

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

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

Karina Kamachi Kobashigawa
Médica Veterinária

2018

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

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

Karina Kamachi Kobashigawa

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Aldrovani

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

2018

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

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: José Luiz Laus
Banca examinadora: Bruno Watanabe Minto, Annelise Carla Camplesi, João Antônio Tadeu Pigatto, Alexandre Lima de Andrade
Bibliografia

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

CDU 619:617.7- 089:599.325.1

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

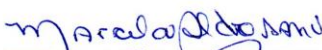
TÍTULO DA TESE: TRANSPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA COM CÉLULAS EPITELIAIS LIMBAIS CULTIVADAS EM SANDUÍCHE: ESTUDOS CLÍNICOS E DE VIABILIDADE EM CÔRNEAS DE COELHOS

AUTORA: KARINA KAMACHI KOBASHIGAWA

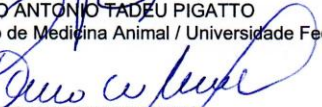
ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ LAUS

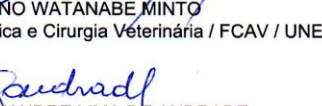
COORDENADORA: MARCELA ALDROVANI RODRIGUES

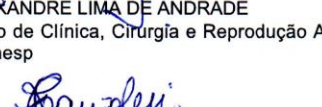
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


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


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


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


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


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

Jaboticabal, 24 de janeiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À todos os estagiários que passaram pelo Setor.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



SUMÁRIO

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

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

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

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – Unesp



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.


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

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA - Unifesp



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

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

São Paulo, 07 de maio de 1998

Ilmo. Sr.

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

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

Atenciosamente,


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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

LISTA DE MEDIDAS

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

1. Introdução

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

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

2. Revisão de Literatura

2.1. Superfície Ocular

O termo superfície ocular foi introduzido por Thoft (1977) e compreende os epitélios das conjuntivas bulbar e palpebral, da córnea e do limbo (AHMAD; FIGUEIREDO; LAKO, 2006; ALDROVANI; LAUS, 2015). O epitélio limbal abriga células tronco (CTs) epiteliais adultas e oligopotententes (SCHERMER; GALVIN; SUN, 1986; DANIELS et al., 2001; LI et al., 2007; MARIAPPAN et al., 2014; ALDROVANI; LAUS, 2015), que possuem razão núcleo-citoplasma elevada, ciclo celular quiescente na fase G0, divisão celular assimétrica, e ausência de junções comunicantes na membrana plasmática (SCHLÖTZER-SCHREHARDT; KRUSE, 2005). Devido à ausência de marcador molecular específico para detecção de CTs epiteliais limbais, a discriminação fenotípica é conseguida empregando-se painel de marcadores positivos e negativos (AHMAD; FIGUEIREDO; LAKO, 2006; ALDROVANI; LAUS, 2015). As CTs epiteliais limbais, juntamente com as células amplificadoras transitórias (TACs), também chamadas de precursoras, representam a população progenitora (indiferenciada) do epitélio corneal (ALDROVANI; LAUS, 2015; ALDROVANI; FILEZIO; LAUS, 2017). A diferença mais marcante entre as CTs e as TACs reside na capacidade proliferativa, que é praticamente inexistente na primeira, porém é elevada na segunda. A manutenção de qualquer tipo de epitélio estratificado, incluindo o corneal, depende de um equilíbrio entre a renovação e a divisão assimétrica das CTs, a proliferação de células precursoras, e a taxa de morte celular (YOON; ISMAIL; SHERWIN, 2014). Na presença de uma injúria epitelial, visando-se uma rápida reparação, a taxa de proliferação celular aumenta drasticamente (YOON; ISMAIL; SHERWIN, 2014).

O limbo está localizado na transição entre a córnea e a esclera. Sua anatomia foi descrita por Vogt (1921) e por Van Buskirk (1989). Aparentemente, a histoarquitetura do limbo varia na dependência da espessura do epitélio limbal (LE et al., 2016). A maioria das espécies tem, como característica estrutural marcante, a presença das paliçadas de Vogt. Tratam-se de elevações fibrovasculares radiais, formadas de matriz

extracelular (MEC) estromal vascularizada e rica em terminações nervosas não mielinizadas que, aparentemente, constituem o nicho primário das CTs epiteliais limbais corneais (MIRI et al., 2012; GRIEVE et al., 2015).

Nichos secundários de CTs têm sido identificados no limbo, notadamente nas espécies desprovidas de paliçadas de Vogt, como o rato (DUA et al., 2005; GRIEVE et al., 2015). Destacam-se as criptas epiteliais limbais (DUA et al., 2005) e as projeções focais estromais (SHORTT et al., 2007). O tamanho, a forma e a orientação das criptas e das projeções estromais diferem entre as espécies (GRIEVE et al., 2015), entretanto, sempre originam compartimentos tridimensionais. Admite-se que a regulação das CTs epiteliais limbais acontece por vias biológicas cibernéticas (ALDROVANI; FILEZIO; LAUS, 2017), que envolvem elementos solúveis e estruturais da MEC do nicho (DANIELS et al., 2001). Na via biológica cibernética, as células e a MEC comunicam-se em uma via de mão dupla, de tal sorte que a depleção ou a manipulação acidental ou experimental das células modificam a MEC e vice-versa (ALDROVANI; FILEZIO; LAUS, 2017). Evidências da comunicação célula-ECM foram pioneiramente reportadas por Hay (1991), cujo trabalho inspirou o desenvolvimento da primeira córnea humana por bioengenharia (GRIFFITH et al., 1999). Em 2003, España e colaboradores (2003) observaram que CTs epiteliais limbais cultivadas sobre MEC estromal corneal tendem à diferenciação e à apoptose, enquanto que CTs cultivadas sobre MEC estromal limbal preservam características de indiferenciação.

2.2. Deficiência de Células Tronco Limbais (LSCD)

Doenças da superfície ocular podem alterar o microambiente do limbo, ensejando perda de CTs epiteliais e desencadeando LSCD (ALDROVANI; LAUS, 2015). As alterações manifestam-se, comumente, por condições alérgicas, tóxicas, ou inflamatórias (ALDROVANI; LAUS, 2015). Fármacos sistêmicos ou locais, como a mitomicina C, podem contribuir para o surgimento ou o agravamento de LSCD (BRIGHTBILL, 2009). Os sinais clínicos mais evidentes, tanto no homem quanto em animais domésticos, são o blefarospasmo, a secreção ocular, o edema corneal, a

presença de defeitos epiteliais corneais persistentes, a vascularização corneal, a inflamação crônica, e a perda de transparência da córnea (GOMES et al., 1999; LAUS; ORIÁ, 1999). A depender do quantitativo de CTs perdidas, o epitélio corneal se torna vulnerável à invasão por células caliciformes da conjuntiva, desencadeando conjuntivalização (KIM; TSENG, 1995; PUANGSRICHARN; TSENG, 1995; DANIELS et al., 2001; DUA et al., 2003; DUA et al., 2009). Estima-se que 65% dos casos de LSCD, em seres humanos, se manifestam como conjuntivalização difusa associada à perda total de CTs limbais (BAYLIS et al., 2011). Em animais domésticos, todavia, não há estatísticas quanto à incidência de LSCD (ALDROVANI; LAUS, 2015).

Puangsricharn e Tseng (1995) estabeleceram critérios para se classificarem as LSCDs em uma de duas categorias, segundo o seu agente causal: categoria I – perda de CTs epiteliais, por destruição abrupta; categoria II – depleção gradual de CTs, por suporte estromal insuficiente. Incluem-se, na categoria I, pacientes com história clínica de destruição do limbo, como nas queimaduras químicas e nas ceratites infecciosas graves. Na categoria II, incluem-se os sem história de destruição do limbo, mas com evidências de exaustão funcional de CTs, como nas ceratites associadas a deficiências endócrinas múltiplas e nas limbites crônicas.

2.3. Principais Condutas para o Tratamento de LSCD

2.3.1. Desbridamento e Transplantação de Enxerto Conjuntival Limbal

Condutas para o tratamento de LSCD apoiam-se na restauração do estroma e na reposição das CTs epiteliais perdidas (ALDROVANI; LAUS, 2015). Para lesões parciais ou setoriais, o desbridamento mecânico do epitélio conjuntival representa estratégia efetiva (ATALLAH et al., 2016). Para tratar a LSCD total, enxerto conjuntival limbal autógeno (no caso de lesão unilateral) ou alógeno, entre vivos (para lesões bilaterais), em torno de 240 graus da circunferência limbal, é a primeira opção. Todavia, os procedimentos oferecem riscos ao olho doador, pois a obtenção dos tecidos pode induzir lesões (DUA et al., 2010). Fragmentos do limbo, da conjuntiva e o anel

corneoescleral de doadores cadáveres também podem ser transplantados para olhos com LSCD total, mas os riscos de recidiva são elevados e terapias imunossupressoras de longo prazo devem ser instituídas (SOLOMON et al., 2002).

Dua e colaboradores (2010) estimaram que o tempo determinante para o sucesso ou a falência dos transplantes de limbo é de cinco anos, em seres humanos. O percentual de êxito é de 65%, quando o doador tem parentesco com o receptor, e de 41%, quando não o tem (DUA et al., 2010).

Relativamente ao tratamento de cães com LSCD, Brunelli e colaboradores (2007) mostraram resultados satisfatórios com transplantação de limbo autógeno. Em três meses de acompanhamento pós-operatório, observaram-se nenhuma recidiva de conjuntivalização e ausência de sinais de desconforto. Poucos olhos apresentaram vascularização. A opacidade e a pigmentação corneais foram discretas. Os olhos doadores exibiram, no pós-operatório inicial, sinais de inflamação, que arrefeceram com o passar do tempo.

2.3.2. Membrana Amniótica (MA)

O uso de MA, em oftalmologia, iniciou-se com De Roth (1940) no tratamento de defeitos conjuntivais, porém, só ganhou notoriedade após a publicação de um estudo em que ela foi separada do córion e transplantada para olhos de coelhos com LSCD (KIM; TSENG, 1995). Na atualidade, a MA é importante aliada na reconstrução da superfície ocular, notadamente nos defeitos corneais persistentes ou nos recorrentes, nas perfurações corneais, nos defeitos conjuntivais, na LSCD parcial ou total, no pterígio e para certos tipos de neoplasia. A MA é, também, empregada em casos de olho seco, em bolhas filtrantes com vazamentos, e nas disfunções palpebrais (AZUARA-BLANCO; PILAI; DUA, 1999; GOMES et al., 1999; PRABHASAWAT; TESAVIBUL; KOMOLSURADEJ, 2001; HIGA et al., 2007). Em oftalmologia veterinária, ela já foi utilizada na ceratectomia penetrante, no simbléfaro, em certas neoplasias esclerais ou nas corneais, no tratamento de úlceras corneais, na LSCD parcial ou total,

nas queimaduras químicas e no sequestro corneal felino (BARROS et al., 1998; ANDRADE et al., 2009; BARACHETTI; GIUDICE; MORTELLARO, 2010).

A MA, para aplicações clínico-cirúrgicas em veterinária, pode advir de doador da mesma espécie ou não; neste caso, originando xenoenxertos, cuja viabilidade já foi comprovada (RENDAL-VÁZQUEZ et al., 2012; ALDROVANI et al., 2015; KOBASHIGAWA et al., 2015). Suas propriedades biomecânicas são peculiares (módulo de Young maior que o da córnea), o que a torna factível para transplantação na superfície ocular (ALDROVANI; LAUS, 2015). Ademais, espessura, resiliência, avascularidade, viscoelasticidade e propriedades ópticas congregam condições que permitem utilizar a MA no tratamento de afecções da córnea (CONNON et al., 2010).

A microscopia de luz convencional revela três das camadas da MA: epitélio, membrana basal e estroma (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999). Em nenhuma dessas há expressão de antígenos da classe maior de histocompatibilidade (HLA, HLB, HLC, DR) ou de beta-2-microglobulinas, o que possibilita a sua transplantação, com riscos de rejeição baixos. Relativamente aos mecanismos de ação, moléculas inibidoras da inflamação e da angiogênese foram detectadas nas células epiteliais, nas mesenquimais e no estroma do âmnion fresco (AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999; DUA et al., 2004; SAMPAIO et al., 2006; MALHOTRA; JAIN, 2014). A MA, portanto, enseja efeitos inibidores sobre a inflamação e a apoptose, e estimula a reparação tecidual (PRABHASAWAT; TESAVIBUL; KOMOLSURADEJ, 2001; MALHOTRA; JAIN, 2014; ALDROVANI; LAUS, 2015).

Em cirurgias reconstrutivas ou nas reparadoras da superfície ocular, a MA pode ser empregada como enxerto, neste caso, sendo incorporada ao tecido receptor para reduzir a inflamação (técnica do embutimento); ou como ponte para a migração de células corneais remanescentes (técnica da sobreposição). Ela pode, outrossim, ser utilizada como bandagem para proteção de tecidos transplantados à córnea, ou como substrato carreador de CTs para a superfície ocular em casos de LSCD total (DUA et al., 2004).

2.3.3. Terapia Celular

A terapia celular está emergindo como opção para tratar LSCD total (TSENG; PRABHASAWAT; BARTON, 1998; HOLLAND; MANNIS; BARRY LEE, 2015; ALDROVANI; LAUS, 2015). No Brasil, ela é praticada há mais de 15 anos e os índices de sucesso são crescentes (GOMES et al., 2009) em função do aprimoramento das técnicas em cultivos celulares. Há relatos sobre o uso de culturas de células da mucosa oral, da polpa dentária, do cordão umbilical, da conjuntiva e do epitélio limbal, no tratamento de LSCD (ALDROVANI; LAUS, 2015). No entanto, na presente revisão serão tecidas considerações apenas sobre o cultivo terapêutico de células do limbo, por se tratar do mais difundido entre os centros de referência em superfície ocular. O procedimento foi realizado pela primeira vez em 1997, por Pellegrini e colaboradores, e consiste em cultivar um explante de limbo ou uma suspensão de células epiteliais limbais sobre substratos que podem ser sintéticos, matriz ou selantes de fibrina, lentes de contato ou membrana biológica, e depois transplantá-los para a superfície ocular com LSCD (PELLEGRINI et al., 1997; TSENG; PRABHASAWAT; BARTON, 1998; SANGWAN et al., 2012; HOLLAND; MANNIS; BARRY LEE, 2015; ALDROVANI; LAUS, 2015).

Os índices de sucesso da terapia com células “ex-vivo” variam na dependência do agente causal de LSCD, da fonte doadora de células, do protocolo de cultivo celular e do substrato utilizado para expandir e carrear as culturas celulares. Ademais, os procedimentos autógenos evoluem melhor do que os alógenos (AHMAD et al., 2010).

2.4. Expansão “Ex-vivo” de Células Epiteliais Limbais

Culturas celulares para transplantação à superfície ocular com LSCD podem ser estabelecidas a partir de suspensões de células epiteliais limbais ou de explantes superficiais de limbo corneoescleral. A viabilidade das culturas depende de características inerentes às células (genéticas e epigenéticas) e de fatores

microambientais inerentes ao meio básico de cultivo e ao substrato de expansão celular. Relativamente aos meios de cultivo, os mais utilizados para se expandirem células epiteliais limbais são o SHEMA (“supplemental hormonal epithelial medium”), o KSFM (“keratinocyte serum-free medium”) e o Epilife® (LOUREIRO et al., 2013). Quanto ao substrato para a expansão das células, a MA é o padrão ouro (ALDROVANI; LAUS, 2015).

Protocolos de preparação da MA, para aplicação como substratos em cultivos celulares, podem envolver agentes químicos ou enzimáticos na remoção do epitélio amniótico. Dentre os químicos, resultados melhores foram percebidos com ácido etileno-amino-tetra-acético (EDTA), uma vez que ele não destrói a membrana basal e preserva o estroma (GRUETERICH; ESPANA; TSENG, 2002). Koizumi e colaboradores (2007), ao compararem as características de células epiteliais limbais crescidas sobre MAs íntegras vs. tratadas em EDTA, observaram que culturas provenientes de membranas desepitelizadas apresentavam-se mais estratificadas e mais ricas em estruturas de adesão.

Dentre os fatores microambientais capazes de afetar a viabilidade de células “ex-vivo” destacam-se os parácrinos, a interação via complexos de adesão focal com macromoléculas de MEC e a biodisponibilidade de oxigênio e de moléculas solúveis (fatores de crescimento, de sobrevivência e de apoptose, entre outros) no substrato (GRUETERICH; ESPANA; TOUHAMI, 2002). Reconhece-se que os processos de apoptose, de diferenciação e de migração, bem como a permeabilidade, a polaridade e o metabolismo das células “ex-vivo”, são influenciáveis pelo microambiente (AHMAD; FIGUEIREDO; LAKO, 2006; REILLY; ENGLER, 2010; ALDROVANI et al., 2015; ALDROVANI, FILEZIO, LAUS, 2017).

Comparativamente aos outros substratos, a MA preserva melhor a vitalidade das CTs nas culturas celulares, o que resulta em quantitativo elevado de células progenitoras que expressam o fator de transcrição nuclear delta p63 (TRCIN et al., 2015). O percentual de células imunopositivas para delta p63, nas culturas, representa condição decisiva para o sucesso terapêutico. Aproximadamente 78% dos casos bem-sucedidos, ou seja, que evoluem sem intercorrências, contêm, no mínimo, 3% de

células progenitoras (RAMA et al., 2010). Ademais, culturas primárias (ou de primeira passagem) também parecem evoluir melhor, uma vez que possuem mais células com capacidade proliferativa do que culturas secundárias, terciárias, ou quaternárias (YOON; ISMAIL; SHERWIN, 2014).

Não há consenso, ou diretrizes multicentro, quanto ao protocolo ideal para se expandirem células epiteliais limbais “ex-vivo” ou para transplantá-las à superfície ocular. Resultados de transplantes de MA contendo células “ex-vivo” variam entre os diferentes centros (ZHAO; MA, 2015). Curvas atuariais de Kaplan-Meier mostram que casos de insucesso ocorrem mais nos dois primeiros anos de pós-operatório e que normalmente eles advêm da exaustão das células transplantadas (BAYLIS et al., 2011).

Com o intuito de se aumentar a viabilidade das culturas limbais e de se favorecer a proliferação celular, estratégias desenvolvidas para outras linhagens estão sendo utilizadas na manutenção de constructos formados pela associação “ex-vivo” das células epiteliais limbais com a MA. Como exemplos mais conhecidos, destacam-se o “air-lifting” e o “feed layer”. O primeiro consiste em baixar o volume do meio de cultivo ao nível da superfície do epitélio (KAWAKITA et al., 2005; CHEN et al., 2010), para reduzir os espaços intercelulares e promover estratificação (BAN et al., 2003). No segundo, utiliza-se co-cultura de fibroblastos de camundongo 3T3, letalmente irradiados ou tratados com mitomicina C, como camada alimentadora das células epiteliais limbais (TANIOKA et al., 2007). O uso de células 3T3 favorece o crescimento de camadas uniformes de epitélio limbal corneal (BAYLIS et al., 2011; GHOU BAY-BENALLAOUA et al., 2013). Cristovam e colaboradores (2008) observaram que o “feed layer” ajuda a promover o crescimento e a preservar as CTs do limbo cultivado. Todavia, discutem-se questões de biossegurança associadas ao uso clínico da técnica. Há riscos, pois se aumentam as chances de rejeição, de infecção e de microquimerismo (BAYLIS et al., 2011; MEI et al., 2012; ZAMUDIO et al., 2016; BEHAEGEL et al., 2017).

Na busca por técnicas ou processos que pudessem melhorar a qualidade de culturas celulares para terapia limbal, González, Chen e Deng (2017) excluíram do meio de cultivo, os componentes xenobióticos, como toxina colérica e dimetil sulfoxido, porém isso reduziu significativamente o quantitativo de células progenitoras e não

favoreceu o crescimento celular. Outros autores propuseram modificar, não o meio de cultivo, mas a geometria ou a configuração dimensional dos sistemas de expansão celular (MEIER; HAY, 1975; REILLY; ENGLER, 2010; LEVIS et al., 2013; LI et al., 2014; TSAI; TSAI, 2014; NAKAMURA et al., 2016). Em teoria, quando a configuração do sistema é alterada de bidimensional para tridimensional ocorrem modificações nas vias de sinalização microambiental (bioquímica e biofísica) que regulam a viabilidade e a sobrevivência das culturas celulares (BERTHIAUME et al., 1996; LEVIS et al., 2013; FISHER; TAM; SHOICHET, 2014; ROHAINA et al., 2014; TSAI; TSAI, 2014; ZHANG et al., 2014). Os sistemas de cultivo tridimensionais foram estabelecidos, em princípio, para explorar mecanismos de proliferação e de diferenciação das culturas de células hematopoiéticas. Desde então, eles têm sido empregados na expansão de uma variedade de culturas, por fornecerem às células estímulos dorsais e ventrais, tal como ocorre no nicho biológico “in vivo” (ZHANG, 2004).

Pesquisas comparando diferentes técnicas de cultivo celular mostraram que muitas linhagens de células progenitoras, ou mesmo células adultas, se desenvolvem bem em sistemas tridimensionais, ou seja, quando cultivadas entre dupla camada de substrato ou de matriz polimérica, ou ainda, entre lamínulas de vidro (SWIFT; PFEIFER; BROWVER, 2010; WANG; SUI, 2011). O intento, conhecido por cultivo sanduíche, promove a reorganização estrutural do citoesqueleto e, aparentemente, potencializa a funcionalidade das células mantidas em cultura. O sanduíche oferece configuração tridimensional e estímulos dorsais e ventrais para a proliferação celular, representando opção viável para se expandirem células epiteliais (ARTYM; MATSUMOTO, 2010). Por exemplo, células Vero do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), quando cultivadas em sanduíche, geram tecidos epiteliais funcionais contendo lâmina basal (HAAS, 2000). No caso de culturas de CTs, há evidências de que a configuração sanduíche preserva a “stemness” (HAAS, 2000; ARTYM; MATSUMOTO, 2010; BALLESTER-BELTRÁN et al., 2015).

Vislumbrando aplicações na cirurgia reconstrutiva da superfície ocular, Hashemi e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos da configuração sanduíche sobre culturas celulares. Os autores não cultivaram células limbais, mas utilizaram culturas de células

da mucosa oral e observaram aumento relevante nas taxas de proliferação celular, comparativamente às técnicas tradicionais de cultura bidimensional envolvendo substratos do tipo monocamada. Houve formação de epitélio estratificado, com células imunopositivas para o par 3/12 de citoqueratinas (marcador de diferenciação em células epiteliais corneais), e rico em integrinas $\beta 1$ e em estruturas de adesão. Após esse estudo, nenhum outro foi publicado no mesmo escopo.

Até o presente, desconhecem-se estudos sobre o potencial terapêutico de sanduíches formados por células epiteliais limbais cultivadas entre duas camadas de MA, para a reconstrução de superfícies oculares com LSCD.

2.5. Hipóteses

Duas hipóteses alicerçaram a pesquisa. A primeira é de que a configuração do sistema utilizado para promover expansão “ex-vivo” de células epiteliais limbais, destinadas à reconstrução de superfícies oculares com LSCD, seja um fator determinante dos resultados terapêuticos. A segunda é de que sistemas tridimensionais, como o sanduíche, com dupla camada de MA, oferecem culturas celulares epiteliais limbais viáveis, com potencial para aplicações clínico-cirúrgicas.

2.6. Objetivos

Frente ao exposto, objetivou-se com a pesquisa compararem-se as imunoexpressões de marcadores de células progenitoras (delta p63) e de células em proliferação (PCNA) em culturas de explantes limbais de coelhos expandidos sobre MA humana, empregando-se o método convencional (um substrato simples de MA) e o sanduíche (cultivo entre duas camadas de MA). Além disso, estudarem-se a evolução clínica, a morfometria tecidual, e os imunofenótipos de indiferenciação, de proliferação e de morte celular (apoptose) de córneas com LSCD tratadas por terapia celular, ou

seja, pela transplantação de constructos formados por MA associada com células limbais expandidas “ex-vivo”.

3. Material e Métodos

3.1. Considerações Quanto à Ética

A pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob o número de protocolo 05429/14. Os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o estatuto para uso de animais da “Association for Research in Vision and Ophthalmology¹” (ARVO) foram obedecidos.

3.2. Animais e Delineamento Experimental

Utilizaram-se 21 coelhos da linhagem Nova Zelândia Branco, saudáveis, machos e fêmeas, adultos, pesando entre 2,0 e 2,5 kg. Os indivíduos foram mantidos individualmente em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, em ambiente ventilado, com dieta à base de ração comercial e de água potável, à vontade. Como critérios de inclusão, consideraram-se a semiotécnica oftálmica balizada no teste lacrimal de Schirmer², na biomicroscopia com luz em fenda³, na tonometria de aplanção⁴, na oftalmoscopia binocular indireta⁵ e no teste do tingimento pela fluoresceína sódica⁶.

O olho direito (OD) de cada animal foi submetido a protocolo cirúrgico para indução de LSCD. O olho esquerdo (OE) foi submetido à biópsia limbal superficial apenas para a obtenção de tecidos, que foram expandidos sobre uma camada de MA

¹ http://www.arvo.org/About_ARVO/Policies/Statement_for_the_Use_of_Animals_in_Ophthalmic_and_Visual_Research/

² Teste de Schirmer, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

³ Portable SL 14, Kowa, Tokyo, Japan

⁴ Tono-Pet Avia, Reichert, Norwell, MA, USA

⁵ Oftalmoscópio binocular indireto OHC, Eye Tec, São Carlos, Brasil

⁶ Fluoresceína Strips, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

(técnica de cultura convencional, n = 10, grupo G-mono) ou entre duas MAs (técnica de cultivo em sanduíche, n = 11, grupo G-Sand), a alocação dos animais foi realizada de forma aleatória, mantendo a homogeneidade entre grupos. Metade dos constructos (de cada grupo) formados pela associação de MA com tecido limbal foi incluída em parafina para posterior avaliação por imuno-histoquímica; a outra metade foi transplantada para olhos com LSCD. O transplante foi autólogo [doador (OE) e receptor (OD)].

O delineamento experimental da pesquisa está simplificado na Fig. 1.

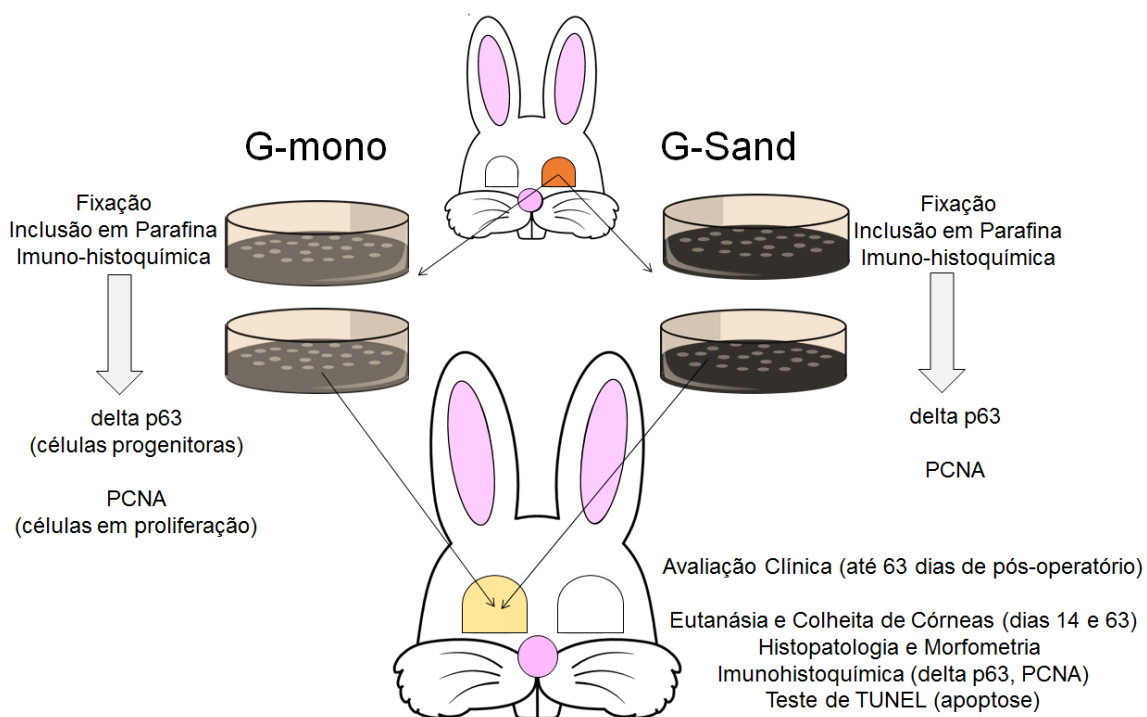


Figura 1. Desenho simplificado do estudo. Olho esquerdo (OE) do coelho foi submetido a biópsia limbal para obtenção de explante, que foi dividido em duas metadas iguais, que foram cultivadas empregando-se método tradicional (sobre uma camada de MA, G-mono) ou Sanduíche (entre duas camadas de MA, G-Sand). Uma parte das amostras de cada grupo foi fixada em formalina tamponada 10%, incluída em parafina e avaliada por imuno-histoquímica; a outra foi transplantada para o olho direito (OD) com LSCD, com 28 dias de evolução. Os transplantes foram autólogos [doador (OE) e receptor (OD)].

3.3. Protocolo para Indução da LSCD

Como medicação pré-anestésica, os coelhos receberam sulfato de morfina,⁷ na dose 0,5 mg/kg, pela via intramuscular. Após 15 minutos, induziu-se a anestesia geral inalatória, com isoflurano⁸, empregando-se máscara. A anestesia foi mantida utilizando-se sonda orotraqueal número 3. Tricotomia periocular e antissepsia, com solução de iodopovidona 0,1%, foram realizados. A dessensibilização corneal foi obtida com colírio de tetracaína 1% contendo 0,1% de fenilefrina⁹, imediatamente ao isolamento do campo operatório com panos e adesivo estéril¹⁰. A blefarostase foi realizada e o olho foi posicionado em proptose.

Procedimentos para indução de LSCD foram realizados sob a magnificação de microscópio cirúrgico¹¹. Realizou-se peritomia em 360 graus, seguida por ceratolimbectomia em 360 graus (de 2 mm). Ato contínuo, papel filtro¹², com diâmetro de 3 cm, foi embebido em NaOH¹³ 0,5 M (pH 12) e gentilmente pressionado sobre a córnea paracentral, por 1 minutos. A superfície ocular foi lavada com NaCl 0,9% estéril¹⁴, por 1 min (Fig. 2). Procedeu-se, posteriormente, ao desbridamento mecânico do epitélio corneal remanescente, com lâmina de bisturi número15¹⁵ (ANDRADE et al., 2009).

Para analgesia pós-operatória, empregou-se cloridrato de tramadol¹⁶, na dose de 4 mg/kg, a intervalos regulares de 12 horas, por 4 dias consecutivos. Aos mesmos intervalos, administrou-se terapia antibiótica local com tobramicina 0,3%¹⁷. Quando necessário, o tempo de terapia analgésica foi estendido.

No presente estudo, o fenótipo LSCD foi definido como presença concomitante de neovascularização e opacificação corneais, de inflamação variando entre moderada

⁷ Dimorf, Cristália, Itapira, Brasil

⁸ Isoforine, Cristália, Itapira, Brasil

⁹ Anestésico, Allergan, Guarulhos, Brasil

¹⁰ Tegaderm Film, 3M, Sumaré, Brasil

¹¹ Microscópio cirúrgico M-22, DFV, Valença, RJ, Brasil

¹² Whatman 40, F. Maia Ltda, Cotia, Brasil

¹³ Synth, Diadema, Brasil

¹⁴ Eurofarma, Ribeirão Preto, Brasil

¹⁵ Lâmina de Bisturi esterilizada n 15, Solidor, Joinville, Brasil

¹⁶ Tramadon, cloridrato de tramadol, Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil

¹⁷ Tobramicina, Biosintética, Guarulhos, Brasil

e intensa, e de defeitos epiteliais persistentes (XU et al., 2012; AFSHARKHAMSEH et al., 2016).

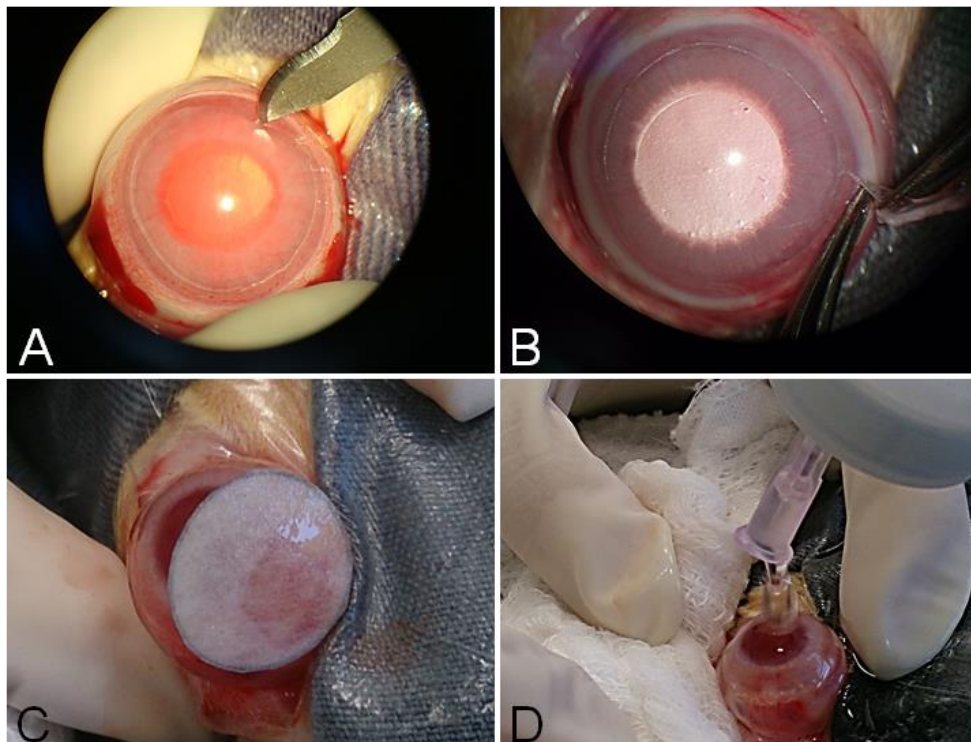


Figura 2. Procedimento cirúrgico para indução de LSCD em coelhos. O olho direito (OD) foi submetido a uma peritomia em 360° seguida por uma ceratolimectomia, utilizando bisturi (A) e tesoura (B). A superfície corneal foi cauterizada com auxílio de papel filtro embebido com solução aquosa de NaOH 0,5% (C), ato contínuo foi lavada com solução de NaCl 0,9% (D). Ao final, o epitélio remanescente foi removido com auxílio de bisturi.

3.4. Protocolo para Obtenção do Explante de Limbo

O explante de limbo foi coletado do OE, 21 dias após a indução da LSCD no olho adelfo. A medicação pré-anestésica, os procedimentos anestésicos e os cuidados pós-operatórios foram os mesmos, relativamente à indução da LSCD.

A remoção do fragmento de limbo corneoescleral foi feita sob a magnificação de um microscópio cirúrgico. A área excisada foi de 3 mm, mensurada com paquímetro. O fragmento de limbo foi coletado (posição de 11 à 1 horas) com bisturi angulado

crescente¹⁸ e com pinça colibri¹⁹. O endotélio e o estroma posterior (cerca de 2/3) dos explantes de limbo foram removidos e descartados (VALDETARO et al., 2016). Na sequência, os explantes limbais superficiais foram divididos em duas metades iguais, que foram individualmente cultivadas sobre MA.

3.5. Obtenção e Preparação de MA Humana

MA's humanas foram coletadas no curso de operações cesarianas realizadas em três pacientes assistidas no Amparo Maternal do Hospital São Paulo, da Escola Paulista de Medicina (EPM-Unifesp), após realização de exames sorológicos para HIV, HPV, hepatites B e C e sífilis, e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As MA's foram desepitelizadas em EDTA²⁰ 0,2%, raspadas com “scraper”²¹ para remoção de células remanescentes, estendidas sobre membranas de ester celulose mistas²² (com a face epitelial voltada para cima) e cortadas em fragmentos de 2 cm x 2 cm (VALDETARO et al., 2016). Os complexos MA-filtro foram lavados em tampão fosfato²³, pH 7,4, contendo 1000 UI/mL de penicilina G²⁴, 20 mcg/mL de estreptomicina²⁵ e 2,5 mcg/mL de anfotericina B²⁶. Em seguida, foram acondicionados em frascos estéreis contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco²⁷ e glicerina²⁸ 98%, na proporção de 1:1, volume/volume. O material foi criopreservado em biofreezer (-80°C), até o momento do uso.

Os procedimentos foram realizados com consentimento das gestantes e após aprovação da Comissão de Ética Médica da Unifesp, sob protocolo número 227/98.

¹⁸ Bevel Up, Alcon, São Paulo, Brasil

¹⁹ Pinça Colibri, HR Instrumentos, São Paulo, Brasil

²⁰ EDTA, Sigma Company, St. Louis, MO, USA

²¹ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

²² Filtros de nitrocelulose, Ophthalmos, São Paulo, Brasil

²³ Ophthalmos, São Paulo, Brasil

²⁴ Ophthalmos, São Paulo, Brasil

²⁵ Ophthalmos, São Paulo, Brasil

²⁶ Ophthalmos, São Paulo, Brasil

²⁷ Dulbecco's modified Eagle Medium, Sigma Company, St. Louis, MO, USA

²⁸ Ecibra, São Paulo, Brasil

3.6. Cultura de Explante

Dois protocolos, diferindo quanto à configuração do sistema para expansão de células, foram utilizados para se cultivarem os explantes (Fig. 3). O primeiro consistiu em cultivar o explante limbal sobre a face desepitelizada de uma MA (grupo G-mono). O segundo consistiu em cultivar o explante limbal entre as faces desepitelizadas de duas MAs (grupo G-Sand). Relativamente ao cultivo sanduíche, o explante primeiro foi cultivado, por 1 hora, sobre uma MA descoberta, para favorecer sua adesão ao substrato. Em seguida, a MA contendo o explante foi coberta com outra MA.

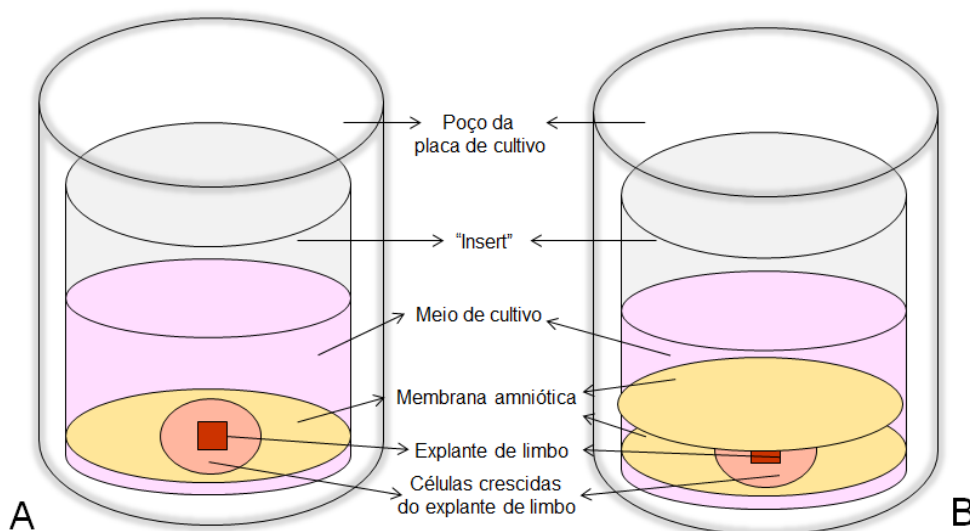


Figura 3. Desenho ilustrando os métodos de cultivo empregados no estudo. (A) protocolo tradicional de cultura em explante sobre monocamada de membrana amniótica. (B) protocolo sanduíche de cultura em explante entre duas camadas de membrana amniótica. O meio de cultivo utilizado, em ambos os casos, foi o Epilife®, contendo suplemento para crescimento de células corneais.

Todos os fragmentos de MA foram fixados dentro de “inserts”²⁹ posicionados em placas de seis poços, para não emergirem durante o cultivo (VALDETARO et al., 2016). Previamente ao uso, as MAs foram removidas dos filtros de nitrocelulose¹⁷ e lavadas em tampão fosfato⁴, pH 7,4, 0,01 M, para remoção dos traços de glicerina.

²⁹ Corning Netwells Inserts® - Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA

As condições de cultivo foram iguais para todos (estufa com 5% de CO₂ e 37°C). Empregou-se, como meio de cultivo, Epilife®³⁰ contendo suplemento para crescimento de células corneais³¹ (LOUREIRO et al., 2013). Não se empregaram soro fetal e “air-lifting”. A troca do meio foi realizada a cada 3 dias, por 7 dias (JEON, 2015). A cada troca, as amostras receberam 2,5 mL de meio de cultivo.

3.7. Transplantação de MA com Células “Ex-vivo” para a Córnea com LSCD

Fragmentos de MA contendo células expandidas “ex-vivo” de explantes limbais foram transplantados para a córnea (superfície ocular) com LSCD induzida 28 dias antes. A medicação pré-anestésica, os procedimentos anestésicos e os cuidados pós-transplante foram os mesmos, relativamente à indução da LSCD. O transplante foi autógeno. Os animais foram direcionados, por sorteio, aos diferentes grupos de tratamento.

Após tricotomia e antissepsia, a superfície corneal com LSCD foi excisada sob a magnificação de um microscópio cirúrgico (i.e., ceratectomia). Relativamente ao G-mono, a MA foi posicionada sobre a córnea, com a face contendo células cultivadas voltadas para cima, e, em seguida, foi revestida com uma bandagem de MA (sem células). A sutura das MAs foi feita na região do limbo empregando-se mononylon 9-0³², em oito pontos simples separados, e mononylon 10-0³³, em padrão de sutura contínuo (Fig. 4).

O procedimento cirúrgico para o G-Sand foi similar ao de G-mono. A única diferença foi a transplantação do sanduíche de MAs contendo células, que se deu em bloco, sem uso de MA adicional no final. Os pontos não foram removidos.

³⁰ Epilife, Cascade Biologics, Portland, OR, USA

³¹ Human Corneal Growth Supplement, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

³² Ethicon, São Paulo, Brasil

³³ Ethicon, São Paulo, Brasil

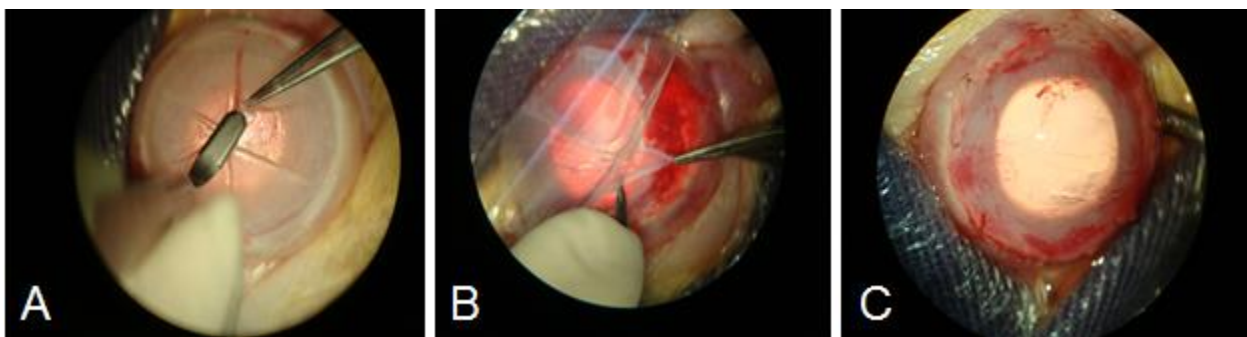


Figura 4. Transplantação de MAs contendo células “ex-vivo” para córneas de coelhos com LSCD. Em A, ceratectomia da superfície corneal. Em B, posicionamento da MA. Em C, consecução de sutura para fixação da MA ao leito receptor.

3.8. Pós-Transplante e Análise da Intenção-de-Tratar

Os olhos foram avaliados e fotografados³⁴ nos dias 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63 do pós-transplante. Sinais de quemose, de blefaroespasma, de secreção ocular e de hiperemia conjuntival foram avaliados quanto à incidência e, quando presentes, quali-quantificados em (1) discretos (2) moderados, e (3) severos. Eventos e intercorrências, inclusive nas pálpebras, foram anotados.

A transparência corneal foi classificada em (0) córnea totalmente transparente, (1) opacidade discreta, permitindo observar detalhes da íris; (2) opacidade moderada, dificultando a observação da íris; (3) opacidade severa, não permitindo a percepção do contorno pupilar (ANDRADE et al., 2009; SELVER et al., 2016) (Fig.5). As avaliações contaram com dois examinadores e foi conduzida de forma duplo cega.

³⁴ Retinógrafo, Topcon, Tokyo, Japan

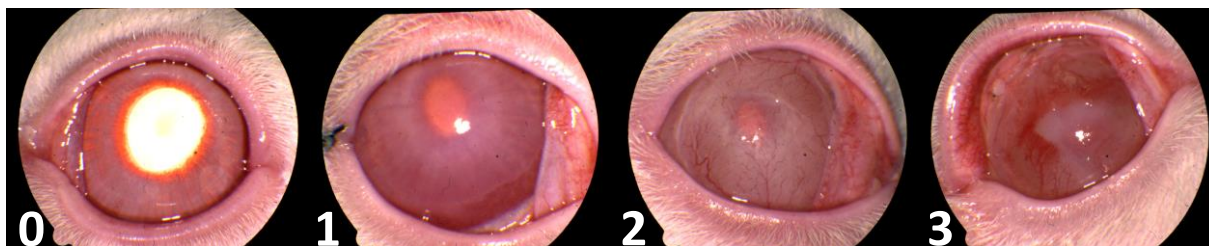


Figura 5. Imagens fotográficas exemplificando a classificação utilizada para a transparência corneal. (0) transparente, (1) discreta opacidade, (2) moderada e (3) severa.

O teste do tingimento pela fluoresceína sódica foi empregado, a partir do dia 14 de pós-transplante, para a avaliação das lesões ulcerativas e dos defeitos epiteliais corneais. Os percentuais de áreas corneais ulceradas e de áreas corneais contendo neovasos foram calculados a partir de imagens de olhos fotografados nos dias 14 e 63 de avaliações, com auxílio do programa de computador ImageJ³⁵ (SILVA et al., 2012; GOKTAS et al., 2014).

Os dados referentes à opacidade corneal e aos defeitos epiteliais corneais persistentes foram estudados empregando-se o método analítico da intenção-de-tratar (YELLAND et al. 2015), ou seja, a alocação pareada dos olhos foi respeitada na avaliação estatística univariada, do pré-transplante ao último dia das avaliações pós-transplante.

3.9. Confeção de Lâminas para Histologia

Córneas foram colhidas de coelhos submetidos a eutanásia ativa, utilizando-se aprofundamento anestésico³⁶ nos dias 14 e 63 de pós-transplante. Elas, bem como amostras de G-mono e de G-Sand não transplantadas para olhos com LSCD, foram fixadas em formalina tamponada 10%³⁷, desidratadas em soluções crescentes de álcool

³⁵ <http://imagej.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, Bethesda, MD, US

³⁶ Tiopenthax®, tiopental sódico, Cristália, Itapira, Brasil

³⁷ Dinâmica, São Paulo, Brasil

etílico³⁸ e processadas para inclusão em paraplast sem dimetilsulfóxido³⁹. Os cortes confeccionados de constructos MA-células foram avaliados à imuno-histoquímica. Cortes de córneas com LSCD, e que receberam membranas contendo células, foram avaliados morfometricamente, à imuno-histoquímica, e pelo teste de TUNEL.

3.10. Morfometria de Tecido Corneal

Cortes de córneas operadas (G-mono e G-Sand) foram desparafinizados em xilol⁴⁰, tratados em soluções decrescentes de álcool etílico, hidratados em água, e corados com tricrômico de Masson⁴¹.

Córneas coradas com Masson foram estudadas em microscópio de luz⁴² equipado com vídeo-camera e “softwares”^{43,44} de análise de imagens. O material foi avaliado quanto à presença de neovasos no estroma, o grau de estratificação do epitélio corneal, a espessura do epitélio corneal e a espessura corneal total. Todas as medidas de espessura (mcg) foram feitas com auxílio da ferramenta “straight line” disponível no Menu do “software” ImageJ. A calibração espacial do sistema de análise de imagens foi feita com a régua micrométrica do microscópio.

3.11. Imuno-Histoquímica

Utilizaram-se anticorpos primários para detecção do fator de transcrição nuclear delta p63 (diluição, 1:1000) e do antígeno de proliferação nuclear PCNA (diluição, 1:1500). Todos os anticorpos foram adquiridos da Abcam Company⁴⁵. Amostras de rim humano foram utilizadas como controles positivos para delta p63 e PCNA (APÊNDICE A).

³⁸ Synth, São Paulo, Brasil

³⁹ Merck, Darmstadt, Germany

⁴⁰ Synth, São Paulo, Brasil

⁴¹ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

⁴² BX 53, Olympus, Tokyo, Japan

⁴³ Cell Sens, Olympus, Tokyo, Japan

⁴⁴ ImageJ, <http://imagej.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

⁴⁵ Abcam, Cambridge, England

Cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em soluções decrescentes de álcool etílico e lavados em água deionizada. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato, pH 6,0⁴⁶. A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de 8% de peróxido de hidrogênio em álcool metílico, por 20 minutos. As proteínas inespecíficas foram bloqueadas⁴⁷ em temperatura ambiente (25°C), por 1 hora. A incubação dos cortes com os anticorpos primários foi “overnight” a 4°C. O Kit Advance⁴⁸ foi utilizado como anticorpo secundário, empregando-se diaminobenzidina⁴⁹ (DAB) como cromógeno. Contra-colorações foram feitas com hematoxilina de Harris.

As imunomarcações, estudadas à microscopia de luz⁵⁰, foram ranqueadas, segundo suas frequências, por amostra, em ausente, 1+ (<10% de imunomarcação), 2+ (10%–30%), 3+ (31%–50%), 4+ (51%–80%), 5+ (>80%); o foram também segundo suas intensidades, em ausente, baixa, média e alta. Todas as avaliações foram qualitativas. Considerando-se que reações em imuno-histoquímica não obedecem às leis de Beer-Lambert (VAN DER LOOS, 2008), as avaliações foram subjetivas, conduzidas sem auxílio de “software”.

3.12. Teste de TUNEL

O teste de TUNEL (marcação de “nicks” por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase) foi realizado seguindo-se recomendações do fabricante⁵¹. A DAB foi utilizada como cromógeno. As avaliações foram conduzidas empregando-se a microscopia de luz. Amostras de rim com apoptose induzida por infecção bacteriana foram utilizadas como controles negativos (APÊNDICE B). As amostras foram estudadas, subjetivamente, por único examinador, e ranqueadas em marcação ausente, baixa, média e alta.

⁴⁶ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

⁴⁷ Leite em pó Molico, Nestle, São Paulo, Brasil

⁴⁸ Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

⁴⁹ Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

⁵⁰ BX-53 Olympus, Tokyo Japan

⁵¹ TUNEL POD Roche, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.13. Análises dos Dados

As variáveis contínuas foram testadas para a normalidade estatística e avaliadas empregando-se o teste de quiquadrado, o teste de Wilcoxon, o teste t não pareado, a análise de variância (ANOVA) de uma via, e a ANOVA para medidas repetidas, com o pós-teste de Tukey. Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas significativas. Todos os cálculos e as comparações foram realizados empregando-se “softwares”^{52,53}.

4. Resultados

4.1. Condições Clínicas dos Olhos de G-mono e G-Sand

Os grupos G-mono e G-Sand diferiram quanto à incidência de quemose e de blefarospasmo, nas avaliações do dia 3 e do dia 14, respectivamente (Tabela 1). No dia 3, casos de quemose foram mais frequentes entre coelhos de G-Sand ($P < 0,05$). No dia 14, observaram-se mais olhos com blefarospasmo em G-mono ($P < 0,05$).

⁵² GraphPad Software, San Diego, CA, USA

⁵³ MedCalc Inc, Mariakerke, Belgium

TABELA 1. Porcentagem de olhos, em cada grupo da pesquisa, que após os transplantes apresentaram-se com sinais de quemose, de blefarospasmo, de secreção, de hiperemia conjuntival e de opacidade corneal

Momentos de avaliação	Sinais clínicos									
	Quemose		Blefarospasmo		Secreção		Hiperemia		Opacidade corneal	
	G-mono	G-S	G-mono	G-S	G-mono	G-S	G-mono	G-S	G-mono	G-S
Dia 1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Dia 3	66,6	100*	100	100	100	100	100	100	100	100
Dia 7	50,0	50,0	58,3	75,0	83,3	100	66,6	66,6	91,6	100
Dia 14	8,30	8,30	66,6	33,3*	75,0	83,3	16,6	16,6	100	100
Dia 21	0	0	16,6	16,6	66,6	83,3	33,3	0	100	100
Dia 28	0	0	33,3	16,6	50,0	75,0	16,6	16,6	100	100
Dia 35	0	0	33,3	16,6	33,3	50,0	0	0	100	100
Dia 42	0	0	16,6	16,6	50,0	50,0	16,6	0	100	100
Dia 49	0	0	33,3	16,6	50,0	33,3	0	0	100	100
Dia 56	0	0	50,0	16,6	50,0	33,3	0	16,6	100	100
Dia 63	0	0	16,6	16,6	50,0	33,3	16,6	16,6	100	100

G-S, G-Sand .

Os resultados estão expressos em porcentagem.

* $P < 0,05$ vs. G-mono.

Valores dentro do mesmo retângulo diferiram significativamente.

Relativamente aos escores (1 a 3) de intensidade dos sinais clínicos (Fig. 6), os olhos de G-mono e de G-Sand não apresentaram diferenças quanto à quemose (Fig. 6A), que foi mais intensa nos dias 1 e 3, regredindo a partir do dia 7, e desaparecendo no dia 21.

Nos dias 1 e 7, os sinais de blefarospasmo foram mais intensos entre olhos de G-mono ($P < 0,05$) (Fig. 6B). Na quinta (dia 35), sexta (dia 42) e sétima (dia 49) semanas de avaliações, os olhos de G-Sand apresentaram blefarospasmo de moderado a severo, que regrediu nas avaliações posteriores. No dia 63, observou-se diferença significativa entre G-mono e G-Sand ($P < 0,05$).

Os olhos de G-Sand apresentaram sinais mais intensos de secreção, comparativamente aos de G-mono, nas avaliações dos dias 49 e 63 ($P < 0,05$) (Fig. 6C). Relativamente à hiperemia conjuntival, ela se mostrou mais intensa em olhos de G-Sand, nos dias 14 e 28 de avaliação ($P < 0,05$) (Fig. 6D). Nas avaliações subsequentes, não houve diferenças entre os grupos da pesquisa.

Não se observaram diferenças na intensidade da opacidade corneal entre os grupos, nos diferentes momentos da avaliação ($P > 0,05$) (Fig. 5E) (Fig. 7).

No último dia de avaliação (dia 63) observou-se que os animais apresentaram deformações palpebrais. Na pálpebra superior encontraram-se 14,28% de alterações intensas, 23,80% de moderadas, e 42,5% de leves; na inferior visibilizaram-se 9,52% de alterações intensas, 14,28% de moderadas e 23,9% de leves.

Nenhum dos olhos apresentou deiscência da membrana, sendo que as mesmas se mantiveram bem posicionadas até o final das avaliações

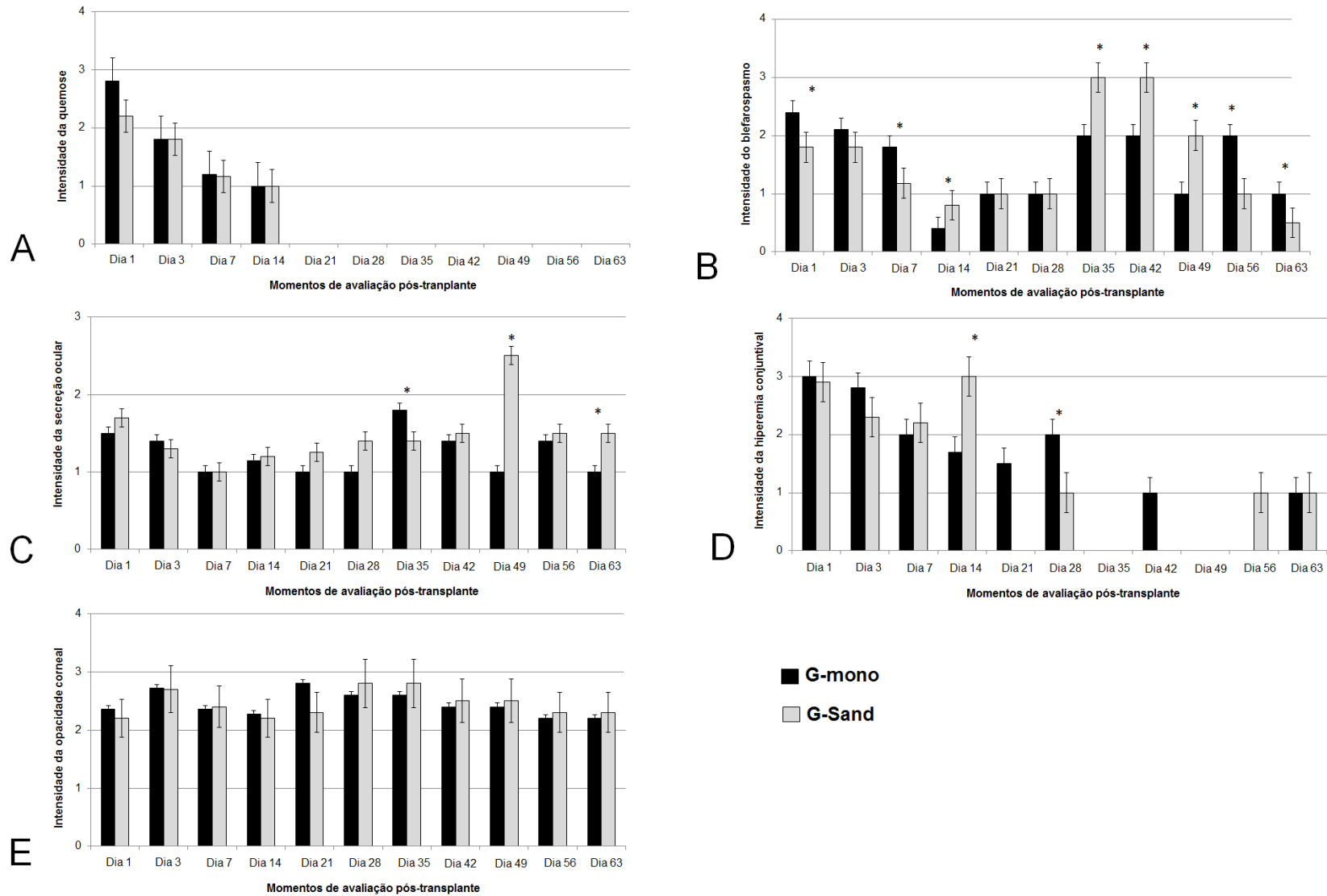


Figura 6. Gráficos de barras, com erro padrão, representando as intensidades médias dos sinais clínicos (escores de 1 a 3) estudados nos grupos G-mono e G-Sand. (A) Quemose; (B), Blefarospasmo; (C) Secreção ocular; (D) Hiperemia conjuntival; (E) Opacidade corneal. * $P < 0,05$.

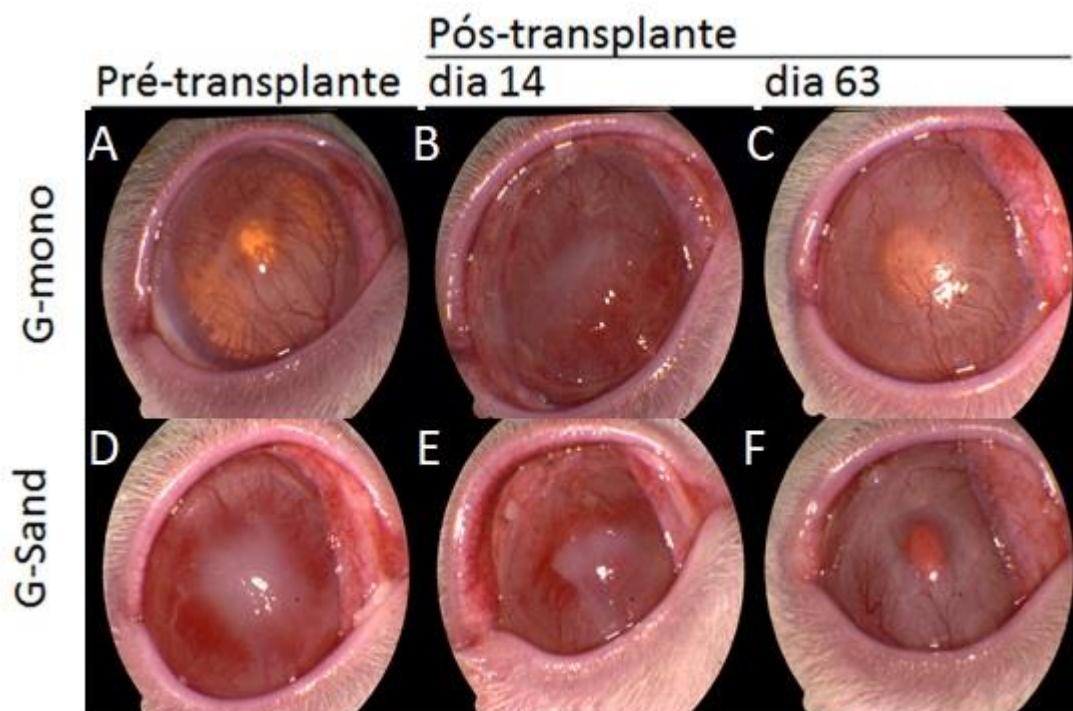


Figura 7. Evolução da opacidade corneal após transplantação de constructos de MA e de células epiteliais limbais expandidas “ex-vivo”. Em A e D, aparência pré-operatória, após 28 dias da indução de deficiência limbal (ou seja, imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos). Em B e C, após a transplantação no grupo G-mono. Em E e F, grupo G-sand. Sendo 14 dias (B e E) e 63 dias (C e F) após o transplante.

Nos dias 14 e 21 das avaliações, no G-Sand houve mais córneas positivas para fluoresceína (Fig. 8A). Nas avaliações subsequentes, os percentuais de córneas ulceradas e com defeitos epiteliais, em G-Sand, decaíram e, em alguns momentos (dias 42 e 56), foram menores que os no G-mono ($P < 0,05$). No dia 63, não se observaram diferenças na ocorrência de defeitos epiteliais (40% em G-mono e 33,3% em G-Sand), entre os grupos da pesquisa ($P > 0,05$).

Avaliações conduzidas com o “software” imageJ mostraram que as córneas de G-Sand apresentaram menos frações de áreas ulceradas, comparativamente às de G-mono (Fig. 8B).

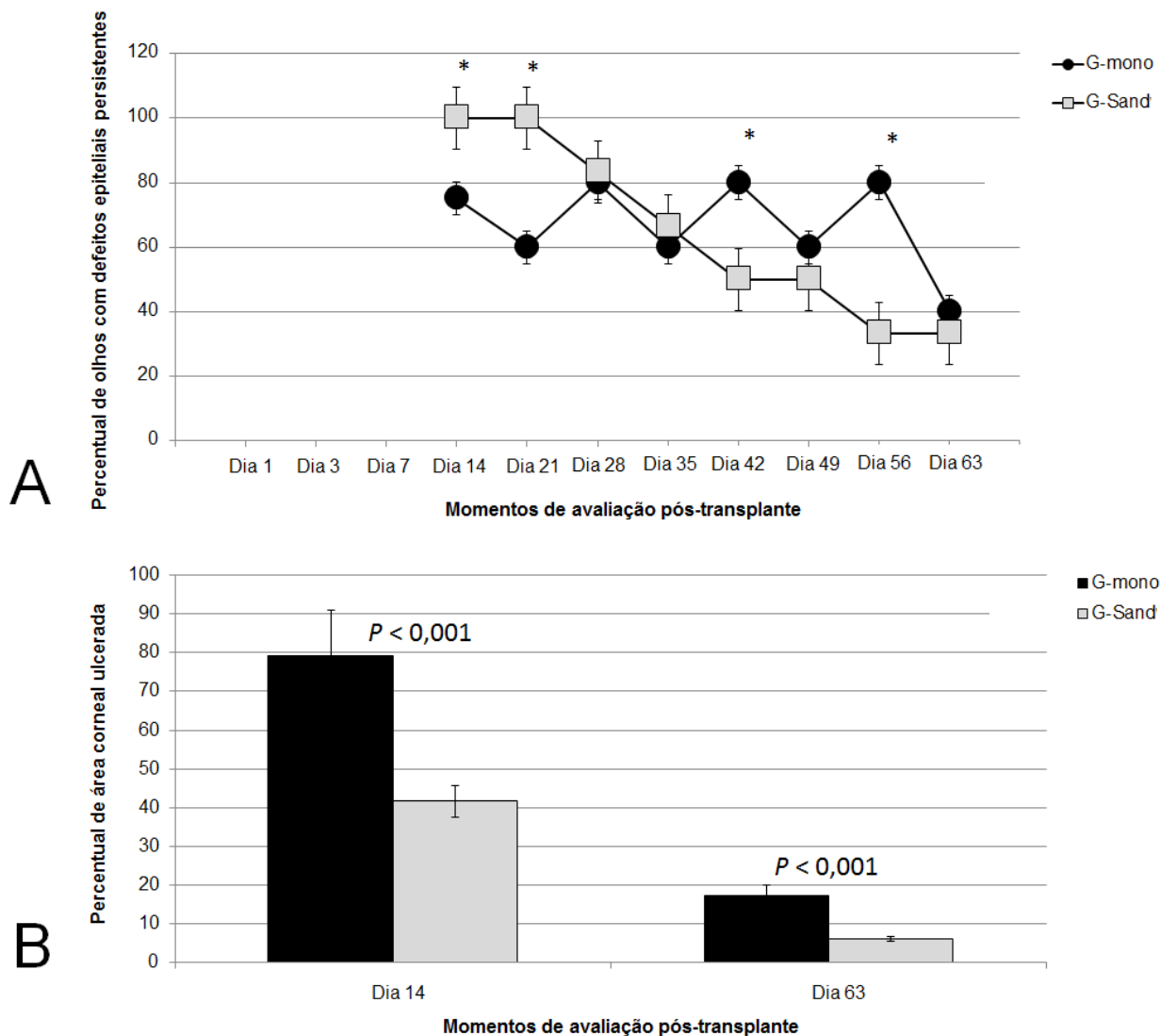


Figura 8. Progressão das úlceras e dos defeitos epiteliais em córneas de coelhos dos grupos G-mono e G-Sand. (A) Percentual médio de córneas com defeitos epiteliais e positivas ao teste do tingimento pelo fluoresceína sódica. (B) Fração média (%) de áreas corneais ulceradas. Observe que as córneas do G-Sand apresentaram percentual reduzido de de áreas ulceradas, comparativamente às córneas do G-mono, nos pós-transplantes dias 14 e 63.

As córneas de G-Sand, no dia 63 de pós-transplante, apresentaram percentual reduzido de áreas contendo neovasos, comparativamente às corneas de G-mono (Fig.9).

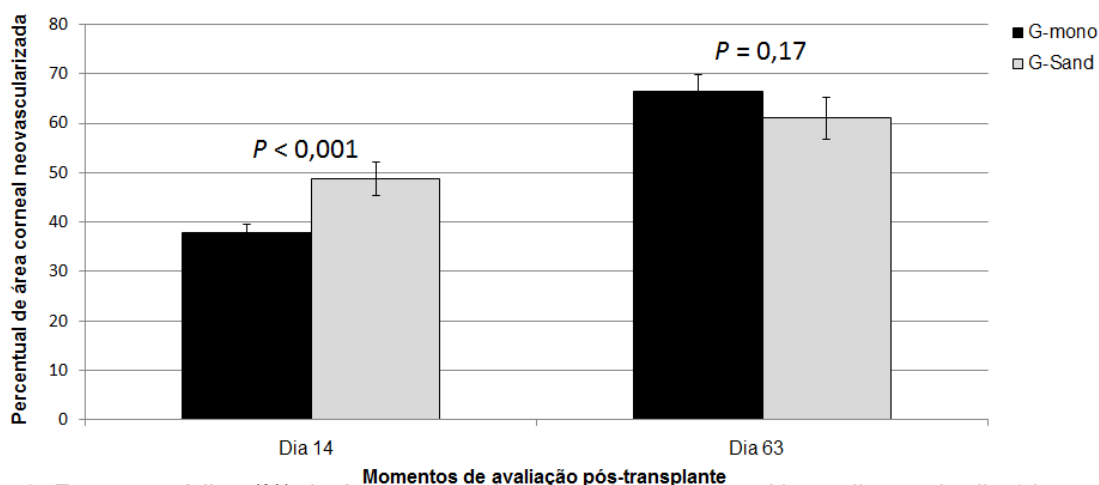


Figura 9. Frações médias (%) de áreas corneais contendo neovasos. Na avaliação do dia 14, as córneas de G-Sand apresentaram frações elevadas de áreas contendo neovasos. Todavia, no dia 63 do pós-transplante, elas apresentaram menos áreas vascularizadas, comparativamente às córneas de G-mono.

4.2. Análise da Intenção-de-Tratar

Os protocolos adotados para tratar os olhos de G-mono e de G-Sand foram eficazes na resolução de 60% e de 66,70%, respectivamente, dos casos de defeitos epiteliais corneais persistentes ($P = 0,68$), decorridos 63 dias de pós-transplante. Em relação à opacidade corneal, nenhum dos protocolos, aos 63 dias de pós-transplante, foi efetivo em sua resolução. Todavia, houve redução na intensidade da opacificação, sem diferença entre os grupos (Fig. 7).

4.3. Morfometria Tecidual

No dia 14 de avaliação, as córneas de G-Sand apresentaram epitélio mais espesso (Tabela 2). Todavia, na avaliação do dia 63, quem apresentou córneas com epitélios mais estratificados e espessos foi o G-mono (Tabela 2). A espessura corneal total foi menor em G-mono, nos dias 14 e 63 ($P = 0,00$). As córneas de G-Sand apresentaram menos vasos no estroma ($P = 0,00$).

TABELA 2. Parâmetros morfométricos obtidos para córneas de coelhos com LSCD, nos grupos G-mono e G-Sand, após 14 e 63 dias de pós-transplante

Parâmetros	Momentos de avaliação									
	Dia 14					Dia 63				
	G-mono		G-Sand		<i>P</i>	G-mono		G-Sand		<i>P</i>
	$\bar{X}$	DP	$\bar{X}$	DP		$\bar{X}$	DP	$\bar{X}$	DP	
Estratificação do epitélio corneal	2,82	0,13	2,44	0,78	0,05	4,77	0,15	2,00	0,81	0,00
Espessura do epitélio corneal	18,97	0,91	26,72	12,76	0,02	48,84	0,30	14,46	5,16	0,00
Espessura corneal total	720,60	3,00	512,50	2,15	0,00	604,30	15,40	317,30	9,91	0,00
Quantidade de vasos na córnea	7,75	0,71	6,85	0,42	0,00	6,85	0,62	5,66	0,16	0,00

$\bar{X}$, média; DP, desvio padrão.

Estratificação corresponde ao número de camadas de células epiteliais na córnea.

Espessuras estão expressas em micrômetros.

Diferenças foram significativas quando $P < 0,05$.

4.4. Imuno-Histoquímicas e teste de TUNEL

4.4.1. Avaliação das Culturas Celulares Quanto à Presença de Células Progenitoras e de Células em Proliferação

As culturas do G-mono apresentaram mais células progenitoras, imunopositivas para delta p63, do que as culturas G-Sand (Fig. 10 A, B). Com base no perfil da imunomarcção para delta p63, as culturas de G-mono foram ranqueadas como frequência 3+ de intensidade alta, enquanto as do G-Sand o foram como frequência 2+ de intensidade média.

Relativamente às células em proliferação positivas para PCNA, elas foram mais frequentes nas amostras do G-Sand (Fig. 10 A, C). As culturas do G-mono foram ranqueadas como 2+ de intensidade média e as culturas de G-Sand o foram como 5+ de intensidade alta. Embora estudos na co-localização assistida por “software” dos imunomarcadores não tenham sido conduzidos, foi possível notar, por inspeção visual, que algumas das células em proliferação (PCNA+) eram progenitoras (delta p63+).

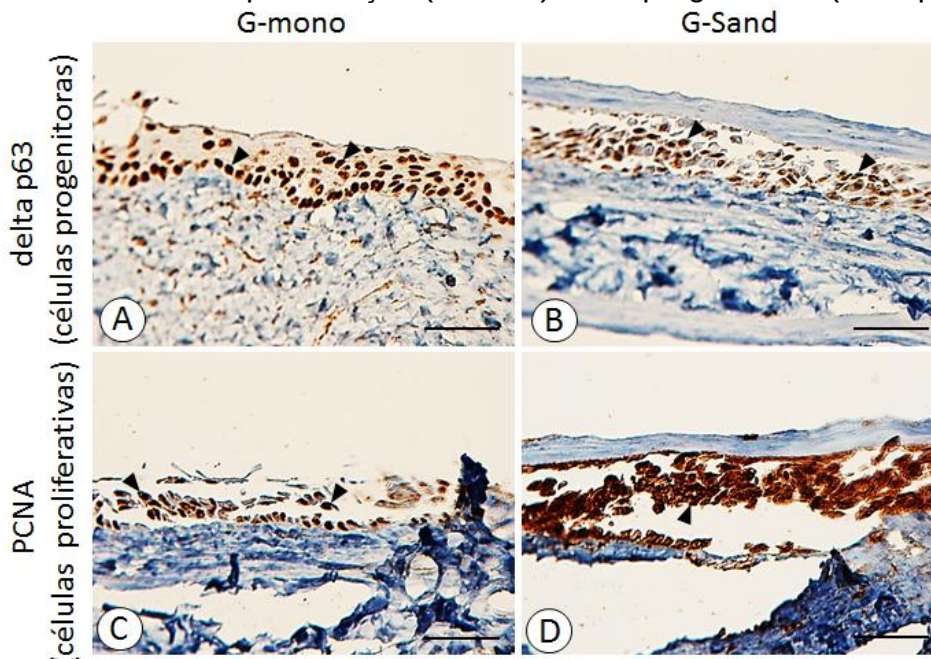


Figura 10. Fotomicrografias de culturas celulares imunomarcadas com anticorpos anti-delta p63 (A, B) e anti-PCNA. As cabeças de setas apontam para células imunomarcadas. Notar que a intensidade da imunomarcção para delta p63 foi alta no G-mono e média no G-Sand. Já a intensidades da imunomarcção para PCNA foi média no G-mono e alta no G-Sand. Barra = 50 micrômetros.

4.4.2. Células Progenitoras, em Proliferação e Apoptóticas nas Córneas de G-Mono vs. G-Sand

Aos 14 dias de pós-transplante, as córneas do G-mono foram ranqueadas, segundo o perfil de imunomarcção para delta p63, como 3+ de intensidade alta, enquanto as córneas do G-Sand o foram como 2+ de intensidade média (Fig. 11 A, B). No dia 63 de pós-transplante, as córneas do G-mono tinham menos células progenitoras (1+, apresentando imunomarcção de intensidade baixa), do que as córneas de G-Sand (imunomarcção 3+ de intensidade média) (Fig. 11 C, D). Células imunopositivas para delta p63 não foram observadas na camada apical dos epitélios das amostras estudadas.

Relativamente às células em proliferação imunomarcadas com anti-PCNA, no dia 14, as córneas de G-mono foram ranqueadas como 3+ de intensidade média e as de G-Sand o foram como 2+ de intensidade média (Fig. 11 E, F). No dia 63, as córneas de G-Mono e as de G-Sand apresentaram perfis de imunomarcção para anti-PCNA idênticos aos do dia 14 (Fig. 11 G, H). Foi possível notar, por inspeção visual, que algumas das células em proliferação (PCNA+) eram progenitoras (delta p63+).

Nenhuma das amostras apresentou células responsivas ao teste de TUNEL, ou seja, com fragmentação cromatínica característica de apoptose (Fig. 11 I, J).

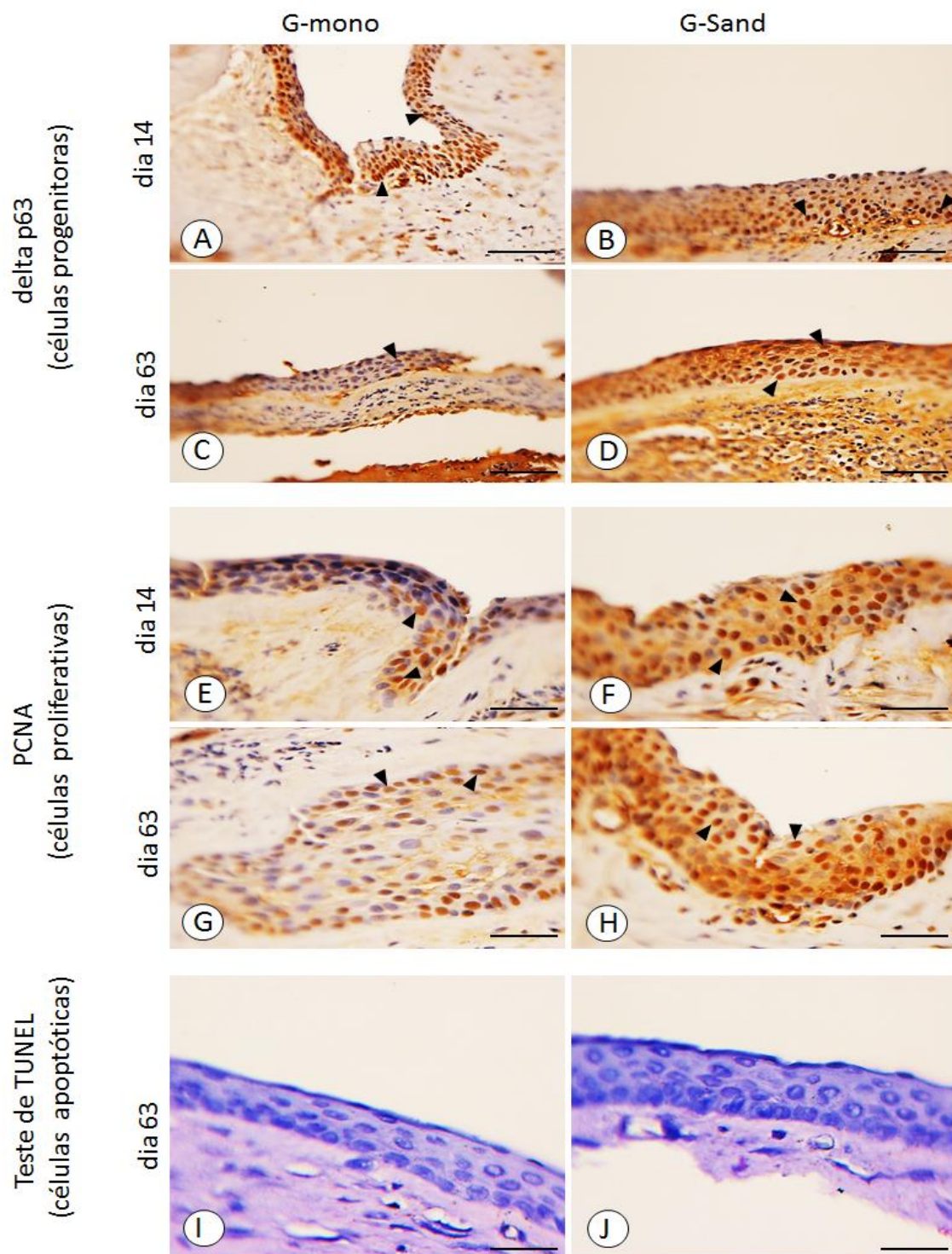


Figura 11. Fotomicrografias de córneas imunomarcadas com anticorpo anti-delta p63 (A–D), anti-PCNA (E–H) ou com o teste de TUNEL (I, J). No dia 14 de avaliação, a frequência e a intensidade da imunomarcagem para delta p63 foram maiores em córneas de G-mono, porém, no dia 63, o padrão se inverteu. Tanto no dia 14 quanto no dia 63, a frequência de imunomarcagem para PCNA foram maior no G-Sand. As cabeças de setas apontam para células imunomarcadas. O teste de TUNEL não detectou células apoptóticas. Como houve ausência de marcação para TUNEL, para fins ilustrativos, apenas amostras do dia 63 estão apresentadas. Barras = 50 micrômetros (A–H), 20 micrômetros (I, J).

5. Discussão

Coelhos são empregados em pesquisas oftálmicas pelo tamanho do bulbo do olho e a facilidade de manejo e de manipulação. Estudos de LSCD rotineiramente utilizam estes animais como modelos experimentais, apesar de diferentes pesquisadores divergirem quanto à eficácia dos protocolos na indução de lesões que culminem em LSCD. Andrade e colaboradores (2009), por exemplo, reportaram dificuldades para indução de LSCD em coelhos com o uso de álcool. Em contraste, Parente e colaboradores (2002; 2003), apesar de reconhecerem as dificuldades, mostraram que a reprodutibilidade intra-laboratorial entre olhos com LSCD experimental pode ser conseguida empregando-se protocolos de indução combinados, envolvendo tanto agentes químicos quanto mecânicos, tal como o foi nesta pesquisa.

Terapias celulares envolvendo transplantação de células epiteliais limbiais autógenas, cultivadas sobre MA, emergem como opção para o tratamento da LSCD em pacientes cujas terapias conservadoras estão contraindicadas por requererem imunossupressão sistêmica prolongada. Como questões determinantes para o sucesso das terapias celulares, elencam-se o sítio de coleta das células ou dos explantes, os procedimentos na preparação da superfície ocular a ser reconstruída, e a configuração do sistema de cultivo empregado na expansão das células. Sendo assim, neste estudo, parâmetros clínicos, morfométricos e imuno-histoquímicos foram estudados em córneas com LSCD tratadas com células cultivadas em sistemas com diferentes configurações, ou seja, bidimensional (convencional) e tridimensional (sanduíche). Não obstante, antes de discuti-los, considerações sobre a obtenção das células e a preparação da superfície ocular devem ser tecidas, uma vez que se relacionam diretamente com os resultados terapêuticos.

Relativamente à obtenção do limbo, Meyer-Blazejewska e colaboradores (2010) mostraram que, em olhos humanos, o melhor local para explantação tecidual é a região limbal superior, que contém Paliçadas de Vogt (GRIEVE et al., 2015) rica em projeções e em criptas contendo células progenitoras. Estima-se que um explante de 2 x 2 mm coletado da região limbal superior contenha, aproximadamente, 2.10^4 células. Embora

olhos de coelhos sejam desprovidos de paliçadas de Vogt, Townsend (1991) informa que o movimento centrípeto de migração celular proposto pela teoria XYZ ocorre também nos coelhos, sendo factual encontrarem-se células tronco no epitélio limbal superior. A região dorsal do limbo de coelhos, ademais, é muito vascularizada comparativamente ao restante do perímetro. Tal observação é importante porque há evidências de que áreas estromais limbais de vascularização intensa concentram maior população de células progenitoras epiteliais limbais corneais, por oferecerem nutrição aos nichos de CTs (MIRI et al., 2012; GRIEVE et al., 2015).

Previamente a qualquer tentativa de reconstrução da superfície ocular, é essencial melhorarem-se as condições do microambiente, para favorecer a viabilidade de células remanescentes no tecido corneal e a das células que serão carreadas. A melhoria do microambiente decorre da atenuação ou da resolução de fatores biológicos que ensejam danos teciduais e do controle de comorbidades. Destacam-se como principais fatores biológicos a serem atenuados ou diminuídos, a inflamação superficial crônica, as doenças autoimunes, os agentes infecciosos, os tumores e os insultos iatrogênicos. Dentre as comorbidades, destacam-se condições lacrimais, alterações cicatriciais, a triquíase e a lagofthalmia (ATALLAH et al., 2016).

Em anos recentes, entendeu-se que sistemas de cultivo tridimensionais poderiam fornecer células com características fenotípicas e funcionais superiores às ofertadas por sistemas bidimensionais (HAAS, 2000; ARTYM; MATSUMOTO, 2010; SWIFT; PFEIFER; BROWVER, 2010; WANG; SUI, 2011). No caso de culturas de CTs, foi proposto que a configuração sanduíche preserva a “stemness” (HAAS, 2000; ARTYM; MATSUMOTO, 2010; BALLESTER-BELTRÁN et al., 2015). Todavia, a avaliação imuno-histoquímica das culturas deste estudo mostraram que o G-Sand apresentou menor quantidade de células progenitoras do que o G-mono, porém apresentou mais células em proliferação. A proliferação celular é uma característica de células precursoras (TACs), derivadas da divisão das CTs, e de células epiteliais em diferenciação (YOON; ISMAIL; SHERWIN, 2014). Interessantemente, por comparação visual entre amostras, foi evidente observar que algumas das células em proliferação eram progenitoras. É, portanto, plausível propor que a imunomarcação para delta p63

foi menos intensa no G-Sand porque as CTs, ao invés de preservarem a vitalidade, se dividiram originando TACs com alta capacidade proliferativa (YOON; ISMAIL; SHERWIN, 2014). Claro que estudos de clonogenicidade são necessários para confirmar a hipótese. As vias pelas quais o cultivo sanduiche pode ter induzido divisão assimétrica de CTs não foram investigadas no presente estudo, porém, é possível que ao receber estímulos dorsais e ventrais, as membranas das células tenham reposicionado as integrinas, que são proteínas transmembrânicas associadas com a recepção dos estímulos mecanosensoriais oriundos do microambiente. Reposicionamento de integrina é um evento bem estabelecido em culturas celulares (GOEL et al., 2010) e está intimamente associado com crescimento e proliferação celular. Os achados deste estudo vão de encontro aos resultados de Hashemi e colaboradores (2009), que avaliaram os efeitos da configuração sanduíche sobre culturas de células da mucosa oral e observaram aumento relevante nas taxas de proliferação celular.

Apesar de G-mono e de G-Sand terem diferido nas frequências de células progenitoras, os resultados apontam que, em ambas as culturas, elas excederam os 3% propostos por Ahmad, Figueiredo e Lako (2006) como determinantes da viabilidade terapêutica (RAMA et al., 2010). As excelentes frequências de células progenitoras podem estar relacionadas ao meio de cultivo utilizado, ou seja, ao Epilife. Loureiro e colaboradores (2013) mostraram que o Epilife, comparativamente ao meio epitelial suplementado com hormônio (SHEM) e ao meio queratinócito livre de soro (KSFM), fornece culturas com mais células progenitoras positivas para delta p63 e para ABCG2 (membro 2 da subfamília G de transportadores de cassetes de ligação de ATP), com baixa velocidade de crescimento. O Epilife, diferentemente da maioria dos meios de cultivo, não possui cálcio, que estimula a diferenciação de células progenitoras (MEYER-BLAZEJEWSKA et al., 2010). Outro fator a ser considerado é que as células avaliadas neste estudo, além de cultivadas em meio de cultivo livre de cálcio, foram expandidas sem “air-lifting”, que consiste em baixar o nível do meio ao nível do epitélio para induzir diferenciação celular via contato com o ar (BAN et al., 2003; KAWAKITA et al., 2005; CHEN et al., 2010).

Há evidências de que culturas expressando delta p63 (células progenitoras), quando transplantadas à superfície ocular, evoluem com riscos menores de intercorrências por exaustão celular do que culturas ricas em células diferenciadas (PATHAK et al., 2016). Culturas de células progenitoras, contudo, são difíceis de serem transplantadas para a superfície ocular, pois elas são desprovidas de estruturas de adesão, o que prejudica sua permanência na superfície ocular (BAN et al., 2003). Na presente pesquisa, para assegurar que as células seriam mantidas após transplantação, as córneas de G-mono foram revestidas com um “patch” de MA. Perdas celulares não foram consideradas intercorrências potenciais no grupo G-Sand, uma vez que as células estavam confinadas entre duas camadas de MA.

Ti e colaboradores (2002) mostraram que a técnica de cultivo e de transplantação celular está associada com um risco considerável de intercorrências, como contaminação, perfuração corneal no intraoperatório, infecção bacteriana, hemorragia sob o enxerto, inflamação intensa e a ocorrência possível de cistos de inclusão conjuntival. Os resultados do presente estudo, todavia, não evidenciaram tais intercorrências. Muitas das manifestações clínicas encontradas nas córneas do G-mono e do G-Sand são aquelas que acompanham a reparação corneal e não divergem daquelas reportadas em literatura, ainda que envolvendo outros tipos de terapia celular em indivíduos com LSCD (TI et al., 2002).

No presente estudo, os resultados clínicos do uso de células cultivadas em sanduíche foram similares aos observados com o uso de células cultivadas em sistema tridimensional. Interessantemente, em muitos dos coelhos deste estudo encontrou-se ectrópio iatrogênico. Achados similares foram reportados por TI et al. (2002), que admitiram que o blefarostato tenha contribuído para tal e enfatizam que a lagofthalmia causada pelo ectrópio induz ceratopatias e enseja deiscência de MA, reduzindo a taxa de sucesso terapêutico associado ao transplante, ademais causando diminuição do espalhamento e da qualidade do filme lacrimal (GOMES, 2000). Uma vez que, no presente estudo, apenas 19,42% e 52,3% dos animais não apresentaram qualquer alteração palpebral superior e inferior respectivamente, admite-se o ectrópio como possível fator crítico na evolução clínica da reconstrução cirúrgica da superfície ocular,

medida principalmente pela frequência e intensidade dos defeitos epiteliais persistentes e das opacidades, os quais aos 63 dias de pós-transplante não haviam resolvido, como revelado pela análise da intenção-de-tratar.

Outra justificativa poderia se tratar da própria ação do álcali, causando danos e deformações nas estruturas circunvizinhas, como cicatrizes tanto conjuntivais como palpebrais, diminuição do fornice conjuntival e simbléfaro (GOMES, 2000; TRIEF et al., 2017). A injúria química ao atingir a conjuntiva, afeta as células de Goblet, levando a redução ou mesmo ausência do muco no filme lacrimal, podendo resultar em ceratoconjuntivite seca (TRIEF et al., 2017).

Lai e colaboradores (2015) descreveram as alterações que ocorrem sobre uma superfície ocular mal lubrificada ou exposta. A partir de 2 horas foi possível encontrar células inflamatórias migrando sobre o limbo e defeitos corneais epiteliais. Após 3 horas, observaram-se apoptose no epitélio corneal (teste de TUNEL). O ectrópio, enquanto comorbidade, induz à inflamação crônica. Este, e fatores adjuntos podem influenciar negativamente a sobrevivência de células transplantadas para a superfície ocular, prejudicando a evolução de córneas tratadas. Condições outras que influenciam a inflamação superficial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, são suturas incitando angiogênese (TI et al., 2002; GIACOMINI et al., 2014). A aplicação de suturas corneais apresenta-se como uma linha tênue entre a manutenção das células na superfície corneal e o estímulo exacerbado da inflamação. Ademais, o grau de inflamação é influenciado por protocolos antiinflamatórios com esteroides e pela origem do substrato biológico (xenógeno ou autógeno). No presente estudo e em muitos outros sobre LSCD, antiinflamatórios não foram utilizados em face da presença de metaloproteases, ativadas por este grupo de fármacos (SUZUKI et al., 2003; BROOKS; OLLIVIER, 2004).

Os grupos G-mono e G-Sand não mostraram diferença quanto à cinética das lesões (teste do tingimento pela fluoresceína sódica). Porém, no grupo G-Mono, as áreas desepitelizadas (positivas para o teste do tingimento pela fluoresceína sódica) foram estatisticamente maiores aos 14 e 63 dias. Áreas desepitelizadas exibem quimiotaxia para células inflamatórias, causando edema, o que justifica a ocorrência de espessura corneal aumentada no grupo G-Mono (GAN et al., 1999). Também, células

inflamatórias estimulam angiogênese, fundamentando a maior vascularização no grupo G-mono (GIACOMINI et al. 2014).

A atividade mitótica é factual no epitélio basal do limbo (GAN et al., 1995). O fechamento de lesões corneais em coelhos é descrito como um processo bifásico, em que há estagnação inicial, com proliferação das células basais do limbo, seguida pelo deslizamento de células e a reposição do contingente celular (CROSSON; KLYCE; BEUERMAN, 1986). Em situações injuriantes, o epitélio corneal pode expressar marcadores de proliferação, como fora visto no presente estudo, em uma tentativa de rapidamente reparar a lesão.

Em ambos os grupo, os olhos que apresentaram opacidade não foram os mesmos que apresentaram positividade no teste do tingimento pela fluoresceína. Nota-se que mesmo o defeito epitelial não estando mais presente, ainda havia opacidade de moderada a severa em ambos os grupos da pesquisa. A transparência corneal depende de outros fatores, além da reposição do contingente celular. A supraorganização de moléculas do estroma corneal, arranjadas de forma delicada e precisa, de modo a permitir a passagem da luz, é afetada pela deficiência limbal. Ainda que a população de células seja reposta, o desarranjo das fibras haverá de permanecer (HOLMES et al., 2001; BROOKS; OLLIVIER, 2004). Andrade e colaboradores (2010), afirmam que a indução de dano limbal causa diminuição de proteoglicanos corneais. Estes glicoconjugados possuem a importante função de manter o arranjo regular e equidistante das fibrilas de colágeno, promovendo transparência. Ademais, os mesmos autores afirmam que a lesão poderia causar diminuição da síntese de proteoglicanos pelos ceratócitos ou mesmo um aumento na sua velocidade de degradação. A opacidade também pode ser atribuída à falta de homogeneidade na espessura das fibrilas de colágeno no estroma, fato que poderia ter sido causado pelo uso de álcali, que gera saponificação do tecido.

Diferenças espécie-específicas na organização do colágeno e na produção de moléculas de crescimento e de sobrevivência que influenciam o comportamento de células cultivadas podem justificar, entre outros fatos, a ocorrência de opacidade corneal persistente nos coelhos com LCSD, após 60 dias de tratamento com MA contendo

células, ao passo que, a este tempo, em cães e em seres humanos têm-se uma melhor resolução das lesões (BRUNELLI et al., 2007; ALDROVANI; LAUS, 2015).

Apesar das inúmeras evidências de que o substrato e as condições do meio semelhante ao nicho natural das células fornecem células superiores (BAN et al., 2003; WANG; SUI, 2011), a similaridade dos resultados clínicos, morfométricos e imuno-histoquímicos entre os grupos do presente estudo corrobora com os resultados de Pathak e colaboradores (2016), que observaram que o substrato de expansão celular é menos importante que o meio de cultivo para o desenvolvimento de células “ex-vivo”. No presente estudo, a única vantagem oferecida pelo G-Sand foi um maior contingente de células progenitoras na córnea tratada, o que pode influenciar a vitalidade e a sobrevida do transplante em longo prazo. Maior observação temporal seria necessária para confirmar a hipótese.

Técnicas inovadoras, alternativas à terapia celular com células epiteliais limbais, têm sido propostas para tratar córneas com LSCD, dentre elas o transplante simples de epitélio limbal (SLET) e o uso de diferentes tecidos no cultivo de constructos para transplante (v.g., COMET) (ATALLAH et al., 2016). O SLET, por exemplo, foi proposto por Sangwan e colaboradores (2012), que preconizaram as seguintes etapas: coleta de 2 mm de tecido limbal, secções deste tecido em 8 a 10 explantes, distribuição e fixação sobre a face epitelial de membrana amniótica com cola de fibrina, transplantação para a superfície corneal do paciente após retirada do pannus epitelial. Para manutenção dos SLETs, emprega-se uma de lente de contato que é retirada 7 dias depois. Os resultados mostraram-se satisfatórios, e os pacientes apresentaram melhora nas condições visuais. Única ressalva é o tamanho da casística, que incluiu apenas seis pacientes. Em 2016, Vazirani e colaboradores avaliaram os resultados do SLET em 68 olhos. Os autores observaram evolução clínica superior à obtida na presente investigação e em outras em que se utilizaram de terapia limbal. Encontrou-se superfície epitelizada, avascular e estável, em 85% dos casos, no interregno de seis meses.

A literatura Veterinária carece de estudos a respeito da LSCD (ALDROVANI; LAUS, 2015; SANCHEZ; DANIELS, 2016), são escassos os trabalhos que descrevem a

síndrome, facilitando, desta forma, a extrapolação de dados da Medicina para a Veterinária. Brunelli e colaboradores (2006) acompanharam a evolução clínica de cães após a indução da deficiência limbal, dentre os sinais clínicos apresentados a longo prazo (30 dias), citam-se 72,2% dos animais apresentando neovascularização central, 100% com conjuntivalização, edema corneal ausente em 5,6%, leve em 55,5%, moderado em 33,3% e severo em 5,6%, tecido de granulação ausente em 61,1%, leve em 16,7%, moderado em 5,6% e severo em 16,7%, pigmentação corneal ausente em 27,8%, leve em 61,1% e moderada em 11,1%. Estes resultados exemplificam a diferença entre os comportamentos das diferentes espécies à LSCD. Apesar das diferentes apresentações, alguns dados são corroborados através da resposta positiva de cães ao transplante limbal, como os descritos por Brunelli e colaboradores (2007) e por Brito, Cunha e Laus (2010), perpetuando papel essencial do limbo na renovação e manutenção celular.

Existem indícios de afecções que acometam a córnea e que possam apresentar um padrão diferenciado de LSCD, como na ceratoconjuntivite seca e na ceratite pigmentar, em que, possivelmente, ocorrem alterações no nicho das CT e que, consequentemente, causem a pigmentação observada nestas doenças e no modelo proposto por Brunelli e colaboradores (2006). Para ratificar estas afirmações, existe a necessidade de estudos avançados e específicos. Pesquisas sobre telócitos e sua atuação, localização de CT, marcadores específicos e o diagnóstico em animais de companhia são essenciais para a aplicação de técnicas e para o sucesso de terapias, Sanchez e Daniels (2016) reiteram que a extrapolação de dados de uma espécie para outra nem sempre é possível ou prudente.

6. Conclusões

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

7. Referências*

- AFHARKHAMSEH, N.; GHAHARI, E.; ESLANI, M.; DJALILIAN, A.R. A simple mechanical procedure to create limbal stem cell deficiency in mouse. **Journal of Visualized Experiments**, n.117, e54658, 2016. Disponível em: <10.3791/54658>
- AHMAD, S.; FIGUEIREDO, F.; LAKO, M. Corneal epithelial stem cell: Characterization, culture and transplantation. **Regenerative Medicine**, v.1, n.1, p.29-44, 2006. Disponível em: <10.2217/17460751.1.1.29>.
- AHMAD, S.; KOLLI, A.; LAKO, M.; FIQUEIREDO, F.; DANIELS, J.T. Stem cell therapies for ocular surface disease. **Drug Discovery Today**, v.15, n.7/8, p.306-313, 2010. Disponível em: <10.1016/j.drudis.2010.02.001>.
- ALDROVANI, M.; LAUS, J.L. Membranas amnióticas nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular. **Investigação**, v.4, n.2, p.10-20, 2015.
- ALDROVANI, M.; LIMA, T.B.; PADUA, I.R.M.; KOBASHIGAWA, K.K.; VALDETARO, G.P.; FILEZIO, M.R.; CRISTOVAM, P.C.; GOMES, J.A.P.; LAUS, J.L.. Remodeling of higher order chromatin-DNA structure in rabbit corneal limbal epithelial progenitor cells grown on human intact and denuded amniotic membrane. In: **Conference of the European College of Veterinary Ophthalmologists – ECVO**. Helsinki, Finland, p.24, 2015.
- ALDROVANI, M.; FILEZIO, M.R.; LAUS, J.L. A supramolecular look at microenvironmental regulation of limbal epithelial stem cells and the differentiation of their progeny. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.80, n.4, p.268-272, 2017. Disponível em: <10.5935/0004-2749.20170066>
- ANDRADE, A.L.; GOMES, J.A.P.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V.; CAMPOS, M. Aspectos clínicos e morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.127-42, 2009.
- ANDRADE, A.L.; CAMPOS, M.Q.; GOMES, J.A.P.; BERTO, A.G.A.; MICHELACCI, Y.M. Effect of amniotic membrane transplantation on corneal healing and proteoglycan expression in a experimental model of limbal deficiency in rabbits. **European Journal of Ophthalmology**, v 20, n.2, p.290-299, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967677>
- ARTYM, V.V.; MATSUMOTO, K. Imaging cells in three-dimensional collagen matrix. **Current Protocols in Cell Biology**, v.10.18, n.10, p.1-20, 2010. Disponível em: <10.1002/471143030.cb1018s48>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KAWAKITA, T.; ESPANA, E.M.; HE, H.; LI, W.; LIU, C.Y.; TSENG, S.C. Intrastromal invasion by limbal epithelial cells is mediated by epithelial-mesenchymal transition activated by air exposure. **American Journal of Pathology**, v.167, p.381-393, 2005. Disponível em: <10.1016/S0002-9440(10)62983-5>.

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

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

KOIZUMI, N.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N.J.; KAWASAKI, S.; TANIOKA, H.; KOIZUMI, K.; KOCIOK, N.; JOUSSEN, A.M.; KINOSHITA, S. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. **Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.245, n.1, p.123-134, 2007. Disponível em: <10.1007/s00417-005-0095-3>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

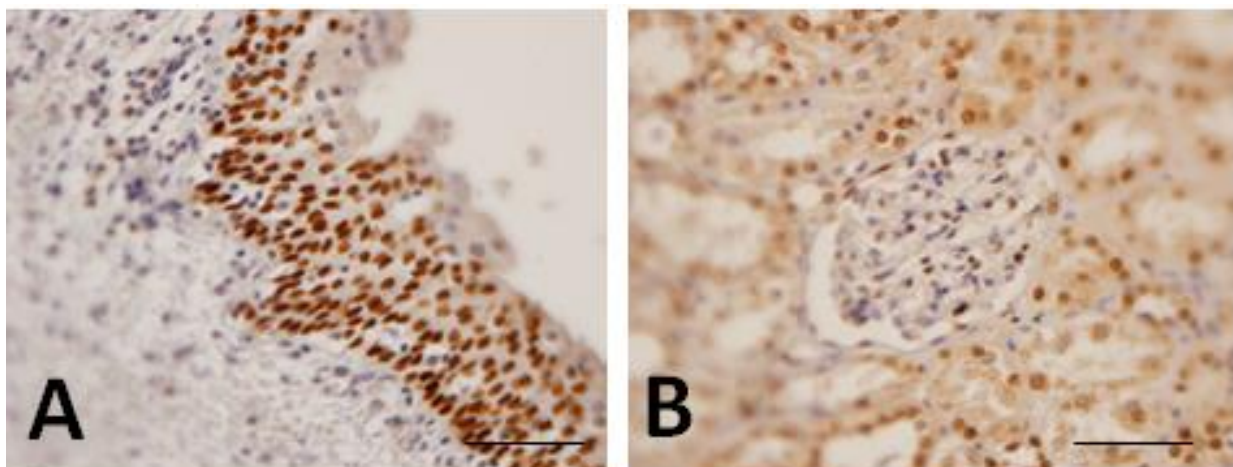
8. Implicações

Dado que a configuração do sistema de cultivo celular, estabelecida com MA, não é fator determinante para o sucesso da terapia celular limbal, desfechos negativos que eventualmente acompanham o método de cultivo convencional, sobre a face de um substrato, não são resolvidos pela conversão de bi- para tridimensional. A terapia celular continua repleta de intercorrências, apesar de, na atualidade, ser promissora e superior aos transplantes limbais do passado. Novas pesquisas devem ser realizadas na tentativa de melhorarem-se os resultados da terapia celular limbal. Além disso, há imprescindibilidade na otimização dos modelos experimentais, uma vez que defeitos pálpebrais não foram descritos apenas na presente pesquisa e é notória a influencia que este fato acarreta na evolução clínica do experimento.

Na Veterinária, existe a necessidade da identificação da localização exata das células progenitoras, fato que possibilitaria o emprego de cultivos celulares em cães e em outras espécies domésticas, além de esclarecimentos sobre a patogenia da deficiência limbal.

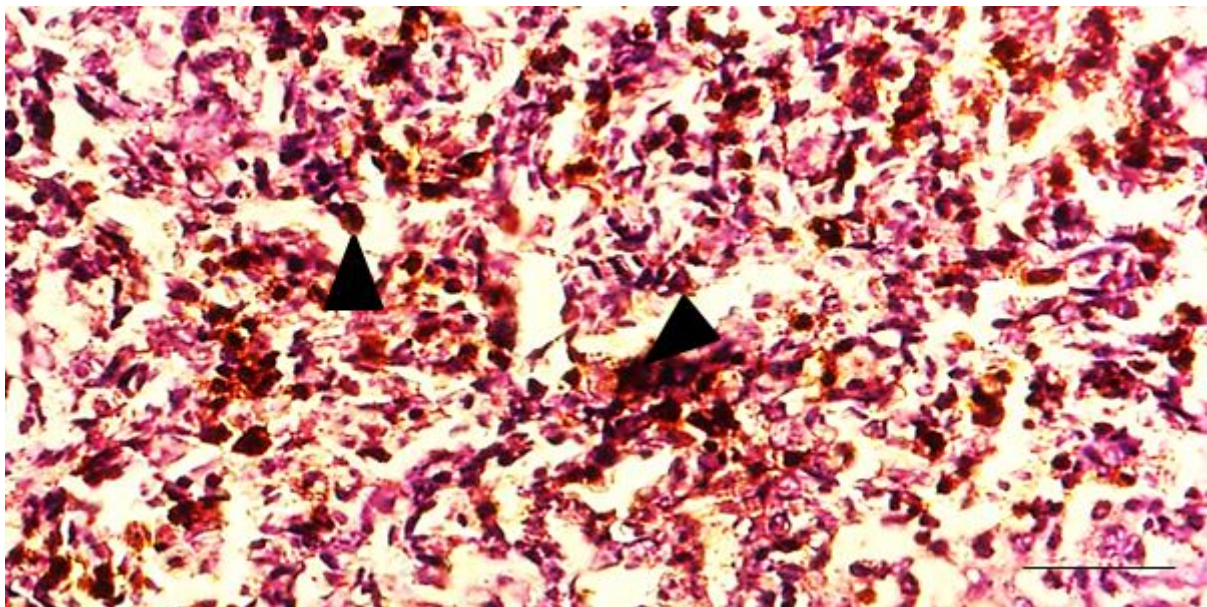
É possível que o advento de novas tecnologias, como as que empregam métodos automáticos e eliminam a mão de obra humana, possibilite, no futuro próximo, uma expansão segura de culturas celulares com características superiores. Também, o emprego de robôs cirurgiões em cirúrgias oftálmicas, como já vem ocorrendo em países da Europa, certamente diminuirão intercorrências e dificuldades cirúrgicas associadas à reconstrução da superfície ocular, possibilitando maior precisão na transplantação dos constructos de bioengenharia, e melhorando resultados pós-operatorios. Técnicas alternativas à terapia limbal estão começando a ser exploradas pelos diferentes centros de pesquisa e tratamento em oftalmologia, incluindo o nosso.

APÊNDICE A



Fotomicrografia de cortes de rim humano, que foram na presente pesquisa utilizados como controles positivos para as imuno-histoquímicas destinadas à detecção de células progenitoras (anti-delta p63) (A) e de células em proliferação (anti-PCNA) (B). Barra = 50 micrômetros.

APÊNDICE B



Fotomicrografia de amostra controle do teste de TUNEL. As células apoptóticas marcaram em marrom-castanho intenso (cabeças de setas). Barra = 20 micrômetros.