

MARCUS VALÉRIUS DE MATOS FREITAS

**CAPACIDADE REGENERATIVA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
LESÕES ULCERATIVAS PROFUNDAS DE CÓRNEA EM COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho

Teresina/PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

F862c Freitas, Marcus Valérius de Matos
Capacidade regenerativa de células – tronco mesenquimais em
lesões ulcerativas profundas de córnea em coelhos. / Marcus
Valérius de Matos Freitas - 2018.
71 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho

1.Células-tronco mesenquimais 2 .Úlcera de córnea 3.Coelho
4. Histopatologia 5. Fator de crescimento do endotélio vascular
(VEGF) I.Título.

CDD 636.089 719

**CAPACIDADE REGENERATIVA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
NAS LESÕES ULCERATIVAS PROFUNDAS DE CÓRNEA EM COELHOS**

MARCUS VALÉRIUS DE MATOS FREITAS

Tese aprovada em: 24/09/2018

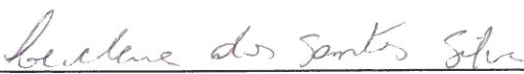
Banca Examinadora:



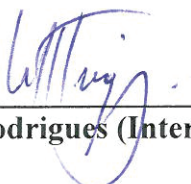
Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



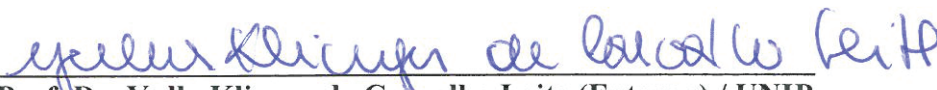
Profa. Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa (Externa) / IFPI



Profa. Dra. Lucilene dos Santos Silva (Interna) / Bolsista PNPD-CAPES/UFPI



Prof. Dr. Marcelo Campos Rodrigues (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Yulla Klinger de Carvalho Leite (Externa) / UNIP

Dedico,

Aos meus pais Freitas e Gersonita

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por me fortalecer a cada dia, e está sempre presente em minha vida.

Agradeço à minha esposa Nira Nunes Freitas, pelo incentivo, mesmo nos momentos difíceis ao longo desta jornada.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho, pela maneira dedicada com que trata o ensino, e a pesquisa, sempre de forma ética, incentivando os seus orientandos.

À pós-doutoranda Lucilene dos Santos Silva, decisiva na realização deste trabalho, pela atenção e dedicação, à Profa, Dra. Sílvia de Araújo França Baeta, pelo auxílio e dedicação na realização desta pesquisa.

Aos professores Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa e Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto, pela participação na idealização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcelo Campos Rodrigues, pelo incentivo ao estudo da oftalmologia, e na realização deste trabalho.

Aos Ms. Hermínio José da Rocha Neto, Huanna Waleska Soares Rodrigues e Camila Ernanda Sousa de Carvalho e a graduanda Marina Silva Carvalho, pelo auxílio valoroso na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Macedo, e ao Ms. Paulo Marques Costa pela ajuda e incentivo.

Aos Funcionários do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), pela atenção e dedicação.

Aos Funcionários do Biotério Central da UFPI, pela maneira dedicada e respeitosa com que trataram os animais durante a pesquisa.

À Universidade Federal do Piauí, e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade de realização deste curso de Doutorado.

Ao Hospital Veterinário Universitário, pelo pronto atendimento no auxílio de determinados materiais e medicamentos.

A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.

Gumarães Rosa

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	12
CAPÍTULO I*	21
RESUMO	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO	39
COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA	39
DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSES	39
REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO II**	45
Introdução	47
Material e métodos.....	48
<i>Delineamento experimental</i>	48
<i>Descongelamento e marcação das CTMMO-co</i>	49
<i>Indução da úlcera de córnea e aplicação de CTMMO-co</i>	49
<i>Procedimento cirúrgico de enxerto corneconjuntival</i>	50
<i>Tratamento pós-operatório</i>	51
<i>Eutanásia e coleta de córnea</i>	51
<i>Análise histopatológica e rastreamento celular</i>	51
<i>Análise imunoistoquímica</i>	51
<i>Avaliação Estatística</i>	52
Resultados e discussão.....	52
Conclusão.....	60
Referências.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Confeção da úlcera de córnea (A). Úlcera de córnea profunda. Nota-se borda regular e exposição do estroma corneano (seta branca) (B). Leito corneal para enxerto no G2 (C). Aspecto final da técnica enxerto corneconjuntival G2 (D).

Figura 2. Aumento de volume da conjuntiva bulbar pela presença das CTMMO-co aplicadas pela via subconjuntival.

Figura 3. Coelho-G1. Tingimento pela fluoresceína 3 dias pós-cirúrgico (A). Negativo aos 6 dias (B).

Figura 4. Olhos dos grupos G1 e G2 15 dias pós-operatório. Nota-se fotofobia e blefarospasmos moderados (A) Ausencia de fotofobia e blefarospasmos no G1(B).

Figura 5. Olhos dos grupos G1 e G2 7 dias pós-operatório. Secreção ocular moderada (→), e hiperemia conjuntival severa(→) em G2 (A). Ausência de secreção e hiperemia conjuntival em G1(B).

Figura 6. Olhos dos grupos G1 e G2. Nota-se opacidade axial (→), e ausência de vascularização corneana no G1 aos 30 dias(A).Vascularização (→) (B) e opacidade axial (→) em G2 (B) aos 30 e 15 dias respectivamente.

Figura 7. Fotomicrografia de córneas de coelhos não coradas: microscopia de fluorescência (A e B) e coradas com HE microscopia de luz (C a I). G2-30: Ausência de marcação celular com nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes (A); G1-30: Células marcadas com nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes (B); Estrutura de córnea normal (C); G1-7: Fibroplasia típica com fibroblastos ativos (→) e bandas de colágeno (→) (D); G2-7: Infiltrado inflamatório eosinofílico difuso e neovascularização (↔) (E); G1-15: Fibroplasia (F); G2-30: Hiperplasia epitelial (→), neovascularização (→), fibroplasia (□) e infiltrado inflamatório eosinofílico (G); G1-30: Fibroplasia (H); G2-15: Infiltrado inflamatório eosinofílico difuso intenso, neovascularização (→) (I).

Figura 8. Alterações histopatológicas em coelhos submetidos a úlcera de córnea induzida profunda tratados com CTMMO e pela técnica de enxerto corneconjuntival.

CAPÍTULO II

Figura 1. Fotomicrografia de córneas de coelhas. G1-30: Córnea não corada. Células marcadas com nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes (→), microscopia de fluorescência (A); Estrutura da córnea normal. HE (B); Retina: Controle positivo para marcação de VEGF. IMH (C); G1-7: Fibroplasia e área focal de hiperplasia epitelial (→) HE (D); Imunomarcção de

VEGF na camada basal do epitélio. IMH (E) e controle da reação, corte sem VEGF, ausência de marcação (F); G2-7: Infiltrado inflamatório difuso e neovascularização no estroma. HE (G); Imunomarcção moderada de VEGF no epitélio e estroma corneal. IMH (H) e ausência de marcação no corte controle da reação (I).

Figura 2. G1-15: Fibroplasia e degeneração da camada basal do epitélio (→) (A). e Imunomarcção leve de VEGF na camada basal do epitélio. IMH (B); G2-15: Infiltrado inflamatório difuso intenso e neovascularização no estroma. HE (C) e imunomarcção intensa de VEGF no epitélio e estroma corneal. IMH (D); G1-30; Fibroplasia e hipertrofia da camada basal do epitélio. HE (→) (E), imunomarcção leve de VEGF na camada basal do epitélio. IMH (F); G2-30: Neovascularização e infiltrado inflamatório difuso. HE (G), mesmo corte de G evidenciando a diferença de coloração na área de formação do novo colágeno (→). Tricômico de Masson (H) e imunomarcção moderada de VEGF na camada basal do epitélio e no estroma. IMH (I)

Figura 3. Imunomarcção de VEGF-A em estroma e epitélio da córnea de coelhas Nova Zelândia tratadas com CTMMO-co e enxerto corneconjuntival.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Sinais clínicos em coelhos submetidos a úlcera de córnea profunda tratados com CTMMO e pela técnica de enxerto córneo conjuntival.

Tabela 2. Alterações histopatológicas em córneas de coelhos submetidos a úlcera profunda tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos e pela técnica enxerto corneconjuntival.

RESUMO

A oftalmologia exige cada vez mais a necessidade de se buscar tratamentos eficazes, seguros, menos onerosos e com aplicabilidade para as diversas oftalmopatias. Esta pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos da utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelhos (CTMMO-co), aplicadas pela via subconjuntival, no tratamento da úlcera de córnea profunda induzida em coelhos. As CTMMO-co de coelhos foram previamente isoladas e caracterizadas no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco NUPCelt/UFPI. Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, adultas e híginas, divididas em 6 grupos com 4 animais cada: os grupos G1-7, G1-15, G1-30, receberam aplicação de CTMMO-co via subconjuntival na concentração de $1 \times 10^6/0,2\text{ml}$ de PBS, marcadas com nanocristais fluorescentes (Q-tracker®) e foram avaliados por um período de 7, 15 e 30 dias, respectivamente; nos grupos G2-7, G2-15 e G2-30, os animais foram submetidos à técnica cirúrgica de enxerto corneconjuntival, e também, avaliados por 7, 15 e 30 dias. Os sinais clínicos foram avaliados diariamente, durante os períodos indicados e ao final de cada tempo de avaliação, as coelhas foram eutanasiadas e submetidas à coleta de córneas para análises histopatológica e imunohistoquímica. Macroscopicamente, nos animais dos grupos tratados com CTMMO-co, foi verificada inexistência de opacidade e de vascularização da córnea, durante todo o experimento, enquanto, nos animais submetidos ao enxerto corneconjuntival, a opacidade da córnea variou, de severa, leve, e mesmo ausente, entre os animais, com diferença significativa entre os grupos, exceto entre G1-7 e G2-7. Quanto aos demais sinais clínicos, dentre eles, blefarospasmo, dor e fotofobia, ocorreram de forma mais discreta, nos animais tratados com CTMMO-co em relação aos com enxerto corneconjuntival, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$). A reepitelização evidenciada por ausência do tingimento da córnea pela fluoresceína, ocorreu precocemente nos animais dos grupos tratados com CTMMO-co, em média aos 6 dias, e nas coelhas do enxerto corneconjuntival a média foi de 10 dias pós-operatório, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas significativas. Na análise histopatológica, vascularização e infiltrado inflamatório diferiram significativamente entre os tratamentos, uma vez que, nos grupos com CTMMO-co não foi observada vascularização, e o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto, e, apenas no G1-7. Por outro lado, nos animais submetidos à cirurgia com enxerto corneconjuntival essas alterações variaram de médias a intensas, sendo o infiltrado inflamatório caracterizado por polimorfonucleares, sobretudo eosinófilos. O espessamento da córnea foi mais evidente no grupo de coelhos com o enxerto diferindo significativamente entre os tratamentos em relação aos grupos tratados com CTMMO-co. Outras alterações como, hiperplasia, hipertrofia, e degeneração hidrópica do epitélio corneal e fibroplasia, foram evidenciadas, porém, não diferiram estatisticamente entre os grupos. A imunomarcagem com o Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) apresentou diferença significativa nos tratamentos, sendo mais intensa nos animais submetidos à cirurgia com enxerto corneconjuntival, com marcação bem evidente tanto no epitélio quanto no estroma, diferindo dos tratados com CTMMO-co, que apresentaram marcações mais discretas, na maioria, apenas no epitélio. Conclui-se que a terapia com aplicação subconjuntival de CTMMO-co, além de menos invasiva e de fácil realização, apresenta melhores resultados que a técnica cirúrgica de enxerto corneconjuntival, quanto aos parâmetros clínicos, bem como, os achados histopatológicos e imunohistoquímicos. Assim, o uso de CTMMO-co por via subconjuntival é viável para o tratamento de úlcera de córnea profunda em coelho, podendo ser realizado em ambiente ambulatorial, por técnico devidamente treinado.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, úlcera de córnea, coelhos, histopatologia, Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

ABSTRACT

Ophthalmology increasingly requires the need to seek effective, safe, less expensive treatments with applicability to the various ophthalmopathies. The aim of this study was to evaluate the effects of the use of mesenchymal stem cells from rabbit bone marrow (BMSC-co), applied by the subconjunctival route, in the treatment of induced deep corneal ulcers in rabbits. The BMSC-co of rabbits were previously isolated and characterized in the Integrated Nucleus of Morphology and NUPCelt / UFPI Trunk Cell Research. 24 female New Zealand rabbits, adult and healthy, were divided into 6 groups with 4 animals each: the groups G1-7, G1-15, G1-30, were submitted to subconjunctival BMSC-co at the concentration of $1 \times 10^6 / 0.2 \text{ ml PBS}$, labeled with fluorescent nanocrystals (Q-tracker®) and evaluated for a period of 7, 15 and 30 days, respectively; in the G2-7, G2-15 and G2-30 groups, the animals were submitted to the surgical technique of corneoconjunctival graft and also evaluated for 7, 15 and 30 days. Clinical signs were evaluated daily during the indicated periods and at the end of each evaluation time the rabbits were euthanized and submitted to corneal collection for histopathological and immunohistochemical analyzes. Macroscopically, in the animals of the BMSC-co treated groups, there was no opacity and corneal vascularization during the whole experiment, while in animals submitted to the corneoconjunctival graft, cornea opacity ranged from severe, mild, and even absent, between animals, with significant difference between groups, except between G1-7 and G2-7. Other clinical signs, such as blepharospasm, pain and photophobia, occurred in a more discrete way, in the animals treated with BMSC-co in relation to those with graft, presenting a statistical difference ($p < 0.05$). Other clinical signs, such as blepharospasm, pain and photophobia, occurred more discreetly in the animals treated with BMSC-co than in the corneoconjunctival grafts, presenting a statistical difference ($p < 0.05$). The reepithelialization evidenced by absence of corneal dyeing by fluorescein, occurred early in the animals of the groups treated with BMSC-co, on average at 6 days, and in the corneoconjunctival graft rabbits the mean was 10 postoperative days, although they did not present statistical differences significant. In the histopathological analysis, vascularization and inflammatory infiltrate differed significantly between treatments, since no vascularization was observed in the groups with BMSC-co, and the inflammatory infiltrate was discrete, and only in G1-7. On the other hand, in the animals submitted to surgery with corneoconjunctival graft, these alterations varied from medium to intense, and the inflammatory infiltrate was characterized by polymorphonuclear, mainly eosinophilic. Corneal thickening was more evident in the rabbit group with the graft differing significantly between treatments in the groups treated with BMSC-co. Other alterations, such as hyperplasia, hypertrophy, and hydropic degeneration of the corneal epithelium and fibroplasia, were evidenced, but did not differ statistically between the groups. Immunostaining with the vascular endothelial growth factor (VEGF) showed a significant difference in the treatments, being more intense in the animals submitted to corneoconjunctival graft surgery, with evident marking both in the epithelium and in the stroma, differing from those treated with BMSC-co, which presented more discrete markings, mostly only on the epithelium. It is concluded that the therapy with subconjunctival application of BMSC-co, besides being less invasive and easy to perform, presents better results than the surgical technique of corneoconjunctival graft, as well as clinical parameters, as well as histopathological and immunohistochemical findings. Thus, the use of BMSC-co by subconjunctival route is feasible for the treatment of deep corneal ulcer in rabbit, and can be performed in an outpatient setting by a properly trained professional.

Keywords: mesenchymal stem cells, corneal ulcer, rabbits, histopathology, vascular endothelial growth factor (VEGF).

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O globo ocular é constituído pelas túnicas fibrosa, vascular e nervosa. A túnica fibrosa, por sua vez, compreende a córnea e a esclera, estas isolam o conteúdo interno ocular do meio externo, conferindo proteção às estruturas interna do globo (SLATTER, 2005). No coelho adulto o comprimento axial do bulbo ocular é de aproximadamente 15,6 mm. A córnea, histologicamente composta por quatro camadas: epitelial e lâmina basal, estroma, membrana de Descemet e camada endotelial, mede aproximadamente 0,41-0,48 mm de espessura, e 12,6 mm de diâmetro (VALINHOS et al., 2012; JEKL, 2015).

A camada epitelial é constituída por um epitélio escamoso estratificado, composto por uma fileira de células basais colunares alongadas, duas camadas de células poligonais e, na superfície externa, três camadas de células em forma de asas e uma camada de células escamosas. (ANDREGHETTI et al., 2008) Estas se dividem continuamente, e quando amadurecem emergem para a superfície da camada epitelial, apresentam-se grandes, planas, poligonais e com microvilos (STADES, 1999). Esta camada cria a primeira barreira para o ambiente externo e é parte integrante da interface com o filme-córnea lacrimal que é crítica para o poder de refração do olho, e caracteriza-se pela extrema uniformidade do limbo ao limbo. (DELMONTE; KIM, 2011).

Contíguo ao epitélio corneano encontra-se a membrana basal epitelial, que constitui a matriz extracelular, altamente especializada, forma uma delgada camada acelular com papel importante na homeostase, na cicatrização e enfermidades da córnea, importante no isolamento dos fatores de crescimento epiteliais dos estromais (TORRICELLI et al., 2013), sendo constituída principalmente por colágeno tipo IV, lamininas, e por proteoglicano de heparan sulfato (MA et al., 2009).

O estroma subjacente à membrana basal compreende a maior parte da córnea do coelho, cão e homem, representando quase 90% da sua espessura (JIANG et al., 2017), está limitado anteriormente pela membrana basal da camada epitelial e posteriormente pela membrana de Descemet, é constituído de feixes de fibras de colágeno, fibroblasto e substância adesiva. As fibrilas dispostas de forma paralelas dão origem a lamelas, com linfócitos entremeados, macrófagos e neutrófilos (SLATTER, 2005). Os principais componentes do estroma são colágenos do tipo I, III, V, VI e XII; glicosaminoglicanos, sulfatos de keratan, sulfatos de dermatan, sulfatos de condroitina, glicoproteínas, bem com ceratócitos, que são os componentes

celulares predominantes do estroma da córnea, que estão envolvidos na manutenção da matriz extracelular (MEC), e são distribuídos entre as lamelas do estroma (DELMONTE; KIM, 2011).

A membrana de Descemet está localizada posterior ao estroma e anterior à camada endotelial, é elástica, acelular, e considerada membrana basal da camada endotelial. A camada endotelial é a última camada da córnea, é formada por uma única camada de células, está em contato direto com o humor aquoso, revestindo toda a câmara anterior. Apresentam intensa atividade metabólica. No homem, densidade de células endoteliais ao nascer em uma córnea normal é de 3500 a 7000 células / mm² (WILLOUGHBY et al., 2010).

A transparência da córnea é fundamental para a perfeita percepção do estímulo visual que atinge a retina, sendo favorecida pela ausência de vascularização, pela composição de epitélio não queratinizado (AHMAD et al., 2010), ausência da bainha de mielina em sua inervação (MÜLLER et al., 2003), e pelo controle exercido pela camada endotelial da entrada de excesso de líquido no estroma (EDELHAUSER, 2006)

Por sua posição anatômica deixar a córnea exposta a torna vulnerável as lesões, como traumas por corpo estranho, infecções por bactérias, fungos e vírus, podendo levar à formação de úlceras. Outras etiologias de úlceras de córnea são conformações palpebrais anormais, posicionamentos anormais dos cílios, conformação do crânio, pregas nasais, exposição escleral, enfermidades como ceratoconjuntivite seca, lagofalmo, traumas, infecções bacterianas (MANDELL; HOLT, 2005; PACKER et al., 2015),

As úlceras de córnea são classificadas quanto a profundidade em superficiais, profundas, e em descementocele,. São comuns em cães com menos de 3 anos de idade, pois estão em seu período de vida mais ativo, sendo aquelas em decorrência de trauma, mais prevalentes (MANDELL; HOLT, 2005; KIM et al., 2009).

O diagnóstico das úlceras de córnea é realizado através de exames clínicos com o auxílio de magnificação com lupas, biomicroscópio com lâmpada de fenda; citologia e cultura e antibiograma, utilização de teste de Schirmer, e corantes de fluoresceína (ION et al., 2015; JAKSZ et al., 2017). O diagnóstico preciso norteará a conduta terapêutica a ser adotada, que, poderá ser realizada através da instituição de tratamento clínico, ou pela associação de tratamento clínico e protocolos cirúrgicos (HERRERA, 2008).

O tratamento clínico se baseia na utilização de substituto da lágrima, antibiótico, antiinflamatório, ciclopégicos, lentes de contato, produtos derivados do fator de crescimento, produtos derivados do sangue (EURIDES et al., 2010). O plasma rico em plaquetas (PRP), um dos produtos derivados do sangue, tem a vantagem de ser um procedimento não cirúrgico, de

baixo custo, e de fácil obtenção, e que demonstrou eficiência em úlceras corneanas extensas não infecciosas superficiais em coelhos (ACOSTA et al., 2014), no entanto, tem efeito limitado na cicatrização de úlcera estromal profunda (WU et al., 2015). Deve-se levar em consideração o seu potencial de transmissão de doenças infecciosas, necessitando de uma rigorosa triagem para doenças infecciosas durante todo o processo de produção (LI et al., 2013).

Inúmeras técnicas cirúrgicas são empregadas atualmente no tratamento das úlceras de córnea, dentre elas, o flap de terceira pálpebra, confecções de enxertos conjuntivais livres e pediculados, recobrimento conjuntivais totais ou parcial, enxerto córneoconjuntivaival, recobrimento com membranas biológicas naturais como cápsula esplênica (EURIDES et al., 2013), de pericárdio (HUNNING et al., 2009; DULAURENT et al., 2014), membrana amniótica (PONTES et al., 2012), submucosa de intestino delgado suíno (VANORE et al., 2007).

O flap de terceira pálpebra é uma técnica utilizada nos casos em que há uma impossibilidade se fixar pontos na córnea. Esta técnica, quando associada ao uso de colírios antibióticos, cicloplégicos e inibidor de protease, é eficaz no tratamento de úlcera colagenolítica (SILVA et al., 2015); no entanto, em lesões severas da córnea, o recobrimento com a terceira pálpebra não é eficiente para reposição da substância própria e para suprimento sanguíneo, bem como, dificulta a administração de medicamentos oftálmicos, e impossibilita a visualização e avaliação da lesão da córnea (EURIDES et al., 2013).

Os recobrimentos conjuntivais fornecem um suprimento vascular aplicados diretamente no leito vascular corneano lesionado, favorecendo uma defesa mais rápida frente à agressão bacteriana, como os retalhos conjuntivais 180°, que são empregados em lesões corneanas que ocorrem próximas ao limbo da córnea; os de 360° que são indicados para tratamento de úlceras corneanas extensas, que impossibilitem suturas na córnea, (PUMPHREY, 2011; DORBANDT et al., 2015). Estas técnicas podem promover cicatrização vascular levando à deposição de tecido de granulação e posterior cicatriz fibrovascular exagerada, com ocorrência de leucoma cicatricial denso, irregular e vascularizado (FERREIRA et al., 2013).

A técnica cirúrgica de enxerto conjuntival pediculado é realizada em córneas com úlceras profundas, sua largura deve ser suficiente para cobrir a lesão corneana e manter suprimento sanguíneo à mesma (HERRERA, 2008). O enxerto córneoconjuntival, é uma técnica cirúrgica que utiliza enxerto autógeno, através da confecção de um pedículo de córnea e conjuntiva aderidas com a finalidade de reparar lesões profundas na córnea, não apresenta o indesejável risco de rejeição, no entanto, é necessária que a área periférica da úlcera esteja sadia. Uma

vantagem da técnica é que o enxerto que recobre o eixo visual é constituído de tecido corneano, minimizando cicatrizes e opacidades (GELATT, 2003).

As úlceras de córnea são causadas por danos ao epitélio e quantidades variáveis de estroma, podendo atingir estruturas mais profundas como a membrana de Descemet, ou mesmo a camada endotelial. Nas úlceras superficiais, sem que haja comprometimento da membrana basal da córnea, o processo de cicatrização se dará através da migração, mitoses, e deslizamentos das células das camadas epiteliais circunjacentes, e de células-tronco do limbo para cobrir a lesão, processo que pode durar de 4 a 7 dias, e, geralmente, sem produzir opacidades significativas (HERRERA, 2008; TORRICELLI et al., 2014). No entanto, quando há comprometimento com destruição da membrana basal, e acesso ao estroma, o processo de reparação se desenvolverá de forma mais lenta (JAKSZ et al., 2017).

Quando de uma injúria corneana, uma cascata de eventos é desencadeada com a finalidade de restaurar a homeostasia corneana, sendo mediada por citocinas e receptores, quimiocinas, fatores de crescimento, células epiteliais, ceratócitos estromais, fibroblastos, células inflamatórias, e células derivadas da medula óssea, lacrimal, nervos, e do sistema imunológico (OLIVIER et al., 2007; TORRICELLI et al., 2014).

A apoptose representa um mecanismo de morte celular programada em que a liberação de enzimas lisossomais ou outros componentes intracelulares são incapazes de lesar tecidos vizinhos, e que as citocinas oriundas da lesão epitelial são o principal fator que desencadeia este processo celular (NETTO et al., 2005). A localização dos eventos no processo de reparação corneana é influenciada pela localização de apoptose dos ceratócitos, sendo aquelas mortes próximas à superfície da córnea são as primeiras alterações estromais observadas após lesão do epitélio corneano (WILSON et al., 2001).

Uma diversidade de citocinas inflamatórias está presente no complexo processo de reparação das lesões corneanas, e tanto estas, quanto seus receptores estão presentes nas células, e quase sua totalidade é produzida por células inflamatórias como polimorfonucleares, linfócitos, monócitos/macrófagos, basófilos/mastócitos e eosinófilos (PONTES et al., 2011).

Embora concentrações muito elevadas de interleucinas IL-1 α e IL-1 β sejam observadas no epitélio, muito pouco sinal de IL-1 é detectado no estroma sub-adjacente, exceto dentro de poucas células do estroma que estão presentes em algumas seções (BARBOSA et al., 2010). Estas IL são sequestradas nas do epitélio, isoladas das células estromais na córnea normal, até que uma lesão de magnitude suficiente para quebrar a função da barreira epitelial ou danificar

diretamente as células epiteliais basais e promova sua liberação, quando ganham acesso ao estroma exposto (NETTO et al., 2005).

Diversos fatores de crescimento e citocinas são produzidos pelas células da córnea e estão envolvidos na quimiotaxia de ceratócitos em lesões epiteliais, dentre eles, fator de crescimento epidérmico (EGF), Fator de crescimento transformador (TGF- β 1), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), fator de crescimento de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF), e interleucinas (IL) - 1, -6 e -10, que têm efeitos específicos nas células epiteliais (ANDRESSEN et al., 1998; LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015).

Em córneas não lesadas, o epitélio corneano juntamente com a membrana basal epitelial controla o contato dos fatores de crescimento e citocinas derivadas do epitélio, como TGF- β 1 e PDGF, com as células estromais e / ou, na direção oposta, impede o contato dos fatores de crescimento derivados do estroma, tais como KGF, com o epitélio (KIM et al., 1999; LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015), da mesma forma, a membrana de Descemet controla a penetração da TGF- β 1 a partir do humor aquoso, controlando seus efeitos nos ceratócitos estromais (MARINO et al., 2017).

O PDGF e o TGF- β , participam de interações estroma-epiteliais envolvidas na geração de miofibroblastos associados à opacidade estromal da córnea. Este fenômeno ocorre quando há uma lesão na córnea, seja por queimadura química, trauma cirúrgico, ou uma infecção microbiana, que comprometa a camada epitelial e membrana basal, deixando o estroma exposto ao TGF- β e PDGF, que ativarão os ceratócitos a sofrerem transdiferenciação em miofibroblastos, (KAUR et al., 2009b; SAIKA et al., 2016). O PDGF, ainda, aumenta a síntese de fibronectina, ácido hialurônico, colagenase e de outros fatores de crescimento (TEIXEIRA, 2014).

O TGF- β 1 aumenta os efeitos promotores de crescimento do EGF nos ceratócitos, provevemente por aumentar o número de receptores de alta afinidade do EGF, sendo assim, sugere-se que o EGF e o TGF- β 1 estão intimamente envolvidos na modulação da proliferação de células, e cicatrização de feridas na córnea (HONGO et al., 1992).

Após as células inflamatórias terem retirado restos de tecido lesado e detritos, os ceratócitos, que são células especializadas, ativados, começam a produzir colágeno de reposição, e componentes da matriz extracelular (PLUMMER, 2017). Os fibroblastos formados a partir de ceratócitos ativados, fabricam colágeno para reparo do estroma com deposição aleatória, o que

leva a formação de cicatriz, estimulando neovascularização da córnea, com vasos sanguíneos limvais direcionados para a ferida (MILLER, 2001).

Quando ocorre a cicatrização da lesão corneana, com a reconstrução estrutural da membrana basal, essa camada retoma a sua função de barreira entre o epitélio e o estroma, e os níveis de TGF- β derivados do epitélio no estroma, provavelmente caem (NETTO et al., 2006), por sua vez, quando estes caem para níveis criticamente baixos, as IL-1 α ou IL-1 β podem desencadear a apoptose de miofibroblastos, visto que, como ocorre em outros órgão em relação aos miofibroblastos, na córnea, o TGF demonstrou ação opostas às IL-1 α e IL-1 β , neutralizando seus efeitos (KAUR et al., 2009a),

A cicatrização incompleta da lesão do epitélio da córnea, leva ao recrutamento de células inflamatórias, principalmente, os neutrófilos, levando à síntese e ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), que são enzimas que degradam a matriz extracelular da córnea (WONG et al., 2002). As MMPs, as proteinases serinas, a neutrófilo elastase, agem na córnea na degradação de colágenos dos tipos III e IV, bem como de componentes da matriz extracelular como laminina e fibronectina (PERCHES et al., 2012).

A córnea, principal meio refrativo do olho, é dotada de privilégio angiogênico conseguido através do equilíbrio entre mecanismos pró e antiangiogênicos. Quando este equilíbrio é quebrado por alguma alteração corneana como, injúrias químicas, mecânicas, degenerativas ou infecciosas, em favor dos fatores pró-angiogênese, haverá desenvolvimento de neovasos que podem comprometer severamente a qualidade refrativa da córnea, sendo que neste processo, os macrófagos são responsáveis pela liberação dos fatores pro-angiogênicos, FGF e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que estimulam a produção e migração de células endoteliais (RODRIGUES, 2015). Dentre os fatores angiogênicos, a IL-1 derivada das células epiteliais necróticas da córnea induzem a produção de IL-6 pelos fibroblastos corneais, resultando em elevados níveis de VEGF (EBIBARA et al., 2011).

Estudos em animais mostram que a expressão aumentada do VEGF é uma condição necessária para a indução da neovascularização ocular, e que somente esse aumento é suficiente para induzir esse processo (DAMICO, 2007). Esse fator atua através da ligação a receptores específicos de atividade tirosina quinase, presentes na superfície das células endoteliais e em células derivadas da medula óssea em três receptores: VEGFR1(Flt-1), VEGFR2(KDR), e VEGFR3. O VEGF-A liga-se aos Flt-1 e ao KDR, sendo este último, considerado o principal receptor deste fator de crescimento, e medeia os efeitos proliferativos deste nas células endoteliais vasculares (CARMELIET, 2003; ZHONG et al., 2018).

O VEGF-A apresenta pelo menos seis isoformas diferentes, com 121, 145, 165, 183, 189 e 206 resíduos de aminoácidos. Estudos sugeriram que o VEGF₁₆₅ é, provavelmente, a isoforma mais importante nas ações do VEGF-A, sendo uma molécula-chave na indução da angiogênese e vasculogênese, causando proliferação, brotamento, migração e formação de tubo de células endoteliais (FERRARA et al., 2003; TAMELLA et al., 2005).

Foi constatado que o VEGF-A e VEGFR-2 estão presentes nas córneas lesadas ou não, sendo ativos na fase de cicatrização da ferida, e expressos no epitélio proliferativo, ceratócitos e endotélio, sendo que estes resultados representam uma nova via, envolvendo a expressão sequencial de VEGF-A₁₆₅ e seu principal receptor para respostas proliferativas, para ativação e interação de queratinócitos, nas células epiteliais e endoteliais da córnea e conjuntiva, e células endoteliais vasculares e granulócitos, na lesão corneana (GAN et al., 2004). Assim como já foi constatado o aumento da expressão de VEGF em lesão corneana (DAMICO, 2007), pesquisas tem demonstrado bons resultados no tratamento dessas lesões com uso de CTMs (JIANG et al., 2010; YAN et al., 2014; JIANG et al., 2017), e atribuem esses resultados ao papel imunomodulador dessas células na expressão positiva de fatores com atividade antiinflamatória e antiangiogênica, bem como supressão de fatores inflamatórios e angiogênicos, dentre eles, o VEGF-A (OH et al., 2010; LAN et al., 2012; YAO et al., 2012; HOS et al., 2016).

No que se refere as células-tronco, são células indiferenciadas, com capacidade de auto-renovação através de replicação, e que podem diferenciar-se em diversas linhagens de células específicas (FORTIER et al., 2005). Em todos os animais vertebrados são encontrados dois tipos de células-tronco (CT), classificadas quanto a sua origem em células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA) ou somáticas. As CTE são derivadas da massa celular interna dos blastocistos e do zigoto (DEL CARLOS et al., 2008; PEREIRA, 2008), possuindo capacidade para diferenciar-se em células das três camadas germinativas (WANG et al., 2012). As CTA são obtidas a partir de tecidos adultos, sendo classificadas como hematopoiéticas e mesenquimais (DEL CARLOS et al., 2008).

Quanto à potencialidade, as células-tronco podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As totipotentes apresentam capacidade de gerar todos os tecidos do organismo e do folheto embrionário; as pluripotentes podem gerar todas as linhagens celulares, porém não originam células da membrana extra embrionário; por sua vez, as multipotentes originam células do próprio tecido isolado e diversas células de tecidos somáticos (SOUZA et al., 2003).

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes com capacidade de aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão usando frascos de cultura de tecidos, expressam altos níveis ($\geq 95\%$) de antígeno de superfície CD105, CD73 e CD90, baixa expressão ($\leq 2\%$ positiva) de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e antígeno leucocitário humano (HLA) classe II, além de apresentarem potencial de multilinhagem, sendo capazes de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICCI et al., 2006).

As CTM, além da medula óssea, podem ser isoladas de diversos tecidos adultos, como o adiposo, renal, pancreático, muscular, âmnio, cordão umbilical, líquido amniótico, dentre outros (MEIRELLES et al., 2006; PARK et al., 2012; LOTFY et al., 2014; FAITA et al., 2016), podendo ser isoladas, expandidas em cultura, e estimuladas para se diferenciarem em osso, cartilagem, músculo, estroma da medula, tendão, gordura, e outros tecidos conjuntivos (CAPLAN; BRUDER, 2001).

Vários atributos das CTM como capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens, secretar fatores envolvidos com a regulação imunológica, e capacidade de migrar para os locais de inflamação, fazem com que estas células despertem interesse para muitas implicações clínicas (KIM et al., 2013), por isso, estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de utilização de CTM no tratamento de diversas enfermidades, em humano e animais. Na cardiologia, relatos de uso de células-tronco mesenquimais em modelos animais, demonstrou melhoria da função cardíaca após infarto do miocárdio e prevenção da progressão de insuficiência cardíaca (SCHUSTER et al., 2008; CHACKO et al., 2009). Na endocrinologia, estudos relacionados à terapia de retinopatias diabética utilizando células-tronco (RAJASHEKHAR, 2014).

No âmbito da oftalmologia, inúmeras pesquisas estão em desenvolvimento em busca de estabelecer protocolos terapêuticos frente às diversas oftalmopatias, com interesse crescente para o uso das células-tronco, principalmente naqueles casos em que ocorre perda da função do limbo, com conseqüente conjuntivalização da córnea, com episódios recorrentes de dor, podendo culminar com cegueira (YE et al., 2006; BRUNELLI et al., 2007, YAN et al., 2014), em retinopatias experimentalmente induzidas em ratos (CASTANHEIRA et al., 2008; AGOROGIANNIS et al., 2012) e nas enfermidades da córnea (JIANG et al., 2017), dentre elas a síndrome de Sjögren no homem (XU et al., 2012) e úlceras de córnea (JIANG et al., 2010).

A terapia oftálmica com CTM consiste em aplicação de milhões de células através de diversas vias, dentre elas, a intravenosa, intravítrea, e subconjuntival (BYDŁOWSKI et al., 2009; YAO et al., 2012; MEAD et al., 2013). Essas células são utilizadas pela sua capacidade de

diferenciação em células da córnea e função parácrina, prolongando o tempo de sobrevivência dos enxertos de córnea (LI et al., 2014) por seus efeitos imunomoduladores, e por apresentar níveis insignificantes de complexo principal de histocompatibilidade- MHC-I e/ou não expressão MHC-II em sua superfície (PINTO FILHO et al., 2013). Além disso, estudos demonstram que as CTM expressam fatores antiangiogênicos (ARMSTRONG et al., 2003, OH et al, 2008).

Considerando a grande importância das sequelas corneanas pós-trauma, com comprometimento visual, e consequentemente das atividades sociais e de trabalho, particularmente em países em desenvolvimento, pelos altos custos das cirurgias refrativas com aparato técnico especializado, urge a necessidade de serem estabelecidas terapias no segmento da oftalmologia com mais aplicabilidade, praticidade, eficiência e menos oneroso. Portanto, este estudo visa avaliar a capacidade regenerativa de células-tronco mesenquimais de medula-óssea de coelho (CTMMO-co) nas lesões ulcerativas profundas induzidas, estabelecendo comparações com a técnica cirúrgica enxerto corneconjuntival.

Esta tese foi organizada com introdução e revisão de literatura e dois capítulos, submetidos para publicação. O capítulo I, intitulado: **“Células-tronco mesenquimais como alternativa para o tratamento de lesões ulcerativas profundas de córnea em coelho”**, elaborado segundo as normas da revista Ciência Rural e o capítulo II **“Avaliação da angiogênese em úlcera de córnea profunda induzida em coelhos tratados com células-tronco mesenquimais”**, descrito conforme as normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, além das considerações finais.

CAPÍTULO I*

**manuscrito submetido na revista Ciência Rural*

1 **Células-tronco mesenquimais como alternativa para o tratamento de lesões ulcerativas**
2 **profundas de córnea em coelho**

3 **Mesenchymal stem cells as an alternative for the treatment of deep ulcerative corneal**
4 **lesions in rabbit**

5 **Marcus Valerius de Matos Freitas¹, Maria Acelina Martins de Carvalho²,**

6 **RESUMO**

7 As úlceras de córnea são causas determinantes de opacidade da córnea, podendo causar déficit
8 visual. Este estudo tem como objetivo avaliar a utilização de células-tronco mesenquimais de
9 medula óssea de coelho (CTMMO-co), aplicadas via subconjuntival no tratamento da úlcera
10 de córnea profunda induzida em coelhos. Foram formados dois grupos experimentais,
11 subdivididos em seis, com quatro animais: G1 (G1-7, G1-15, G1-30) e G2 (G2-7, G2-15 e
12 G2-30). O G1 corresponde aos grupos dos coelhos tratados com CTMMO-co, aplicadas via
13 subconjuntival na concentração de $1 \times 10^6/0,2\text{ml}$ de PBS e G2, aos submetidos à técnica
14 cirúrgica enxerto corneconjuntival. As CTMMO-co, foram previamente marcadas com
15 nanocristais fluorescentes (Q-tracker®). Os sinais clínicos foram avaliados diariamente em
16 cada grupo, até o final do tratamento, isto é, de 7 dias nos G1-7 e G2-7, 15 dias nos G1-15 e
17 G2-15 e 30 dias nos animais dos grupos G1-30 e G2-30, quando foram eutanasiados. Em
18 seguida, as córneas foram processadas para análises histopatológicas. Os coelhos dos grupos
19 G1 não apresentaram opacidade e vascularização da córnea, no entanto, manifestaram sinais
20 discretos de blefarospasmo, dor e fotofobia, o que foi evidenciado com mais intensidade, nos
21 grupos com enxerto. Os achados histopatológicos revelaram nos animais submetidos ao

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil.

² Departamento de Morfolofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), 64049-550 Teresina, PI, Brasil.

22 enxerto corneocconjuntival, córneas vascularizadas e infiltrado inflamatório severo, enquanto
23 os tratados com CTMMO-co, apresentaram infiltrado inflamatório leve e ausência de
24 vascularização. Conclui-se assim, que, a terapia com células-tronco mesenquimais da medula
25 óssea, por via subconjuntival é mais efetiva, comparada ao tratamento com o enxerto
26 corneocconjuntival em coelhos, podendo ser indicada para o tratamento de úlcera de córnea
27 profunda.

28 **Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais de medula óssea(CTMMO), úlcera de córnea,
29 histopatologia, coelho

30 **ABSTRACT**

31 Corneal ulcers are cause causes of opacity of the cornea, and can cause visual deficit. This
32 study aims to evaluate the use of mesenchymal stem cells from rabbit bone marrow (BMSCs),
33 applied by subconjunctival in the treatment of deep induced corneal ulcers in rabbits. Two
34 experimental groups, subdivided into six, were formed with four animals: G1 (G1-7, G1-15,
35 G1-30) and G2 (G2-7, G2-15 and G2-30). G1 corresponds to the groups of rabbits treated
36 with BMSCs, applied by subconjunctival in the concentration of 1×10^6 / 0.2ml of PBS and
37 G2, to the surgical technique with corneocconjuntival graft. The BMSCs, were previously
38 labeled with fluorescent nanocrystals (Q-tracker®). Clinical signs were evaluated daily in
39 each group until the end of treatment, ie, 7 days in G1-7 and G2-7, 15 days in G1-15 and G2-
40 15 and 30 days in animals of G1- 30 and G2-30 when they were euthanized.The corneas were
41 then processed for histopathological analysis. The rabbits of the G1 groups did not show
42 opacity and vascularization of the cornea, however, they manifested discreet signs of
43 blepharospasm, pain and photophobia, which was evidenced with more intensity in the graft
44 groups. The histopathological findings revealed in the animals submitted to the
45 corneocconjuntival graft, vascularized corneas and severe inflammatory infiltrate, whereas

46 those treated with BMSCs presented mild inflammatory infiltrate and absence of
47 vascularization. It is concluded that mesenchymal stem cell therapy by subconjunctival is
48 more effective compared to treatment with the corneocojuntival graft in rabbits and may be
49 indicated for the treatment of deep corneal ulcer.

50 **Keywords:** Mesenchymal stem cells from the bone marrow (BMSC), corneal ulcer,
51 histopathology, rabbit.

52 INTRODUÇÃO

53 A ausência de vascularização e a transparência da córnea são condições vitais para a
54 visão normal (ZHONG et al., 2018). No entanto, pela sua posição anatômica a córnea está
55 sujeita a diversas lesões, cuja cicatrização depende de um processo complexo de eventos
56 relacionados, envolvendo morte celular, migração, proliferação, diferenciação e remodelação
57 da matriz extracelular. (LJUBIMOV & SAGHIZADEH, 2015).

58 As úlceras corneais são lesões comuns que apresentam diversas manifestações
59 clínicas, devem receber tratamento rápido e eficiente, de modo a evitar sequelas corneanas,
60 até mesmo, a deficiência visual permanente. Muitas injúrias corneais resultam em
61 neovascularização da córnea (NVC) (GHAZARYAN et al., 2016). Outros sinais são
62 verificados com frequência, a dor, blefaroespasmos, hiperema conjuntival, fotofobia, e
63 opacidade (ANDRADE et al., 2009; BARBOSA et al., 2013; BARROS et al., 2016).

64 Quando as úlceras são superficiais, não envolvendo a membrana basal (MB), o
65 processo de cicatrização pode durar de 4 a 7 dias, geralmente, sem produzir opacidade
66 significativa. Já nas úlceras profundas, o tratamento baseia-se em terapia clínica e cirúrgica,
67 mediante confecção do enxerto conjuntival e do uso de membranas biológicas naturais
68 (PONTES et al., 2008; BARBOSA et al., 2013), técnicas que requerem aparato cirúrgico,
69 qualificação e locais apropriados (ACOSTA et al., 2014). Os aloenxertos são amplamente

70 utilizados, pela existência de privilégio imunológico, cuja manutenção, é importante para o
71 sucesso do transplante da córnea e está estreitamente relacionado com sua natureza avascular
72 (ZHONG et al., 2018). No entanto, condições que interferem nesse privilégio levam a
73 rejeição, que continua a ser a principal causa de falha do aloenxerto corneano.
74 (NIEDERKORN & LARKIN, 2010).

75 Segundo ARAÚJO & GOMES (2015), terapias com células-tronco representam nova
76 estratégia na restauração do epitélio corneal, o que poderá substituir o transplante de córnea
77 convencional. Tal fato decorre das características regenerativas, imunomoduladoras,
78 antiinflamatórias, antiangiogênicas, de transdiferenciação celular e baixa imunogenicidade
79 dessas células (OH et al., 2008; GU et al., 2009; PANKAJAKSHAN & AGRAWAL, 2014;
80 GHAZARYAN et al., 2016; DI et al., 2017). O potencial das células-tronco na regeneração
81 corneal já foi demonstrado, por meio da administração sistêmica de CTMs em lesão epitelial
82 da córnea, induzida por cauterização térmica, em camundongos (LAN et al, 2012). Estudo
83 recente demonstrou melhora significativa na cicatrização de feridas epiteliais em córnea
84 diabética, por meio da aplicação subconjuntival de CTMs (DI et al., 2017), sendo esta, a via
85 mais utilizada na prática clínica para tratamento de distúrbios oftalmológicos (YAO et al.,
86 2012), geralmente, no tratamento de lesões superficiais (LI & ZHAO., 2014 e BARROS et al.,
87 2016; GHAZARYAN et al., 2016)

88 Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a capacidade regenerativa de células-tronco
89 mesenquimais da medula óssea de coelho (CTMMO-co), aplicadas via subconjuntival, no
90 tratamento da úlcera de córnea profunda induzida, estabelecendo um comparativo com o
91 tratamento cirúrgico usual, por meio do enxerto corneconjuntival.

92 MATERIAL E MÉTODOS

93 Foram utilizados 24 coelhos, fêmeas, raça Nova Zelândia, hípidas, idade de 10 a 12
94 meses. Foram formados dois grupos experimentais, subdivididos em seis, com quatro
95 animais: G1 (G1-7, G1-15, G1-30) e G2 (G2-7, G2-15 e G2-30). O G1 corresponde aos
96 grupos dos coelhos tratados com CTMMO-co, aplicadas via subconjuntival na concentração
97 de $1 \times 10^6 / 0,2 \text{ mL}$ de PBS e G2, aos submetidos à técnica cirúrgica enxerto corneconjuntival.
98 Os animais foram avaliados clinicamente por 7, 15 e 30 dias, conforme MONTEIRO et al.
99 (2000) e DONATTI et al. (2013). O experimento foi desenvolvido no Núcleo Integrado de
100 Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt) da UFPI.

101 As CTMMO de coelhos encontravam-se criopreservadas no banco de células do
102 NUPCelt/UFPI, isoladas e caracterizadas em estudo anterior (SILVA et al., 2017). Estas
103 células foram descongeladas, realizadas contagem e avaliação de viabilidade celular e
104 semeadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm^2 na densidade de 10^6 células/mL com 3,0
105 mL de meio de cultivo MEM Alpha Medium+L-glutamine, suplementado. Foram mantidas
106 em estufa incubadora (TECNAL TE-399®) à 37°C em 5% de CO_2 e umidade de 95%, com
107 trocas de meio até a confluência máxima de 80%, quando foram novamente avaliadas a
108 viabilidade e concentração celular para marcação com nanocristais intracitoplasmáticos (Q-
109 Tracker® 655 Cell Labeling Kit), realizada conforme descrito por COSTA et al. (2017).
110 Após a marcação, o pellet foi ressuspendido em Tampão fosfato salino (PBS) na concentração
111 de 10^6 células/ $0,2 \text{ mL}$ e transportado em seringa estéril de 1 mL para aplicação subconjuntival
112 nos animais dos grupos G1.

113 Para indução das úlceras, os animais foram submetidos à pré-anestesia com cloridrato
114 de xilazina (Bayer, SP, Brasil) 3 mg/kg e cloridrato de tramadol (Cristália, SP, Brasil) 2
115 mg/kg via intramuscular, anestesiados com maleato de midazolam (Cristália, SP, Brasil)
116 1mg/kg, e cloridrato de quetamina (Cristália, SP, Brasil) 35mg/kg pela via intramuscular.

117 Após anestesia, foram submetidos à antissepsia das pálpebras e conjuntivas com
118 iodopovidona a 10% e 1%, respectivamente, o globo ocular foi fixado com blesfarostato, e
119 instilada uma gota de solução oftálmica anestésica à base de cloridrato de tetracaína 1% e
120 cloridrato de fenilefrina a 0,1% (Alergan, SP, Brasil). Ao microscópio cirúrgico (DF
121 Vasconcelos) com objetiva 16, foi posicionado o trépano de 4,0 mm na região central da
122 córnea e perpendicular à mesma, sendo realizada leve pressão e movimentos circulares até
123 que a face cortante do trépano penetrasse no estroma profundo da córnea. O botão corneal foi,
124 então, retirado com auxílio de pinça colibri e tesoura de córnea.

125 Após indução das úlceras profundas de córneas, os animais do grupo G2 foram
126 submetidos à cirurgia utilizando a técnica enxerto corneconjuntival conforme GELATT
127 (2003). Inicialmente, as úlceras foram transformadas de formato circular para quadrado, com
128 auxílio de lâmina nº10, com a finalidade de receber, em seu leito, o enxerto de córnea e
129 conjuntiva. Foram realizadas duas incisões divergentes da periferia da úlcera até o limbo, e
130 em seguida para a conjuntiva bulbar. Com um bisturi angulado crescente de 2,0 mm de
131 diâmetro, a córnea foi dissecada até o limbo, e em seguida para a conjuntiva, de tal forma que
132 o enxerto pudesse ser deslizado preenchendo todo o leito da úlcera sem oferecer resistência.
133 O enxerto, então, foi fixado à córnea com fio de sutura oftálmico mononylon 9-0 com pontos
134 separados simples. Todos os animais, no pós-cirúrgico, receberam instilação de uma gota de
135 colírio diclofenaco sódico (Alergan, SP, Brasil) 3 vezes ao dia, durante 5 dias; uma gota de
136 gatifloxacino 0,3%(Alergan, SP, Brasil) 4 vezes ao dia, por 7 dias; meloxicam (Ouro Fino,
137 SP, Brasil) 0,1mg/kg ao dia, via subcutânea, 3 dias; cloridrato de tramadol (Cristália, SP,
138 Brasil) 3 mg/kg a cada 12 horas, 3 dias via intramuscular e enrofloxacina (Bayer, SP, Brasil)
139 5 mg/kg a cada 12 horas, por 7 dias pela via subcutânea. Todos os animais utilizaram colar
140 Elizabetano durante o experimento.

141 Foram avaliados os parâmetros clínicos: presença/ausência de úlcera de córnea,
142 vascularização e opacidade da córnea, opacidade da lesão/enxerto, pigmentação,
143 blefarospasmo, fotofobia, secreção ocular, hiperemia conjuntival, dor e quemose, e,
144 qualificados e quantificados subjetivamente em: (0) ausente; (1) leve; (2) moderada (3)
145 severa (DONATTI et al., 2013), exceto presença/ausência de úlcera de córnea,
146 vascularização e pigmentação, avaliados apenas quanto às presença ou ausência. Os
147 parâmetros clínicos foram avaliados por um único avaliador, diariamente, com auxílio de
148 biomicroscópio com lâmpada de fenda (SL-15, Kowa, Japão), oftalmoscópio direto (Welch
149 Allyn), lanterna halógena (Penlite-Welch Allyn) e fluoresceína sódica (Ophthalmos, SP).

150 Ao final de cada tempo de avaliação, os animais foram eutanasiados, segundo as
151 Normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal–CONCEA, pela
152 infusão intravenosa de cloreto de potássio 10% (Helex Istar, GO, Brasil) 4 mL/kg.
153 Confirmado o óbito, os globos oculares foram enucleados e fixados em solução de formol
154 tamponada (pH 7,2) a 10% por 24 horas para processamento histológico da córnea e
155 rastreamento de CTMMO-co marcadas no tecido corneano.

156 Na análise histopatológica as córneas foram seccionadas ao meio, processadas por
157 técnicas histológicas e coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E). As alterações observadas
158 foram avaliadas de forma semi-quantitativa, mensurando-se a intensidade das lesões na
159 córnea em escala de 0 a 4, onde: 0 = ausente, 1 = leve; 2 = média; 3 = moderada e 4 = intensa.
160 Para o rastreamento das células-tronco, as lâminas histológicas das córneas dos animais do
161 grupo G1, foram desparafinadas e observadas ao microscópio de fluorescência (modelo BX41
162 OLYMPUS).

163 A análise estatística dos dados referentes aos parâmetros clínicos foi realizada com uso
164 do software estatístico R, para comparar os tratamentos foi utilizado o teste não paramétrico
165 de Kruskal-Wallis (KW). Na rejeição da hipótese nula através do teste de KW, foram feitas

166 comparações múltiplas com teste de Dunn, para identificar os tratamentos que se diferem,
167 com 5% de nível de significância. Os resultados dos dados histopatológicos foram analisados
168 pelo teste ANOVA two-way, seguido de Boferroni, utilizando o programa estatístico
169 GraphPad Prism 6 demo statistical software (Califórnia, Estados Unidos®). Foram
170 consideradas diferenças significantes quando $P < 0,05$.

171 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

172 A técnica de obtenção das úlceras corneais profundas, nos animais dos grupos
173 tratados com CTMMO-co (Figura 1A) e nos do enxerto (Figura 1B) foi eficaz, resultando em
174 lesões de tamanho e profundidade homogêneos, com acesso ao estroma posterior da córnea,
175 conforme demonstrado por DONATTI et al. (2013).

176 A via subcutânea para aplicação das CTMMO-co, apresentou praticidade, não sendo
177 verificadas formação de depósito, inflamação, abscesso ou necrose no tecido conjuntivo
178 bulbar, corroborando com as afirmações de ARAÚJO & GOMES (2015), a despeito do
179 potencial das CTMs fornecer uma abordagem terapêutica, quando injetadas nas cicatrizes da
180 córnea. Ademais, a capacidade de depositar tecido conjuntivo organizado *in vitro*, o que
181 poderá ser útil na engenharia de estroma da córnea no futuro. Apesar de outras vias serem
182 utilizadas em transtornos oftálmicos, segundo YAO et al. (2012), na prática clínica a via
183 subcutânea é a mais comum. Este método se mostrou eficaz em pesquisa realizada por DI et
184 al. (2017), que demonstraram melhora significativa no reparo de feridas em córneas diabéticas
185 tratadas com transplante local de CTMs. Estes autores afirmam que, em parte, os resultados
186 são atribuídos a produção do fator de necrose tumoral gene estimulado-6 (TSG-6) secretado
187 pelas CTMs.

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

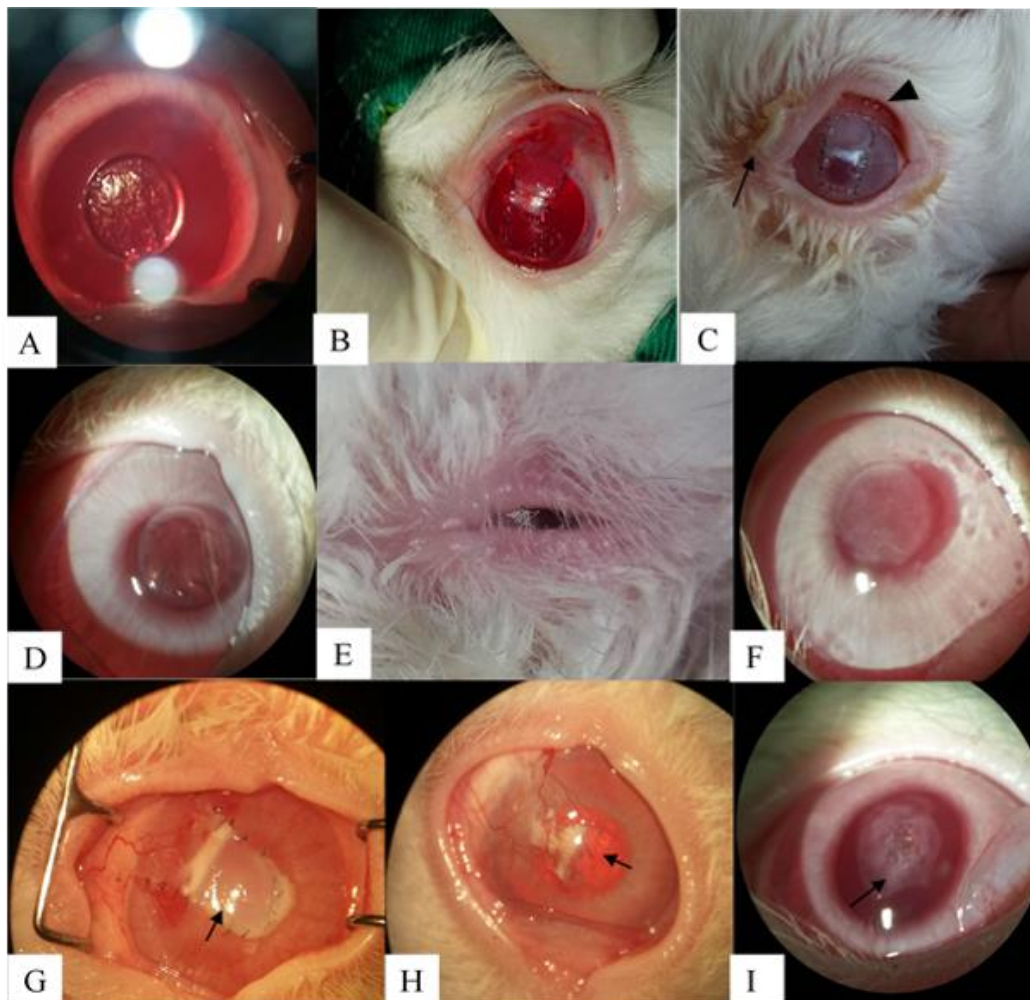


Figura 1. Olhos dos coelhos submetidos à úlceras de córnea profundas. Figuras A, G e H realizadas com câmara acoplada ao microscópio cirúrgico DF Vasconcelos,10x. Figuras D, F e I realizadas com câmara acoplada a lâmpada de fenda Kowa. Aspecto final da úlcera de córnea profunda em G1 (A). Aspecto final da técnica enxerto corneconjuntival em G2 (B). Sete dias pós- operatório: Secreção ocular moderada (→) e hiperemia conjuntival severa (▶) em G2 (C), ausência de secreção e hiperemia conjuntival em G1 (D). 15 dias pós-operatório: fotofobia e blefarospasmo moderados no G2 (E), ausência de fotofobia e blefarospasmo no G1 (F) e opacidade axial (→) (G). 30 dias pós-operatório: Vascularização no G2 (H), opacidade axial (→) e ausência de vascularização em G1 (I).

209 A reepitelização das córneas nos animais do G2 ocorreu em média 10 dias, com
210 cicatrização completa apenas aos 30 dias, entretanto, nos animais tratados com CTMMO-co
211 (G1), embora, não tenha apresentado diferença estatística ($P > 0,05$), a reepitelização foi mais
212 precoce, iniciando no dia 5 e completando no dia 10 (Tabela 1). Considerando que as
213 CTMMO-co foram identificadas na córnea até 30 dias após aplicação (Figura 2B), pode-se
214 inferir que estes resultados devam-se, em parte, à capacidade de sua transdiferenciação em
215 células epiteliais da córnea, como evidenciado por GU et al. (2009), que demonstraram a
216 transdiferenciação das CTMs da medula óssea de coelhos, *in vivo* e *ex vivo*.

217 A vascularização da córnea não ocorreu nos animais do G1, entretanto, foi observada
218 em todos os coelhos submetidos ao enxerto corneconjuntival (Figura 1H) até o final do
219 experimento. Este fato, provavelmente, foi ocasionado pelos fios da sutura, assim como,
220 considerado por GIACOMINIC et al. (2014) comparando a neovascularização corneal
221 induzida por fios de sutura e por queimadura alcalina. De outra forma, em experimento
222 induzindo ceratoplastia lamelar em coelhos tratados com enxerto de omento alógeno livre e
223 células mesenquimais de omento associadas com membrana amniótica (MA) canina,
224 BARROS et al. (2016) observaram vascularização até o final do experimento, aos 30 dias,
225 apenas nos animais tratados com CTMs associadas à MA, sendo os resultados atribuídos ao
226 uso de MA xenogênica e ao material de sutura utilizado.

227 Quanto à hiperemia, variou de ausente (Figura 1D) a moderada nos animais do G1-7
228 e G1-30, ausente a severa no G1-15, leve a severa nos G2-7 (Figura 1C) e G2-15, e ausente a
229 severa no G2-30, com diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Dentro do
230 mesmo tratamento houve diferença entre G1-15 e G1-30, e entre G2-30 em relação ao G2-7 e
231 G2-15 (Tabela 1). Os sinais de blefarospasmo, dor e fotofobia, nos coelhos do G1, variaram
232 de ausentes a leves (Figura 1F), já, nos animais do G2, de ausentes a severos (Tabela 1), com
233 diferença estatística entre tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela1. Sinais clínicos em coelhos submetidos a úlcera de córnea profunda tratados com Células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos e pela técnica enxerto córneoconjuntival

PARÂMETRO CLÍNICO	GRUPOS	M7	M15	M30
ÚLCERA DE CÓRNEA	G1	*5,5 (4,6)	*7 (5,9) aA	* 6 (5,7) aA
HIPEREMIA CONJUNTIVAL	G2	*7 (7;7) aA	*10 (7;11) aA	*10 (8;14)
BLEFAROSPASMO	G1	# 0 (0;1)	# 0 (0;3) aA	# 0 (0;2) aB
OPACIDADE DA CÓRNEA	G2	# 2 (1;3) bA	# 2 (1;3) bA	# 1 (0;3) bB
SECREÇÃO OCULAR	G1	# 0 (0;0) aA	# 0 (0;2) aA	# 0 (0;0) aA
DOR	G2	# 2 (0;3) bA	# 1 (0;3) bAB	# 1 (0;3) bB
OPACIDADE LESÃO/ENXERTO	G1	# 0 (0;0) aA	# 0 (0;0) aA	# 0 (0;0) aA
FOTOFOBIA	G2	# 0 (0;2) bA	# 1 (0;2) bB	# 1 (0;3) bB
QUEMOSE	G1	# 0 (0;1) aA	# 0 (0;3) aA	# 0 (0;1) aA
	G2	# 2 (1;3) bA	# 1 (0;2) bA	# 1 (0;3) bB
	G1	# 0 (0;0) aA	# 0 (0;1) aA	# 0 (0;1) aA
	G2	# 1 (0;3) bA	# 1 (0;2) bAB	# 1 (0;2) bB
	G1	# 1 (0;1) aA	# 1 (0;2) aA	# 2 (0;3) aB
	G2	# 1 (0;2) bA	# 2 (0;3) bA	# 2 (0;3) aB
	G1	# 0 (0;0) aA	# 0 (0;1) aA	# 0 (0;1) aA
	G2	# 2 (0;3) bA	# 1 (0;2) bAB	# 1 (0;3) bB
	G1	# 0 (0;1) aA	# 0 (0;1) aA	# 0 (0;1) aA
	G2	# 0 (0;1) aA	# 0 (0;2) aA	# 0 (0;2) aA

G1 = Grupo tratamento com CTMMO-co. G2 = Grupo submetido a técnica enxerto corneoconjuntival. M7 = Momento de avaliação dos animais avaliados até 7dias. M15 = Momento de avaliação dos animais avaliados até 15 dias. M30 = Momento de avaliação dos animais avaliados até 7dias 30 dias. # = Escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado e 3-severo. Letras minúsculas comparam os grupos no momento de avaliação e letras maiúsculas comparam os momentos dentro do mesmo grupo. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores (P<0,05).

235 A intensa estimulação das terminações nervosas conjuntivais epiteliais e estromais,
236 pelo ato cirúrgico e fios de sutura, foram as prováveis causas da exacerbação dos sinais nos
237 animais tratados com enxerto (Figura 1E), assim como, observado por ANDRADE et al.
238 (2009). Isso se justifica devido ao momento da retirada dos pontos aos 15 dias, coincidir com
239 a atenuação dos sinais clínicos e com ausência de blefarosspasmos, dor e fotofobia em alguns
240 animais do G2-15 e G2-30.

241 Blefarosspasmos, hiperemia conjuntival, fotofobia, quemose e secreção ocular são
242 frequentes em lesões de córnea. Estas manifestações são mais intensas nos primeiros dias,
243 reduzindo gradativamente após a retirada dos pontos (BARBOSA et al., 2013; BARROS et
244 al., 2016). Neste estudo, foram evidenciados de forma mais leve que a indicada por
245 BARBOSA et al. (2013) em terapia com membrana amniótica equina na reparação de
246 ceratectomia lamelar em cães.

247 Secreção ocular foi verificada em maior intensidade nos animais tratados com enxerto,
248 com diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$), onde a variação foi de leve a severa
249 no G2-7 (Figura 1C), ausente a moderada no G2-15 e ausente a severa no G2-30 (Tabela 1).
250 Já nos animais do G1, a intensidade variou de ausente a leve nas coelhas dos G1-7 e G1-30 e
251 ausente a severa nas do G1-15. Estes resultados foram mais tênues, do que os vistos por
252 GODOY-ESTEVES (2015) em coelhos com lesão corneal superficial tratados com membrana
253 amniótica humana e de coelhas.

254 No que se refere à opacidade da córnea, não foi constatada nos animais tratados com
255 CTMMO-co. Porém, variou de ausente a moderada nos animais do G2-7, de ausente a severa,
256 nos G2-15 e G2-30 (Tabela 1). A exposição do estroma corneano pode ter contribuído para a
257 opacidade, conforme citado por MONTEIRO et al. (2000). Já a ausência de opacidade nas
258 córneas dos animais tratados com CTMMO-co deve-se possivelmente, à ação

259 antiinflamatória, antiangiogênica e de transdiferenciação destas células (OH et al., 2008; GU
260 et al., 2009; PANKAJAKSHAN & AGRAWAL, 2014).

261 A opacidade da lesão/enxerto teve uma variação de intensidade de ausente a leve no
262 G1-7, ausente à moderada no G1-15, ausente a severa no G1-30 (Figura 1I), ausente a
263 moderada no G2-7 e ausente a severa no G2-15 (Figura 1G) e G2-30, com diferença
264 estatística entre os grupos ($p < 0,05$), exceto entre G1-30 e G2-30. Diferença significativa
265 ($p < 0,05$) foi evidenciada também, dentro dos tratamentos, G1-30 em relação a G1-7 e G1-15;
266 e G2-30 em relação a G2-7 e G2-15 (Tabela 1). A reparação precoce da camada epitelial e
267 reestabelecimento da membrana basal determinam cicatrização corneana menos densa, fato
268 que ocorreu nos grupos tratados com CTMMO-co, em que as bordas das lesões estavam mais
269 transparentes. Segundo WILSON (2012), o fator de crescimento transformador (TGF- β),
270 junto ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e interleucina (IL) -1 regulam o
271 desenvolvimento de miofibroblastos e apoptose em modelos animais *in vitro* e *in-situ* e são
272 modulados em parte pela membrana basal epitelial, que funciona como barreira entre o
273 epitélio e o estroma. Desta forma, defeitos estruturais e funcionais na MB provavelmente
274 levam à elevação prolongada dos níveis de TGF- β , e de outras citocinas no estroma,
275 culminando com opacidade da córnea.

276 Postula-se que a reparação corneal mais precoce nos animais tratados com CTMMO-
277 co, verificada pela ausência de vascularização (Figura 1I) e sinais clínicos mais discretos ou
278 ausentes, sejam atribuídos à ação destas células. Pois, o rastreamento intracitoplasmático
279 confirmou a presença discreta das CTMMO-co, no estroma corneal dos animais do G1, no
280 local da lesão (Figura 2B), enquanto em uma córnea do grupo enxerto foi notada a ausência
281 de CTMMO-co (Figura 2A). Porém, a evidência de muitas células marcadas no tecido
282 conjuntival bulbar, local onde foram aplicadas, sugere ação parácrina destas células, em
283 acordo com LI & ZHAO (2014). Ainda, confirmada por LAN et al. (2012) ao constatar

284 migração de CTMs da medula óssea administradas via intravenosa, para o epitélio lesado, e
285 não para a córnea normal, causando rápida regeneração de lesão epitelial da córnea induzida
286 por cauterização térmica. Para GHAZARYAN et al. (2016), as células transplantadas
287 melhoraram a cicatrização da ferida da córnea por meio da produção de fatores tróficos e do
288 efeito imunorregulatório ao invés da transdiferenciação direta nas células da córnea.

289 As principais alterações histopatológicas observadas, no epitélio e estroma corneal,
290 bem como os percentuais de animais que apresentaram as lesões em diferentes intensidades,
291 estão descritos na tabela 2. Foram verificadas hiperplasia, hipertrofia e degeneração do
292 epitélio, vascularização de córnea, infiltrado inflamatório e fibroplasia (Figura 2). No entanto,
293 diferenças estatísticas entre os grupos ocorreram apenas quanto a vascularização da córnea,
294 que diferiu entre G1-15 e G2-15 ($P<0,05$) e entre G1-30 e G2-30 ($P<0,01$) e no infiltrado
295 inflamatório, com diferença entre G1-15 e G2-15 ($P<0,05$) (Figura 3).

296 A hiperplasia (Figura 2G) e hipertrofia das células do epitélio corneal vistas na
297 avaliação histopatológica, de ambos os grupos, segundo NETTO et al. (2005), representam
298 uma resposta do epitélio na tentativa de preencher e restaurar a conformação original da
299 córnea, bem como, de se restabelecer a regularidade de sua superfície. No G1 o número de
300 camadas de células do epitélio da córnea variou de 3 a 10, e no G2 de 4 a 8, não diferindo
301 entre os grupos.

302 Angiogênese não foi observada nos animais tratados com CTMMO-co (Figura 2D,
303 2F e 2H), corroborando com os achados da avaliação clínica. No entanto, foi evidenciada no
304 G2 (Figura 2E, 2G e 2I) aos 7, 15 e 30 dias. A ausência de angiogênese nos coelhos do G1, já
305 a partir do sétimo dia, demonstra a efetividade desse tratamento em úlceras de córnea. Além
306 disso, embora até o final do acompanhamento, tenha sido evidenciado desorganização
307 estromal nas áreas de fibroplasia, processo normal na cicatrização de feridas. Ademais, as
308 CTMs promovem a supressão de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento do

309 endotélio vascular (VEGF) (ESLANI et al., 2017), com expressão significativamente
 310 aumentada nas córneas inflamadas e vascularizadas, segundo NIKOLIĆ & JOVANOVIĆ,
 311 2015. Resultados semelhantes foram observados por YAO et al. (2012) em pesquisa sobre os
 312 efeitos de CTMs na cicatrização de feridas na córnea na fase aguda de queimadura alcalina,
 313 concluindo que a aplicação subconjuntival de CTMs acelera significativamente a cicatrização
 314 de feridas na córnea, atenua a inflamação e reduz a neovascularização.

315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324

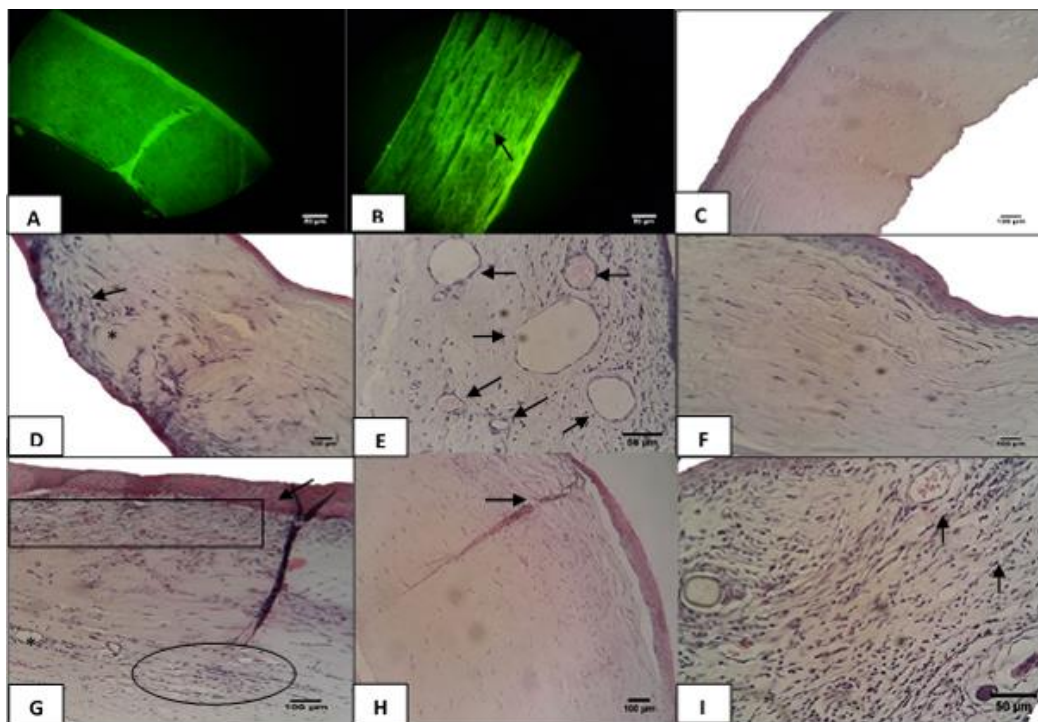


Figura 2. Fotomicrografia de córneas de coelhos submetidos a úlcera de córnea profunda tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos e pela técnica com enxerto córneo conjuntival. Microscopia de fluorescência (A e B) Coloração com HE em microscopia: de luz (C a I). G2-30: Ausência de marcação celular com nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes (A); G1-30: Células marcadas com nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes (→) (B); Estrutura de córnea normal (C); G1-7: Fibroplasia típica com fibroblastos ativos (→) e bandas de colágeno(*) (D); G2-7: Infiltrado inflamatório eosinofílico difuso e neovascularização (→) (E); G1-15: Fibroplasia (F); G2-30: Hiperplasia epitelial (→), neovascularização (*), Fibroplasia (□) e infiltrado inflamatório eosinofílico (○) (G); G1-30: Fibroplasia (H); G2-15: Infiltrado inflamatório eosinofílico difuso intenso, neovascularização (→) (I)

325

Tabela2. Alterações histopatológicas em córneas de coelhos submetidos a úlcera profunda tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos e pela técnica enxerto corneconjuntival.

HISTOPATOLOGIA	TEMPO DE AVALIAÇÃO/ ESCORE	M7				M15				M30			
		S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
		%*	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
HIPERPLASIA EPITELIAL	G1	-	-	-	25	-	25	25	-	25	-	-	-
	G2	-	-	-	-	-	-	-	25	-	25	-	25
HIPERTROFIA EPITELIAL	G1	-	-	-	-	-	50	-	-	-	25	-	-
	G2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-
DEGENERAÇÃO EPITELIAL	G1	25	25	-	-	-	-	25	25	-	25	-	-
	G2		25		25	-	25	25	-	-	-	-	-
VASCULARIZAÇÃO CORNEAL	G1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2			25	25	-	25	25	25	-	25	75	-
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	G1	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2	-	50	25	-	-	-	25	50	-	25	25	25
FIBROPLASIA	G1	25	-	25	25	25	50	25	-	-	25	50	25
	G2	-	50	-	-	25	-	25	-	-	25	-	50
ESPESSAMENTO DO ESTROMA	G1	-	-	-	-	-	100	-	-	-	50	25	-
	G2	-	25	50	-	-	-	25	75	-	-	75	25

G1 = Grupo tratado com CTMMO-co. G2 = Grupo submetido a enxerto corneconjuntival.
M7 = avaliação aos 7 dias. M15 = avaliação aos 15 dias. M30 = avaliação aos 30 dias, * =
Escore de intensidade das lesões: 1-leve; 2-médio; 3-moderado e 4-severo. # = Percentual
de amostras que apresentaram lesão em cada intensidade.

326
327
328

329 Nos animais do G2, não houve rejeição dos enxertos corneconjuntivais, resultado
330 esperado, conforme a afirmação de GELATT (2003), quando do enxerto autólogo. Assim,
331 pode-se inferir que a angiogênese presente em todos os animais submetidos ao enxerto seja
332 consequência da manipulação cirúrgica e reação aos fios de sutura. Para ZHONG et al.
333 (2018), a angiogênese corneal, ocorre provavelmente, em decorrência da quebra do privilégio
334 imunológico, o que predispõe os enxertos à rejeição (NIEDERKORN & LARKIN, 2010).

335

336

337

338

339

340

341

342

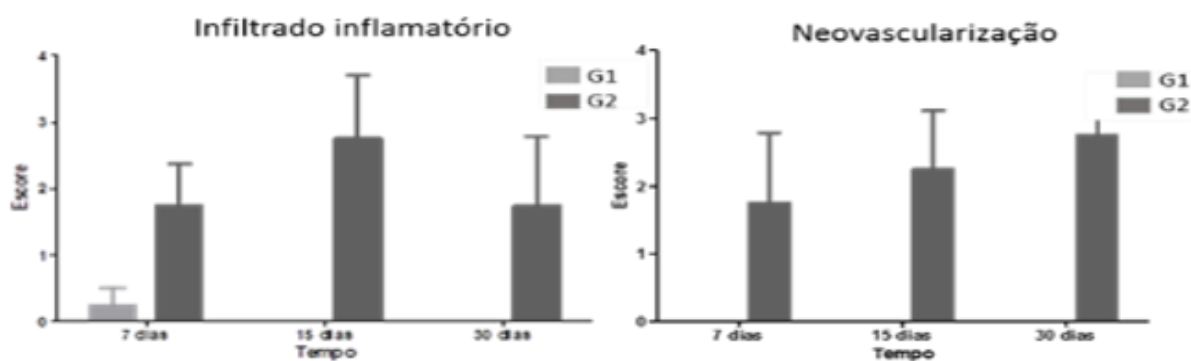


Figura 3. Alterações histopatológicas em córneas de coelhos submetidos a úlcera profunda tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos e pela técnica com enxerto corneconjuntival

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

Infiltrado inflamatório discreto foi observado nos animais do G1, comparado aos do G2 (Figura 2E, 2G e 2I), que apresentou infiltrado, predominantemente eosinofílico, com intensidade variando de média a intensa nos diferentes momentos de avaliação (Tabela 2). Este achado corrobora com a informação de DI et al. (2017) sobre a supressão da resposta inflamatória excessiva após transplante local de CTMs, promovendo uma melhora significativa no reparo corneal. Segundo OKADA et al. (2014), o dano tecidual produz resposta inflamatória local, promovendo o reparo tecidual. Quanto às lesões corneais, após a ruptura da barreira reparo na cicatrização, ocorre por mecanismos paralelos que envolvem o influxo de células inflamatórias, diferenciação de miofibroblastos, síntese de matriz extracelular e formação de cicatriz (BUKOWIECKI et al., 2017)

353

354

355

356

357

A avaliação clínica apresentou uma recuperação significativa nas córneas dos animais tratados com CTMMO-co em relação aos submetidos ao enxerto corneconjuntival. A ausência de vascularização, e a ocorrência discreta de infiltrado inflamatório, apenas nos primeiros dias, vistas na análise histopatológica, demonstraram a efetividade do uso dessas células no tratamento de úlceras corneais profundas.

358 CONCLUSÃO

359 Conclui-se que o tratamento de úlceras de córnea induzidas em coelhos com células-
360 tronco mesenquimais da medula óssea, via subconjuntival, é mais eficiente comparado à
361 técnica cirúrgica com enxerto corneconjuntival. Além disso, é menos invasivo e de fácil
362 execução, portanto, viável para a terapia de úlcera corneal.

363 COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

364 Os procedimentos com o uso dos animais (coelhos) foram aprovados pela Comissão
365 de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFPI, sob o parecer de número 216/16.

366 DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSES

367 Os autores declaram que não há conflitos de interesse que possam influenciar de forma
368 inadequada ou que possam influenciar nosso trabalho.

369 REFERÊNCIAS

- 370 ACOSTA, L.; CASTRO, M.; FERNANDEZA, M. et al. Treatment of corneal ulcers with
371 platelet rich plasma. **Archivos De La Sociedad Española De Oftalmología**. v.89, n.2, p.48-
372 52, 2014. Available from:< [http://www.elsevier.es/es-revista-archivos-sociedad-espanola-
373 oftalmologia-296-linkresolver-tratamiento-ulceras-corneales-con-plasma-
374 S0365669113003328](http://www.elsevier.es/es-revista-archivos-sociedad-espanola-oftalmologia-296-linkresolver-tratamiento-ulceras-corneales-con-plasma-S0365669113003328)>. Accessed: Ab. 23, 2018.
- 375 ANDRADE, A. L. GOMES, J. A. P.; LUVIZOTTO, M. C. R. et al. Aspectos clínicos e
376 morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com
377 deficiência induzida de células germinativas do limbo. **Arquivo Brasileiro de Medicina
378 Veterinária e Zootecnia**. v. 16, n.1, p.127-142, 2009. Available
379 from:<<http://fmvz.unesp.br/rvz-old/index.php/rvz/article/view/397>>. Accessed: Set. 10, 2018.

380 ARAÚJO, A. L.; GOMES, J. A. P. Corneal stem cells and tissue engineering: Current
381 advances and future perspectives. *World Stem Cells*. v.7, n.5, p.806-814, 2015. Available
382 from:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478627/>>. Accessed: Jan. 03, 2019.
383 doi: 10.4252/wjsc.v7.i5.806

384 BARBOSA, A.; BARROS, P. S. M.; GUERRA, J. L. et al. Ceratoplastia lamelar em cães
385 usando membrana amniótica equina. Estudo clínico e morfológico. **Brazilian Journal of**
386 **Veterinary Research and Animal Science**,v. 50, n. 3, p. 211-219, São Paulo, 2013.
387 Available from:<<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/64593>>. Accessed: Ago. 20,
388 2018. doi: 10.11606/issn.1678-4456.v50i3p211-219.

389 BARROS, S. V. S. G; ALDROVANI, M.; LACERDA, L. C. C. et al. Lamellar keratoplasty
390 in rabbits using an allogeneic free omental graft and omentum-derived mesenchymal cells
391 associated with the canine amniotic membrane. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.46, n.10,
392 p.1838-1845, 2016.<Available from: [http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n10/1678-4596-cr-](http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n10/1678-4596-cr-0103_8478cr20151348.pdf)
393 [0103_8478cr20151348.pdf](http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n10/1678-4596-cr-0103_8478cr20151348.pdf).> Accessed: Jan. 03, 2019. doi: 10.1590/0103-8478cr20151348.

394 BUKOWIECKI, A.; HOS, D.; CURSIEFEN, C. et al. Wound-Healing Studies in Cornea and
395 Skin: Parallels, Differences and Opportunities. **Int. J. Mol. Sci.** v.18, n.6, 2017. Available
396 from:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486079/>>. Accessed: Dez. 28, 2017.
397 doi: [10.3390 / ijms18061257](https://doi.org/10.3390/ijms18061257).

398 COSTA, C. R. M.; M. L. T. FEITOSA, M. L. T; BEZERRA, D. O. et al. Labeling of adipose-
399 derived stem cells with quantum dots provides stable and longtermfluorescent signal for ex
400 vivo cell tracking. **Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.** v.53, p.363–370, 2017. Available
401 from:<<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11626-016-0121-2.pdf>>. Accessed:
402 Set. 10, 2018.doi: 10.1007/s11626-016-0121-2.

403 DI, G.; DU, X.; QI, X. et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Diabetic Corneal Epithelial
404 Wound Healing Through TSG-6–Dependent Stem Cell Activation and Macrophage Switch.
405 **IOVS.** v. 58, N.10, p. 4344-4354, 2017. Avaliable
406 from:<<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2649078>>Accessed: Ago. 20, 2018.
407 doi: doi: 10.1167/iovs.17-21506

408 DONATTI, C.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T. et al. Uso do plasma rico em
409 plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e
410 histomorfométrica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.3,
411 p.809-818, 2013. Avaliable from:<<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/89143>>.
412 Accessed: Ago. 20, 2018. doi: 10.1590/S0102-09352013000300029.

413 ESLANI, M.; PUTRA, I.; SHEN, X. et al. Corneal Mesenchymal Stromal Cells Are Directly
414 Antiangiogenic via PEDF and sFLT-1. **Ivest Ophthalmol Vis Sci.** v.58, n.12, p.: 5507-5517,
415 2017. Avaliable from:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5661382/>>.
416 Accessed: Set. 11, 2018. doi: DOI:10.1167/iovs.17-22680.

417 GELATT, K. N. Doenças e Cirurgias da Córnea e Esclera do cão. **Manual de Oftalmologia**
418 **Veterinária.** Barueri: Manole, p. 125-164, 2003.

419 GHAZARYAN, E.; ZHANG, Y.; HE, Y. et al. Mesenchymal stem cells in corneal
420 neovascularization: Comparison of different application routes. **Mol. Med. Reports.** v. 14, p.
421 3104-3112, 2016. Avaliable
422 from:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5042785/pdf/mmr-14-04-3104.pdf>>.
423 Accessed: Set. 10, 2018. doi: [10.3892/mmr.2016.5621](https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5621).

424 GIACOMINI, C.; FERRARI, G.; BIGNAMI, F. et al. Alkali burn versus suture-induced
425 corneal neovascularization in C57BL/6 mice: An overview of two common animal models of
426 corneal neovascularization. **Exp Eye Res.** v.121, p.1-4, 2014. Avaliable from:<

427 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483514000426?via%3Dihub>>.

428 Accessed: Jan. 03, 2019. doi: 10.1016/j.exer.2014.02.005.

429 GODOY-ESTEVEZ, C. A. L.; Gomes, J. A. P.; Yazbek, K. et al. Lamellar keratoplasty in
430 rabbits using human and rabbit amniotic membrane grafts: a comparative study. **Veterinary**
431 **Ophthalmology**, v.18, p.191-197, 2015. Available from:<[https://onlinelibrary.wiley.com](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vop.12109)
432 [/doi/abs/10.1111/vop.12109](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vop.12109)>. Accessed: Ago. 20, 2018. doi: 10.1111/vop.12109.

433 GU, S; XING, C; HAN, J. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into
434 corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. **Mol Vis**, v. 15, p. 99-107, 2009. Available
435 from:<<http://www.molvis.org/molvis/v15/a10/mv-v15-a10-gu.pdf>>Accessed: Set. 15, 2018.

436 LAN, Y.; KODATI, S.; LEE, H. S. et al., Kinetics and Function of Mesenchymal Stem Cells
437 in Corneal Injury. **IOVS**. v.53, n.7, p.3638-44, 2012. Available form:<
438 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2127897>>. Accessed: Jul. 07, 2018. doi:
439 10.1167 / iovs.11-9311.

440 LI, F.; ZHAO S. Z. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and
441 transplantation. **World J Stem Cells**. v.6, n.3, p. 296-304, 2014. Available
442 from:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4131271/>>. Accessed: Set. 10, 2018.
443 doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.296.

444 LJUBIMOV, A. V.; SAGHIZADEH, M. Progress in corneal wound healing. **Progress in**
445 **Retinal and Eye Research**, v.49, p.17-45, 2015. Available from:<
446 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4651844/>>. Accessed: Jan. 03, 2019. doi:
447 [10.1016 / j.preteyeres.2015.07.002](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4651844/).

448 MONTEIRO, E. C. L.; SCHELLINI, S. A.; MARQUES, M. E. A. et al. Tratamento da úlcera
449 corneana experimental com membrana amniótica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v.
450 63, n.1, p. 33-37, 2000. Available from:<<http://www.scielo.br/pdf/abo/v63n1/13602.pdf>>.
451 Accessed: Ago. 20, 2018.

452 NETTO, M. V.; JUNIOR, R. A; CHALITA, M. R. et al. Resposta cicatricial corneana em
453 diferentes modalidades de cirurgia refrativa. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v,68,
454 n.1, p.140-9, 2005. Available from:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004274920050001000027&script=sci_abstract&tlng=pt>. Accessed: Ago. 20, 2018. doi: 10.1590/S0004-
455 [0100027](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004274920050001000027&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Accessed: Ago. 20, 2018. doi: 10.1590/S0004-
456 27492005000100027.

457 NIEDERKORN, J. Y.; LARKIN, D. F. P. Immune Privilege of Corneal Allografts. *Ocul*
458 *Immunol Inflamm.* v.8, n.3, p.162-171, 2010. Available from:<
459 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564633/>>. Accessed: Fev. 05, 2019.
460 doi: [10.3109/09273948.2010.486100](https://doi.org/10.3109/09273948.2010.486100).

461 NIKOLIĆ, L.; JOVANOVIĆ, V. Angiogenesis: A special reference to corneal
462 neovascularization. **Vojnosanit Pregl.** v.72, n.6, p.529–535, 2015. Available from:<
463 [https://pdfs.semanticscholar.org/65a6/1cc10d052be87d73bc9926314225d071726e.pdf?_ga=2.](https://pdfs.semanticscholar.org/65a6/1cc10d052be87d73bc9926314225d071726e.pdf?_ga=2.82533269.227370887.1549220969-645535412.1516158604)
464 [82533269.227370887.1549220969-645535412.1516158604](https://pdfs.semanticscholar.org/65a6/1cc10d052be87d73bc9926314225d071726e.pdf?_ga=2.82533269.227370887.1549220969-645535412.1516158604)>. Accessed: Set. 09, 2018. doi:
465 10.2298/VSP131207013N.

466 OH, J. Y; KIM, M. K; SHIN, M. S. et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of
467 mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. **Stem Cells.**
468 v.26, p.1047-1055, 2008. Available from:<
469 <https://stemcells.journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1634/stemcells.2007-0737>>
470 accessed: Set. 20. 2018. doi: [10.1634/stemcells.2007-0737](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0737).

471 OKADA, Y.; SHIRAI, K.; REINACH, P. S. et al. TRPA1 is required for TGF-β signaling and
472 its loss blocks inflammatory fibrosis in mouse corneal stroma. **Lab Invest.** v.94, n.9, p.1030–
473 1041, 2014. Available from:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5919187/> >.
474 Accessed: Set. 10, 2018. doi: [10.1038/labinvest.2014.85](https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.85)

475 PANKAJAKSHAN, D.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in
476 Vascular Repair and Regeneration. **J Biomed Technol Res.** n.1, v.1, 2014. Available

477 from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5589200/pdf/nihms898750.pdf>>.

478 Accessed: jan. 03, 2019. doi: 10.19104/jbtr.2014.107.

479 PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; DUARTE, T. S. et al. Membrana amniótica canina
480 utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos – Aspectos clínicos.
481 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.5, p.1069-1074, 2008.
482 Available from:<<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n5/05.pdf>>. Accessed: Set. 10, 2018.
483 doi: 10.1590/S0102-09352008000500005.

484 SILVA, M.A; LEITE, Y.K.C.; DE CARVALHO, C.E.S et al. Behavior and biocompatibility
485 of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells with bacterial cellulose membrane. *PerrJ*.
486 v.30, n. 6, p.4656. 2017. Available
487 from:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5933324/pdf/peerj-06-656.pdf>>.
488 Accessed: Set. 10, 2018. doi: 10.7717/peerj.4656.

489 WILSON, S. E. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: Generation, persistence,
490 and transparency **Experimental Eye Research**. v.99, n.1, p. 78-88, 2012. Available from:<
491 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367126/>>. Accessed: Jun. 02, 2018. doi:
492 10.1016 / j.exer.2012.03.018.

493 YAO, L.; LI, ZR.; SU, WR. Et al. Role of Mesenchymal Stem Cells on Cornea Wound
494 Healing Induced by Acute Alkali Burn. **PLoS ONE**. v.7, p.1-7, 2012. Available
495 from:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030842>>. Accessed:
496 Ago. 20, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0030842.

497 ZHONG, W.; MONTANA, M.; SANTOSA, S. M. Angiogenesis and lymphangiogenesis in
498 corneal transplantation-A review. **Survey of ophthalmology**. v.63, n.4, p.453-479, 2018.
499 Available form:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29287709>>. Accessed: Jan. 03,
500 2019. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.12.008.

CAPÍTULO II**

***Manuscrito elaborado conforme normas do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*

1 **Avaliação da angiogênese em úlcera de córnea profunda induzida em coelhos**
2 **tratados com células-tronco mesenquimais**

3 **Evaluation of angiogenesis in induced deep corneal ulcer in rabbits treated with**
4 **mesenchymal stem cells**

5
6 Marcus Valerius de Matos Freitas^{1*}, Maria Acelina Martins de Carvalho¹.

7 ¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, UFPI.

8 *Autor para correspondência: Rua Governador Tibério Nunes, 1000, Ilhotas, Teresina-
9 PI, 64014-050, Brasil.E-mail: mvmfreitas@yahoo.com.br

10 **Resumo:** Diversos fatores podem induzir à angiogênese com conseqüente diminuição da
11 transparência corneana, sendo o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) o
12 principal deles. Este estudo tem por objetivo avaliar a influência das células-tronco
13 mesenquimais (CTM) na angiogênese em úlcera de córnea profunda induzida,
14 comparando-a com o tratamento do enxerto corneconjuntival. Foram utilizadas 24
15 coelhas submetidas a dois tratamentos: terapia com CTM de medula óssea de coelho
16 (CTMMO-co) via subconjuntival em 12 coelhas (G1) e com a técnica cirúrgica enxerto
17 corneconjuntival nas outras 12 (G2). Os animais foram subdivididos em seis grupos de
18 quatro (G1-7, G1-15, G1-30, G2-7, G2-15 e G2-30) e ao final de 7, 15 e 30 dias após o
19 tratamento, foram eutanasiados e as córneas coletadas para avaliação histopatológica e
20 imunoistoquímica. A ausência de vascularização, e infiltrado inflamatório discreto, em
21 apenas um caso, no G1-7, diferiu estatisticamente do G2, onde essas alterações variaram
22 de médias a severas, com evidente vascularização e infiltrado inflamatório eosinofílico.
23 Na imunoistoquímica, houve diferença significativa entre os tratamentos na expressão
24 de VEGF, evidenciada até os 30 dias de avaliação. Conclui-se que a terapia com
25 CTMMO-co, foi superior ao tratamento com enxerto corneconjuntival no reparo
26 corneal, por inibir o processo inflamatório e angiogênese já aos sete dias após sua
27 aplicação.

28 **Palavras-chave:** Angiogênese, CTM, processo inflamatório, VEGF-A, coelho.

29 **Abstract:** Several factors may induce angiogenesis with consequent reduction of corneal
30 transparency, with vascular endothelial growth factor (VEGF) being the main factor.
31 This study aims to evaluate the influence of mesenchymal stem cells (MSC) on
32 angiogenesis in induced deep corneal ulcer, comparing it with corneconjunctival graft
33 treatment. Twenty-four rabbits were submitted to two treatments: Mesenchymal stem
34 cells from the bone marrow (BMSC) of rabbits applied by the subconjunctival route in
35 12 rabbits (G1) and corneconjunctival graft surgery in the other 12 (G2). The animals

36 were subdivided into six groups of four (G1-7, G1-15, G1-30, G2-7, G2-15 and G2-30)
37 and at the end of 7, 15 and 30 days after treatment, were euthanized and the corneas
38 collected for histopathological and immunohistochemical evaluation. The absence of
39 vascularization, and only one discrete inflammatory infiltrate in G1-7, differed
40 statistically from G2, where these alterations ranged from medium to severe, with
41 evident vascularization and eosinophilic inflammatory infiltrate. In
42 immunohistochemistry, there was a significant difference between treatments in VEGF
43 expression, evidenced up to 30 days of evaluation. It was concluded that BMSC therapy
44 was superior to corneconjunctival graft repair in corneal repair, since it inhibited the
45 inflammatory process and angiogenesis seven days after its application.

46 Keywords: Angiogenesis, MSC, inflammatory process, VEGF-A, rabbit.

47 **Introdução**

48 A córnea é um tecido avascular, constituído por epitélio não queratinizado com
49 transparência fundamental para perfeita percepção do estímulo visual que atinge a retina
50 (Hsu et al, 2015; Ahmad et al., 2010). Na córnea há difusão de glicose do humor aquoso
51 e do oxigênio através da lágrima (Hsu et al, 2015). Contudo, representa uma estrutura
52 vulnerável às lesões, tendo em vista que, funciona como barreira física entre o meio
53 interno e externo ocular (Delgado-Garcia et al., 2010). Assim, após lesão corneal uma
54 resposta de cicatrização de ferida inicia rapidamente, a fim de prevenir infecção e
55 reparar a visão (Slatter, 2005). Essas lesões podem decorrer de hipoxia, infecção,
56 inflamação e deficiência do limbo, transplante de córnea, ceratite infecciosa, produtos
57 químicos, lesões traumáticas, doenças auto-ímmunes, até o desgaste crônico de lentes de
58 contato, e podem induzir à angiogênese com conseqüente diminuição da transparência
59 corneana (Tshionyim Et al., 2012). A neovascularização corneal é resultado da
60 perturbação química, mecânica, degenerativa ou infecciosa de um delicado equilíbrio de
61 fatores pró e anti-angiogênicos no epitélio corneano (Rodrigues, 2015), os quais
62 promovem a migração e a proliferação das células endoteliais vasculares, formando

63 finalmente, um tubo capilar como parte do processo de cicatrização de feridas na córnea
64 (Lee e Chung, 2010).

65 O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é uma molécula-chave na
66 indução da angiogênese e vasculogênese, causando proliferação, brotamento, migração
67 e formação de tubo de células endoteliais (Ferrara et al., 2003). É o mais potente dos
68 fatores angiogênicos e apresenta expressão significativamente aumentada nas córneas
69 inflamadas e vascularizadas (Nikolić e Jovanović, 2015). Sendo a isoforma VEGF₁₆₅
70 presente no olho humano, apontada como responsável pela neovascularização
71 patogênica (Ishida et al., 2003). Além do VEGF, há envolvimento de outros fatores de
72 crescimentos na neovascularização corneal, dentre eles o TGF- β que desempenha papel
73 fundamental na formação da cicatriz no tecido da córnea; citocinas pro-inflamatórias
74 (IL-1 e IL-6) que são extremamente reguladas após o ferimento abrasivo da córnea;
75 ceratócitos estromais, células inflamatórias e glândulas lacrimais (Pontes et al., 2011).

76 Estudos com uso de CTM na terapia celular em humanos e animais são
77 frequentes, e pode ser uma alternativa terapêutica promissora para o processo de
78 reparação corneal, uma vez que as CTM possuem capacidade de diferenciação em
79 tecidos mesodermis e não mesodermis (Monteiro et al., 2010). As CTM têm sido
80 utilizadas em diversos estudos no âmbito da oftalmologia (Castanheira et al., 2008;
81 Agorogiannis et al., 2012; Yan et al., 2014; Ueno et al., 2014). Com base na necessidade
82 de avanços nas pesquisas, para elucidar o efeito das células-tronco em reparos corneais,
83 este estudo teve o objetivo de avaliar a influência das CTMMO-co na angiogênese em
84 úlcera de córnea profunda induzida em coelhos, comparando-a com o tratamento com
85 enxerto corneconjuntival.

86

87 **Material e métodos**

88 *Delineamento experimental*

89 Para este experimento, foram utilizadas 24 coelhas da raça Nova Zelândia,
90 híbridas, com 10 a 12 meses de idade, peso entre 2,5 a 3,5 kg, submetidas a dois
91 tratamentos realizados no NupCelt/CCA/UFPI. 12 animais receberam aplicação de
92 CTMMO-co, pela via subconjuntival na concentração de $1 \times 10^6 / 0,2 \text{ml}$ de Tampão
93 Fosfato Salino (PBS), foram divididos em três grupos, cada um, com quatro animais

94 (G1-7, G1-15, G1-30). Os 12 coelhos restantes foram submetidos à técnica cirúrgica de
95 enxerto corneoconjuntival e igualmente subdivididos em (G2-7, G2-15 e G2-30). Todos
96 os animais foram avaliados clinicamente por um período de 7, 15 e 30 dias. Ao final de
97 cada tempo de avaliação, foram submetidos à eutanásia, seguindo os tempos já
98 estabelecidos em outros estudos (Monteiro et al., 2000; Donatti et al., 2013), e após a
99 eutanásia, foram coletadas as córneas para as análises histopatológicas e
100 imunoistoquímicas.

101 Os procedimentos com o uso dos animais (coelhos) foram aprovados pela
102 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFPI, sob o parecer de número 216/16.

103 *Descongelamento e marcação das CTMMO-co*

104 As CTMMO-co utilizadas neste experimento, encontravam-se criopreservadas
105 em quarta passagem, no banco de células Laboratório de Cultivo de Células-Tronco
106 (LABCELT) do NUPCelt da UFPI, isoladas e caracterizadas em estudo prévio realizado
107 por Silva et al. (2017). Estas foram coletadas por punção do fêmur, seguida de
108 separação de células por gradiente de densidade com uso de Ficoll®, avaliação da
109 viabilidade e concentração celular, cultivo celular, ensaio de Unidade Formadora de
110 Colônia Fibroblástica (UFC-F), diferenciações em linhagens condrogênica,
111 osteogênica e adipogênica, caracterização por citometria de fluxo e criopreservação das
112 CTMMOs no banco de Células do NUPCelt.

113 As CTMMO-co criopreservadas foram descongeladas, realizado contagem e
114 avaliação de viabilidade e semeadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² na
115 densidade de 10⁶ células/mL com 3,0 mL de meio de cultivo MEM Alpha Medium+L-
116 glutamine suplementado, e mantidas em estufa incubadora (TECNAL TE-399®) à 37°C
117 em 5% de CO² e umidade de 95% com trocas de meio até a confluência mínima de
118 80%, quando eram novamente avaliada a viabilidade e concentração celular, para
119 marcação com nanocristais intracitoplasmáticos (Q-Tracker® 655 CellLabeling Kit),
120 realizada segundo protocolo descrito por Costa et al. (2017). O pellet foi ressuspensionado
121 em PBS na concentração de 10⁶ células/0,2 ml de PBS e transportado em seringa estéril
122 de 1 mL para aplicação subconjuntival nos animais dos grupos G1.

123 *Indução da úlcera de córnea e aplicação de CTMMO-co*

124 Os animais foram pré-anestesiados com Cloridrato de Xilazina (20mg/ml),
125 3mg/kg e Cloridrato de Tramadol (50mg/ml), 2mg/kg pela via intramuscular após

126 exame clínico e oftálmico. Decorridos 15 minutos foram anestesiados com maleato de
127 midazolam (5mg/ml), 1mg/kg, associado à cloridrato de quetamina (25mg/ml) na dose
128 de 35mg/kg, pela via intramuscular. Confirmado o plano anestésico os animais eram
129 posicionados em decúbito lateral direito, com a córnea paralela à superfície da mesa,
130 realizada antissepsia com iodopovidona a 10% da região periocular, proteção do campo
131 operatório com pano de campo fenestrado estéril e antissepsia com iodopovidona a 1%,
132 seguida de lavagem com solução fisiológica a 0,9% estéril da conjuntiva bulbar,
133 palpebral, e da córnea.

134 A fixação do globo ocular esquerdo de cada coelha foi realizada com uso de
135 blefarostato. As córneas eram anestesiadas com instilação de uma gota de solução
136 oftálmica à base de cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina a 0,1%
137 (Alergan). Após 2 minutos da anestesia tópica, com auxílio de microscópio cirúrgico
138 (DF Vasconcelos), em objetiva 16, foi posicionado o trépano na região central da córnea
139 e perpendicular à mesma. Na sequência foi realizada leve pressão seguida de
140 movimentos circulares até que a face cortante do trépano penetrasse na córnea,
141 atingindo o estroma profundo. Após este procedimento, com auxílio de pinça colibri,
142 bisturi crescente e tesoura de córnea, foi retirado o botão corneal e em cada coelha do
143 tratamento G1 foi aplicado 1×10^6 CTMMO diluídas em 0,2ml de PBS pela via
144 subconjuntival.

145 *Procedimento cirúrgico de enxerto corneconjuntival*

146 Após indução das úlceras de córnea profundas, nos dois tratamentos (G1 e G2),
147 os animais do grupo enxerto (G2), foram submetidos à cirurgia utilizando a técnica de
148 enxerto corneconjuntival conforme Gelatt (2003). Primeiramente transformou-se as
149 úlceras de formato circular para quadrado com auxílio de lâmina nº 10, com a finalidade
150 de receber, em seu leito, o enxerto constituído de córnea e conjuntiva. Em seguida
151 foram realizadas duas incisões divergentes que se estendeu da periferia da úlcera até o
152 limbo, e em seguida para a conjuntiva bulbar. Com uso de bisturi angulado crescente de
153 2,0 mm de diâmetro, a córnea foi dissecada até o limbo, e, em seguida para a
154 conjuntiva, de tal forma que o enxerto pudesse ser deslizado preenchendo todo o leito
155 da úlcera sem oferecer resistência. O enxerto, então, foi fixado à córnea com fio de
156 sutura oftálmico mononylon 9-0 com pontos separados simples.

157 *Tratamento pós-operatório*

158 A terapia pós-cirúrgica dos animais dos dois tratamentos consistiu em instilação
159 de uma gota de colírio antiinflamatório diclofenaco sódico (Still) 3 vezes ao dia, durante
160 5 dias, uma gota de antibiótico gatifloxacino (Zymar 0,3%) 4 vezes ao dia, no período
161 de 7 dias, terapia sistêmica com antiinflamatório não esteróide meloxicam (0,2%),
162 0,1mg/kg ao dia pela via subcutânea durante 3 dias; opióide cloridrato de tramadol (50
163 mg/ml), 3 mg/kg de 12 em 12 horas durante três dias pela via intramuscular; e
164 antibiótico enrofloxacin 10%, 5 mg/kg de 12 em 12 horas, durante 7 dias pela via
165 subcutânea. Todos os animais submetidos à cirurgia receberam colar elisabetano
166 durante a pesquisa.

167 *Eutanásia e coleta de córnea*

168 A eutanásia foi realizada segundo as Normas do Conselho Nacional de Controle
169 de Experimentação Animal – CONCEA. Após anestesia com a combinação de
170 cloridrato de quetamina (25 mg/ml), 50 mg/kg, cloridrato de xilazina 2%, 3 mg/kg e
171 midazolam (5 mg/ml), 2mg/kg, via intramuscular e confirmação do plano anestésico, os
172 animais receberam infusão intravenosa de cloreto de potássio 10%, 4ml/kg, confirmado
173 o óbito, foi realizada a enucleação do globo ocular, tratado e fixado em solução de
174 formol tamponada (pH 7,2) a 10% por 24 horas para processamento histológico.

175 *Análise histopatológica e rastreamento celular*

176 As córneas foram seccionadas ao meio, processadas por técnicas histológicas de
177 rotina e coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E). As lesões observadas no exame
178 histopatológico foram avaliadas de forma semi-quantitativa, mensurando-se a
179 intensidade das lesões no local da úlcera em escala de 0 a 4 onde: 0 = ausente, 1 = leve;
180 2 = média (leve); 3 = moderada; 4 = intensa.

181 Para o rastreamento das células-tronco, após processamento histológico, foram
182 preparadas lâminas com cortes de córneas dos animais tratados com CTMMO-co, as
183 quais foram desparafinadas e observadas em microscópio de fluorescência (modelo
184 BX41 OLYMPUS) para visualização das CTMMO-co.

185 *Análise imunohistoquímica*

186 Cortes de tecido corneal embebidos em parafina foram incluídos em lâminas
187 previamente silanizadas. Após 24 horas foram desparafinados em xilol, hidratados em
188 concentrações decrescentes de álcool etílico e seguiu-se as demais etapas intercaladas por

189 lavagens de PBS. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0 em
190 banho maria a 96° por 20 minutos e esfriamento por 20 minutos em temperatura
191 ambiente. O bloqueio de peroxidase endógena com Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) 3%
192 por 15 minutos, seguida de bloqueio com solução de 5% de soro caprino diluído em
193 solução de 1% de Albumina Bovina Sérica (BSA) e 0,5% de Tween; Incubação dos
194 cortes overnight a 4°C em atmosfera úmida com anticorpo primário monoclonal VEGF
195 JH121 (cat. MA5-13182, ThermoFisherScientific®) na diluição de 1:50; Incubação com
196 o anticorpo secundário GoatAnti-MouseIgg (H+L), HRP Conjugated - KPL (Cat. 074-
197 1806 SeroCare); Revelação com 3,3'-diaminobenzidina (Dako®), contra coloração com
198 hematoxilina de Harrys e montagens das lâminas para pesquisa de imunomarcação por
199 VEGF em microscopia de luz. Foi utilizado corte de retina como controle positivo e os
200 cortes de córnea com lesão suprimindo o anticorpo primário como controle negativo da
201 reação.

202 *Avaliação Estatística*

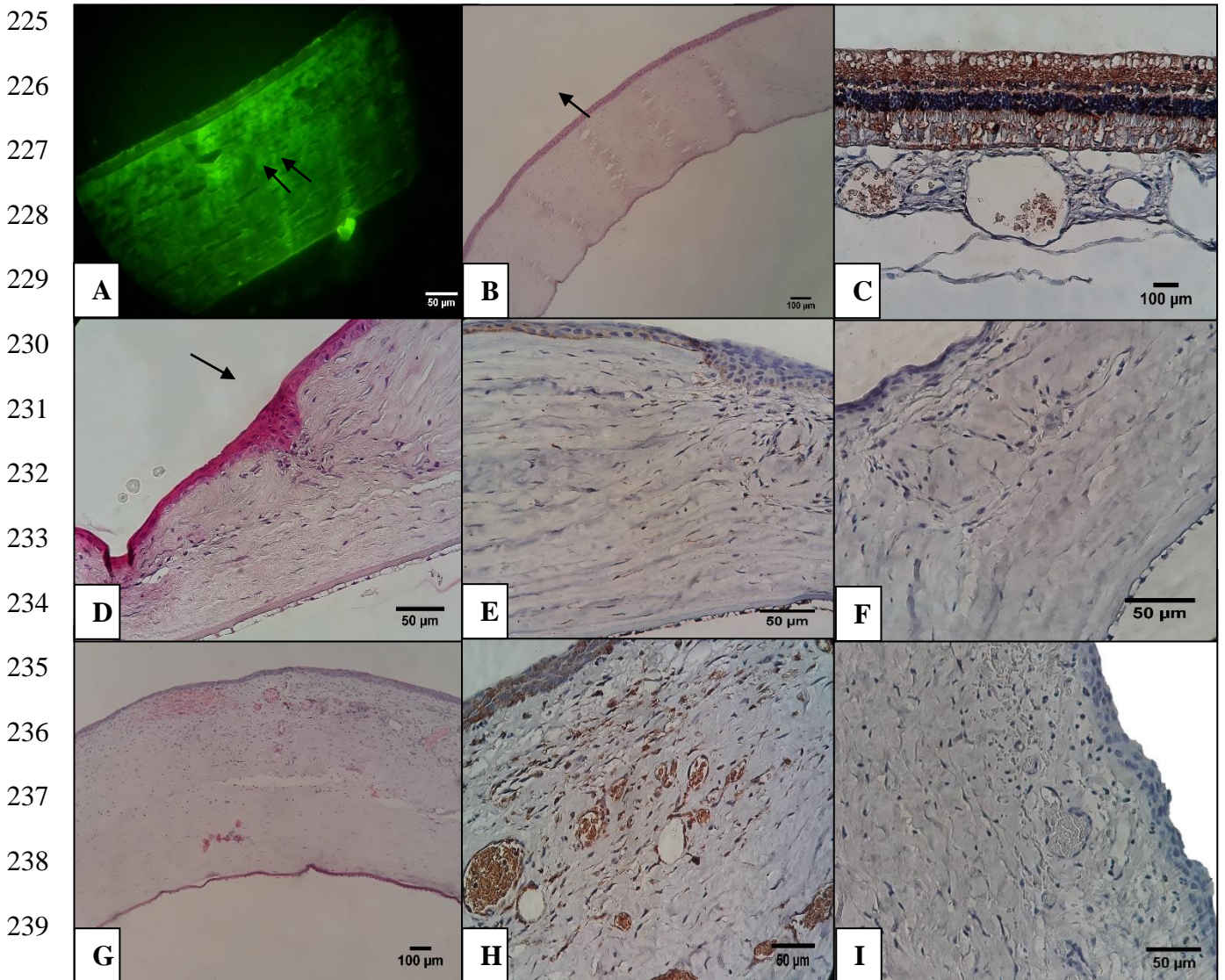
203 Para a análise dos dados histopatológicos e de imunoistoquímica entre os grupos
204 de tratamentos, os resultados foram analisados pelo teste ANOVA twoway, seguido de
205 Boferroni, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6 demo statistical software
206 (Califórnia, Estados Unidos). Foram consideradas diferenças significantes quando P
207 <0,05.

208 **Resultados e discussão**

209 A via de aplicação de CTMMO utilizada em nosso estudo, demonstrou ser
210 prática e rápida, a diluição das células em um volume de apenas 0,2 mL evitou perdas
211 por extravasamento e não foi observado lesão no tecido conjuntival bulbar, podendo
212 esta técnica ser facilmente realizada em ambiente adequado por profissional habilitado.
213 Esses resultados corroboram com Orbay et al. (2012), que sugere que os métodos de
214 administração de CTM devem ser melhores estudados, pela possibilidade remota de se
215 obter resultados clínicos satisfatórios após a administração sistêmica sem alvo
216 específico.

217 Na avaliação histopatológica foram observadas alterações comuns e com
218 intensidade variável em ambos os grupos, tais como hiperplasia e hipertrofia e discreta
219 degeneração do epitélio corneal, marcada fibroplasia (Figuras 1D e 2A, E, G e H) e

220 espessamento do estroma (Figuras 1D e 2C), comparadas a um corte de córnea sem
221 lesão (Fig. 1B), evidenciando apenas as camadas estruturais. No entanto, infiltrado
222 inflamatório e neovascularização, são as duas alterações discutidas nesse experimento,
223 por terem diferido significativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$) e por interferirem
224 substancialmente no reparo corneal.



240 Figura 1. Fotomicrografia de córneas de coelhas. G1-30: Córnea não corada. Células marcadas com
241 nanocristais intracitoplasmáticos fluorescentes (→), microscopia de fluorescência (A); Estrutura da córnea
242 normal. HE (B); Retina: Controle positivo para marcação de VEGF. IMH (C); G1-7: Fibroplasia e área focal
243 de hiperplasia epitelial (→).HE (D); Imunomarcação de VEGF na camada basal do epitélio.IMH (E) e
244 controle da reação, corte sem VEGF, ausência de marcação (F); G2-7: Infiltrado inflamatório difuso e
245 neovascularização no estroma. HE (G); Imunomarcação moderada de VEGF no epitélio e estroma corneal.
IMH (H) e ausência de marcação no corte controle da reação (I).

246 A rápida restauração da integridade da camada epitelial é imprescindível para
247 prevenir a inflamação da córnea, que pode causar perda permanente da visão ou até
248 mesmo a perda do próprio olho (Bukowiecki et al., 2017). Desta forma, após uma
249 injúria corneana, uma cascata de eventos mediada por citocinas e receptores,
250 quimiocinas, fatores de crescimentos, células epiteliais, estromais, derivadas da medula
251 óssea, lacrimal, nervos, e do sistema imunológico é desencadeada com a finalidade de
252 restaurar a homeostasia corneana, (Wilson et al., 2001; Torricelli et al., 2014).

253 Nesse processo complexo, participam uma diversidade de citocinas
254 inflamatórias, e tanto estas, quanto seus receptores estão presentes nas células, sendo
255 que quase sua totalidade é produzida por células inflamatórias tais como
256 polimorfonucleares, linfócitos, monócitos/macrófagos, basófilos/mastócitos e
257 eosinófilos (Pontes et al., 2011). Dentre elas os neutrófilos em condições inflamatórias
258 produzem VEGF, que contribui para a perpetuação do ciclo de angiogênese da córnea
259 (Saraiva et al., 2009).

260 Nossos resultados evidenciaram que infiltrado inflamatório discreto foi
261 observado em uma única amostra aos 7 dias, de um animal tratado com CTMMO,
262 enquanto dos grupos G2, 66,67% apresentam infiltrado inflamatório polimorfonuclear,
263 com predominância de eosinófilos (Fig. 1G e 2C), sendo que aos 30 dias, em 50% dos
264 animais ainda havia infiltrado de moderado à intenso. No processo de reparo corneal,
265 após as células inflamatórias terem retirado restos de tecido lesado e detritos, os
266 ceratócitos, que são células especializadas, ativados, começam a produzir colágeno de
267 reposição, e componentes da matriz extracelular (Wong et al., 2002; Plummer, 2017).
268 Sendo, observado neste estudo, demonstrando a precocidade de reparação da lesão nos
269 animais tratados com CTM, nos quais a fibroplasia era evidente, já desde a avaliação
270 aos sete dias (Fig. 1D), e sem processo inflamatório, que provavelmente regrediu aos
271 primeiros dias pós-tratamento. Contrário aos animais tratados com enxerto, nos quais
272 aos 30 dias, ainda havia processo inflamatório intenso (Fig. 2G).

273

274

275

276

277

278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308

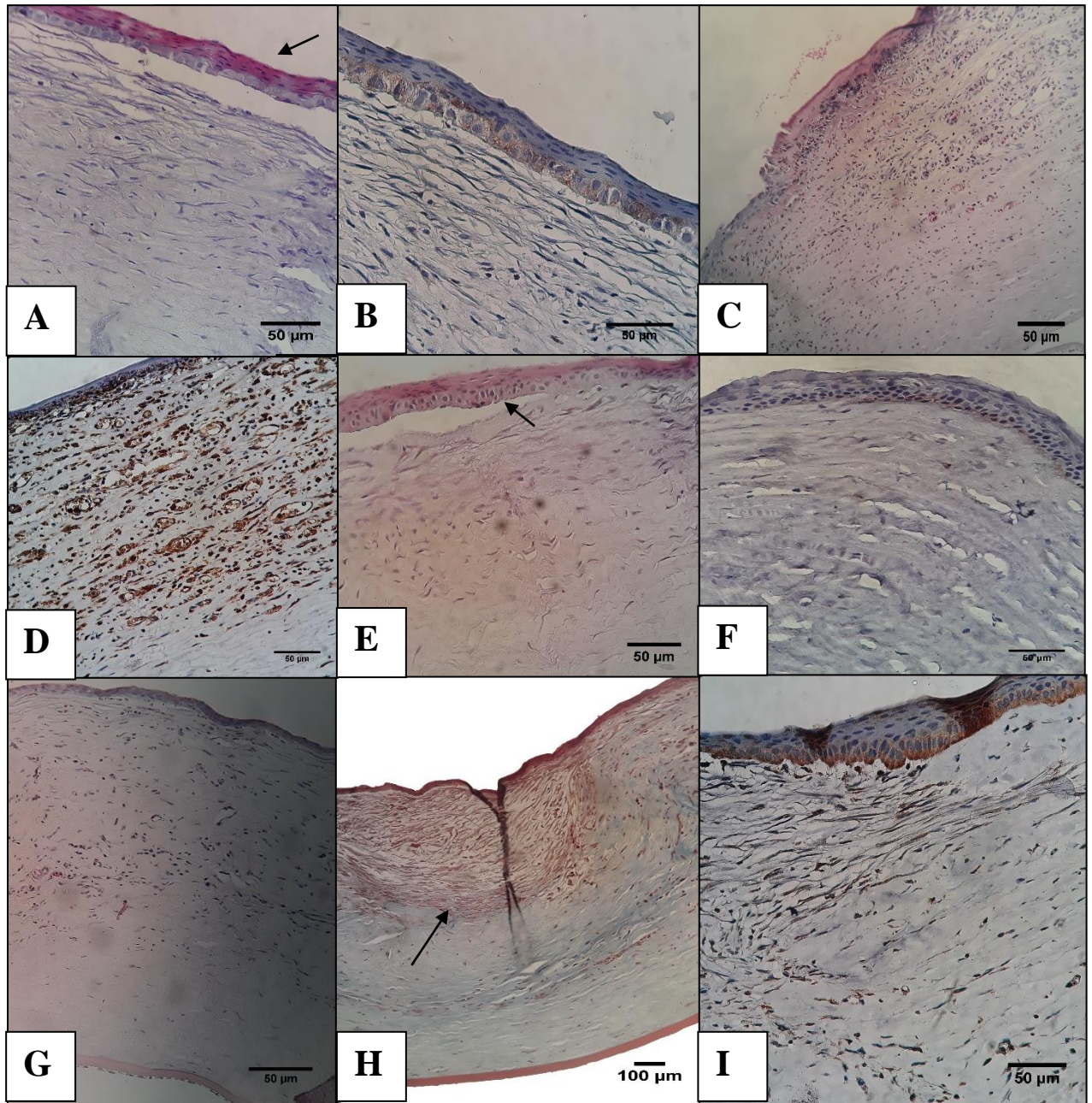


Figura 2. G1-15: Fibroplasia e degeneração da camada basal do epitélio (→) (A). e Imunomarcacão leve de VEGF na camada basal do epitélio. IMH (B); G2-15: Infiltrado inflamatório difuso intenso e neovascularização no estroma. HE (C) e imunomarcacão intensa de VEGF no epitélio e estroma corneal. IMH (D); G1-30; Fibroplasia estromal e hipertrofia da camada basal do epitélio. HE (→). (E), imunomarcacão leve de VEGF na camada basal do epitélio. IMH (F); G2-30: Neovascularização e infiltrado inflamatório difuso. HE (G), mesmo corte de G evidenciando a diferença de coloração na área de formação no novo colágeno (→). Tricômico de Massom (H) e imunomarcacão moderada de VEGF na camada basal do epitélio e no estroma. IMH (I).

309 A córnea é avascularizada, permitindo a entrada máxima de luz e,
310 conseqüentemente, estímulo visual. Esta condição avascular da córnea é conseguida
311 pela presença do privilégio angiogênico, sendo que qualquer alteração neste equilíbrio,
312 por lesões químicas, mecânicas, degenerativas ou infecciosas, podem levar ao
313 desenvolvimento de neovascularização da córnea, comprometendo o desempenho
314 óptico da mesma (Maddula et al., 2011). De fato, nossos resultados histopatológicos
315 comprovaram a formação de novos vasos no estroma corneal dos animais submetidos a
316 enxerto corneconjuntival, sendo moderada a intensa em 50% do G2-7 (Fig. 1G), média
317 a intensa em 75% do G2-15 (Figura 2C), e média a moderada em 100% do G2-30 (Fig.
318 2G). Neovascularização maciça em estroma superficial e profundo, com maior
319 prevalência neste, também foi evidenciada em botões de córneas com diversas
320 patologias (Tshinoyi et al., 2012), bem como em coelhos infectados experimentalmente
321 que desenvolveram lesões no estroma corneano caracterizadas por angiogênese,
322 inflamação e opacidade (Saraiva et al., 2009).

323 A maioria das doenças que ocorrem no epitélio, estroma e endotélio da córnea
324 são acompanhadas por inflamação e defeito de cicatrização (Oie e Nishida, 2013; OH
325 et al., 2014), culminando com desorganização da estrutura da matriz estromal corneana,
326 comum nas doenças e traumas da córnea, resultando em opacidades (Du et al., 2009;
327 Pascolini e Mariotti, 2012). Neste contexto, em grande parte dos casos de
328 vascularização corneana há necessidade de intervenção cirúrgica, e o transplante é uma
329 estratégia terapêutica comum, podendo ser de toda a córnea ou de certas partes, é um
330 método de tratamento comum em todo o mundo. Atinge até 95% de sucesso em córnea
331 avascular, no entanto, em córneas com leitos já neovascularizados, a taxa de sucesso
332 diminui para 50%. Depara-se ainda, com uma escassez de tecidos da córnea de doadores
333 na maioria dos países, tornando o transplante de córnea um método caro e difícil, além
334 da necessidade de imunossupressão (Ghazaryan et al., 2016).

335 Neste sentido, a técnica de enxerto corneconjuntival descarta a necessidade de
336 doadores e pode ser uma alternativa. No entanto, o fato de os animais que receberam
337 esse tratamento apresentarem neovascularização e infiltrado inflamatório aos 30 dias de
338 avaliação, impossibilita inferir o tempo necessário para reparo completo. Por outro lado,
339 a ausência de vascularização nos grupos tratados com CTM já a partir do sétimo dia de
340 avaliação demonstra a efetividade desse tratamento em úlceras de córnea, apesar de

341 também não poderemos inferir o tempo de reparo corneal, pois aos 30 dias na área da
342 lesão ainda foi observado desorganização estromal na nas áreas de fibroplasia, embora
343 sem infiltrado e neovascularização.

344 A recuperação precoce pela atuação das CTMMO-co, aplicadas, via
345 subconjuntival nos coelhos, pode ser confirmada pela diferença entre o processo
346 inflamatório e neovascularização nas córneas deste grupo, comparado as do grupo
347 enxerto. Neste contexto, segundo Krafts (2010), a capacidade regenerativa dos tecidos
348 não reside em suas células parenquimatosas, mas em células-tronco localizadas
349 profundamente dentro do tecido. Além disso, a participação de células-tronco do limbo
350 para cobrir a lesão corneal tem sido demonstrada nas úlceras superficiais, sem que haja
351 comprometimento da membrana basal, sendo que este processo pode durar de 4 a 7 dias,
352 e, geralmente, sem produzir opacidades significantes (Herrera, 2008; Torricell e Wilson,
353 2014). No entanto, considerando que neste experimento, foram realizadas úlceras
354 profundas, atingindo o estroma e mesmo assim houve reepitelização, resolução de
355 infiltrado e ausência de neovascularização nos animais tratados com CTMMO-co, estes
356 resultados nos levam a inferir que se devem a atuação das CTMMO-co aplicadas, pela
357 capacidade de regulação dessas células na resposta inflamatória e inibição de
358 angiogênese, tanto local quando possivelmente parácrina, tendo em vista que a
359 avaliação do rastreamento intracitoplasmático das CTMMO-co, aplicadas confirmou a
360 presença discreta destas no estroma local da lesão (Fig.1A) e em maior quantidade no
361 tecido conjuntival, provavelmente onde foram aplicadas as CTMMO-co.

362 Quantos a expressão de VEGF-A por imunistoquímica, um corte da região da
363 retina foi incluído (Fig.1C) como controle positivo de marcação por VEGF, por ser uma
364 área vascularizada. Os resultados exibiram expressão de VEGF tanto no epitélio quanto
365 no estroma (Fig. 3), com diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,01$). Sendo
366 que houve marcação discreta no estroma em apenas um animal tratado com CTM no
367 grupo G1-30. No entanto, todas as coelhas tratadas com enxerto, expressaram VEGF-A
368 no estroma, com intensidade variando de leve a intensa, como no G2-7 (Fig. 1H), com
369 50% das córneas com marcação de forma leve, 25% média e 25% de forma intensa. No
370 G2-15, 75 % apresentaram intensidade na marcação intensa (Fig.2D), e 25% intensidade
371 média, no G2-30, 75% apresentaram intensidade para marcação pelo VEGF-A de forma
372 média, e 25% moderada (Fig. 2I), com diferença significativa ($p<0,01$) entre os

373 tratamentos. Cortes onde foi suprimido o anticorpo VEGF, foram incluídos como
374 controles das reações de imunistoquímica (Figuras 1F e I).

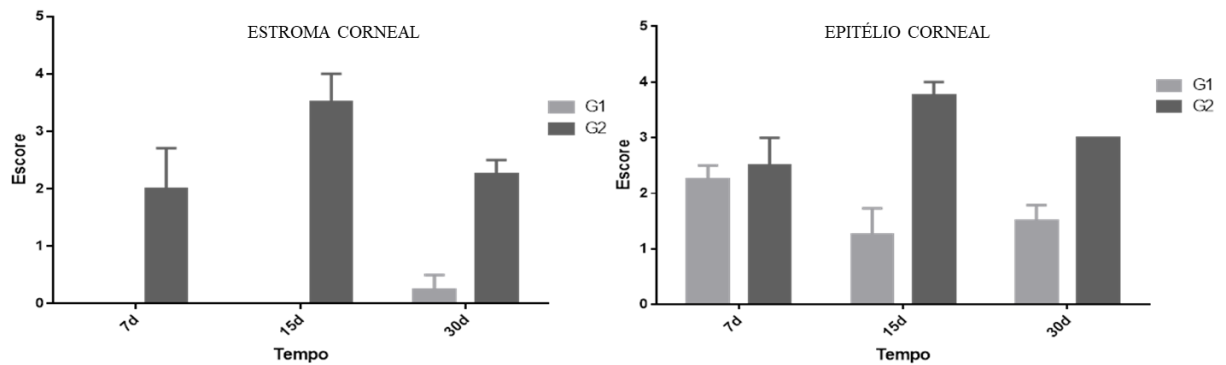


Figura 3. Imunomarcação de VEGF-A em estroma e epitélio corneal de coelhas submetidas a úlcera de córnea induzida profunda, tratadas com CTMMO e pela técnica de enxerto córneoconjuntival

375

376 Essa expressão discreta de VEGF-A nos animais tratados com CTMMO-co,
377 reflete uma precocidade na resposta de cicatrização não vascular (Slatter, 2005), Por
378 outro lado, a expressão acentuada nos animais do G2 denota lesão ainda não curada,
379 com presença de processo inflamatório e angiogênico ativos (Gan et al., 2004). Para
380 Cursiefen (2004), o recrutamento de células inflamatórias promovidas por VEGF-A
381 desempenha papel importante e aparentemente predominante na promoção da
382 neovascularização patológica. De fato, segundo Saraiva et al. (2009), o VEGF induz a
383 resposta de quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos através do receptor VEGF-R1, e
384 como descrito anteriormente, os neutrófilos em condições inflamatórias produzem
385 VEGF, que perpetua o ciclo de angiogênese da córnea.

386 Pesquisas revelaram que VEGF-A está presente em córneas normais ou feridas,
387 sendo que em córneas normais, este fator de crescimento encontra-se aprisionado ao
388 receptor solúvel sVEGFR-1, fator este produzido pelas células epiteliais da córnea, no
389 entanto, também é secretado por CTM em nível suficiente para inibir a angiogênese
390 (Ambati et al., 2006; Eslani et al., 2017). As CTMs expressam, ainda, positivamente a
391 trombospondina-1(TSP1), fator antiangiogênico, que promove a apoptose das células
392 endoteliais, e inibe a migração, proliferação, e formação de tubo no processo de
393 angiogênese (Armstrong et al., 2003) fato este, que provavelmente ocorreu nos animais
394 tratados com CTMMO-co deste estudo, haja visto, que mesmo expressando VEGF, não
395 desenvolveram angiogênese.

396 Quanto à presença de VEGF-A, no epitélio corneal, tanto os animais dos grupos
397 tratados com CTMMO-co, quanto os dos grupos tratados com enxerto, apresentaram
398 imunomarcção de VEGF-A na camada epitelial da córnea, sendo mais discreta nos
399 animais que receberam CTMMO-co, como visto no G1-7, com 75% das córneas
400 apresentando imunomarcção com intensidade média (Fig. 2E), no G1-15, 25%, com
401 forma leve, e 50% com forma média (Fig. 2B), e no G1-30, com 50% com intensidade
402 leve (Fig. 2F), e 50% média. Já nos grupos tratados com enxerto corneconjuntival, o
403 VEGF foi expresso de forma bem mais evidente em todas as amostras no epitélio
404 corneano, sendo 75% em intensidade moderada no G2-7 (Fig.1H), 75% com
405 imunomarcção intensa no G2-15 (Fig. 2D), e em intensidade moderada em 100% das
406 córneas no G2-30 (Fig. 2I). Esse aumento da intensidade de vascularização nas córneas
407 do G2 pode influenciar na qualidade óptica da córnea pela presença de opacidade
408 causada por células sanguíneas circulantes nos canais vasculares, alterações no
409 espaçamento do colágeno estromal entre os vasos sanguíneos, vazamento de fluido
410 causando edema e deposição de lipídios no tecido em torno dos vasos sanguíneos
411 permeáveis, (Azar, 2006).

412 Foi constatado, que ao contrário da atenuação da imunomarcção verificada nos
413 grupos tratados com CTMMO-co ao longo da pesquisa, nos grupos tratados com
414 enxerto houve exacerbação na intensidade da imunomarcção, corroborando com
415 pesquisa que apresentou maior expressão de VEGF-A na camada epitelial comparado
416 ao estroma (Gan et al., 2004), em trabalho com tratamento de lesão corneal com CTM,
417 onde se verificou expressão reduzida de VEGF, particularmente, naquele grupo com
418 injeção de células-troco pela via subconjuntival (Ghazaryan et al., 2016), e em pesquisa
419 com CTM ministrado por via tópica, em que verificou-se baixos níveis de expressão de
420 VEGF-A (Oh et al., 2008).

421 Em nossa pesquisa, embora tenhamos avaliado apenas um dos fatores que
422 influenciam o reparo corneal, os resultados comparativos entre os tratamentos nos
423 levam a inferir que a atuação das CTMMO-co é realmente por imunomodulação,
424 permitindo um equilíbrio entre os fatores, de modo a inibir a formação de novos vasos
425 da córnea. Tendo em vista que, em outros tipos de lesões, como na isquemia renal, a
426 atuação de células tronco mesenquimais é entre outros fatores, por reduzir o processo de
427 inflamação e promover o suprimento vascular (Franquesa et al., 2013; Souidi et al.,

428 2013), enquanto na córnea, nossos resultados sugerem que as CTMMO-co atuaram
429 contrariamente, inibindo a expressão de VEGF-A e consequentemente a angiogênese,
430 condição necessária para preservar a transparência das córnea.

431 **Conclusão**

432 Conclui-se que, a terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea
433 promoveu reparação precoce e satisfatória da córnea, uma vez que, não foi observado
434 processo inflamatório aos 15 dias e vascularização a partir do sétimo dia pós-
435 tratamento. Ainda, pela evidente diferença na expressão de VEGF-A neste grupo,
436 quando comparado aos animais submetidos a enxerto corneconjuntival, sugerindo
437 papel imunomodulador das CTM no reparo corneal por inibir a angiogênese.

438

439 **Referências**

440

441 AGOROGIANNIS, G. I.; ALEXAKI, V.; CASTANA, O. C. et al. Topical application
442 of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile
443 corneal epithelial defect. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. v.250, p.455–457, 2012.

444

445 AHMAD, S.; KOLLI, S.; LAKO, M. et al. Stem cell therapies for ocular surface
446 disease. *Drug Discovery Today*. v. 15, N. 7-8, p. 306-313, 2010.

447

448 AMBATI, B. K.; NOZAKI, M.; SINGH, N. et al., Corneal avascularity is due to soluble
449 VEGF receptor-1. *Nature*. v.443, n.7114, p.993–997, 2006.

450

451 ARMSTRONG, L. C.; BORNSTEIN, P. Thrombospondin 1 and 2 function as
452 inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*. v. 22, p. 63–67, 2003.

453

454 AZAR, D. T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in
455 corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. *Trans Am Ophthalmol Soc*.
456 v.104, p.264-302, 2006.

457

458 BUKOWIECKI, A.; HOS, D.; CURSIEFEN, C. et al. Wound-Healing Studies in
459 Cornea and Skin: Parallels, Differences and Opportunities. *Int. J. Mol. Sci*. v.18, 2017.

460

461 CASTANHEIRA, P.; TORQUETTI, L.; NEHEMY, M. B. et al. Retinal incorporation
462 and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina
463 of rats. *Arq Bras Oftalmol*. v. 71, n.5, p. 644-650, 2008.

464

465 COSTA, C. R. M.; M. L. T. FEITOSA, M. L. T; BEZERRA, D. O. et al. Labeling of
466 adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent
467 signal for ex vivo cell tracking. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim*. v.53, p.363–370, 2017.

468
469 CURSIEFEN, C.; CHEN, L.; BORGES, L. P.; et al. VEGF-A stimulates
470 lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via
471 macrophage recruitment.
472 *J Clin Invest.* v.113, n.7, p.1040-1050, 2004.
473
474 DELGADO-GARCIA, L. M.; LINARES-VILLALBA, S.; LAUS, J. L. Defecto
475 espontáneo crónico del epitelio corneal en caninos: patofisiología y terapêutica. *Vet.*
476 *Zootec.* v. 4, n. 1, p.63-82, 2010.
477
478 DONATTI, C.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T. et al. Uso do plasma rico em
479 plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação
480 clínica e histomorfométrica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo*, v.65, n.3, p.809-818, 2013.
481
482 DU, Y.; CARLSON, E. C.; FUNDERBURGH, M. L. et al. Stem Cell Therapy Restores
483 Transparency to Defective Murine Corneas. *Stem Cells.* v. 27, p. 1635–1642, 2009.
484
485 ESLANI, N.; PUTRA. I.; SHEN, X. et al. Corneal Mesenchymal Stromal Cells are
486 Directly Antiangiogenic via PEDF and sFLT-1. *IOVS.* V. 58, n. 12, p. 5507-5517, 2017.
487
488 FERRARA, N.; GERBER, H.; LECOUTER, J. The biology of gefand its receptors.
489 *Natmed.* v.9, n.6, p.669-676, 2003.
490
491 FRANQUESA, M. et al. Kidney regeneration and repair after transplantation. *Curr*
492 *Opin Organ Transplant.* , v. 18, n. 2, p. 191-196, 2013.
493
494 GAN, L.; FAGERHOLM, P.; PALMBLAD, J. Vascular endothelialgrowthfactor
495 (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in
496 theregulationofcornealneovascularizationandwoundhealing. *Acta Ophthalmol.Scand.*
497 v.82, p.557–563, 2004.
498
499 GELATT, K. N. Doenças e Cirurgias da Córnea e Esclera do cão. *Manual de*
500 *Oftalmologia Veterinária.* Barueri: Manole, p. 125-164, 2003.
501
502 GHAZARYAN, E.; ZHANG, Y.; HE, Y. et al. Mesenchymal stem cells in corneal
503 neovascularization: Comparison of different application routes. *Mol. Med. Reports.* v.
504 14, p. 3104-3112, 2016.
505
506 HERRERA, D. H. *Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia.* 1ª Ed. São Paulo:
507 MedVet Livros, p. 111-140, 2008.
508
509 HSU, C.; CHANG, H.; LIN, T. et al. Corneal neovascularization and contemporary
510 antiangiogenic therapeutics: Review Article. *J. Chin Med. Assoc.* V.78, P. 323-330,
511 2015.
512 ISHIDA, S.; USUI, T.; YAMASHIRO, K. et al. VEGF164- mediated inflammation is
513 required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal
514 neovascularization. *J Exp Med.* v. 198, n. 3, p.483-489, 2003.
515

516 KRAFTS, P. K. Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis*. v. 6, n.4, p.225-233,
517 2010.

518

519 LEE, H.S.; CHUNG S. K. The effect of subconjunctival suramin on corneal
520 neovascularization in rabbits. *Cornea*. v. 29, p. 86-92, 2010.

521

522 MADDULA, S.; DAVIS, D. K.; MADDULA, S. et al. Horizons in Therapy for Corneal
523 Angiogenesis. *Ophthalmology*. V. 118, N. 3, P. 591–599, 2011.

524

525 MONTEIRO, E. C. L.; SCHELLINI, S. A.; MARQUES, M. E. A. et al. Tratamento da
526 úlcera corneana experimental com membrana amniótica. *Arq. Bras. Oftalm.* v. 63, n.1,
527 p. 33-37, 2000.

528

529 MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco
530 Mesenquimais. *Ciência Rural*. v. 40, n.1, p. 238-245, 2010.

531

532 NIKOLIĆ, L.; JOVANOVIĆ, V. Angiogenesis: A special reference to corneal
533 neovascularization. *Vojnosanit Pregl*. v. 72, n. 6, p. 529–535, 2015.

534

535 OH, J. Y.; MEE KUM KIM, M. K.; SHIN, M. I. et al. The Anti-Inflammatory and Anti-
536 Angiogenic Role of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Wound Healing Following
537 Chemical Injury. *Stem Cells*, v.26, p.1047–1055, 2008.

538

539 OH, J. Y.; KO, J. H.; KIM, M. K. WEE, W.R. Effects of Mesenchymal Stem/Stromal
540 Cells on Cultures of Corneal Epithelial Progenitor Cells With Ethanol Injury. *IOVS*.
541 v.55, n.11, p.7628-7635, 2014.

542

543 OIE, Y.; NISHIDA, K. Regenerative Medicine for the Cornea. *BioMed Res. Int*. v.15, p.
544 1-8, 2013.

545

546 ORBAY, H.; TOBITA, M.; MIZUNO, H. Mesenchymal Stem Cells Isolated from
547 Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem*
548 *Cells Int*. Volume 2012.

549

550 PASCOLINI, D.; MARIOTTI, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J*
551 *Ophthalmol*. v.96, p.614-618, 2012.

552

553 PLUMMER, C. E. Corneal Response to Injury and Infection in the Horse. *Vet Clin*
554 *Equine*, v.33, p.439–463, 2017.

555

556 PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B. et al. Processo de
557 reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. *Ci Rural*, Santa
558 Maria, v.41, n.12, p.2120-2127, dez, 2011.

559

560 RODRIGUES, M. C. G. **Neovascularização da Córnea – Perda de um privilégio.**
561 2015,40p.Dissertação de Mestrado em Medicina(Mestrado em oftalmologia)-Faculdade
562 de Medicina da Universidade do Porto.

563

564 SARAVIA, M.; ZAPATA, G.; FERRAILOLO, P. et al. Anti-VEGF monoclonal
565 antibody-induced regression of corneal neovascularization and inflammation in a rabbit
566 model of herpetic stromal keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* v. 247p. 1409–
567 1416, 2009.

568
569 SILVA, M.A; LEITE, Y.K.C.; DE CARVALHO, C.E.S et al. Behavior and
570 biocompatibility of rabbit boné marrow mesenchymal stem cells with bacterialcellulose
571 membrane. *PerrJ.* v.30, n. 6, p.4656. 2017

572
573 SLATTER, D. Córnea e esclera. In: *Fundamentos de oftalmologia veterinária.* São
574 Paulo: Roca, 2005. Cap.11, p.283-338.

575
576 SOUIDI, N.; STOLK, M.; SEIFERT, M. Ischemia–reperfusion injury: beneficial effects
577 of mesenchymal stromal cells. *Current opinion in organ transplantation,* v. 18, n. 1, p.
578 34-43, 2013.

579
580 TORRICELLI, A. A. M.; WILSON, S. E. Cellular and extracellular matrix modulation
581 of corneal stromal opacity: Review. *Experimental Eye Research.* v. 129, p. 151-160,
582 2014.

583
584 TSHIONYI, M.; SHAY, E.; ELISA LUNDE, E. et al. Hemangiogenesis and
585 Lymphangiogenesis in Corneal Pathology. *Cornea.* v.31, n.1, p. 74-80, 2012.

586
587 UENO, H.; HATTORI, T.; KUMAGAI, Y. et al. Alterations in the corneal nerve and
588 stem/progenitor cells in diabetes: preventive effects of insulin-like growth factor-1
589 treatment. *International Journal of Endocrinology.* v. 2014, p. 1-8, 2014.

590
591 WILSON, S. E.; MOHAN, R. R.; MOHAN, R. R. et al. The Corneal Wound Healing
592 Response: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory
593 Cells. *Progress in Retinal and Eye Research.* v. 20, n. 5, p. 625-637, 2001.

594
595 WONG, T. T. L.; MRCOPHTH; SETHI, C. et al. Matrix Metalloproteinases in Disease
596 and Repair Processes in the Anterior Segment. *Survey of Ophthalmology,* v. 47 n.3,
597 p.239-56, 2002.

598
599 YAN, L.; JIANG, D.; HE, J. et al., Limbal Stem Cells and Corneal Epithelial
600 Regeneration: Current Status and Prospectives. *J. Ocular Biol.* v.2, p.1-10, 2014.
601
602

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa demonstrou que o tratamento com células-tronco mesenquimais aplicadas via subconjuntival pode ser instituído em úlcera de córnea profunda em coelhos e mostrou-se mais eficaz que a técnica enxerto corneconjuntival no que se refere à aplicabilidade e rapidez de execução, podendo ser realizado em ambiente ambulatorial, por profissional devidamente treinado. Além de ter evidenciado melhora nos sinais clínicos, precocidade do reparo corneal observado na avaliação histopatológica e imunoistoquímica. No entanto, faz necessários estudos mais detalhados que possam incluir um maior número de amostras, estender os tempos de avaliação até completa reparação corneal e avaliar outros fatores de crescimento que auxiliam a elucidar o papel imunomodulador das CTMs na reparação de lesão corneal.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, L.; CASTRO, M.; FERNANDEZA, M. et al. Treatment of corneal ulcers with platelet rich plasma. **Archivos De La Sociedad Española De Oftalmología**. v.89, n.p.48-52, 2014.
- AGOROGIANNIS, G. I.; ALEXAKI, V.; CASTANA, O. C. et al. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v.250, p.455–457, 2012.
- AHMAD, S.; KOLLI, S.; LAKO, M. et al. Stem cell therapies for ocular surface disease. **Drug Discovery today**. v. 15, ed. 7-8, p. 306-313, 2010.
- ANDREGHETTI, E. **Alteracoes clinicas e morfologicas das córneas de coelhos implantadas com aneis intraestromais de FERRARAR com e sem revestimento de condroitin sulfato**. 2008. Mestardo em Medicina(Mestrado em Cirurgia). Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.
- ANDRESEN, J. L.; EHLERS, H. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. **Curr. Eye Res**. v.17, p.79–87, 1998.
- ARMSTRONG, L. C.; BORNSTEIN, P. Thrombospondin 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. **Matrix Biol**. v. 22, p. 63–67, 2003.

BARBOSA, F. L.; CHAURASIA, S. S.; KAUR, H. et al. Stromal interleukin-1 expression in the cornea after haze-associated injury. **Experimental Eye Research**. v.91, p. 456-461, 2010.

BRUNELLI, A.T.J.; VICENTE, F.A.M. ; F. CHAHUD, F. et al. Sclerocorneal limbal stem cell autograft transplantation in dogs. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec**. v.59, n.5, p. 1194-1204, 2007.

BYDŁOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v.31, p. 25-35, 2009.

CAPLAN, A.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends in Molecular Medicine**, vol.7, n.6, p.259-264, June, 2001.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**. v.9, n.6, p.653-660, 2003.

CASTANHEIRA, P.; TORQUETTI, L.; NEHEMY, M. B. et al. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. **Arq Bras Oftalmol**. v. 71, n.5, p. 644-650, 2008.

CHACKO, S. M.; KHAN, M. K.; KUPPUSAMY, M. L. et al. Myocardial oxygenation and functional recovery in infarct rat hearts transplanted with mesenchymal stem cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 296,p. 1263–1273, 2009.

DAMICO, F. M. Angiogênese e doenças da retina. **Arq Bras Oftalmol**. v.70, N.3, P.547-553, 2007.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M. Células-Tronco E Fatores De Crescimento Na Reparação Tecidual. **Ciênc. vet. tróp**. v. 11, suplemento 1, p.167-169, 2008.

DELMONTE, D. R.; KIM, T. Anatomy and physiology of the córnea. **J Cataract Refract Surg**. V. 37, P. 588–598, 2011.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v. 8, p. 315-317, 2006.

DORBANDT, D. M.; MOORE, P. A. M; MYRNA, K. E. Outcome of conjunctival flap repair for corneal defects with and without an acellular submucosa implant in 73 canine eyes. **Veterinary Ophthalmology**. v.18, n. 2, p. 116–122, 2015.

DULAURENT, T.; AZOULAY, T.; GOULLE, F. et al. Use of bovine pericardium (Tutopatch_) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. **Veterinary Ophthalmology**. v.17, n. 2, p. 91–99, 2014.

EBIBARA, N.; MATSUDA, A.; NAKAMURA, S. et al. Role of the IL-6 Classic- and Trans-Signaling Pathways in Corneal Sterile Inflammation and Wound Healing. **IOVS**. v. 52, n. 12, p. 8549-8557, 2011.

EDELHAUSER, H. F. The Balance between Corneal Transparency and Edema: The Proctor Lecture. **IOVS**. v. 47, n. 5, p. 1755-1767, 2006.

EURIDES, D.; MANTOVANI, M. M.; MENEZES, G. F. et al. Efeito do concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos. **RPCV**. v.105, p. 39-43, 2010.

EURIDES, D.; BUSNARDO, C. A.; MOTA, F. C. D. Recobrimento Conjuntival e Palpebral. In: **Mnaual de Cirurgia Oftálmica Veterinária**. 1ª Ed. Curitiba: Medvep. 2013, Cap 6,p. 90-101.

FAITA, T.; SILVA, V. N; SATTIN, W.R. et al. Membrana amniótica: fonte alternativa de células-tronco mesenquimais em diversas espécies animais. **Pesq. Vet. Bras**. V.36, n.6, p.520-525, 2016.

FERRARA, N.; GERBER, H; LECOUTER, JENNIFER. The Biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**. v. 9, n.3, p. 669-676, 2003.

FERREIRA, G. T. N. M.; SOUZA, T. F. B.; SAKAMOTO, S. S. Aspectos clínicos do enxerto conjuntival 360° e do implante da membrana amniótica criopreservada no tratamento de úlceras de córnea em cães. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 34, n. 3, p. 1239-1252, maio/jun. 2013.

FORTIER, L. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. **Veterinary Surgery**. v.34, p. 415–423, 2005.

GAN, L.; FAGERHOLMI, P.; PALMBLAD, J. Vascular endothelial growthfactor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. **Acta Ophthalmol. Scand**. V.82,P. 557–563, 2004.

GELATT, K. N. Doenças e Cirurgias da Córnea e Esclera do cão. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. Barueri: Manole, p. 125-164, 2003. .

HERRERA, D. H. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**. 1ª Ed. São Paulo: MedVet Livros, p. 111-140, 2008.

HONGO, M.; ITOI, M.; YAMAGUCHP, N.; IMANISHI, J. Distribution of Epidermal Growth Factor (EGF) Receptors in Rabbit Corneal Epithelial Cells, Keratocytes and Endothelial Cells, and the Changes Induced by Transforming Growth Factor-β1. **Exp. Eye Res**. v.54, p.9-16, 1992.

HOS, D.; BUCHER, F.; REGENFUSS, B. et al. IL-10 Indirectly Regulates Corneal Lymphangiogenesis and Resolution of Inflammation via Macrophages. **The American Journal of Pathology**. v. 186, n.1, p. 159-171, 2016.

HÜNNING, P. S.; RIGON, G. M.; BEHEREGARAY, W. K. et al. Reparação de perfuração ocular em um cão usando pericárdio homólogo preservado em glicerina. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n.2, p. 195-199, 2009.

ION, L.; IONASCU, I.; BIRTOIU, A. Melting keratitis in dogs and cats. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. v. 6, p. 342-349, 2015.

JAKSZ, M.; BUSSE, C. Treating corneal ulceration in dogs part 1: superficial ulcers. **Vet Times**. 2017.

JAKSZ, M.; BUSSE, C. Treating corneal ulceration in dogs part 2: deep ulcers. **Vet Times**. 2017.

JEKL, V.; HAUPTMAN, K.; KNOTEK, Z. Oculscopy in Rabbits and Rodents. **Vet Clin Exot Anim**. P.1-13, 2015.

JIANG, T.S.; CAI L.; JI W.Y. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. **Mol. Vis**. v.16, p.1304–1316, 2010.

JIANG, Z.; LIU, G.; MENG, F. et al., Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. **Br J Ophthalmol**.v.101, p.1583–1590, 2017.

KAUR, H.; CHAURASIA, S. S.; AGRAWAL, A. et al. Corneal myofibroblast viability: Opposing effects of IL-1 and TGF b1. **Experimental Eye Research**. v. 89, p.152–158, 2009a

KAUR, H.; CHAURASIA, S. S.; MEDEIROS, F. W. et al. Corneal stroma PDGF blockade and myofibroblast development. **Exp Eye Res**. v.88, n.5, p.960–965, 2009b

KIM, W.; MOHAN, R. R.; MOHAN, R. R.; WILSON, S. E. Effect of PDGF, IL-1a, and BMP2/4 on Corneal Fibroblast Chemotaxis: Expression of the Platelet- Derived Growth Factor System in the Cornea. **IOVS**. v.40, n. 7, p.1364-1372, 1999.

KIM, J. Y.; WON, H.; JEONG, S. A Retrospective Study of Ulcerative Keratitis in 32 Dogs. **Intern J Appl Res Vet Med**. v.7, n.1, p.27-31, 2009.

KIM, N.; CHO, S. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **korean j intern med**. v.28, p.387-402, 2013.

LAN, Y.; KODATI, S.; LEE, H. S. et al., Kinetics and Function of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Injury. **IOVS**. v.53, n.7, p.3638-44, 2012.

LI, H.; LI, B. PRP as a New Approach to Prevent Infection: Preparation and In vitro Antimicrobial Properties of PRP. **J. Vis. Exp**. V.74, P.1-7, 2013.

- LI, F.; ZHAO S. Z. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. **World J Stem Cells**. v.6, n.3, p. 296-304, 2014.
- LJUBIMOV, A. V.; SAGHIZADEH, M. Progress in corneal wound healing. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.49, p.17-45, 2015.
- LOTFY, A.; SALAMA, M.; ZAHRAN, F. et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Rat Bone Marrow and Adipose Tissue: A Comparative Study. **International Journal of Stem Cells**. v.7, n. 2, p. 135-142, 2014.
- MA, D. H; CHEN, HC. J.; JUI-YANG LAI, JY. Et al., Matrix Revolution: Molecular Mechanism for Inflammatory Corneal Neovascularization and Restoration of Corneal Avascularity by Epithelial Stem Cell Transplantation. **The Ocular Surface** . v. 7, n.3, p.128-144, 2009.
- MANDELL, D. C.; HOLT, E. Ophthalmic Emergencies. **Vet Clin Small Anim**. v.35, p.455–480, 2005.
- MARINO, G. K.; SANTHIAGO, M. R.; SANTHANAM, A. et al. Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits. **Experimental Eye Research**. v.161, p.101-105, 2017.
- MEAD, B. ; LOGAN, A. ; BERRY, M. et el. Intravitreally Transplanted Dental Pulp Stem Cells Promote Neuroprotection and Axon Regeneration of Retinal Ganglion Cells After Optic Nerve Injury. **IOVS**. v. 54, n. 12, p. 7544- 7556 , 2013.
- MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**. v. 119, p. 2204-2213, 2006.
- MILLER, W. W. Avaluation end Managemente of Corneal Ulcerations: a Systematic Approach. **Clinical Techniques in Small Animal Praticce**, v. 16, n.1, p.51-57, 2001.
- MÜLLER, L. J.; MARFURT, C. F.; KRUSE , F.; TERVO, T. M. T. Corneal nerves: structure, contents and function. **Experimental Eye Research**. v. 76, p. 521–542, 2003.
- NETTO, M. V. JUNIOR, R. A; CHALITA, M. R. et al. Resposta cicatricial corneana em diferentes modalidades de cirurgia refrativa. **Arq Bras Oftalmol**, v,68, n.1, p.140-9, 2005.
- NETTO, M. V. ; MOHANA, R. R.; SINHAA, S. et al., Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. **Exp Eye Res**. v.82, n.5, p.788–797, 2006
- OH, J. Y.; RODDY, G. W.; CHOI,H. et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. **PNAS**. v.107 n. 39, p. 16875–16880, 2010.
- OH, J. Y.; MEE KUM KIM, M. K.; SHIN, M. I. et al. The Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Role of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Wound Healing Following Chemical Injury. **Stem Cells**, v.26, p.1047–1055, 2008.

- OLLIVIER, F. J.; GILGER, B. C.; BARRIE, K. P. et al. Proteinases of the cornea and preocular tear film: INVITED REVIEW. **Veterinary Ophthalmology**. v.10, n.4, p.199–206, 2007.
- PACKER, R. M. A.; HENDRICKS, A.; BURN, C. C. Impact of Facial Conformation on Canine Health: Corneal Ulceration. **Plos One**. p. 1-16, 2015.
- PARK, S.; SEO, M.; KIM, H.; KANG, K. Isolation and Characterization of Canine Amniotic Membrane-Derived Multipotent Stem Cells. **Plos One**. v.7, n.9, p.1-9, 2012.
- PERCHES, C. S.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T. MATRIZ METALOPROTEINASES NA REPARAÇÃO CORNEAL. REVISÃO DE LITERATURA. **Vet. e Zootec**. v.19, n.4, p.480-489, 2012.
- PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**. V.13,1, P.7-14, 2008.
- PINTO FILHO, S.T.L.; TREICHEL, T. L. E.; JUNIOR, J. S. A. et al. Células-Tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. **Vet. e Zootecnia**. v. 20 (Edição Comemorativa) p. 49-59, 2013.
- PLUMMER, C. E. Corneal Response to Injury and Infection in the Horse. **Vet Clin Equine**, v.33, p.439–463, 2017.
- PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B. et al. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.41, n.12, p.2120-2127, dez, 2011
- PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B. et al. Preserved xenogenic amniotic membrane as a patch on the repair of superficial corneal ulcers in rabbits. **Rev. Ceres, Viçosa**, v.59, n.3, p. 313-320, mai/jun, 2012.
- PUMPHREY, S. A.; PIZZIRANI, S.; PIRIE, C. G. 360-degree conjunctival grafting for management of diffuse keratomalacia in a dog. **Veterinary Ophthalmology**. v.14, n.3, p.209–213, 2011.
- RAJASHEKHAR, G. Mesenchymal stem cells: new players in retinopathy therapy. **Frontiers in Endocrinology**. v. 5, p. 1-7, 2014.
- RODRIGUES, M. C. G. **Neovascularização da Córnea – Perda de um privilégio**. 2015, 40p. Dissertação de Mestrado em Medicina (Mestrado em oftalmologia)-Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- SAIKA, S.; OSAMU YAMANAKA, O.; OKADA, Y. Modulation of Smad signaling by non-TGFβ components in myofibroblast generation during wound healing in corneal stroma. **Experimental Eye Research**. V. 142, p.40-48, 2016.
- SCHUSTER, D. M.; MARTENS, T. P.; ITESCU, S. Células-Tronco Mesenquimais para Reparo Cardíaco **Rev. Bras. Cardiol. Invas**. v. 16, n.1, p. 95-101, 2008.

- WANG, S.; QU, X.; ZHAO, R. C. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **Journal of Hematology & Oncology**. v.5, n.19, p. 1-9, 2012.
- SILVA, A. P. S. M.; ASSIS, P. R.; VIANA, F. A. B. et al. Flap de terceira pálpebra para tratamento de úlcera de córnea colagenolítica difusa em cão: relato de caso. **Enciclopédia Biosfera**. v.11, n.22, p.1296-1305, 2015.
- SLATTER, D. Córnea e esclera. In: **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2005. Cap.11, p.283-338.
- SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol., Salvador**. v. 2, n. 2, p. 251-256, 2003.
- STADES, C.F. et al. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. 203p.
- TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular Research**. v.65, p.550– 563, 2005.
- TEIXEIRA, K. M. **Uso de plasma rico em plaquetas no tratamento de ulcerações corneanas superficiais em equinos**. 2014. 71p. Dissertação(Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária.
- TORRICELLI, A. A. M.; SINGH, V.; SANTHIAGO, M. R.; et al. The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci**. v.54,n.9, p. 6390-6400, 2013.
- TORRICELLI, A. A. M.; WILSON, S. E. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. **Experimental Eye Research**. v.129, p.151-160, 2014.
- VALINHOS, M. A. R.; RANZANI, J. J. T.; RODRIGUES, A. C. L.; BRANDÃO, C. V. S. Mensurações do bulbo ocular e cálculo do poder dióptrico de lentes intraoculares em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.64, n.1, p.58-62, 2012.
- VANORE, M.; CHAHORY, S.; PAYEN, G.; CLERC, B. Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**. v.10, n. 2, p. 93–99, 2007.
- WILLOUGHBY, C. E.; PONZIN, D.; FERRARI, S. et al. Anatomy and physiology of the human eye:effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**. v.38, p.2–11, 2010.
- WILSON, S. E.; MOHAN, R. R.; MOHAN, R. R. et al. The Corneal Wound Healing Response: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory Cells. **Progress in Retinal and Eye Research**. v. 20, n. 5, p. 625-637, 2001.

WONG, T. T. L.; MRCOPHTH; SETHI, C. et al. Matrix Metalloproteinases in Disease and Repair Processes in the Anterior Segment. **Survey of Ophthalmology**, v. 47 n.3, p.239-56, 2002.

WU, T. E.; CHEN, C. J.; HU, C.; CHENG, C. Three case reports: Easy-to-prepare autologous platelet-rich plasma in the treatment of refractory corneal ulcers. **Taiwan Journal of Ophthalmology xxx**. p.1-4, 2015.

XU, j.; WANG, D.; LIU, D. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome. **Blood**, v.120, n. 15, p. 3142-3151, 2012.

YAN, L.; JIANG, D.; HE, J. et al., Limbal Stem Cells and Corneal Epithelial Regeneration: Current Status and Prospectives. **J. Ocular Biol.** v.2, p.1-10, 2014.

YAO, L.; LI, ZR.; SU, WR. Role of Mesenchymal Stem Cells on Cornea Wound Healing Induced by Acute Alkali Burn. **Plos One**. v.7, p.1-7, 2012.

YE, J.; YAO, K.; KIM, J. C. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. **Eye**. v.20, p. 482–490, 2006.

ZHONG, W.; MONTANA, M.; SANTOSA, S. M. Angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal transplantation-A review. **Survey of ophthalmology**. v.63, n.4, p.453-479, 2018.