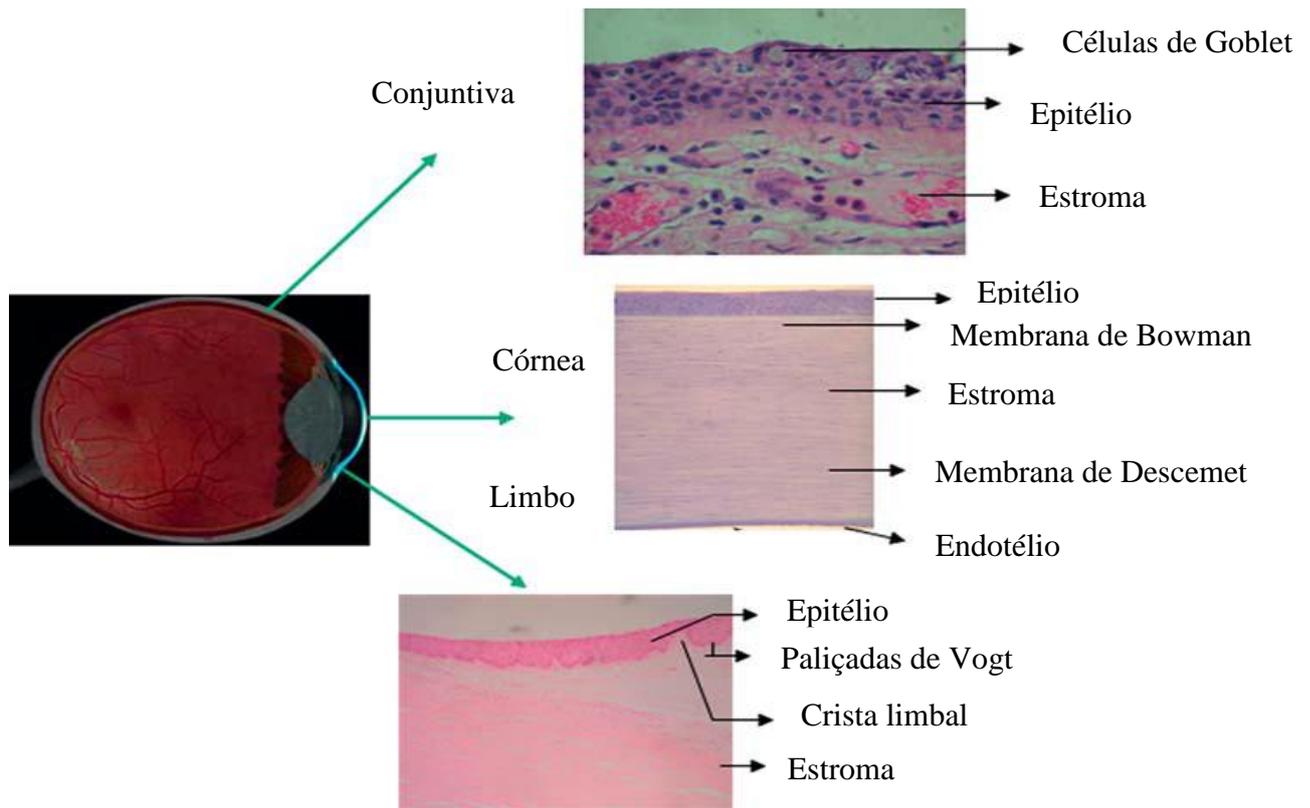
A necessidade do teste de desempenho em cultura surgiu diante do fato de que os controles estabelecidos no Procedimento Operacional Padrão (POP)<sup>2</sup>, são aqueles que garantem a semelhança do colírio preparado com a lágrima, controles microbiológicos e sorológicos. Diante da comprovação do benefício relatado pelos pacientes e dos achados oftalmológicos, a confirmação do efeito em cultura celular tornará o produto tecnicamente mais aceito e poder-se-á disponibilizar o POP, para demais serviços.

Tendo em vista que o foco da indicação do SAUOC é a SOS, passaremos a revisar pontos importantes sobre o olho humano, produção da lágrima e as causas da SOS.

## **I.1 Anatomia do Olho Humano**

O conhecimento da forma e relação entre os tecidos do olho facilita a compreensão dos mecanismos das doenças e do desempenho das células na cultura celular.

Pode-se dividir o olho humano em três camadas. A camada interna é composta pela retina e pela coróide. A camada média ou úvea é composta pela íris e pelo corpo ciliar e a camada externa é composta pela córnea, esclera, junção córneo-escleral (limbo) e conjuntiva.<sup>3</sup> (**Figura 1**)

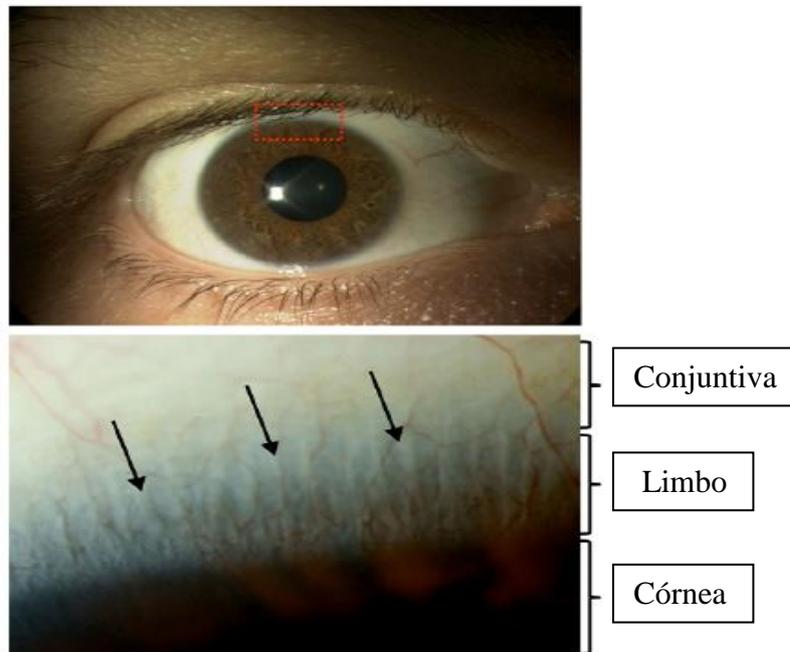


Fonte: Adaptado de *Limbalstem cells: application in ocular biomedicine*

**Figura 1** - Camada externa do olho humano

### I.1.1 Limbo

O limbo é uma estrutura anatômica da superfície ocular que mede de 1,5 a 2,0 mm e corresponde à zona de transição entre a esclera e a córnea.<sup>4</sup> (Figura 2)



*Fonte: Adaptado de Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease.*

**Figura 2** - Localização do limbo no olho humano

Nesta região é possível encontrar grande quantidade de células-tronco, as quais são importantes para a renovação constante do epitélio da córnea.<sup>5-10</sup>

Este dado foi primeiramente descrito por Davanger & Evensen em 1971, que mostraram que o epitélio da córnea é mantido e renovado por uma população de células encontradas no limbo, função esta muito importante, visto que durante a homeostase as células da córnea são constantemente perdidas.<sup>4,11</sup>

Como a integridade dos tecidos e sua renovação dependem das células-tronco, a destruição das células-tronco do limbo pode levar a desordens que resultam em inflamação crônica, dor, visão danificada e cegueira.<sup>12-14</sup>

Além disso, o limbo é um meio protetor, caracterizado por apresentar vascularização, inervação e proteção contra danos potenciais como luz ultra-violeta, pois apresenta pigmentos de melanina. As paliçadas de Vogt, presentes nesta região, formam uma rede ondulada que permite aproximar os vasos sanguíneos do epitélio basal, fornecendo, assim, maiores quantidades de nutrientes e fatores de crescimento para a córnea.<sup>15,16</sup>

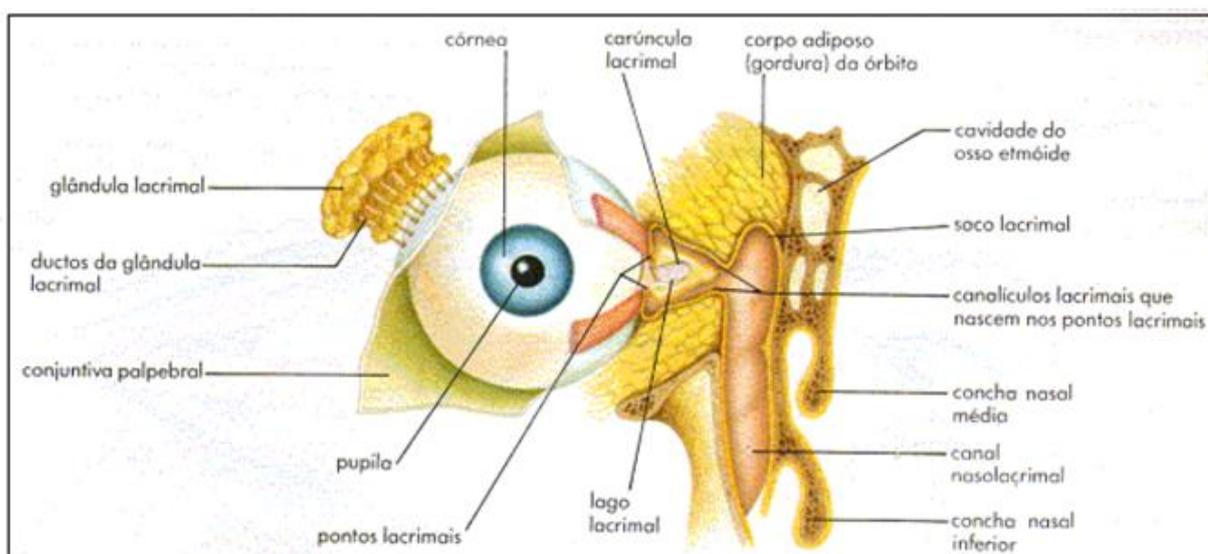
O uso clínico de células-tronco do limbo para o tratamento de doenças relacionadas à perda destas células foi primeiramente descrito em 1997 por Pellegrini *et al.*<sup>17-21</sup>

Muitos estudos mostram que é possível utilizar células-tronco do limbo para uso clínico em casos de restauração de danos da córnea, permitindo a melhora da visão.<sup>22-26</sup>

## I.2 Propriedades Fisiológicas da Lágrima

As lágrimas desempenham fundamental papel fisiológico, pois contêm antimicrobianos, fatores de crescimento, fibronectina e vitaminas importantes para a proliferação e diferenciação do epitélio conjuntivo e da córnea.<sup>27</sup>

A unidade funcional da lágrima consiste nas glândulas lacrimais, pálpebras, nervos motores e superfície ocular (córnea, conjuntiva, filme lacrimal e glândulas sebáceas de Meibomian).<sup>28</sup> (**Figura 3**)



Fonte: Atlas de Anatomia Humana – Demétrio Gowdak & Luisa Henrique Gowdak – FTD

**Figura 3** - Anatomia do olho humano

O filme lacrimal pré-corneano consiste em três camadas: lipídica (externa), aquosa (intermediária) e mucínica (interna).<sup>3</sup>

A camada lipídica é secretada pelas glândulas meibomianas, e tem como função retardar a evaporação da camada aquosa do filme lacrimal e lubrificar as pálpebras. A disfunção dessa camada pode causar olho seco evaporativo.<sup>3</sup>

Secretada pelas glândulas lacrimais, a camada aquosa contém água, proteínas e eletrólitos. Sua função é suprir o epitélio corneano avascular de oxigênio e combater estímulos nocivos. A deficiência dessa camada resulta em olho seco hipossecrator.<sup>3</sup>

A camada mucínica é secretada pelas células calciformes conjuntivais, pelas criptas de Henle e pelas glândulas de Manz. Sua função é de lubrificação e umidificação da córnea. A deficiência dessa camada pode causar problemas evaporativos e hipossecretorios.<sup>29</sup>

### **I.3 Síndrome do Olho Seco (SOS)**

A síndrome do olho seco ou ceratoconjuntivite sicca é uma condição comum ocular relacionada à idade, especialmente em mulheres pós menopausa. Em suas formas mais leves causa desconforto ocular, fadiga e distúrbios visuais que interferem na qualidade de vida. Em suas formas mais graves, provoca dor crônica e comprometimento da visão. Embora seja altamente prevalente e custe bilhões de dólares para gerenciar, os tratamentos atuais têm sido largamente insuficientes, tornando-se uma condição frustrante, tanto para médicos quanto para pacientes.<sup>3</sup>

A SOS é causada por deficiência de função das glândulas lacrimais e perda do componente aquoso da lágrima, bem como por excessiva evaporação provocada por fatores ambientais, como vento e ar condicionado. O olho seco evaporativo pode ocorrer também por deficiência lipídica, mais frequentemente secundária à disfunção da glândula meibomiana e por defeitos de lubrificação do olho pelo filme lacrimal.<sup>30</sup>

Estes distúrbios levam à hiperosmolaridade da lágrima, causando desconforto, estresse pró inflamatório e dano ocular.<sup>31,32</sup>

A SOS é considerada um significativo problema público e estima-se que comprometa entre 14% e 33% da população mundial.<sup>33,34</sup>

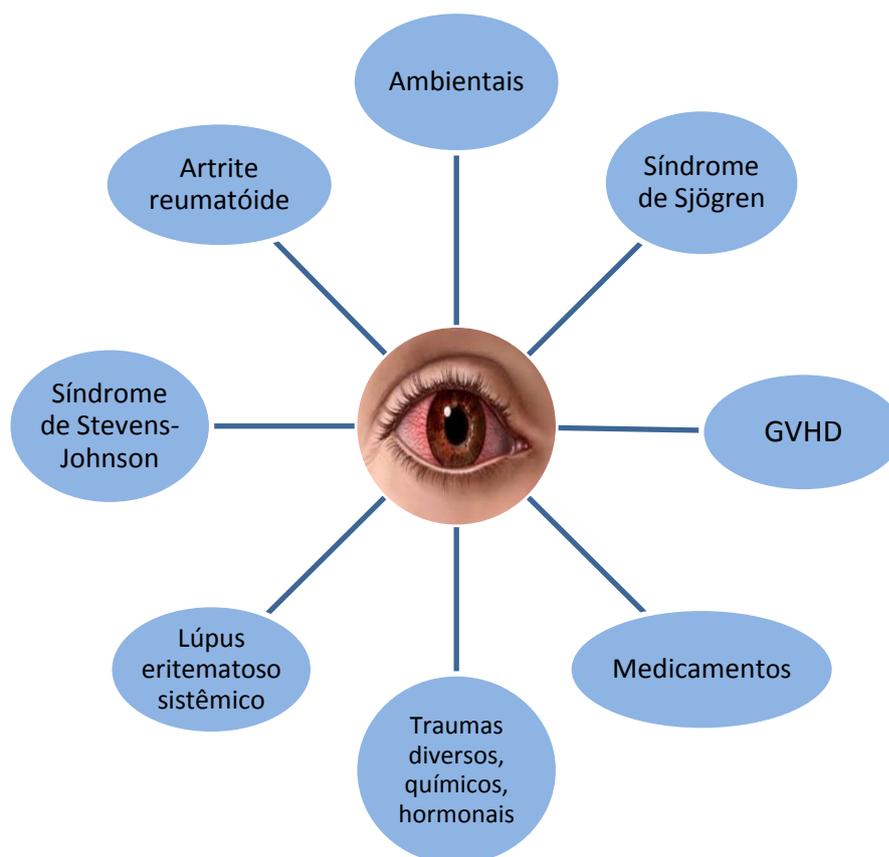
Com relação aos achados clínicos, pode-se observar queimação, sensação de corpo estranho, embaçamento transitório da visão, irritação, prurido e fotofobia. Estes sintomas se intensificam na exposição a ar condicionado, vento e leitura prolongada.<sup>4</sup>

Pacientes com olho seco apresentam erosões epiteliais denominadas puntatas, que podem ser encontradas na córnea. Além disso, essa doença predispõe a ceratite bacteriana e úlcera, que pode levar à perfuração.<sup>35,36</sup>

A fisiopatologia da síndrome está relacionada às condições que levam à evaporação da lágrima, baixa produção do filme lacrimal e inflamação. A diminuição da quantidade de lágrima secretada e hiperosmolaridade da lágrima promovem inflamação da superfície ocular, levando à instabilidade do filme lacrimal. A infiltração de células T na glândula lacrimal e produção de citocinas pró inflamatórias contribuem para o aumento da inflamação local. Os mediadores

inflamatórios encontrados na lágrima incluem diversas citocinas, como interleucina1 (IL-1), fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e proteases<sup>35</sup>.

Diversas são as causas do olho seco, podendo também ser um distúrbio secundário a doenças como Síndrome de Sjögren, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença do enxerto *versus* hospedeiro (DEVH) e Síndrome de Stevens-Johnson. (**Figura 4**)



**Figura 4** - Causas da Síndrome do Olho Seco

### I.3.1 Síndrome de Sjögren

A Síndrome de Sjögren foi primeiramente relatada em 1933, quando Henrik Sjögren apresentou achados clínicos e histológicos de 19 mulheres que apresentavam sintomas como olho seco.<sup>36</sup>

É uma doença inflamatória crônica autoimune que se caracteriza principalmente por olhos e boca secos devido à destruição das glândulas lacrimais e salivares pelo sistema imune. Outras

glândulas secretoras também podem ser acometidas, como as localizadas na nasofaringe, vias aéreas superiores e vagina.<sup>37-41</sup>

Esta síndrome é classificada em primária, quando não está associada a outras doenças autoimunes, e em secundária, quando está associada a enfermidades autoimunes, como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico.<sup>37,42</sup>

Estudo realizado na Espanha mostrou que a prevalência da Síndrome de Sjögren secundária em pacientes com artrite reumatoide foi de 17% após 10 anos de duração da doença e de 25% após 30 anos de doença.<sup>43</sup>

As glândulas salivares e lacrimais estão envolvidas em um processo autoimune em que autoanticorpos provocam a destruição dos ácinos e ductos glandulares, com ativação de processo inflamatório e infiltração linfocítica que tem por consequência a hipossecreção de saliva e lágrima.<sup>44</sup>

Aproximadamente 30% dos pacientes com Síndrome de Sjögren desenvolvem manifestações extraglandulares, como fenômeno de Baynaud, neuropatia periférica e vasculite. A desordem infiltrativa linfocítica leva à doença linfoproliferativa, especialmente linfoma de células B, que ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes com Síndrome de Sjögren.<sup>45</sup>

Muitos estudos têm sido realizados para analisar o papel dos fatores genéticos e ambientais na patogênese da Síndrome de Sjögren. Sugere-se que alguns vírus são potenciais agentes causadores da doença, como Epstein-Barr vírus, HTLV-1 e vírus coxsackie.<sup>39</sup>

Fatores ambientais, como a infecção viral, afetam glândulas exócrinas e estimulam as células dendríticas ou glandulares a ativar o sistema imune inato. Isto leva à produção de citocinas pelas células epiteliais do local. Os linfócitos migram para dentro das glândulas em resposta às citocinas, aderem às moléculas de adesão vascular e interagem com as células dendríticas e epiteliais.<sup>45</sup>

Subsequentemente ocorre ativação de mecanismos de dano tecidual, como apoptose, resultando em infiltração crônica das glândulas afetadas, fibrose e perda da função normal.<sup>46</sup>

### **I.3.2 Artrite Reumatóide**

A artrite reumatoide é uma doença crônica e inflamatória que afeta principalmente as articulações. Ocorre pela resposta autoimune contra auto-antígenos, causando ativação das células T auxiliares CD4+. As células T ativadas produzem citocinas que ativam as células fagocitárias, liberando enzimas que causam a degradação do tecido. Além disso, as células T

estimulam as células B, levando à produção de anticorpos. A evolução clínica é variável, sendo que em alguns pacientes pode evoluir para destruição articular progressiva.<sup>47</sup>

### **I.3.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico**

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo que se caracteriza por acometer diversos órgãos, principalmente articulações, pele, células sanguíneas, vasos sanguíneos, membranas serosas, rins e cérebro. Pacientes com esta doença apresentam importantes distúrbios imunológicos, com a presença de autoanticorpos dirigidos, sobretudo contra antígenos nucleares.<sup>48</sup>

### **I.3.4 Doença Enxerto-versus-Hospedeiro (DEVH)**

Sabe-se que em média 25.000 transplantes alogênicos de medula óssea são realizados no mundo anualmente, sendo que grande parte dos pacientes passam a apresentar a SOS após o transplante.<sup>49</sup>

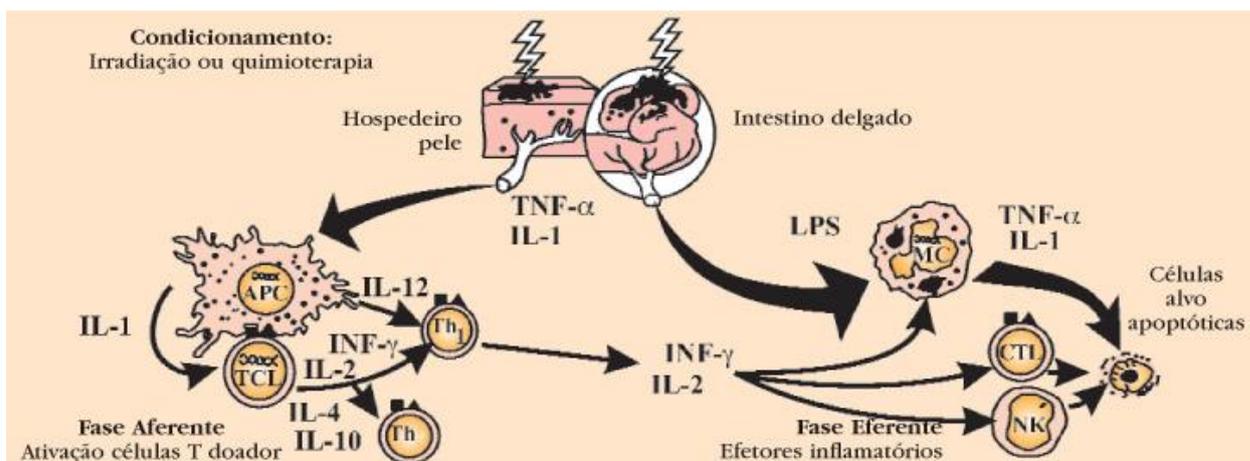
Há vários fatores de risco que predispõem ao desenvolvimento de DEVH crônica. Estes incluem: idade do doador ou receptor e doador-receptor que apresentem disparidade genética.<sup>24</sup>

A DEVH é uma síndrome sistêmica que ocorre quando células T imunologicamente competentes são transplantadas em paciente com deficiência imunológica.

Isto pode acontecer no transplante de medula óssea e órgãos sólidos ricos em células linfóides e após transfusão de sangue não irradiado. As células T transplantadas reconhecem o tecido do paciente como “estranho”, reagindo contra ele.<sup>49</sup>

Esta doença é a maior complicação do transplante de medula óssea alogênico, podendo ser dividida em aguda e crônica de acordo com o tempo e achados clínicos e histopatológicos.

A DEVH aguda se desenvolve nos primeiros três meses após o transplante de medula óssea (TMO) alogênico e caracteriza-se clinicamente pela tríade: exantema, icterícia (hepatite) e gastroenterite. Os principais danos ocorrem no sistema imune, pele, fígado, pulmões e trato gastrointestinal. As manifestações cutâneas são em geral o primeiro sinal da doença, caracterizada por eritema nas palmas das mãos e plantas dos pés, precedida por sensação de queimação ou prurido. A resposta imune da doença aguda ocorre em duas fases: aferente e eferente. Na fase aferente células T CD 4+ e CD 8+ reagem a aloantígenos classe I e II dos hospedeiros na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). (**Figura 5**)



Fonte: Silva et al. An Bras Dermatol, 2005

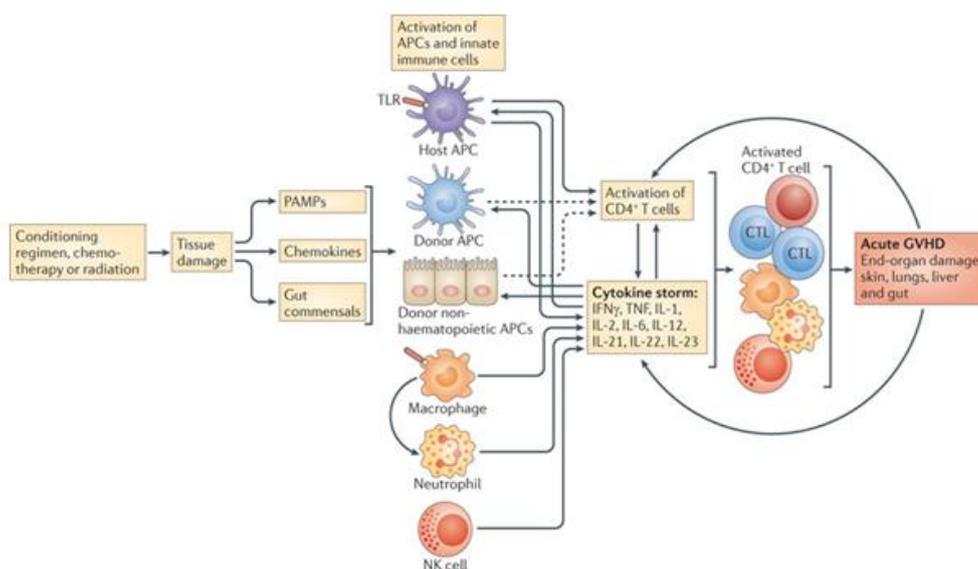
**Figura 5** - Imunofisiopatologia da DEVH: respostas aferente e eferente

O regime de condicionamento (irradiação ou quimioterapia) inicia a resposta imune pelo dano aos tecidos do hospedeiro com indução da liberação de citocinas, principalmente IL-1 e TNF- $\alpha$ . As células T são estimuladas pela IL-1 a produzir interleucina 2 (IL-2). Sob a influência da IL-2, as células T CD 4+ e CD 8+ expandem-se clonalmente e se diferenciam em células efetoras, as quais induzem a resposta enxerto-*versus*-hospedeiro. Essas células efetoras são ativadas pelo interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 12 (IL-12) em células efetoras T helper1, as quais direcionam a resposta enxerto contra hospedeiro.

A fase eferente não é ainda bem compreendida, mas sabe-se que as células T ativadas produzem citocinas, como IL-2 e IFN- $\gamma$ . Esses mediadores parecem recrutar e ativar células efetoras, como linfócitos adicionais, macrófagos e células natural Killer (NK) que atacam tanto os tecidos do doador, como do hospedeiro.

Com relação à DEVH crônica, é uma síndrome multiorgânica e ocorre geralmente três meses após o TMO. É classificada quanto à extensão em: localizada, quando só a pele e/ou o fígado estão envolvidos, e extensa, quando outros órgãos estão envolvidos.

A DEVH crônica caracteriza-se pelo dano epitelial mediado por células mononucleares e fibrose. Linfócitos T citotóxicos CD 8+ predominam no infiltrado e podem induzir dano tecidual. Além destas, outras células efetoras como NK, macrófagos, mastócitos e citocinas podem mediar a citotoxicidade. A ativação crônica e a degranulação dos mastócitos contribuem para a indução da fibrose. A ativação policlonal de células B pode resultar na formação de auto-anticorpos, como antinuclear, antiplaquetário e fator reumatóide.<sup>50</sup> (Figura 6)



Fonte: Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. *Advances in graft-versus-host disease biology and therapy*, 2012

**Figura 6** - Imunofisiopatologia da DEVH

Sendo assim, uma das consequências da DECH é o olho seco, decorrente da formação de fibrose da glândula lacrimal devido à presença de linfócitos T (CD4 e CD8) periductais.<sup>50,51</sup> Em 2013 o *International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease Consensus* estabeleceu parâmetros como critério diagnóstico com determinação da gravidade e graduação da DEVH ocular. Estes critérios estão representados nas duas tabelas abaixo que relacionam uma escala de gravidade e presença ou ausência de doenças sistêmicas.<sup>51</sup>

**Tabela 1 – Escala de gravidade da DEVH ocular crônica segundo *International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus, 2013***

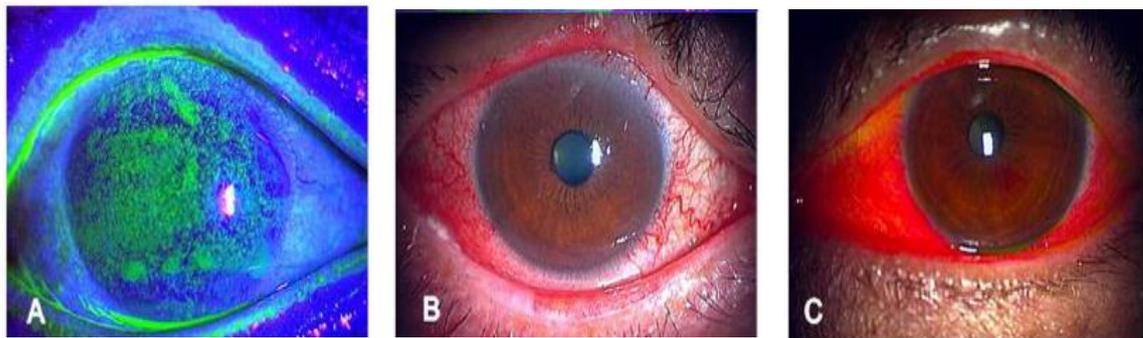
Escore de gravidade	Teste de Schirmer (mm)	Escore de coloração da córnea por fluoresceína	Índice de doença de superfície ocular	Hiperemia conjuntival (pontos)
0	> 15	0	<13	Nenhuma (0-4)
1	11-15	< 2	13-22	Pequena a moderada (5-8)
2	6-10	2-3	23-32	Grave (9-11)

**Tabela 2 – Dianóstico da DEVH ocular crônica, segundo *International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus, 2013***

Escore de gravidade	Nenhum (pontos)	DEVH provável	Índice de doença de superfície ocular
Ausência de DEVH sistêmico	0-5	6-7	<13
Presença de DEVH sistêmico	0-3	4-5	13-22

Neste consenso estabeleceu-se que a DEVH crônico ocular ocorre em 70,4% de pacientes que apresentam outra DVHD sistêmica crônica, mas que em 17,7% dos casos a DEVH crônico ocular apresenta-se isoladamente. Usando apenas o teste de Schirmer o resultado falso negativo é de 22,7%.

A **Figura 7** representa os aspectos da coloração com fluoresceína com os respectivos escores de gravidade segundo Ogawa *et al*, 2013.<sup>52</sup>



**Figura 7** - Resultados da superfície ocular em casos típicos de DEVH ocular crônica. (A) imagem representativa com coloração por fluoresceína (Escore 3). Nota-se epiteliopatia ponteada difusa sobre a córnea de um paciente com DEVH crônica relacionada ao olho seco. Linhas Gray (Meibolines sobre margem da pálpebra superior e inferior) estão distorcidas. (B) Hiperemia conjuntival grave (injeção na superfície ocular danificada) escore 2. (C) Coloração de Rosa Bengala - conjuntiva ocular na superfície gravemente danificada.

### **I.3.5 Síndrome de Stevens-Johnson**

A Síndrome de Steven Johnson é uma doença inflamatória aguda que afeta principalmente a pele e membranas mucosas, incluindo a superfície ocular. Caracteriza-se por uma reação de hipersensibilidade mediada por células imunes a drogas ou microorganismos. Na fase aguda da doença, pode ocorrer conjuntivite que pode levar a dano severo na córnea.<sup>53</sup>

Após a fase aguda, os pacientes frequentemente continuam com problemas na superfície ocular, como olho seco e inflamações.<sup>54</sup>

#### **I.4 Tratamento**

O tratamento do olho seco tem como principais objetivos aliviar o desconforto e prevenir dano corneano estrutural. Mais de um dos tratamentos descritos a seguir podem ser utilizados simultaneamente.<sup>32</sup>

✓ Preservação da lágrima existente

Redução da temperatura ambiental para evitar a evaporação da lágrima, umidificação do ambiente, substitutos lacrimais, como colírios, géis e pomadas.

✓ Redução da drenagem lacrimal

A oclusão do ponto lacrimal preserva a lágrima natural e prolonga o efeito dos colírios artificiais. A oclusão pode ser temporária, reversível, a longo prazo ou permanente.

✓ Outras opções

Ciclosporina tópica: reduz a inflamação mediada por células do tecido lacrimal

Agentes colinérgicos orais: efetivos no alívio da boca seca (xerostomia)

#### **I.5 Exames Oftalmológicos**

Alguns exames oftalmológicos são muito importantes para o diagnóstico do olho seco, como o tempo de ruptura do filme lacrimal (*break up time* – BUT), presença de puntatas e acuidade visual. Estes testes estão descritos no capítulo Casuística e Métodos.

#### **I.6 Produção de Colírio a Partir de Soro Autólogo e Sangue de Cordão Umbilical**

O tratamento do olho seco consiste na reposição da lágrima para aumentar a umidade da superfície ocular e melhorar a lubrificação. É realizado com colírios que contêm conservantes que impedem a proliferação de micro-organismos. Entretanto, esta terapia substitutiva da lágrima apresenta limitações, visto que estes colírios não possuem a complexa composição da lágrima natural, não sendo eficaz em alguns casos. Além disso, os conservantes podem ocasionar toxicidade e alergia.<sup>31</sup>

Sendo assim, buscaram-se novas alternativas de terapia, sendo observado que o colírio produzido com soro autólogo é um tratamento eficaz para distúrbios oculares, como

anormalidades encontradas no epitélio ocular e olhos secos, além de ser um produto não tóxico para o organismo e de baixo custo.<sup>55,56</sup>

O soro contém uma grande variedade de fatores de crescimento, vitaminas e imunoglobulinas, sendo que alguns destes estão em maior concentração no soro quando comparados com a lágrima (**Tabela 3**).<sup>57</sup>

**Tabela 3** - Comparação entre componentes da lágrima e do soro

	LÁGRIMA	SORO
<b>pH</b>	7,4	7,4
<b>EGF (ng/mL)</b>	0,2-3,0	0,5
<b>TGF-β (ng/mL)</b>	2-10	6-33
<b>Vitamina A (mg/mL)</b>	0,02	46
<b>Fibronectina (μg/mL)</b>	21	205

Seu uso foi primeiramente descrito por Fox *et al* em 1984. Em seguida, Tsubota *et al* descreveu a presença no soro de fatores de crescimento e vitaminas com potencial epiteliotrófico para a superfície ocular.<sup>57</sup>

O colírio produzido com soro autólogo é indicado no tratamento do olho seco severo. Este tratamento mostrou-se efetivo em doenças como Síndrome de Steven Johnson, ceratite límbica e síndrome do olho seco associada à Síndrome de Sjögren.<sup>58</sup>

O soro autólogo também pode ser utilizado no tratamento da síndrome do olho seco após transplante de células-tronco hematopoéticas. Em estudo realizado em pacientes com doença do enxerto *versus* hospedeiro, foi possível observar melhora significativa após quatro semanas de uso de soro autólogo, sendo que anteriormente todos estes pacientes utilizaram colírio (lágrima artificial) sem melhora do quadro clínico. Os componentes da lágrima, como fatores de crescimento epidermais (EGF) e vitamina A são importantes para a proliferação, diferenciação e maturação do epitélio ocular. O colírio produzido a partir do soro autólogo pode suprir estes fatores e melhorar a condição da superfície ocular.<sup>52</sup>

Embora o mecanismo pelo qual o soro autólogo melhora o olho seco seja desconhecido, há algumas explicações plausíveis. Os componentes da lágrima, também presentes no soro, como fatores de crescimento epidermais e vitamina A são importantes para a proliferação,

diferenciação e maturação do epitélio da superfície ocular. Estudos com culturas de fibroblastos da córnea humana e células endoteliais mostram que estas células expressam fator de crescimento epidermal e têm a síntese de seu DNA aumentada na presença destes fatores.<sup>59</sup>

Estudo de Kojima *et al* comparou soro autólogo e colírio comercial (lágrima artificial) em pacientes que os utilizaram por duas semanas, seis vezes ao dia. Na comparação dos valores de BUT (*Break up time*), exame oftalmológico que indica a instabilidade do filme lacrimal, dos pacientes que usaram colírio com soro autólogo e dos que utilizaram o colírio comercial, o valor do BUT foi significativamente maior no grupo de pacientes que usaram soro autólogo. Considerando que quanto maior o valor do BUT, melhor a produção da lágrima, os pacientes que utilizaram colírio de soro autólogo tiveram melhor desempenho. Além disso, o BUT dos pacientes pré e pós tratamento com soro autólogo aumentou.<sup>60</sup>

Outra alternativa eficaz para o tratamento do olho seco é o colírio produzido a partir de soro de cordão umbilical, o qual contém muitos fatores de crescimento e componentes da lágrima, tais como fatores de crescimento epidermais (EGF), vitamina A, fator  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ), substância P e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Destes, as concentrações de EGF e TGF- $\beta$  são muitas vezes superiores no soro de cordão umbilical quando comparado com soro de sangue periférico.<sup>34</sup>

Vajpayee *et al* compararam a eficácia do soro autólogo e do soro de cordão umbilical no tratamento de doenças epiteliais crônicas e observou-se que o soro de cordão umbilical leva a uma melhora mais rápida do quadro clínico em comparação ao soro autólogo.<sup>4</sup>

Yoon *et al* utilizaram o soro de cordão umbilical para o tratamento da síndrome do olho seco, ceratite neutrofílica e olho seco associado à doença do enxerto *versus* hospedeiro, sendo que o tratamento foi efetivo para todas estas doenças. Especificamente com relação à síndrome do olho seco, os autores observaram que o soro de cordão umbilical foi mais efetivo na diminuição dos sintomas da doença.<sup>58</sup>

Sharma *et al* confirmaram melhor eficácia do soro de cordão umbilical em comparação ao soro autólogo em pacientes submetidos à terapia em casos de queimaduras químicas oculares agudas. Neste estudo foi possível observar que o uso de soro de cordão umbilical proporciona rápido crescimento epitelial, melhor clareza da córnea e melhor diminuição de isquemia do limbo.<sup>61</sup>

Existem outras vantagens do soro de cordão umbilical: a coleta deste material biológico permite obter maior quantidade de soro para a produção do colírio em uma única coleta em comparação ao sangue periférico. Desta forma, um maior número de pacientes pode ser

beneficiado. Além disso, pacientes com sorologia reagentes para HIV, hepatite B e C, sífilis, HTLV I/II e Doença de Chagas têm uma alternativa terapêutica, visto que não podem utilizar colírio produzido com o seu próprio soro, mas podem fazer uso de colírio produzido a partir de soro de cordão umbilical. Esta terapêutica também é uma alternativa para pacientes sem acesso venoso.<sup>61</sup>

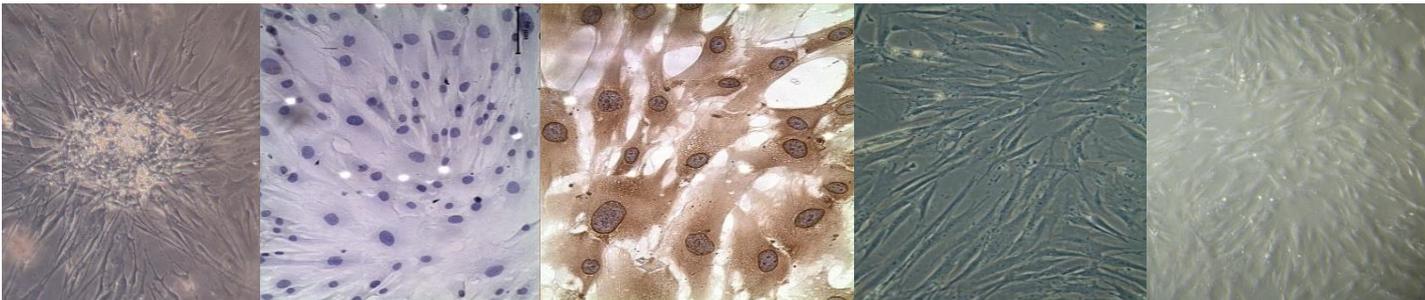
### **I.7 Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas**

Os produtos derivados do sangue, como as plaquetas, têm a capacidade de estimular a regeneração de diferentes tecidos, sendo que os fatores de crescimento derivados de plaquetas (FCDP) têm importante função na reparação tecidual. Estes fatores são utilizados no tratamento de diferentes casos na oftalmologia como defeitos epiteliais da córnea, síndrome do olho seco, síndrome da superfície ocular e na reconstrução da superfície ocular pós perfuração corneana associada com transplante de membrana amniótica.

As plaquetas têm muitos fatores de crescimento e citocinas, as quais estão associadas com o processo de cura e regeneração de tecidos. Os fatores de crescimento que são liberados quando da ativação das plaquetas são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TGF- $\beta$ , IGF e EGF.<sup>62,63</sup>

Sendo assim, muitos estudos têm sido realizados com o plasma rico em plaquetas (PRP), que contém grande quantidade destes fatores de crescimento. O PRP é utilizado na prática clínica em casos de enxertos ósseos, feridas crônicas, colocação de implantes e defeitos de cartilagem.<sup>64</sup>

# *Objetivos*



## **II. OBJETIVOS**

### **II.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o uso de soro autólogo de uso ocular na Síndrome do Olho Seco.

### **II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Analisar os dados médicos/ofthalmológicos dos pacientes que tiveram a indicação de autocolírio (SAUOC), a partir das informações de prontuário;
- ✓ Estabelecer a cultura e expansão de células aderentes obtidas da região córneo-escleral;
- ✓ Identificar os efeitos *in vitro* da ação de colírio obtido a partir de soro humano, em cultura de células da região córneo-escleral;
- ✓ Analisar as células aderentes cultivadas, em meio contendo colírio ou fatores de crescimento derivados de plaquetas, pela técnica de imunohistoquímica;
- ✓ Comparar o desempenho das células aderentes do anel córneo-escleral em dois meios de cultura: DMEM Knockout e Keratinocyte.

# *Casuística e Métodos*



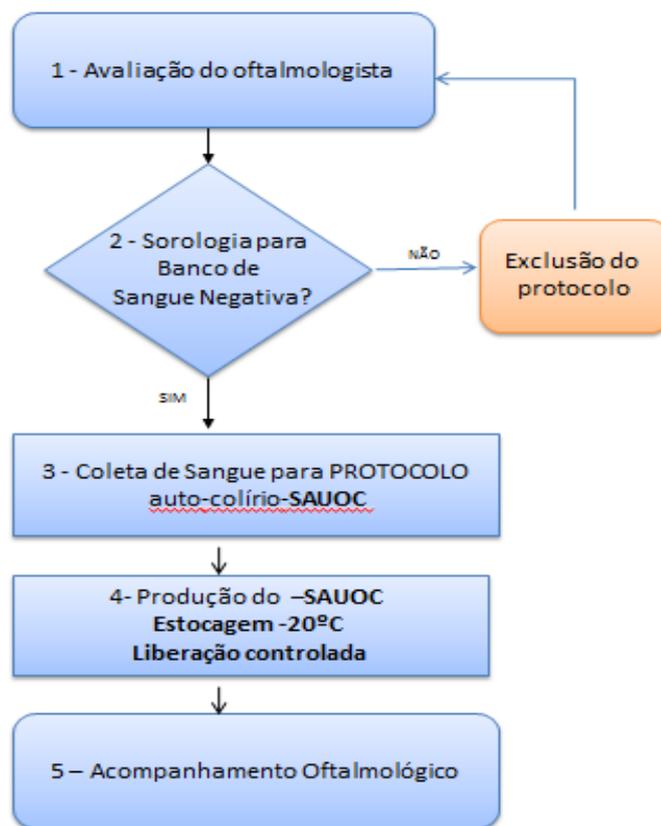
### III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu tem recebido desde 2008 solicitações do Serviço de Oftalmologia para o preparo de soro autólogo de uso ocular (SAUOC) para pacientes com Síndrome do Olho Seco, de etiologia multifatorial, pacientes estes com pobres resultados com outras terapêuticas já instituídas. Com a preocupação de se obter a aprovação do comitê de ética, um pedido especial fora realizado na época, com o intuito de preparar o colírio de soro autólogo, a exemplo do que já se faz em Hemoterapia com a transfusão autóloga.

Esta autorização foi concedida através de termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo CEP e recentemente re-analisado através de projeto cadastrado na Plataforma Brasil, tendo recebido número de registro CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 23941613.2.0000.5411 e aprovação. Portanto, este trabalho consta de diferentes etapas, entre elas, indicação de colírio produzido com soro autólogo por oftalmologista, registro dos achados oftalmológicos, avaliação da hemoterapia, triagem sorológica, processo produtivo do colírio, criopreservação e liberação controlada do mesmo.

No ano de 2013, decidiu-se estabelecer protocolo de análise dos benefícios do SAUOC sobre a cultura de células do anel córneo-escleral, portanto, esta análise não corresponde a estudos prévios. Desta forma, a fase de cultura celular utilizou soro alogênico e não autólogo, como no uso clínico.

Os pacientes foram encaminhados para o Hemocentro com a finalidade de produzir o SAUOC. Após o recebimento do pedido de inter-consulta da oftalmologia, uma consulta com foco em hemoterapia foi realizada por médico hemoterapeuta, com o principal objetivo de identificar fatores de riscos para doenças infecto contagiosas transmissíveis pelo sangue, tais como: Hepatite B e C, HIV, HTLVII, Doença de Chagas e Sífilis. Estas atividades estão sumariamente representadas na **figura 8**.



**Figura 8** - Atividades desenvolvidas desde a indicação do SAUOC até sua liberação para paciente

Para análise dos benefícios ou não instituídos pela produção, liberação e uso do SAUOC por pacientes com Síndrome do Olho Seco, foi realizado levantamento de prontuários dos pacientes atendidos. No período de junho de 2008 até novembro de 2013 (66 meses) foram atendidas 12 solicitações. Os dados inicialmente planilhados foram: sexo, idade, diagnóstico e co-morbidades.

Dentre os exames oftalmológicos registrados nos prontuários de pacientes em uso de colírio de sangue autólogo, destacam-se:

- ✓ Tempo de ruptura do filme lacrimal
- ✓ Presença de puntatas
- ✓ Acuidade visual.

### III.1 Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (*Break up time* – BUT)

Indica a estabilidade do filme lacrimal. Após a instilação de fluoresceína, o paciente deve piscar por várias vezes e parar em seguida. Com o uso de feixe de luz amplo e filtro azul cobalto, após um intervalo de tempo, o paciente é examinado. Linhas ou pontos escuros indicam a formação de áreas ressecadas.<sup>3</sup>

O BUT está no intervalo entre a última piscada dos olhos e o aparecimento ao acaso do primeiro ponto ressecado, sendo que o BUT inferior a 10 segundos é anormal.<sup>3</sup>

Escore em segundos	Interpretação
>10	Olho normal
Entre 5 e 10	Anormalidade em instalação (resultado marginal)
<5	Olho Seco

**Figura 9** - Interpretação clínica do *break up time test*

### III.2 Presença das Puntatas

Puntatas são erosões epiteliais que podem ocorrer na córnea. Podem ser observadas utilizando-se fluoresceína como corante.<sup>3</sup>

### III.3 Acuidade Visual

Principal medida da visão central, a qual é responsável pela percepção das formas, resolução dos detalhes e identificação de cores. A acuidade visual mede o poder de resolução do sistema visual, que é a capacidade de perceber a separação entre dois pontos, propriedade fundamental para a identificação dos objetos e de seus detalhes.<sup>3</sup>

### III.4 Preparo do Colírio Produzido com Soro Autólogo

Após resultados sorológicos, os pacientes com todas as análises não reagentes para as doenças infecciosas estudadas tiveram uma amostra de sangue total coletado por veno-punção sem a presença de anticoagulante (coleta em tubo seco). Estes foram colocados em banho-maria

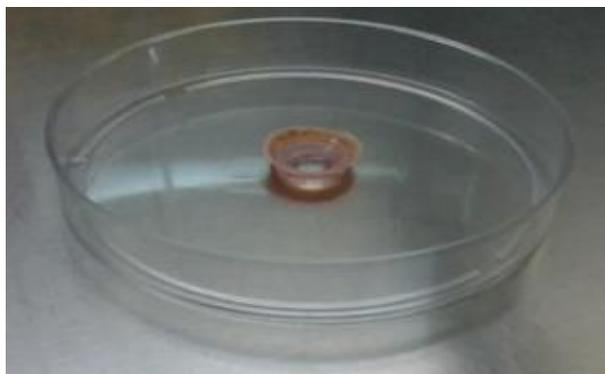
a 37°C por 2 horas para retração do coágulo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido, em condições estéreis, para tubo cônico de 50 mL, onde foi feita a diluição do soro com solução fisiológica na proporção de 1:2. Após filtração do soro, o mesmo foi mantido em geladeira.<sup>2</sup>

### III.5 Preparo dos Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas (FCDP)

Foram selecionadas três bolsas de concentrado de plaquetas, duas de tipagem AB+ e outra de tipagem AB negativo, descartadas para uso clínico devido o prazo de validade vencido. O conteúdo das bolsas foi transferido para tubos cônicos de 50 mL, os quais foram mantidos em vórtex para agitação vigorosa e consequente rompimento das plaquetas para liberação dos fatores de crescimento. Após agitação, os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram congelados.<sup>2</sup>

### III.6 Obtenção do Anel Córneo-escleral

O anel córneo-escleral foi obtido com parceria com a OPO (Organização à Procura de Órgãos) e o Banco de Olhos. **(Figura 10)**. A córnea para fins de transplante passa por um processamento em que existe tecnicamente a necessidade de melhorar o tecido com a retirada cirúrgica, em ambiente estéril, do anel córneo-escleral, que em condições cotidianas é descartado como resíduo do serviço de saúde. Em seguida, o anel-córneo escleral foi encaminhado ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu, onde foi mantido em frasco contendo HEPES, antibiótico e antimicótico por 24 horas à temperatura de 4°C.<sup>2</sup>



*Arquivo Pessoal, 2013*

**Figura 10:** Anel córneo-escleral

### III.7 Cultivo de Células

Após ser mantido em geladeira por 24 horas, o anel córneo-escleral foi dissociado em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi, a fim de aumentar a área de contato entre o tecido e a enzima colagenase tipo I, responsável pela digestão do tecido, aumentando a eficiência da digestão enzimática. A solução contendo enzima colagenase tipo I e meio Hydroxyethyl Piperazineethnesulfonic Acid (HEPES) foi de 1 mg/mL. O fragmento, juntamente com a solução, foi mantido durante 15 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C com umidade controlada. Posteriormente, a solução contendo o tecido digerido foi transferido para tubo cônico, no qual foi acrescentado meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino para neutralização da ação enzimática. O tubo foi submetido à centrifugação por 10 minutos, 1.200 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o meio HEPES foi acrescentado para lavagem do *pellet*. A amostra foi centrifugada novamente. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi removido e 1mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM) Knockout contendo 10% de soro fetal bovino, L-glutamina, aminoácidos essenciais e não essenciais, antibiótico e antimicótico foi adicionado para homogeneização do pellet. As células foram então plaqueadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e a visualização das células foi realizada em microscópio invertido com contraste de fase utilizando o equipamento Axiovert 200 da Zeiss<sup>®</sup>.<sup>2</sup>(Figura 11)



*Fonte: Arquivo Pessoal, 2013*

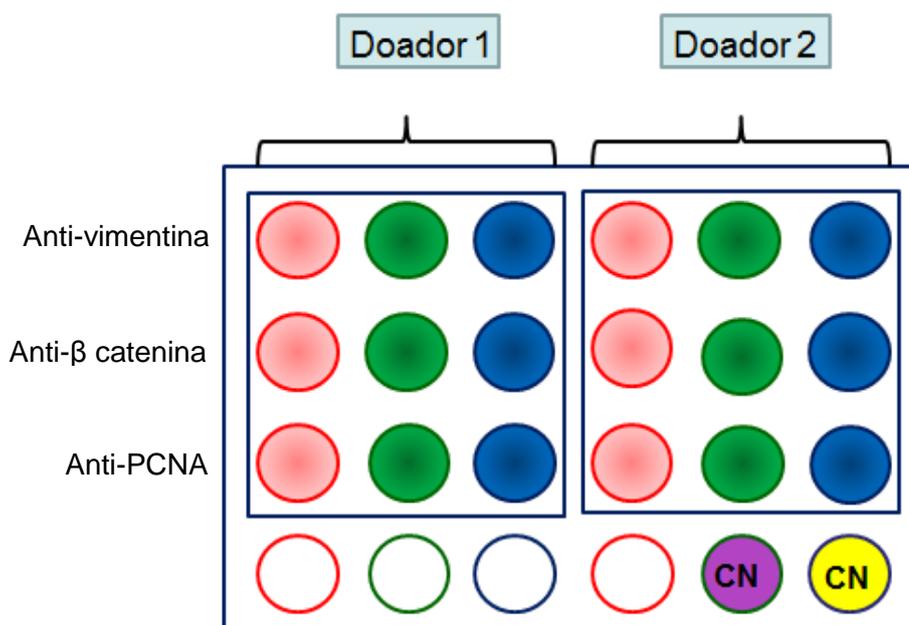
**Figura 11:** Microscópio invertido Axiovert 200 Zeiss<sup>®</sup>

Após obtenção de confluência celular de 80%, as células foram retiradas do frasco de cultura. Este processo, denominado tripsinização, consiste em desprender as células aderidas ao plástico do frasco. Para realizar esta técnica, foi retirado todo o meio de cultura com posterior

lavagem do frasco com HEPES. Em seguida, acrescentou-se a enzima tripsina, mantendo-se o frasco em estufa por 3 minutos. Após análise microscópica do desprendimento das células, adicionou-se meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino para inativar a ação da tripsina. Com pipeta, todo o volume do frasco foi retirado e transferido para tubo cônico, o qual foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos e o *pellet* foi lavado com HEPES. Em seguida, as células foram colocadas em placas com 24 poços, onde foram plaqueadas.

### III.8 Preparo das Placas do Experimento

As células foram plaqueadas na placa de 24 poços de modo que cada amostra de doador foi plaqueada em 9 poços, como mostra a **figura 12**.



**Figura 12:** Representação da placa de experimento

Os poços em vermelho correspondem àqueles em que foram colocadas células para controle, ou seja, sem tratamento. Nestes poços foi acrescentado 1mL de meio com 10% de soro fetal bovino. Os poços verdes representam as células em meio contendo colírio produzido com soro autólogo. A proporção foi de 500µL de meio com 10% de soro fetal bovino e 500µL de colírio. Os poços azuis representam os locais em que foram plaqueadas células tratadas com fatores de crescimento derivados de plaquetas, onde foi colocado 1mL de meio com 10% de soro fetal bovino e 1µL de FCDP. A quantidade de células colocada em cada poço foi  $2,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Os anticorpos descritos na lateral da figura foram os utilizados em cada fileira. Foram utilizados dois meios de cultura: DMEM Knockout ou Keratinocyte, sendo que

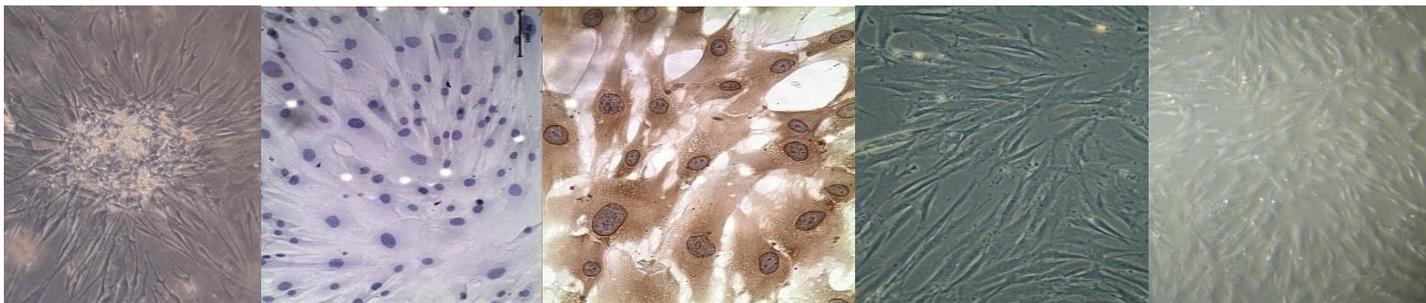
para cada amostra utilizou-se um meio em todo o processo, desde a cultura inicial nos frascos até a placa.

### **III.9 Análises Morfológicas**

Após 28 dias de cultura, as células que cresceram nos poços das placas de cultura foram lavadas com solução de D-PBS<sup>TM</sup> duas vezes e fixadas com solução tamponada de metanol a 10% durante 10 minutos. Os poços contendo células foram então preenchidos com solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas, por 10 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e embebidos em solução contendo 1% de albumina de soro bovino para o bloqueio das interações proteína-proteína não-específicas, durante uma hora. Posteriormente, os poços foram incubados com anticorpos primários contra vimentina (marcador mesenquimal),  $\beta$  catenina (marcador epitelial) e PCNA (marcador de proliferação) em reação *overnight*.

Em seguida, os poços foram lavados em PBS e incubados com o apropriado anticorpo secundário, marcado com peroxidase, durante uma hora e meia. A marcação foi revelada pela diaminobenzidina e os poços foram contra-corados pela hematoxilina para marcação dos núcleos das células cultivadas. Após preparo das lâminas, os resultados foram analisados ao microscópio e fotodocumentados. Todos os métodos descritos acima seguem protocolos publicados modificados.<sup>65</sup>

# *Resultados e Discussão*

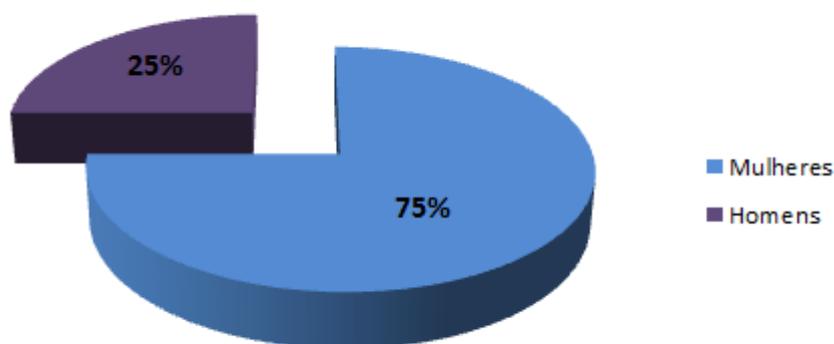


## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV. 1 Análise dos Dados dos Pacientes

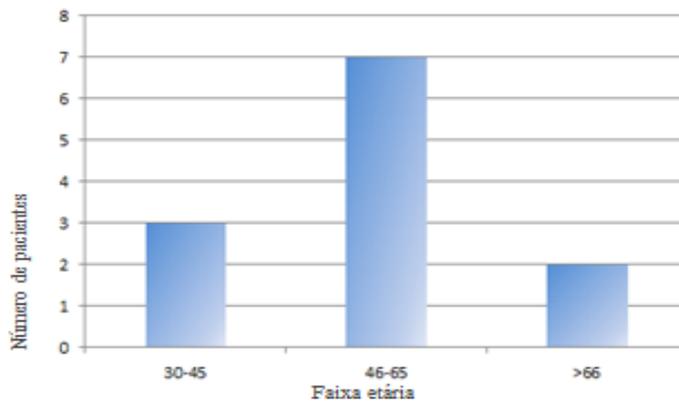
Durante o período de análise de junho de 2008 a novembro de 2013, foram encaminhados 12 pacientes pelo Serviço de Oftalmologia com indicação do uso de SAUOC. Após consulta com hemoterapeuta e avaliação do resultado da sorologia das doenças transmissíveis pelo sangue, 9 deles puderam ser atendidos, enquanto que 3 foram excluídos do protocolo por apresentarem sorologia reagente. Os dados apresentados correspondem aos 12 pacientes encaminhados.

Com relação ao sexo dos pacientes, o *sex-ratio* é de 1homem/4mulheres. **(Gráfico 1)**.



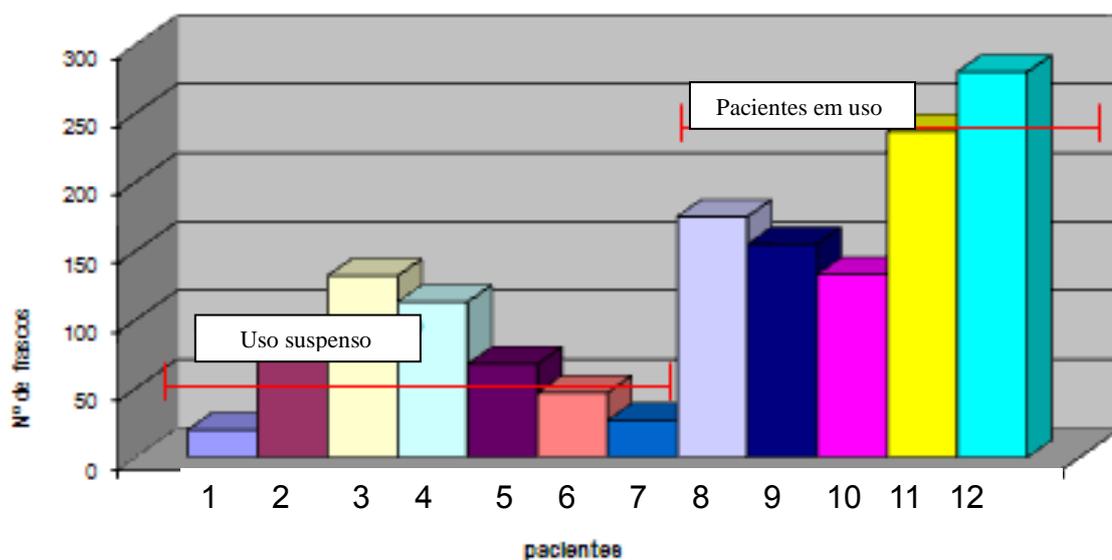
**Gráfico 1-** Distribuição dos pacientes quanto ao sexo

Quanto à distribuição dos pacientes, por faixa etária, observa-se que os extremos correspondem a 33 anos para o paciente de menor idade e 80 anos para o paciente mais velho. No entanto, a média de idade dos pacientes se enquadra na faixa etária entre 46-65 anos, ou seja, idade adulta madura e produtiva. É nesta faixa etária, que o impacto sócio-econômico é maior. Segundo Ana Maria Rossi, presidente da Associação Internacional de Cuidados com estresse, estima-se que o prejuízo com afastamento do trabalho, no Brasil, seja de 3,5% do produto interno bruto do país, considerando faltas, ausências na empresa, presenteísmo (quando a pessoa está fisicamente no local, mas não é produtiva) e a licença médica com todos os problemas de saúde. O prejuízo maior é do trabalhador que sente o prejuízo no seu bem maior: a saúde. Sem ela, ocorre progressivamente a sensação de “desinserção social”. É sabido que pacientes portadores de doenças crônicas como SOS, apresentam alto grau de estresse. **(Gráfico 2)**



**Gráfico 2** - Distribuição dos pacientes com indicação de soro autólogo de uso ocular, por faixa etária.

Durante o período estudado (2008-2013) foram produzidos 1464 frascos de 5ml de SAUOC, perfazendo um total de 11.712 ml de colírio preparado. O material biológico, depois de processado foi embalado em frascos estéreis com conta-gotas, envolvidos com papel alumínio para evitar a ação da luz sobre o produto, e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Em 2008 houve o encaminhamento de apenas 1 paciente que usou o produto por um curto período de tempo e abandonou o seguimento com o serviço (paciente 1). Sequencialmente, os pacientes 2, 3, 4 e 5 tiveram a medicação suspensa, sem o retorno para o Laboratório de Engenharia Celular, ou registro no prontuário, que justificasse a descontinuidade do produto. Os pacientes 6 e 7 tiveram razões sorológicas para a não continuidade do produto. Um deles por sorologia reagente para Doença de Chagas, cujo processo investigatório clínico identificou bloqueio de ramo direito e hemi-bloqueio de ramo esquerdo com doença cardíaca instalada. O outro paciente apresentava sorologia reagente para hepatite B (**Gráfico 3**).



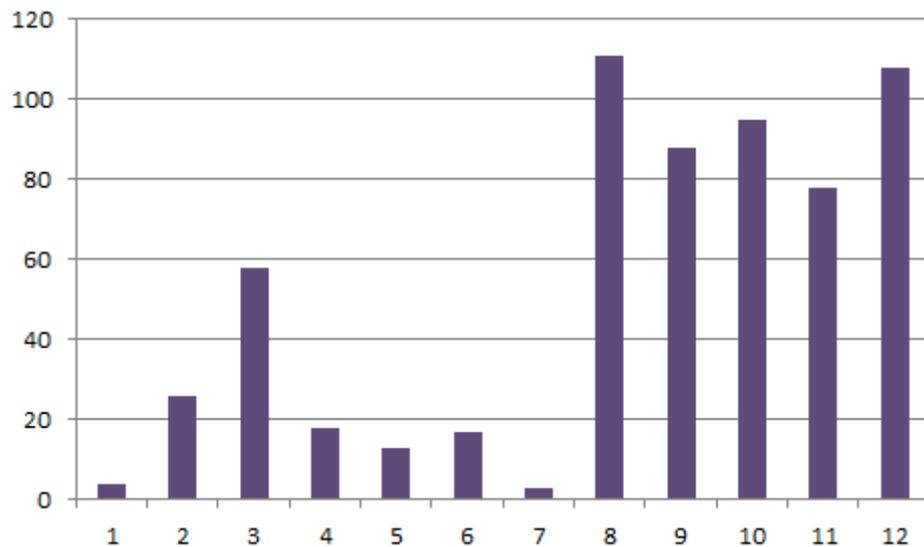
**Gráfico 3** - Produção de autocolírio, em número de frascos de 8ml, por paciente

Do total de frascos produzidos (1.464) somente 980 foram de fato dispensados para os pacientes. Ou seja, foram dispensados 66,93% dos frascos produzidos. Desde o início do tratamento, houve variação quanto à distribuição, visto que alguns pacientes tiveram seus tratamentos com colírio produzido com soro autólogo interrompido devido intercorrências como sorologia reagente (pacientes que estavam em janela imunológica antes do início do tratamento), ou mudança de cidade, o que impedia o comparecimento ao Hemocentro para retirada do produto. Desde o início da produção, ficou estabelecido que o lote de SAUOC produzido seria liberado em quantidades suficientes para uso em 2 meses, tendo em vista, que no congelador doméstico, o produto poderia sofrer danos por congelador superlotado, e até mesmo contaminação, caso fosse aberto de forma inadvertida por pessoa que não soubesse a finalidade do mesmo (**Gráfico 4**).

O percentual de descarte de produto não utilizado está elevado, e fora dos índices preconizados por legislação vigente, para hemocomponentes. O colírio de sangue autólogo pode ser legalmente considerado um hemocomponente especial, de uso não venoso, onde o índice máximo de descarte aceito é de 10%, segundo a portaria nº 2712 de 12 de dezembro de 2013, publicado no DOU nº221, de 13 de novembro de 2013, seção1, página 103.<sup>66</sup>

Apesar de não ter sido realizado perfil de satisfação do cliente com relação ao frasco conta-gotas, levantou-se a hipótese de que os sistemas mais atuais como *Meise vial*, ou *maco tubos* (dosagem/dia) seriam melhores, no entanto, recentemente um artigo publicado identificou

que 67% dos pacientes preferem o frasco conta-gotas. Foram avaliados itens como a conveniência de abertura , aplicação com conta-gotas, preferência do paciente além do número de gotas recuperados. Quanto a este último item, o resultado foi substancialmente melhor para frascos conta-gotas e *Meise vials* quando comparado com *Maco - tubos*.<sup>67</sup>



**Gráfico 4** - Quantidade de frascos de colírio liberada por paciente desde o início do tratamento

Diversas foram as doenças de base dos pacientes com Síndrome do Olho Seco encaminhados ao Hemocentro. Dentre elas, destaca-se a Síndrome de Sjögren, presente em 7 dos 12 pacientes encaminhados (58%) dos casos analisados. (**Tabela 4**)

	<b>DOENÇA</b>	<b>SOROLOGIA</b>
<b>1</b>	Síndrome de Sjögren e Lúpus	Não Reagente
<b>2</b>	Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatóide	Não Reagente
<b>3</b>	DEVH pós TMO	Não Reagente
<b>4</b>	Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatóide	Não Reagente
<b>5</b>	Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatóide	Doença de Chagas
<b>6</b>	Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatóide	Hepatite B
<b>7</b>	Úlcera de Córnea	Hepatite B/HTLV I/II
<b>8</b>	Síndrome de Sjögren	Não Reagente
<b>9</b>	Síndrome de Sjögren	Não Reagente
<b>10</b>	Agenesia de glândula lacrimal	Não Reagente
<b>11</b>	Queimadura Química	Não Reagente
<b>12</b>	Síndrome de Steven Johnson	Não Reagente

**Tabela 4** – Doenças de base dos pacientes e resultados de sorologia

A presença de hepatite B foi identificada em 2 dos 7 pacientes com S. Sjögren (30% dos pacientes), lembrando que a síndrome de Sjögren tem um caráter autoimune, com infiltração linfocitária em glândulas exócrinas, com maior prevalência de soroconversão para doenças virais. O papel da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) em pacientes com síndrome de Sjögren primária ainda não está claro. Chen *et al* investigaram a prevalência e significado clínico da infecção pelo VHB em pacientes portadores de SOS em Taiwan . Os autores analisaram 175 pacientes, dos quais, 18 (10,3%) tinham sorologia reagente para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), sendo portanto um n muito maior e uma prevalência 3 vezes menor que a identificada neste trabalho. Os autores identificaram que não houve alteração quanto à sobrevivência, mas que os resultados sugerem que a infecção pelo HBV pode proteger os indivíduos portadores de SOS de complicações pulmonares. <sup>68</sup>

Destaca-se que no mundo existem 480-520.000.000 pessoas cronicamente infectadas com hepatite B ou C viral. Além de seus efeitos no fígado, infecções virais de hepatite crônica pode ter manifestações extra-hepáticas graves. Essas manifestações têm sido mais amplamente estudadas na infecção crônica de HCV, onde os efeitos deletérios fora do fígado são mais frequentemente descritos, porém eles também têm sido relatados na infecção crônica por HBV.

Entre estas manifestações extra-hepáticas têm sido abordadas as manifestações oculares causadas pela infecção por HBV ou HCV, ou induzidos por terapia anti-viral utilizadas. Os achados clínicos descritos na literatura são: xeroftalmia, úlcera de Mooren e retinopatia. A SOS é uma das manifestações oculares de infecções por HCV melhor descritos pela literatura, principalmente associado à síndrome de Sjögren, e retinopatia isquêmica causado por uma vasculite induzida por HCV ou tratamento com interferon. Não há manifestações oculares graves de infecção pelo HBV que não seja a síndrome do olho seco. Os autores chamam atenção especial para uma possível ligação entre a vacina HBV e uveíte.<sup>69</sup>

Os percentuais de soroprevalência para hepatite B, nos 12 pacientes com SOS, que fizeram ou fazem o uso do SAUOC apontam para a necessidade de aprofundamento e levantamento estatístico, com estudo epidemiológico para se analisar a soroprevalência de Hepatite B e C em paciente portadores de SOS por Sjögren, ou SOS de outra causa, no Serviço de Oftalmologia do HC-FMB/UNESP.

#### **IV.2 Análise dos Prontuários**

A análise física dos prontuários não permitiu coleta consistente dos dados dos 12 pacientes. Desta forma, para o *break up time*, o n foi de 4, ou seja, apenas 33,3% dos pacientes em uso de auto-colírio tiveram este dado registrado de forma sistemática. Para acuidade visual, o dado está mais uniformemente presente nos prontuários, e pode-se recuperar dados de 9 pacientes (75% dos casos). Quanto à presença das puntatas, os dados recuperados correspondem a 66,6% dos pacientes estudados (n=8). A dificuldade identificada nesta etapa do trabalho nos remete a uma reflexão sobre a importância do prontuário médico e as formas de registro.

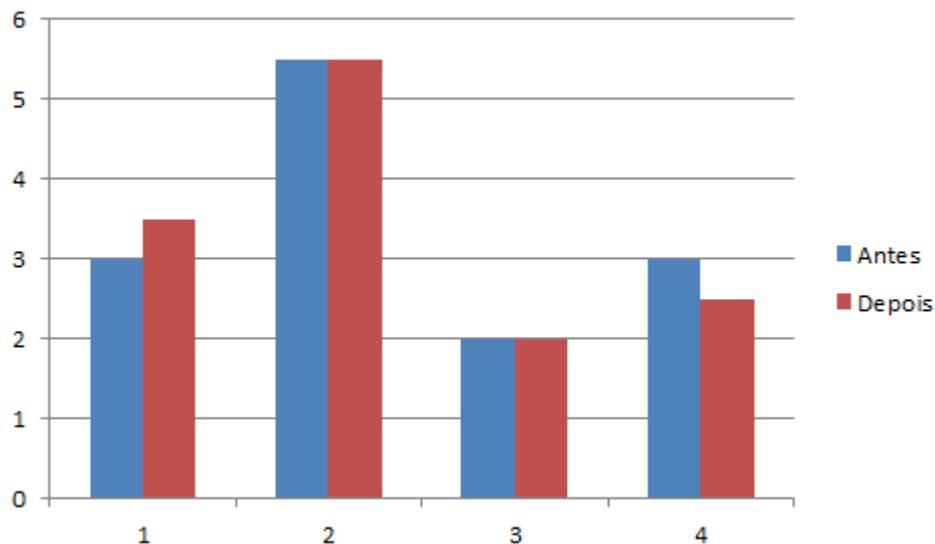
A respeito da inconstância dos dados encontrados tem-se o fato de se tratar de um Hospital Escola, cujo ambulatório está sob a supervisão de docentes e ou doutores sob regime de escala, que possuem individualmente mais ou menos rigor na cobrança quanto aos registros em prontuários. No entanto, o Conselho Federal de Medicina define o prontuário de paciente:

*“...o documento único constituído de um conjunto de informações, sinais e imagens registradas, geradas a partir de fatos, acontecimentos e situações sobre a saúde do paciente” [...] com objetivo de facilitar a assistência ao paciente. É um meio de comunicação entre os diferentes profissionais da saúde, além de ser um recurso indispensável para a continuidade do tratamento na internação e também no período das consultas de ambulatório contribuindo com a assistência e a pesquisa.*<sup>70</sup>

Como os dados necessários para uma correta avaliação desta pesquisa não foram delieados em projeto em 2008, as críticas quanto aos registros ficam esvaziadas.

#### IV.2.1 Tempo de quebra do filme lacrimal (*Break up time – BUT*)

Com relação ao tempo de quebra do filme lacrimal, apenas 4 pacientes, dos 12 analisados, possuíam este dado registrado na ficha de exames oftalmológicos. Em dois deles, não houve diferença no tempo antes e após o uso de colírio produzido com soro autólogo. Nos dois pacientes restantes, em um houve melhora do tempo e no outro houve piora do tempo de quebra do filme lacrimal. (**Gráfico 5**)



**Gráfico 5:** Comparação entre os tempos de quebra do filme lacrimal pré e pós tratamento

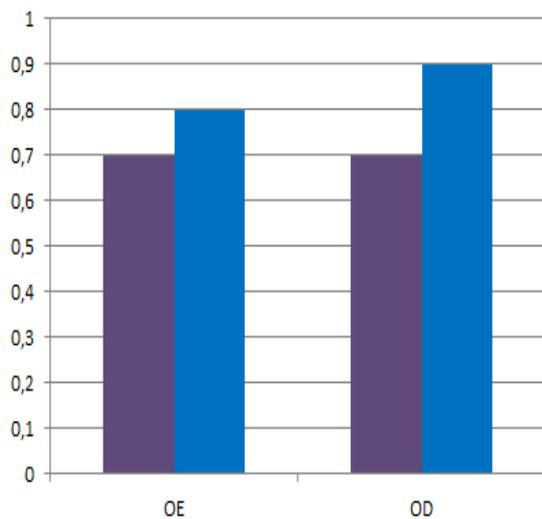
O teste de tempo de ruptura do filme lacrimal convencional foi introduzido em 1969 e desde então tem sido universalmente aplicado para o diagnóstico da SOS. Por muitos especialistas, o teste é usado como padrão diagnóstico. A fluoresceína usada no teste convencional pode induzir reflexo de lacrimejamento e diminuir a estabilidade da lágrima.<sup>71</sup>

#### IV.2.2 Acuidade Visual

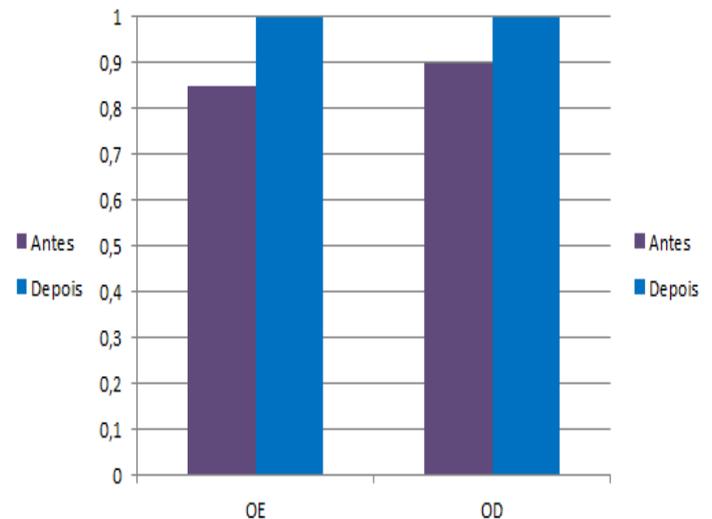
O dado da acuidade visual estava presente de forma constante nos prontuários de 9 pacientes. Foi possível observar uma expressiva melhora em ambos os olhos dos pacientes. O paciente 9 não apresentou dados numéricos, visto que devido a sua visão já bastante debilitada, apenas conseguia enxergar movimentos muito próximos como contar dedos a 1 metro e contar

dedos ante a face. Entretanto, neste caso, também houve uma evolução, pois no olho direito, o paciente que antes apenas enxergava dedos a 1 metro, passou a vê-los a 3 metros. No olho esquerdo, que antes via apenas dedos ante a face, passou a enxergá-los a 2 metros de distância.

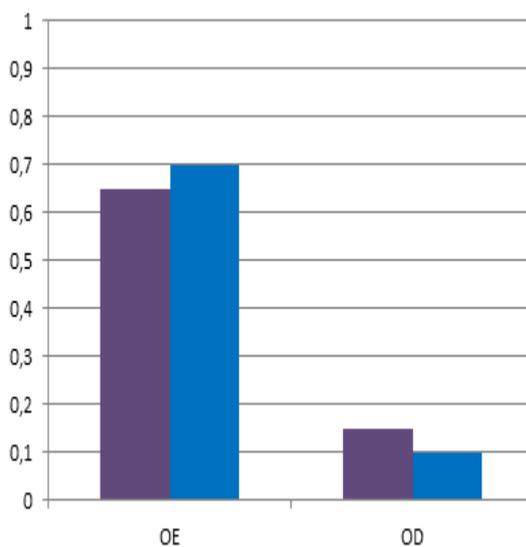
O paciente 8 também apresentou melhora em seu olho direito, visto que passou a enxergar dedos a 50 cm, e antes do tratamento apenas enxergava movimento de mãos frente a sua face. Os gráficos abaixo representam a acuidade dos pacientes, sendo OE (olho esquerdo) e OD (olho direito).



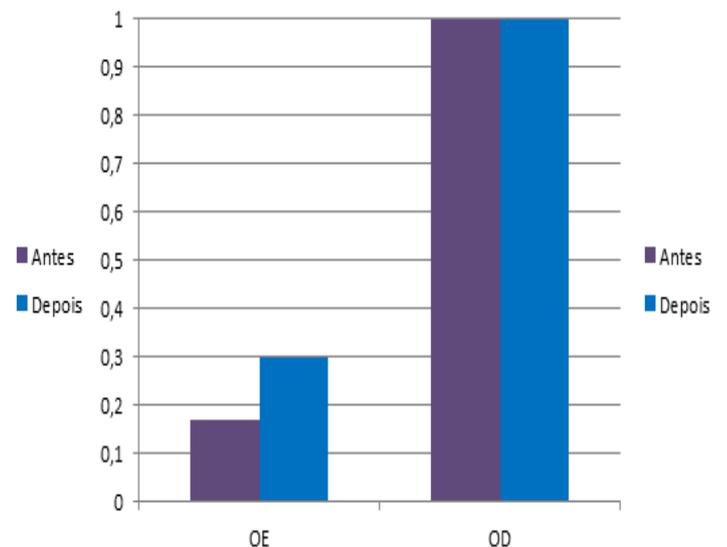
**Gráfico 6:** Acuidade visual do paciente 1



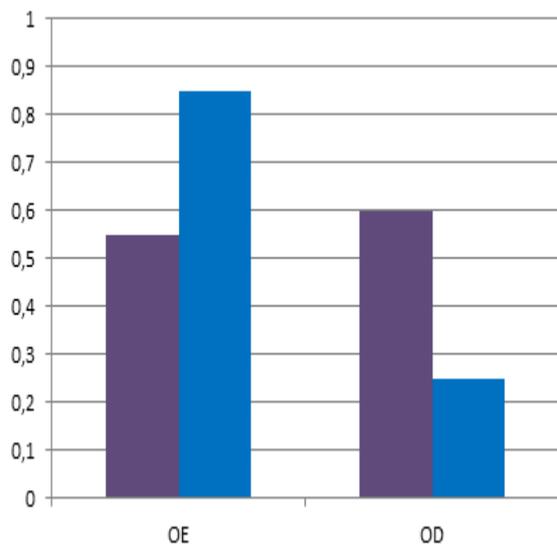
**Gráfico 7:** Acuidade visual do paciente 2



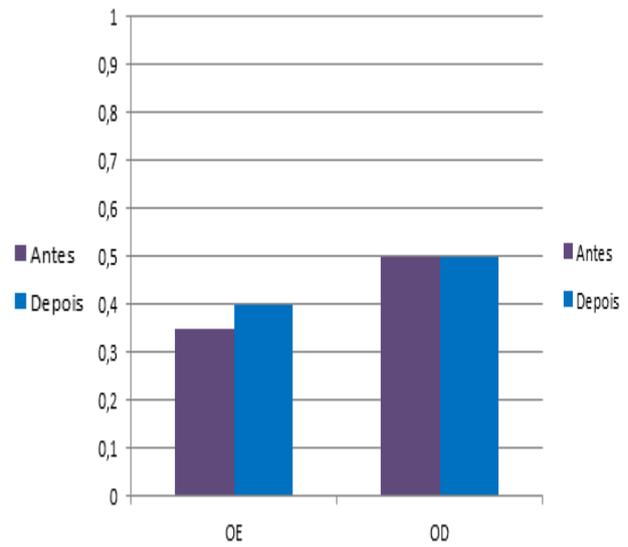
**Gráfico 8:** Acuidade visual do paciente 3



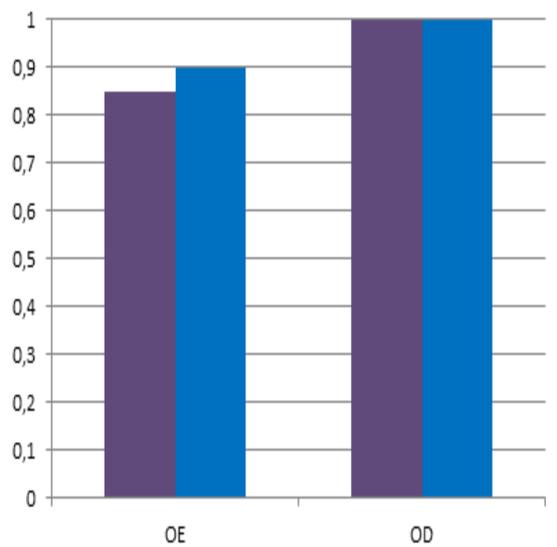
**Gráfico 9:** Acuidade visual do paciente 4



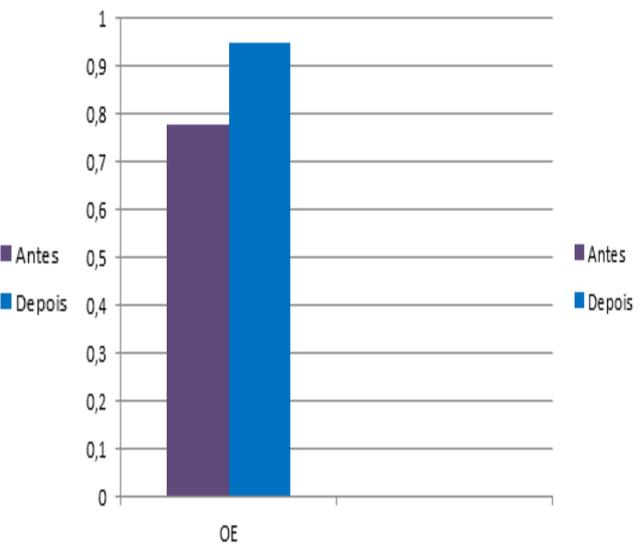
**Gráfico 10:** Acuidade visual do paciente 5  
6



**Gráfico 11:** Acuidade visual do paciente



**Gráfico 12:** Acuidade visual do paciente 7

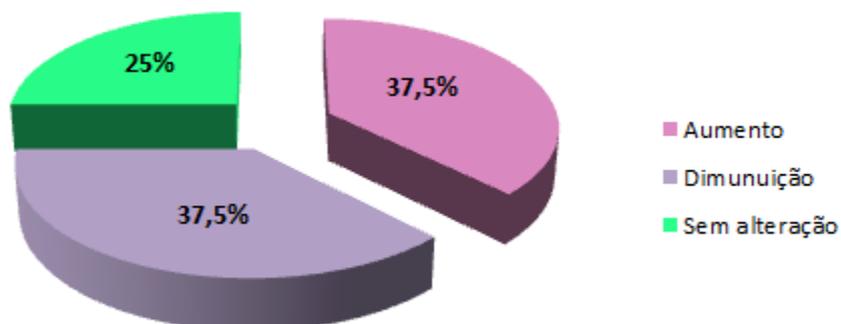


**Gráfico 13:** Acuidade visual do paciente 8

#### IV.2.3 Presença de Puntatas

Dos 12 pacientes, 8 deles tinham em seus prontuários dados contínuos da presença de puntatas. Em 37,5% dos casos analisados houve melhora, ou seja, diminuição da quantidade de

puntatas. Em 25% dos pacientes não houve alteração e em 37,5% observou-se que a quantidade de puntatas aumentou, com piora do quadro. (Gráfico 14)



**Gráfico 14:** Representação gráfica da evolução das puntatas

Jirsova, K *et al*, publicaram em 2014, artigo com o intuito de avaliar o impacto do soro autólogo na superfície ocular de pacientes com SOS e fizeram uma comparação entre os exames clínicos e laboratoriais, antes e após o tratamento do soro, com *follow up* de três meses. Os autores avaliaram 17 pacientes, que fizeram a aplicação do soro 12 vezes ao dia. Os autores relataram que a aplicação do soro autólogo conduziu a uma melhora significativa no teste de Schirmer ( $p < 0,01$ ) e BUT ( $p < 0,05$ ). Além destes registros, observaram ainda aumento da presença de células epiteliais, com decréscimo da metaplasia escamosa. Desta forma, Jirsova K *et al* consideraram que houve importante melhora em 77% dos casos, levando-se em consideração dados objetivos (exames realizados) e subjetivos (informações do paciente). Do ponto de vista subjetivo, os pacientes referem que os efeitos diminuem após 3 meses de uso, mas este dado não foi confirmado com os achados laboratoriais ou testes que continuavam apontando para melhora. No entanto, existe um percentual de paciente que não apresentou benefícios, em especial aqueles que apresentam infecções bacterianas oculares de repetição.<sup>72</sup>

O presente trabalho difere de Jirsova K *et al* em dois aspectos: não há registro que indique o aumento da presença de células epiteliais, ou decréscimo da metaplasia escamosa; além disso, os pacientes que usam o colírio de soro autólogo há mais de 50 meses mantêm a informação de que sentem melhora. Isto pode estar relacionado ao perfil psicológico do paciente, ou ainda às comorbidades pré-existentes.

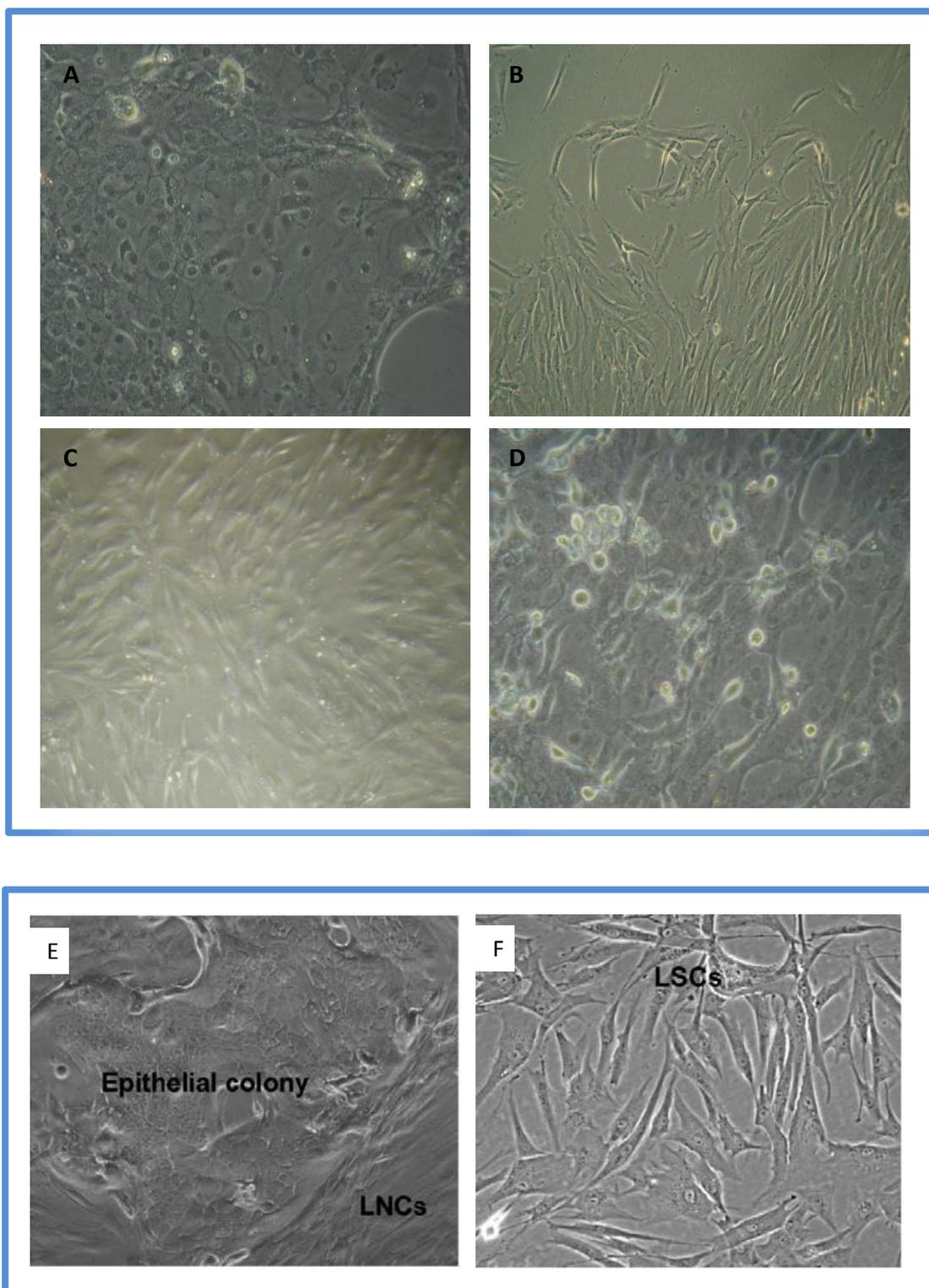
### IV.3 Cultura Celular

Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. Foi feita em duas fases: na primeira, o meio de cultura das células foi trocado com *DMEM Knockout* e na segunda, com meio *Keratinocyte*.

#### IV.3.1 Células cultivadas em meio *DMEM Knockout*

Após 28 dias de cultura das células, foi possível observar confluência de 80% das células nos frascos de 25 cm<sup>2</sup>.

Nos primeiros 10 dias de cultura, observou-se que havia predomínio de células com características epiteliais. Após este período, as células tiveram sua morfologia modificada para fibroblastóide, uma das características das células mesenquimais. (**Figura 13**). Estes achados corroboram os de Li *et al*, que observaram que as células epiteliais na ausência de *feeders cells* se desdiferenciam ou entram em apoptose.

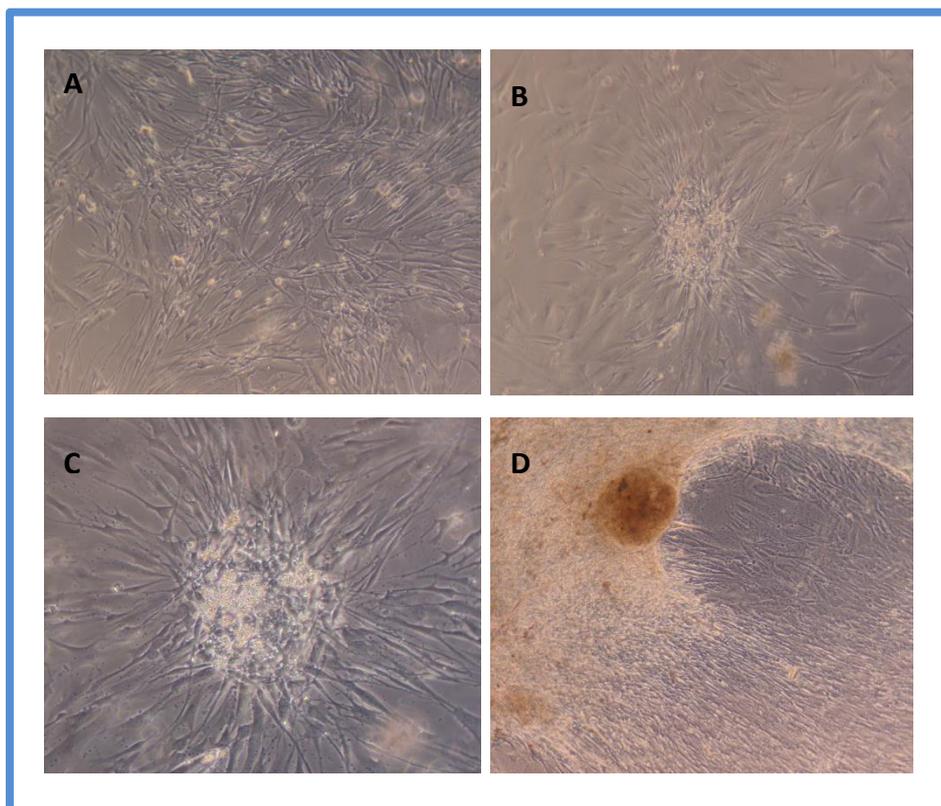


**Figura 13** - Fotomicrografia de microscopia invertida das células cultivadas. (A) Células epiteliais em aumento de 10x; (B) Colônia de células aderentes, de aspecto fibroblástico em aumento de 10X; (C) Células-tronco do anel córneo-escleral com confluência de 100% em aumento de 10X; (D) Células controle. Em (E) e (F), células cultivadas por Li *et al*, sendo que em (E) visualiza-se colônia de células epiteliais normais do limbo após 14 dias de cultura. No bordo inferior destaque para população de células fibroblasto-like do microambiente do limbo (LNCs). Em (F) o autor destaca o cultivo de células tronco adultas do limbo.

Foi realizada a tripsinização das células, com o desprendimento das mesmas do frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Após contagem das células em câmara de Neubauer, foi feita a distribuição na placa de 24 poços, de forma que cada poço continha a mesma quantidade de células.

A placa do experimento contendo as células controle, células tratadas com colírio e células tratadas com FCDP, foi mantida em estufa de CO<sup>2</sup> a 37°C e o meio foi trocado a cada 48 horas. Após 5 dias de tratamento, pôde-se observar confluência celular de 90%. (**Figura 14**)

Com relação às células controle, não houve alteração do aspecto das células cultivadas após a passagem para a placa. As células tratadas com colírio e FCDP sofreram alterações, visto que em algumas regiões da placa as células permaneceram com aspecto semelhante ao do frasco de 25 cm<sup>2</sup>, ou seja, mantiveram crescimento normal sem aumento da apoptose. Entretanto, em outras regiões haviam células em processo de degeneração e restos celulares, talvez por conta dos hormônios de crescimento contidos no meio, que se degeneraram.



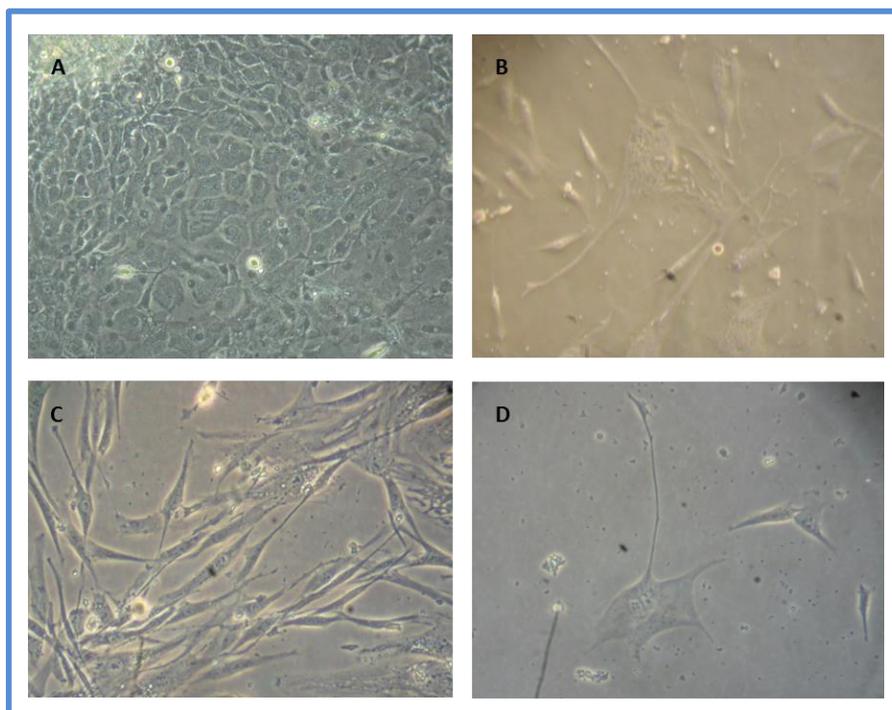
**Figura 14** - Fotomicrografia de microscopia invertida das células cultivadas. (A) Células tratadas com FCDP em aumento de 10x. (B) Células controle em aumento de 10x. (C) Células tratadas com colírio em aumento de 20x. (D) Células tratadas com FCDP em aumento de 10x.

Acredita-se que o epitélio da córnea é mantido por células-tronco/progenitoras do limbo localizado anatomicamente nas paliçadas de Vogt e residem dentro de um nicho chamado cripta do limbo. As células-tronco progenitoras na camada basal do limbo apresentam ciclo lento de replicação, mas elevado potencial proliferativo expressando alguns marcadores de células-tronco epiteliais entre eles, a  $\beta 1$  integrina e a N-caderina. No entanto, os autores destacaram que não existe um marcador específico para estas células epiteliais como a queratina 3/12 e a conexina 43. As células vizinhas do limbo incluem melanócitos, células apresentadoras de antígenos (Langerhans), linfócitos T supressores, células estromais do limbo, todas interagindo com células tronco, e as chamadas células basais do limbo. Li *et al* colaboradores identificaram 3 tipos celulares distintos na região estudada: células tronco do limbo, células fibroblastos-like e células epiteliais basais. Estas últimas se mantêm em cultura no máximo 10-14 dias, e necessitam depois disto, de *feeders cells* como fibroblastos irradiados (3T3) para manter o fenótipo e genótipo epitelial, caso contrário, se desdiferenciam. Como no experimento atual, não foi usada a linhagem 3T3 como *feeders cells*, observou-se o fenômeno de desdiferenciação ou ainda, a eliminação das células epiteliais pela ausência do microambiente favorecedor composto pelas células alimentadoras.<sup>73</sup>

### V.3.2 Células cultivadas em meio Keratinocyte

Nos 30 dias iniciais de cultura, as células apresentaram características de células epiteliais. Nos dias seguintes, foi possível observar mudanças das características das células, que passaram a caracterizar-se como fibroblastóides.

Com relação ao tempo de crescimento das células, estudo de Gomes *et al* confirmou o que foi encontrado: o tempo para que a confluência celular atingisse 80% foi de 28 dias, sendo que o crescimento iniciou-se entre 3 a 5 dias de cultura, sendo o pico entre os dias 19 e 22. **(Figura 15)**

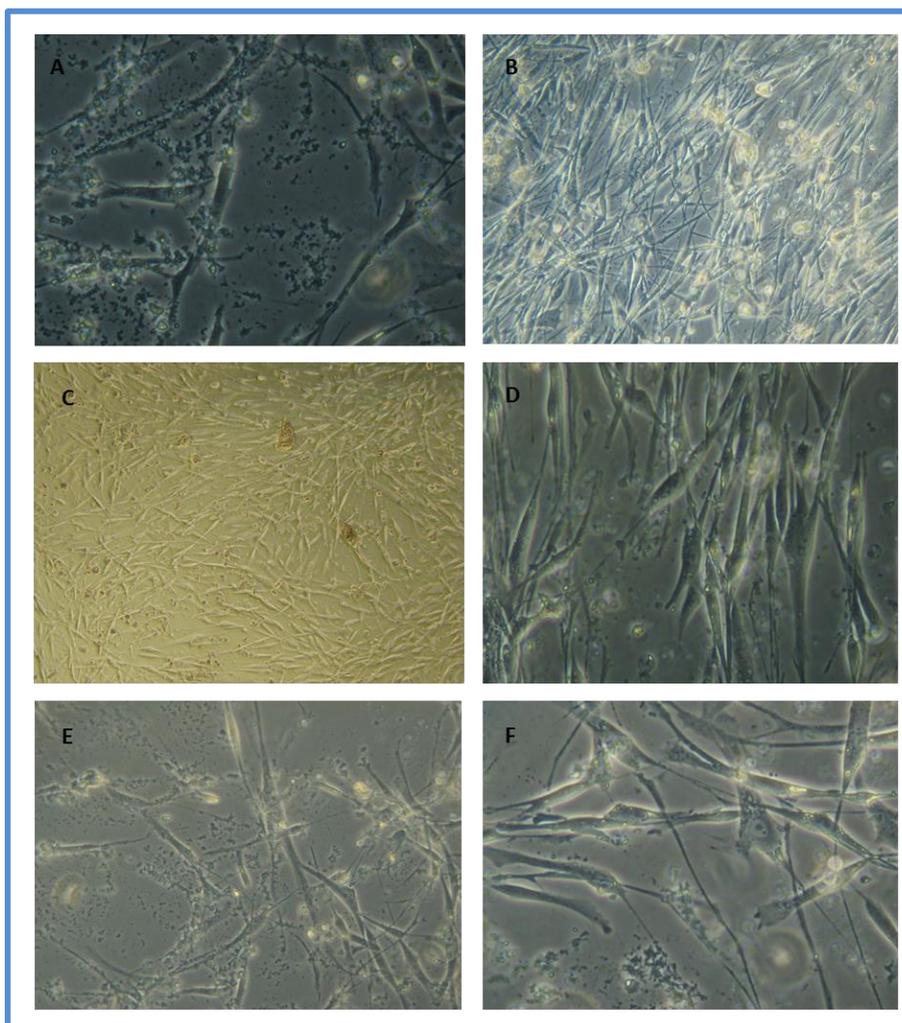


**Figura 15** - (A) Células epiteliais em aumento de 10x. (B) Células controle em aumento de 5x. (C) Células controle em aumento de 10x. (D) Células controle em aumento de 20x.

Foi realizada a tripsinização das células, com o desprendimento das mesmas do frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Após contagem das células em câmara de Neubauer, foi feita a distribuição na placa de 24 poços, de forma que cada poço continha a mesma quantidade de células.

A placa do experimento, contendo as células controle, células tratadas com colírio e células tratadas com FCDP, foi mantida em estufa de CO<sup>2</sup> a 37°C e o meio foi trocado a cada 48 horas. Após 5 dias de tratamento, pôde-se observar confluência celular de 90%.

As células controle não sofreram alteração após passagem para a placa, bem como as células tratadas com colírio, que cresceram favoravelmente, sem apresentar aspecto de degeneração celular. (**Figura 16**)



**Figura 16** - (A) Células tratadas com FCDP em aumento de 20x. (B) Células controle em aumento de 10x. (C) Células controle em aumento de 5x. (D) Células tratadas com colóide em aumento de 20x. (E) Células tratadas com FCDP em aumento de 10x. (F) Células tratadas com FCDP em aumento de 20x.

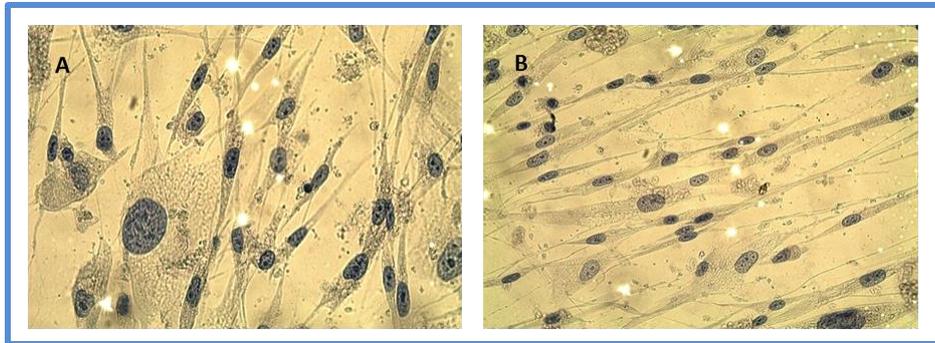
### IV.3.3 Imunohistoquímica

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Matriz Extra Celular do Instituto de Biociências de Botucatu.

#### IV.3.3.1 Controle Negativo da Reação

Conforme a técnica, os controles negativos não recebem o anticorpo secundário, ao contrário das outras células. Sendo assim, controles negativos que apresentam reação indicam

que houve marcação inespecífica. Nos controles negativos realizados com as células, não houve marcação, ou seja, a imunohistoquímica foi validada. (**Figura 17**)

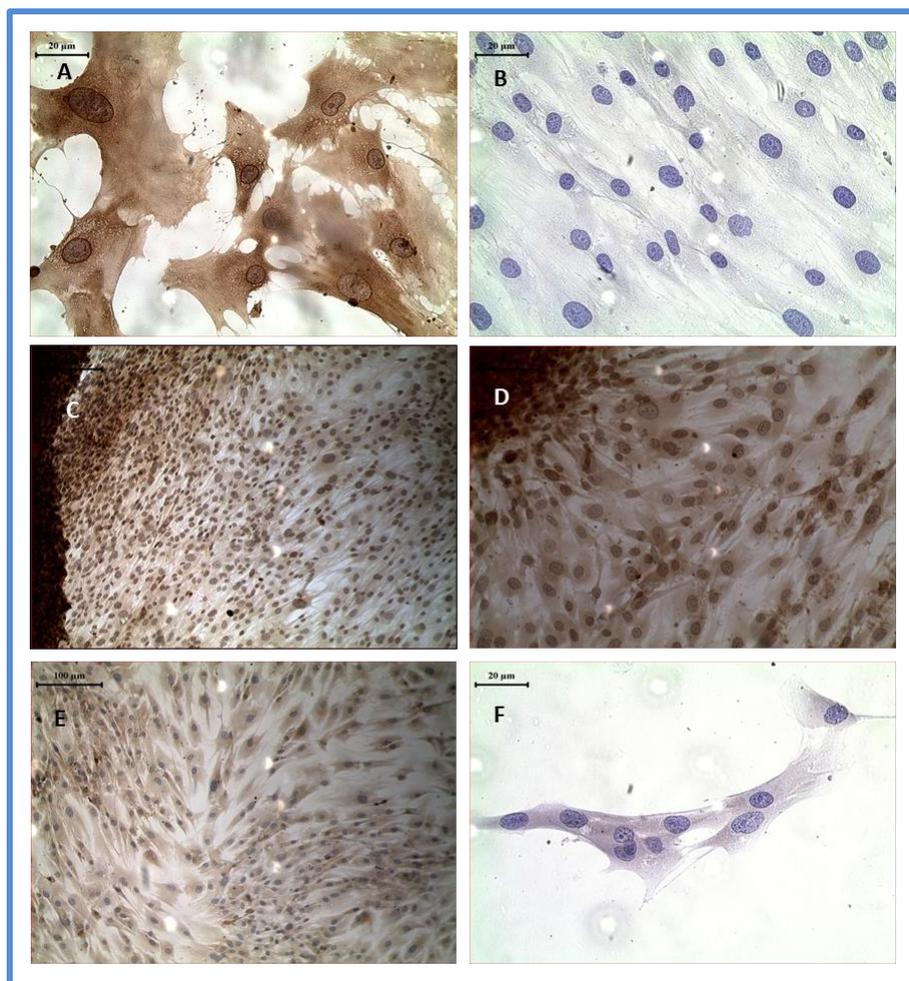


**Figura 17** - (A) Anti-mouse em aumento de 40x. (B) Anti-rabbit em aumento de 40x.

#### IV.3.3.2 Células cultivadas em meio DMEM Knockout

No momento em que as células estavam com 80% de confluência, foi realizada a tripsinização das células e passagem das mesmas para a placa de 24 poços. Em seguida, foi realizado o tratamento com colírio e fatores de crescimento derivados de plaquetas. Após 5 dias, foi feita a Imunohistoquímica em parceria com o Laboratório do Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB).

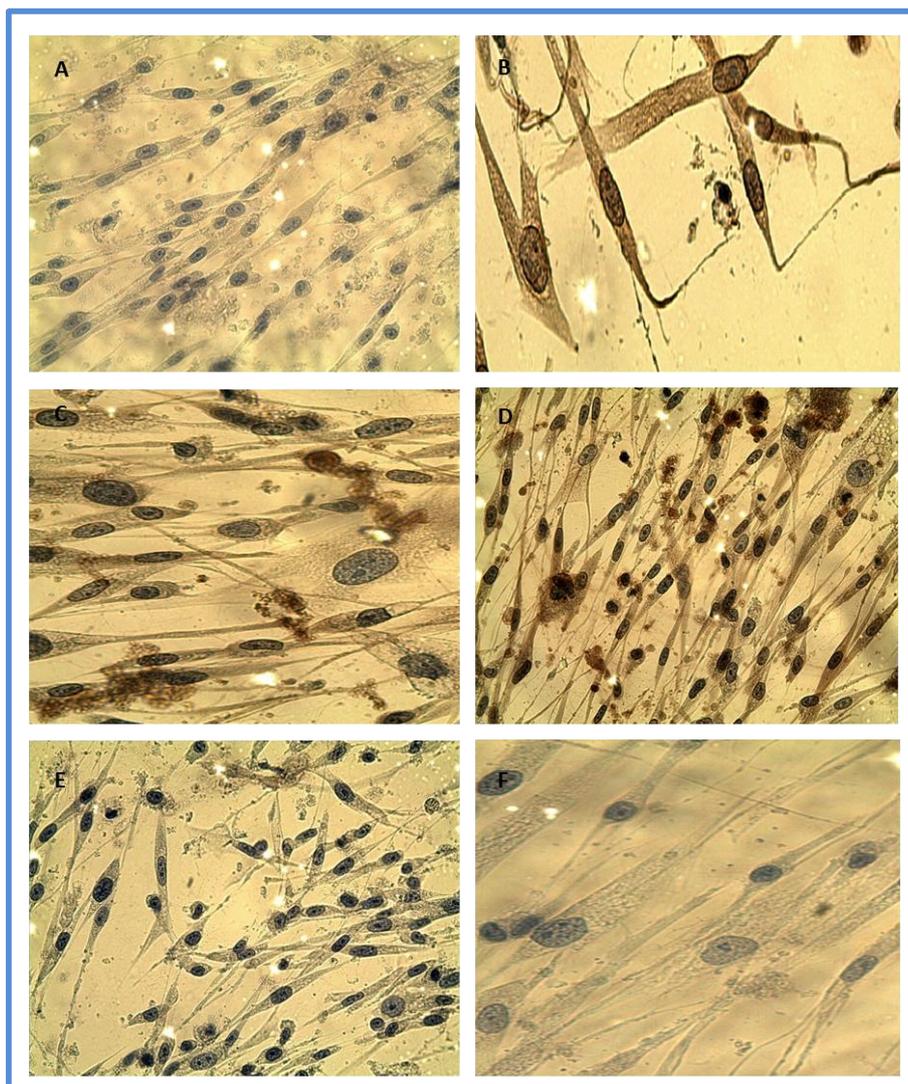
Foram utilizados os anticorpos anti-vimentina (marcador de célula-tronco mesenquimal), anti-beta catenina (marcador epitelial) e anti-PCNA (marcador de proliferação) para análise das células. Observou-se que o anticorpo que mais marcou foi o anti-vimentina, evidenciando que grande parte das células obtidas foram aquelas com características de células-tronco mesenquimais. (**Figura 18**) Em (A) observam-se as células marcadas com anti-vimentina. Em (B), foi utilizado o marcador anti-beta-catenina. A coloração azul demonstra que não houve marcação. Em (C), (D) e (E) observam-se células marcadas com anti-PCNA. Nas fotos 3 e 4, onde a quantidade de células é maior, houve marcação (núcleos marcados em cor marrom). Em contrapartida, as imagens (E) e (F) mostram que onde há poucas células, não há marcação (núcleos azuis).



**Figura 18** – (A) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (B) Marcação com anti-betacatenina em aumento de 40x. (C) Marcação com anti-PCNA em aumento de 10x. (D) Marcação com anti-PCNA em aumento de 20x. (E) Marcação com anti-PCNA em aumento de 10x. (F) Marcação com anti-PCNA em aumento de 40x.

#### IV.3.3.3 Células cultivadas em meio Keratinocyte

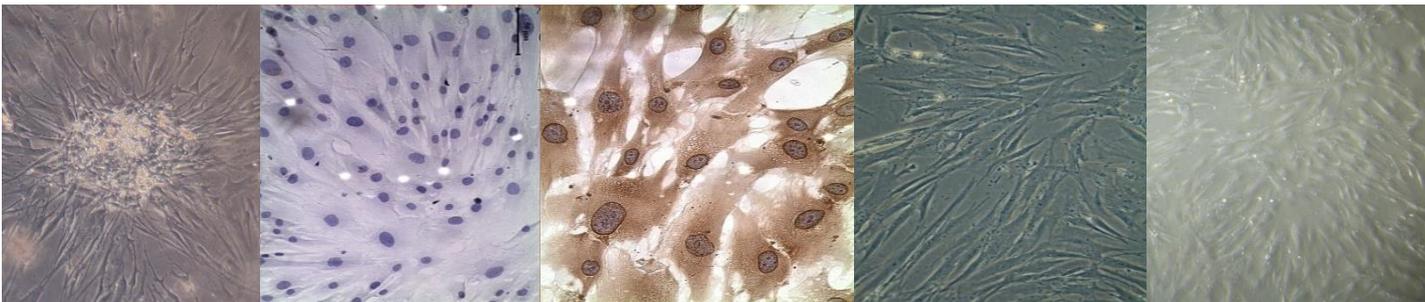
As células cultivadas com meio keratinocyte foram marcadas com os mesmo anticorpos que as células cultivadas com DMEM Knockout: anti-vimentina, anti-betacatenina e anti-PCNA. Foi possível observar que as células foram pouco marcadas com anti-vimentina e não foram marcadas com anti-betacatenina e anti-PCNA. **(Figura 19)** Isto mostra que neste caso, pode ser que haja uma menor quantidade de células que caracterizam-se como células-tronco mesenquimais em comparação com as células cultivadas em meio DMEM Knockout, em que observou-se uma maior marcação com a anti-vimentina. Isto pode mostrar que células em meio keratinocyte diminuem a quantidade de células mesenquimais, sendo um avanço para conseguir-se uma cultura de células plenamente epiteliais.



**Figura 19** - (A) Marcação com anti-beta-catenina em aumento de 20x. (B) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (C) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (D) Marcação com anti-vimentina em aumento de 40x. (E) Marcação com anti-PCNA em aumento de 40x. (F) Marcação com anti-PCNA em aumento de 40x.

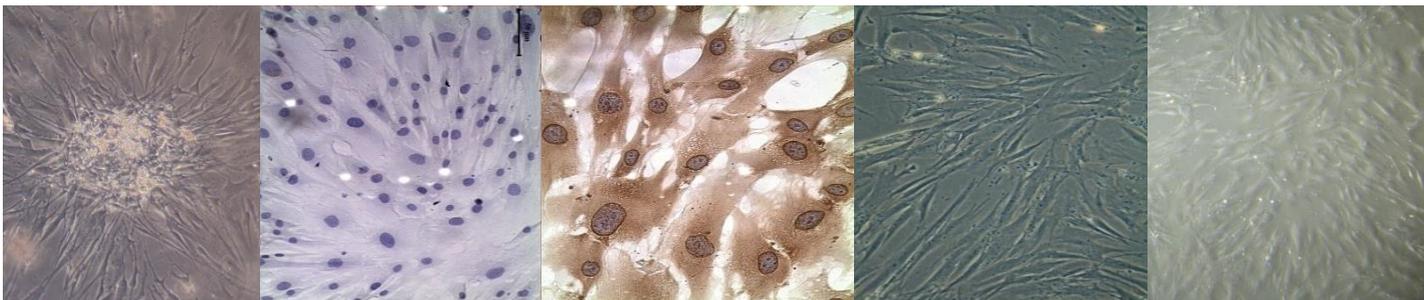
A anatomia do limbo pode nos explicar os resultados encontrados. Considerando-se que esta região do olho contém diversos tipos celulares, como células dendríticas, células endoteliais vasculares, pericitos, células de Schwann, células-tronco e fibroblastos, torna-se necessário considerar que provavelmente a cultura não foi de uma população homogênea de células. O meio de cultura, com a presença ou não de fatores de crescimento específicos, seleciona as células que crescem melhor com determinados suplementos. Sendo assim, justifica-se o fato de que as células com características epidermais mantiveram-se por mais tempo em cultura com meio keratinocyte em comparação com o DMEM Knockout. No entanto, o fato de não ter sido usado *feeders cells* pode justificar o desaparecimento progressivo destas células, quando cultivadas.<sup>73</sup>

# *Conclusões*



- ✓ Doze pacientes foram incluídos no protocolo de uso de SAUOC, no período de 2008 a 2013. O *sex ratio* dos pacientes encaminhados ao Hemocentro que utilizam autocolírio é de 1homem/4mulheres.
- ✓ Do total de pacientes encaminhados ao Hemocentro que utilizam autocolírio, a faixa etária que compreende o maior número de pacientes foi de 46 a 65 anos.
- ✓ Durante o período de estudo foram produzidos 1464 frascos de soro autólogo de uso ocular, com volume de 5ml, mantidos congelados a -20°C.
- ✓ Identificou-se um descarte de 33,07% do material processado;
- ✓ O paciente com mais tempo de uso, relatando benefícios com o SAUOC, tem 50 meses de acompanhamento em uso do colírio.
- ✓ Foi estabelecida a metodologia de cultura das células do anel córneo-escleral evidenciando populações heterogêneas de células.
- ✓ As células epiteliais em cultura mantêm seu fenótipo por 10-14 dias, desdiferenciando-se posteriormente na ausência de *feeders cells*.
- ✓ O uso do meio de cultura *keratinocyte* mantém as células com características epidermais por mais tempo em cultura em comparação com aquelas cultivadas com DMEM *Knockout*.
- ✓ As células mantidas em meio de cultura *Keratinocyte* foram marcadas em menor intensidade pelo anticorpo anti-vimentina em relação àquelas tratadas com DMEM *Knockout*.

# *Referências Bibliográficas*



- 1 - Rocha, L. Oftalmologista da FMB assume a presidência da APABO no Brasil. *Jornal Informativo da Faculdade de Medicina de Botucatu e Hospital das Clínicas*. Ano IV, fevereiro 2012, pag 5-6
- 2 - Deffune, E. Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Engenharia Celular: Processamento de Auto-colírio, 2012
- 3 - Kanski JJ. *Oftalmologia clínica: uma abordagem clínica*. Elsevier. 2004; pp 56-61
- 4 - Notara M, Alatza A, Gilfillan J, Harris AR, Levis HJ, Schrader S, Vernon A, Daniels JT. *In sickness and in health corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy*. *Exp Eye Res*. 2010; 90: 188-195
- 5 - Bicas HEA, Jorge AAH. *Oftalmologia: Fundamentos e aplicações*. Tecmedd. 2007; pp 153-185
- 6 - Kawakita T, Shimmura S, Hornia A, Higa K, Tseng SCG. Stratified epithelial sheets engineered from a single adult murine corneal/limbal progenitor cell. *J Cell Mol Med*. 2008; 12: 1303-1316
- 7 - Chen YT, Li W, Hayashida Y, He H, Chen SY, Tseng DY, Kheirhan A, Tseng SCG. Human amniotic epithelial cells as novel feeder layers for promoting ex vivo expansion of limbal epithelial progenitor cells. *Stem Cells*. 2007; 25: 1995-2005
- 8 - Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells as the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res*. 2004; 78: 433-446
- 9 - Ghoubay-Benallaoua D, Basli E, Goldschmidt P, Pecha F, Chaumeil C, Laroche L, Borderie V. Human epithelial cell cultures from superficial limbal explants. *Molecular Vision*. 2011;17: 341-354
- 10 - Matsumoto Y, Dogou M, Goto E, *et al.* Autologous serum application in the treatment of neurotrophickeratopathy. *Ophthalmology*. 2004; 111: 1115-20

- 11 - Ahmad S, Kolli S, Lako M, Figueiredo F, Daniels JT. Stem cell therapies for ocular surface. *Drug Discovery Today*. 2010; 15: 306-313
- 12 - Daniels JT, Levis H. New technologies in limbal epithelial stem cell transplantation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009; 20: 593-597
- 13 - Grueterich M, Espana EM, Tseng SCG. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Survey of Ophthalmology*. 2003; 48: 631-646
- 14 - Jones RR, Hamley IW, Connon CJ. Ex vivo expansion of limbal stem cell is affected by substrate properties. *Stem Cell Research*. 2012; 8: 403-409
- 15 - Rege A, Kulkarni V, Puthran N, Khandgave T. A clinical study of subtype-based prevalence of dry eye. *J ClinDiagn Res*. 2013; 7 (10); 2207-2210
- 16 - Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*. 2005; 81: 247-264
- 17 - Rocha EM, Pelegriño FSA, de Paiva CS, Vigorito AC, de Souza CA. Bone marrow transplantation. 2000; 25: 1101-1103
- 18 - Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, Daniels JT. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology*. 2008; 115: 1989-1997
- 19 - Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, Limb A, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Survey of Ophthalmology*. 2007; 52: 483-502
- 20 - Shortt AJ, Tuft SJ, Daniels JT. Ex vivo cultured limbal epithelial transplantation. A clinical perspective. *The Ocular Surface*. 2010; 8: 80-90

- 21 - Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997; 349: 990-3
- 22 - Di Iorio E, Ferrari S, Fasolo A, Böhm E, Ponzin D, Barbaro V. Techniques for culture and assessment of limbal stem cell grafts. *The Ocular Surface*. 2010; 8: 146-153
- 23- Daya SM, Watson A, Sharpe JR, Giledi O, Rowe A, Martin R, James E. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology*. 2005; 112:470-477
- 24- Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosae epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2006; 142: 757-764
- 25- Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S. Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology*. 2006; 113 (10): 1765-1772
- 26- Basu S, Ali H, Sangwan VS. Clinical outcomes of repeat autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns. *Am J Ophthalmology*. 2012; 153: 643-650
- 27 - Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drop for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88: 1467-1474
- 28 - Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol*. 2008; 71 (6): 47-54
- 29 - Elisseeff J, Madrid MG, Lu Q, Chae JJ, Guo Q. Future perspectives for regenerative medicine in ophthalmology. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2013; Jan-Mar; 20 (1): 38-45
- 30 - Gadaria-Rathod N, Lee KI, Asbell PA. Emerging drugs for the treatment of dry eye disease. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2013 Jun;18 (2): 121-36

- 31 - Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* 2007; 52: 369-374
- 32 - Lyngholm M, Hoyer PE, Vorum H, Nielsen K, Ehlers N, Mollgard K. Immunohistochemical markers for corneal stem cells in the early developing human eye. *Experimental eye research.* 2008; 87: 115-121
- 33 - Rein DB, Zhang P, Wirth KE. The economic burden of major adult visual disorders in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124: 1754-1760
- 34 - Fiscella RG. Understanding dry eye disease: A managed care perspective. *Am J Manag Care.* 2011; 17: 432-439
- 35 - Pelikan Z. Inflammatory mediator profiles in tears accompanying keratoconjunctival responses induced by nasal allergy. *Br J Ophthalmol.* 2013 Jul; 97 (7): 820-8.
- 36 - Theander A, Wollheim FA. A note from Sweden: Recollection of Henrik Sjögren. In: Fox RI, Fox CM, editors. *Sjögren's Syndrome: Practical Guidelines to Diagnosis and Therapy.* New York: Springer. 2012; pp 11-13
- 37 - Felberg S, Dantas PEC. Diagnóstico e tratamento da Síndrome de Sjögren. *Arq Bras Oftalmol.* 2006; 69 (6): 959-63
- 38 - Igoe A, Scofield RH. Autoimmunity and infection in Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25: 480-487
- 39 - Fox RI, Fox CM. Sjögren's syndrome: infections that may play role in pathogenesis, mimic the disease, or complicate the patients course. *Indian Journal of Rheumatology.* 2011; 6: 13-25
- 40 - Nakamura H, Takagi Y, Kawakami A, Ida H, Nakamura T, Eguchi K. HTLV-I infection results in resistance toward salivary gland destruction of Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2008; 26: 653-655
- 41 - Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA. *et al.* American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the

Sjögren´s International Collaborative Clinical Alliance Cohort. *Arthritis Care Res.* 2012; 64: 475-487

42 - Haga H, Naderi Y, Moreno AM, *et al.* A study of the prevalence of sicca symptoms and secondary Sjögren´s syndrome in patients with rheumatoid arthritis, and its association to disease activity and treatment profile. *Int J Rheum Dis.* 2012; 15: 284-288

43 - Carmona L, Gonzales-Alvaro I, Balsa A, *et al.* Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:897-900

44 - Chen MH, Hsiao LT, Chen MH, Isai CY, Huang YH, Chou CT. Clinical significance of chronic hepatitis B virus infection in patients with primary Sjögren´s syndrome. *Clin Rheumatol.* 2012; 31: 309-315

45 - Sipsas NV, Gamaletsou MN, Moutsopoulos HM. Is Sjögren´s syndrome a retroviral disease? *Arthritis Research and Therapy.* 2011; 13: 212

46 - Katsifis, GE, Moutsopoulos NM, Wahl SM. T lymphocytes in Sjögren´s syndrome: contributors to and regulators of pathophysiology. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007; 32: 252-264

47 - Brenol CV, Monticeli OA, Xavier RM, Brenol JCT. Artrite reumatoide e aterosclerose. *Rev Assoc Med Bras.* 2007; vol 53 n° 53

48 - Freire EAM, Souto LM, Ciconelli RZ. Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol.* 2011; 51 (1): 70-80

49 – Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009; 373, 1550-1561

50 - Silva MM, Brouzas LFS, Filgueira AL. Tegumentary manifestations of graft-versus-host disease in bone marrow transplantation recipients. *An Bras Dermatol.* 2005; 80 (1): 69-80

- 51 - Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* 2012; May 11; 12 (6): 443-58
- 52 - Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, Yamada M, Mashima Y, Watanabe R, Kuwana M, Tsubota K, Ikeda Y, Ogushi Y. Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host-disease. *Bone marrow transplantation.* 2003; 31: 579-583
- 53 - Kawasaki S, Nishida K, Sotozono C, Quantock AJ, Kinoshita S. Conjunctival inflammation in the chronic phase of Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84 (10): 1191-1193
- 54 - De Rojas MV, Dart JK, Saw VP. The natural history of Stevens Johnson syndrome patterns of chronic ocular disease and the role of systemic immunosuppressive therapy. *Br J Ophthalmol.* 2007; 91 (8): 1048-1053
- 55 - López-García JS, García-Lozano. Use of containers with sterilizing filter in autologous serum eyedrops. *Ophthalmology.* 2012; 119 (11): 2225-2230
- 56- Partal A, Scott. Low cost protocol for the production of autologous serum eye drops by blood collection and processing centres for the treatment of ocular surface diseases. *Transfusion Medicine.* 2011; 21: 271-277
- 57- Thanathanee O, Phanphruk, W, Anutarapongpan O, Romphruk A, Swan-Apichon O. Contamination risk of 100% autologous serum eye drops in management of ocular surface diseases. *Cornea.* 2013; 32 (8): 1116-1119
- 58-Yoon KC, Heo H, Im SK, You IC, Kim YH, Park YG. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome. *Am J Ophtalmol.* 2007; 144: 86-92
- 59 - Woost P, Jumblatt M, Eiferman R. Growth factors and corneal endothelial cells: characterization of epidermal growth factor receptor from bovine corneal endothelial cells. *Cornea.* 1992; 11: 11-19

- 60-Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Matsumoto Y, Kaido M, Tsubota K. The effect of autologous serum eye drops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmology*. 2005; 139: 242-246
- 61 - Sharma N, Goel M, Velpandian T, Titiyal JS, Tandon R, Vajpayee RB. Evaluation of umbilical cord serum therapy in acute ocular chemical burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52: 1087-1092
- 62 - Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY, Cho BC, Yang JD, Shin JH. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analyses of activated and inactivated groups. *Archives of Plastic Surgery*. 2013; 40: 530-535
- 63- Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol*. 2004; 36: 28-35
- 64 - Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, Peng J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013; 21: 1627-163
- 65- Ramos-Vara JÁ. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005; 42: 405-26.
- 66 - Portaria nº 2712 de 12 de dezembro de 2013, publicado no DOU nº 221 de 13 de dezembro de 2013, seção 1, página 103
- 67 - Spaniol K, Koerschgen L, Sander O, Koegler G, Geerling G. Comparison of application systems for autologous serum eye drops. *Curr Eye Res*. 2014
- 68 - Chen MH, Hsiao LT, Chen MH, Tsai CY, Huang YH, Chou CT. Clinical significance of chronic hepatitis B virus infection in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol*. 2012; 31 (2) :309-15
- 69 - Tsounami A, Theopistos V, Katsanos K, Asproudis I, Tsianos EV. Treatment and non-treatment related ocular manifestations in patients with chronic hepatitis B or C. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; Apr, 17 (8): 1123-31

70 - Malaquias AR. Projeto de implantação da informatização do ambulatório no serviço de oftalmologia de um hospital geral de Porto Alegre. Monografia do Curso de Especialização em Informatização Científica e Tecnológica em Saúde. Parceria da Fundação Osvaldo Cruz com o Grupo Hospitalar Conceição

71 - Jiang Y, Ye H, Xu L, Lu Y. Noninvasive keratograph assessment of tear film break-up time and location in patients with age-related cataracts and dry eye syndrome. *J Int Med Res.* 2014 Jan 20. [Epub ahead of print]

72 - Jirsova K, Brejchova K, Krabcova I, Filipec M, Al Fakh A, Palos M, Vesela V. The application of autologous serum eye drops in severe dry eye patients; subjective and objective parameters before and after treatment. *Curr Eye Res.* 2014; Jan, 39 (1): 21-30

73 - Li Y, Inoue T, Takamatsu F, Kobayashi T, Shiraishi A, Maeda N, Ohashi Y, Nishida E. Differences between Niche Cells and Limbal Stromal Cells in Maintenance of Corneal Limbal Stem Cells. *IOVS Papers. Press,* 2014