

ANA GREICE BORBA LEITE

**UTILIZAÇÃO DE MATRIZ CORNEAL SUÍNA DESCELULARIZADA EM
CERATOPLASTIAS**

**RECIFE
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

ANA GREICE BORBA LEITE

**UTILIZAÇÃO DE MATRIZ CORNEAL SUÍNA DESCELULARIZADA EM
CERATOPLASTIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

RECIFE

2015

Ficha catalográfica

L533u Leite, Ana Greice Borba
Utilização de matriz corneal suína descclularizada em
ceratoplastias / Ana Greice Borba Leite. – Recife, 2015.
36 f. : il.

Orientador: Fabrício Bezerra de Sá.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.
Inclui referências e anexo(s).

1. Córnea 2. Matrizes descclularizadas 3. Enxerto
corneano I. Sá, Fabrício Bezerra de, orientador II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

UTILIZAÇÃO DE MATRIZ CORNEAL SUÍNA DESCELULARIZADA EM
CERATOPLASTIAS

Dissertação elaborada por
ANA GREICE BORBA LEITE

Aprovada em 20/02/2015

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Moacir Bezerra de Andrade
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Dr^a. Mariana Gomes do Rêgo
PNPD/CAPES/PPGCV

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à amizade verdadeira, aos amigos de alma e coração, a todos aqueles que veem no próximo um irmão, que se doa sem querer nada em troca, que luta com todas as forças para defender e ajudar o outro. Dedico esses dois anos de pesquisa aos meus amigos queridos, do peito, da vida. Eu não seria nada sem a riqueza que trago comigo, vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos que ele realizou e realiza em minha vida;

À minha família por todo o amor concedido;

Aos amigos pela lealdade e amizade;

Ao professor Fabrício Bezerra de Sá pelos ensinamentos;

A todos que fazem parte do Laboratório de Oftalmologia Experimental (UFRPE);

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de estudo e pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“A paciência é amarga, mas seu fruto é doce”

Jean Jacques Rousseau

RESUMO

A córnea é considerada a porção refratária mais importante do olho devido sua curvatura e transparência. Entre as enfermidades que acometem essa estrutura se destacam as ulcerações corneais, que quando não são tratadas adequadamente podem levar a perda da visão. O tratamento das ulcerações corneais complicadas consiste na realização de enxertos e transplantes, procedimentos que, por apresentarem grandes demandas devido a seus resultados satisfatórios, encontram dificuldades na obtenção de doadores. A bioengenharia tem apresentado progressos significativos envolvendo técnicas que visam reconstruir parte ou a totalidade da espessura danificada da córnea com a utilização de biomateriais, como por exemplo, o uso de membrana amniótica descelularizada, conjuntiva descelularizada de suíno, mucosa oral autóloga e matriz corneal descelularizada suína. Estudos com córneas descelularizadas apresentaram resultados satisfatórios, efeitos estes que criaram novas possibilidades terapêuticas para o tratamento de lesões corneais que necessitem de enxertos. A descelularização de um tecido ou órgão consiste na remoção de células e de seus componentes sem alterar a matriz extracelular minimizando qualquer efeito adverso na composição e integridade da estrutura remanescente, entre os protocolos utilizados nesse processo têm-se a utilização de métodos químicos, biológicos, físicos ou uma associação destes. Para verificar a eficiência da descelularização são realizadas várias análises, entre elas a histológica, a histoquímica, a extração e quantificação do material genético. Avaliações microbiológicas também são realizadas para verificar a eficiência da esterilização durante o procedimento de preparação das matrizes corneais descelularizadas, assim como seu armazenamento em meio conservante por um determinado período. As matrizes podem ser armazenadas utilizando vários meios conservantes como o Eusol[®], Optisol[®], RPMI-1640[®], Glicerina, entre outros. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência da descelularização de córneas suínas utilizando solução de hidróxido de sódio (0,5 M) e sua utilização em uma ceratoplastia lamelar em cão. As córneas foram coletadas em abatedouros da região metropolitana do Recife e transportadas para o Laboratório de Oftalmologia Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram esterilizadas em iodopovidona 10% (vic pharma[®]), descelularizadas utilizando solução de hidróxido de sódio (0,5 M) e conservadas em meio RPMI-1640[®] e glicerol (1:1) sob temperatura de 20 °C negativos. Foram realizados estudos histológicos e histoquímicos para verificar a presença de células residuais e organização das fibras colágenas no estroma, a extração e quantificação do DNA das córneas controle e descelularizadas, e análise microbiológica do meio de conservação. O paciente que recebeu o enxerto lamelar utilizando a matriz corneal suína descelularizada foi avaliado oftalmologicamente em diferentes períodos pós operatórios. Como resultado a solução de hidróxido de sódio (0,5 M) foi eficiente na descelularização da córnea suína, a análise microbiológica teve resultado negativo para bactérias e fungos, as córneas apresentaram conservação adequada em meio RPMI-1640[®] e glicerol (1:1), e a ceratoplastia lamelar em cão utilizando a matriz corneal suína descelularizada apresentou resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Córnea. Matrizes descelularizadas. Enxerto corneano.

ABSTRACT

The cornea is considered the most important refractory portion of the eye due to its curvature and transparency. Among the diseases that affect this structure, corneal ulcerations is the most common and when untreated can lead to vision loss. Complicated corneal ulcers require the use of grafts or even corneal transplants. Corneal transplants may be challenging due to high demand and difficulty in obtaining donors. Bioengineering techniques to reconstruct partial or total corneal lesions with the use of biomaterials have had significant progress. These biomaterials include decellularized amniotic membrane, decellularized pig conjunctiva, autologous oral mucosal epithelium and decellularized porcine corneas. Studies with decellularized corneas showed satisfactory results, shedding light into new therapeutic possibilities for the treatment of corneal lesions that require grafts. The decellularization of a tissue or organ consists in removing cells and their components without changing the extracellular matrix, preserving integrity of its structure and composition. The protocols used to obtain these extracellular matrixes include methods such as chemical, biological, physical or a combination of these. Decellularization efficiency is verified through many analyzes, including histological, histochemical and extraction and quantification of genetic material. Microbiological evaluation is also conducted to check if sterilization procedures during corneal preparation were efficient and if storage medium did not suffer contamination during a certain period of time. Many storage mediums for cellular matrixes are available such as Eusol[®], Optisol[®], RPMI 1640[®], glycerine, among others. This study aimed to evaluate the efficiency of decellularization of pig corneas using sodium hydroxide solution (0.5 M) and the use of extracellular matrix for the treatment of corneal ulcer in a dog that underwent lamellar keratoplasty. Corneas were obtained from a local butcher from the metropolitan region of Recife and transported to the Experimental Ophthalmology Laboratory at the Federal Rural University of Pernambuco, where they were sterilized in 10% povidone iodine (vic pharma[®]), decellularized using sodium hydroxide solution (0.5 M) and maintained in RPMI 1640[®] and glycerol (1:1) at - 20 °C. Histological and histochemical studies were performed to verify cellular and collagen fiber organization in corneal stroma, DNA extraction was performed to verify the presence of cell residues from decellularized corneas and microbiological analysis of the conservation medium. Patient that received lamellar graft using decellularized corneal matrix had ophthalmic evaluation in different postoperative periods. Results demonstrated that Sodium hydroxide solution (0.5 M) was effective in decellularizing porcine cornea, microbiological analysis was negative for bacteria and fungi, corneas presented adequate preservation in RPMI 1640[®] and glycerol (1:1) medium. Lamellar keratoplasty in a dog using corneal decellularized matrix demonstrated satisfactory results.

Keywords: Cornea. Decellularized matrices. Corneal graft.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
REFERÊNCIAS.....	17
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4 ARTIGO CIENTÍFICO – CERATOPLASTIA LAMELAR EM CÃO UTILIZANDO MATRIZ CORNEAL SUÍNA DESCELULARIZADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO (0,5 M)	
4.1 TÍTULO.....	23
4.2 INTRODUÇÃO.....	24
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.4 RESULTADOS.....	26
4.5 DISCUSSÃO.....	27
4.6 CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

A córnea é a estrutura mais anterior do olho, é transparente e faz parte da túnica fibrosa. Ela apresenta várias camadas sendo elas: o epitélio corneano, que é estratificado pavimentoso não queratinizado; o estroma, que é composto por fibras colágenas e queratócitos; a membrana de Descemet, que é a membrana basal do endotélio; e o endotélio, que é epitélio simples pavimentoso (SLATTER, 2005; TURNER, 2010; SANTODOMINGO; VILLA, 2011).

Devido a sua curvatura e transparência e por possuir a capacidade de refração e transmissão da luz, a córnea é vista como a porção mais importante do olho (BATISTA, 2005). Apesar da cuidadosa distribuição das suas fibras, a transparência da córnea não é somente um fenômeno estrutural, mas também fisiológico e depende do bombeamento contínuo de líquidos intersticiais, um processo realizado pelas células endoteliais que mantém o estroma desidratado em um nível de 78%, por meio das bombas de sódio e potássio, presentes nas membranas, que transportam íons e fluidos (Na^+/K^+) (DYCE; SACK; WENSING, 1997; JU et al., 2012).

Entre as doenças que acometem a córnea estão as ceratites ulcerativas, comumente encontradas em pequenos animais e que estão relacionadas à perda da visão em cães e gatos, não só pelo alto índice de morbidade, mas também pela gravidade das lesões corneais (SAMPAIO; RANZANI, 2005).

As úlceras corneanas consistem na perda de uma ou mais camadas da córnea (CUNHA, 2008), variando de simples defeitos ou abrasões superficiais no epitélio até perfurações de espessura completa, com prolapso de íris (BROOKS, 2005), podendo levar a perda do olho devido à endoftalmite, glaucoma, perfuração e *Phthisis bulbi* secundários (CUNHA, 2008). Segundo Turner (2010), entre as causas de ulceração corneal podem ser citadas as anormalidades palpebrais, ciliares ou do filme lacrimal, substâncias irritantes, traumas, infecções, distrofias e degenerações corneais.

O diagnóstico da úlcera de córnea é baseado nos sinais clínicos, nos resultados obtidos durante o exame ocular e na avaliação da sua integridade com o uso de corantes. O tratamento das ceratites ulcerativas vai depender da causa e da severidade da lesão, podendo ser medicamentoso e/ou cirúrgico, que inclui uma série de técnicas, entre elas a utilização de adesivos, recobrimento de terceira pálpebra, tarsorrafia temporária, recobrimento conjuntival e ceratoplastias reconstrutivas (BERCHT, 2009).

A utilização de enxertos homólogos de córnea em cães e gatos como tratamento cirúrgico das úlceras corneais ainda é incipiente dentro da oftalmologia veterinária. Pois, além de haver a escassez de doadores, há sempre a necessidade de uma grande equipe de técnicos que garantam a coleta, a manutenção e a realização de exames virais, bacteriológicos e fúngicos. Estes impasses levam a novas pesquisas com enxertos heterólogos descelularizados, técnica que está surgindo como um método promissor e inovador no tratamento das ceratites ulcerativas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Novas descobertas permitiram o aperfeiçoamento do exame do olho e trouxeram grandes avanços para a oftalmologia (TRAMONTIN, 2010). Atualmente, a engenharia de tecidos tem oferecido novas oportunidades terapêuticas com o desenvolvimento de matrizes acelulares permitindo a substituição ou regeneração estrutural e funcional dos tecidos lesados (PERPÉTUA et al., 2010; SOUZA, 2011), se tornando uma rotina na medicina a utilização dessa técnica em diversas estruturas e nos mais variados tratamentos (BADYLAK, 2006; BADYLAK, 2007; GILBERT; SELLARO; KEANE et al., 2012).

A vantagem de utilizar uma matriz acelular como um andaime para o crescimento celular ou remodelação reconstrutiva de órgãos e tecidos, é que ela apresenta os mesmos constituintes que a matriz extracelular nativa (BROWN et al., 2010). Postula-se que uma matriz íntegra com ausência completa de células seja essencial para a obtenção de enxertos que venham a ser adequadamente repovoados por células específicas, sem tendência à degeneração, sendo duráveis e com potencial regenerativo (WOLLMANN et al., 2011).

Atualmente é possível encontrar uma grande variedade de produtos comerciais de matriz extracelular alogênico ou xenogênicos disponíveis para utilização em diversos tratamentos (BADYLAK, 2007; KEANE et al., 2012). As matrizes heterólogas são facilmente obtidas em abatedouros comerciais de animais de produção e uma rigorosa metodologia que garanta a remoção eficiente do material celular e nuclear, minimizando quaisquer efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica na matriz extracelular remanescente, permite a formação de uma reserva ou banco para diferentes enxertos (OSÓRIO JR et al., 2012).

O principal evento que se deseja evitar em um processo de enxertia é o desencadeamento de uma resposta imunomediada desfavorável por parte do hospedeiro (FRANCISCO, 2012; OSÓRIO JR et al., 2012), que envolve tanto o sistema imune inato como o adquirido, sendo essa resposta afetada por variáveis específicas do enxerto, incluindo a sua aplicação clínica, a fonte da matéria prima e o processo de descélularização ao qual foi submetido (BADYLAK; GILBERT, 2008)

Para diminuir as reações negativas perante o enxerto lança-se mão da descélularização, um procedimento que consiste na remoção dos componentes celulares sem alterar a matriz extracelular, minimizando quaisquer efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica na estrutura remanescente (GILBERT;

SELLARO; BADYLAK, 2006; FRANCISCO, 2012; OSÓRIO JÚNIOR et al., 2012). Visto que, os efeitos causados pelas células alogênicas ou xenogênicas dentro de uma matriz biológica são amplamente indesejáveis, tornando necessária a sua remoção e de seus componentes intracelulares (KEANE et al., 2012).

Além do procedimento de retirada das células, a preservação da matriz extracelular é de grande importância, pois, sabe-se que a associação de métodos podem afetar algumas propriedades da estrutura e que a sua integridade diminui a imunogenicidade do enxerto e atua na manutenção das propriedades biomecânicas (BADYLAK, 2007; FRANCISCO, 2012; OSÓRIO JÚNIOR et al., 2012). Isso torna a avaliação de matrizes descelularizadas bastante complexa, e envolve não somente o seu estudo histológico, mas também sua caracterização biomecânica, biocompatibilidade, imunogenicidade e potencial de repovoamento celular (WOLLMANN et al., 2011), fazendo com que a complexidade do protocolo de descelularização seja, geralmente, proporcional ao grau de conservação biológica desejada da estrutura tratada, especialmente para partes de órgãos e órgãos inteiros (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Existem várias estratégias para lisar a célula e remover o material celular de um tecido, entre eles estão os métodos físicos, que incluem a agitação, pressão, congelamento e descongelamento, os métodos químicos, que utilizam ácidos e bases, detergentes iônicos e não iônicos, tratamentos hipotônicos e hipertônicos, álcoois e agentes quelantes, e os métodos biológicos, que usam enzimas e soro (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; LYNCH; AHEARNE, 2013). Nos métodos químicos e biológicos, é importante adequar a concentração e o tempo de exposição da solução descelularizante de acordo com o tipo do tecido a ser tratado (WOLLMANN et al., 2011), além disso, deve-se ter uma maior atenção no momento da retirada dos resíduos, pois, resquícios dos produtos podem permanecer no tecido descelularizado e induzir uma grave resposta inflamatória após sua implantação no receptor (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; FRANCISCO, 2012).

A eficiência na remoção das células e componentes celulares de um tecido ou órgão depende da origem do material e da metodologia empregada na descelularização. Cada um dos tratamentos empregados afeta a composição bioquímica, a ultraestrutura do tecido e o comportamento mecânico da matriz extracelular, que por sua vez, afetam a resposta do hospedeiro após o enxerto (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

As técnicas de descelularização, mais comumente utilizadas, para tecidos e órgãos de fina espessura, tais como bexiga, intestino, pericárdio e âmnio, incluem a congelação e descongelação, remoção mecânica das camadas indesejáveis, tais como músculo ou

submucosa, e exposição a detergentes ou ácidos seguidos de sucessivos enxagues. Tecidos mais espessos, como a derme, podem precisar de um tempo de exposição maior nas soluções e, conseqüentemente, mais enxagues. Outros órgãos e tecidos como o tecido adiposo, o cérebro e o pâncreas geralmente requerem a adição de lípidos solventes, como, por exemplo, álcoois (CAPRO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Várias pesquisas foram e estão sendo desenvolvidas utilizando matrizes descelularizadas, como a realizada por Da Costa et al. (2004) que compararam o implante de homoenxertos valvares criopreservados e heteroenxertos valvares descelularizados de suínos na via de saída do ventrículo direito de carneiros jovens, obtendo melhor resultado com as válvulas de suíno descelularizada que apresentaram progressiva repopulação por células autógenas e mínima tendência à calcificação.

Também em 2004, Falke et al. realizaram a substituição de segmento traqueal descelularizado em cães e tiveram como resultado um substituto adequado para o reparo de defeitos traqueais. Pimentel (2009) avaliou o implante em ovinos de homoenxerto arterial descelularizado e homoenxerto arterial fresco do segmento da artéria carótida comum e obteve melhores resultados com os segmentos da artéria carótida comum descelularizada, tendo um bom repovoamento celular e a manutenção da matriz extracelular. Navarro et al. (2010) avaliaram o comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares descelularizados em ovinos e obtiveram excelentes substitutos valvares a médio prazo, sendo eles progressivamente repovoados por células, não havendo sinais de degeneração e/ou calcificação.

Estudos realizados com a córnea revelaram que o principal obstáculo do sucesso da engenharia de tecidos tem sido a replicação da estrutura e composição bioquímica de uma matriz corneal (LYNCH; AHEARNE, 2013). A lógica por trás dessa aproximação é que a construção de um tecido que melhor recria o microambiente da córnea oferece, provavelmente, um bom substrato para a sobrevivência e função do tecido corneal (SHAFIQ et al., 2012).

Atualmente os métodos de descelularização corneal têm sido amplamente utilizados por suas vantagens em preservar o natural da matriz extracelular, o que é difícil de imitar usando métodos sintéticos (SHAO et al., 2012). Essa técnica pode proporcionar uma matriz quase idêntica da córnea nativa, que pode ser repovoada por células para reconstruir o epitélio da córnea com o subjacente suporte do estroma (SHAFIQ et al., 2012), e também é uma solução potencial para a falta de doadores de córneas (HASHIMOTO et al., 2010; GRIFFITH; HARKIN, 2014). Diante disso, a descelularização corneal é uma técnica

particularmente importante, pois, em muitas situações clínicas, a enfermidade corneal se estende além do epitélio e na maioria dos casos atinge o estroma (SHAFIQ et al., 2012).

Estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados para determinar a adequação de córneas descclularizadas como uma matriz para restaurar a visão em casos de lesões corneais (LYNCH; AHEARNE, 2013). Entre os estudos realizados estão o de Perpétua et al. (2010) que avaliaram o implante de matrizes descclularizadas de córneas suínas em coelhos e obtiveram baixos resultados de rejeição e não surgimento de vasos, e o de Yoeruek et al. (2012) que demonstraram que matrizes descclularizadas de córneas suínas, posteriormente implantadas em úlceras corneais de coelhos, permaneceram transparente e sem rejeição imunológica. A avaliação histológica revelou que células do coelho migraram para a matriz descclularizada durante o período de acompanhamento. Além disso, as células cresceram de forma estratificada, sobre o xenotransplante indicando uma boa biocompatibilidade.

Apesar dos resultados positivos já obtidos, no processo de descclularização tecidual além da retirada das células e do seu conteúdo, existe a preocupação de se preservar a matriz extracelular e os fatores de crescimento. E nesse ponto ainda é necessária à realização de mais estudos para tentar compreender melhor como os fatores de crescimento interagem entre si e com as células, qual é seu efeito, qual mecanismo intracelular é desencadeado e como eles podem ser ativados ou inativados. Seria igualmente interessante se aprofundar no fenômeno de migração que leva células ao ambiente de cicatrização (MORANDINI; SANTOS; TABA JUNIOR, 2008).

A utilização de diversos tipos de tecidos descclularizados para substituição e reconstrução de órgãos é uma técnica viável e pode ser utilizada em córneas, permitindo o seu armazenamento em meios conservantes, que oferecem flexibilidade no deslocamento, no preparo dos pacientes, na marcação da data da cirurgia conforme as necessidades do cirurgião e do bloco cirúrgico e, maior prazo para avaliação das matrizes a serem enxertadas (ANDRADES et al., 2011).

Outro ponto importante é a conservação das matrizes corneais descclularizadas para enxertos, que tem evoluído ao longo do tempo, apresentando diversas técnicas atualmente descritas na literatura (BRAGA, 2007). Os meios conservantes utilizados permitem menos trocas possíveis com as matrizes corneais evitando uma hiperidratação ou desidratação excessiva, o que causa uma redução na sua transparência (ALVIM et al., 2003).

Entre os meios conservantes utilizados para armazenar as matrizes corneais descclularizadas estão o Eusol-C[®] e Optisol-GS[®], que preservam por um período de curto a médio prazo (PEREIRA, 2011), e a criopreservação utilizando etilenoglicol em nitrogênio líquido durante 60 dias (ALVES et al., 2011). A conservação também pode ser feita com

Glicerina a 98% (BRAGA, 2007) ou associada à solução supersaturada de açúcar a 300%, que apresentam bons resultados por um período de 30 dias (GONÇALVES et al., 2003), e solução fisiológica a 0,9% e Dextran 40 a 10% (ALVIM et al., 2003).

REFERÊNCIAS

ALVES, L. B. et al. Avaliação morfológica de córneas de coelhos criopreservadas com etilenoglicol. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.2, p. 376-381, 2011.

ALVIM, H. S. et al. Técnica para preparação e conservação de olhos de porco para cirurgia experimental. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v. 66, p. 627-630, 2003.

ANDRADES, M. G. et al. Generación de córneas por bio-ingeniería con xenoimplantes descelularizados y queratocitos humanos. **Gaceta de optometria y óptica oftálmica**, Madrid, v. 455, p. 21-23, 2011.

BADYLAK, S. F.; GILBERT, T. W. Imune response to biologic scaffold materials – Review. **Seminars in Immunology**, v. 20, p. 109-116, 2008.

BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. **Biomaterials**, Pennsylvania, v. 28, p. 3587–3593, 2007.

BATISTA, M. E. **Comparação entre quatro tratamentos oftálmicos tópicos na cicatrização de úlceras corneanas em coelhos**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BERCHT, B. S. **Úlcera de córnea profunda em cães**. 2009. 35 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BRAGA, F. V. A. **Uso de adesivo de cianoacrilato para a fixação de botão corneal autógeno ou alógeno conservado em glicerina a 98% na ceratoplastia penetrante em coelhos**. 2007. 65 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

BROOKS, D. E. **Oftalmologia para veterinários de equinos**. São Paulo: Roca, 2005. 144 p.

BROWN, B. N. et al. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, Pennsylvania, v. 31, p. 428-237, 2010.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, Pennsylvania, v. 32, p. 3233-3243, 2011.

CUNHA, O. **Manual de oftalmologia veterinária**. 2008. Disponível em: < <http://200.18.38.50/www/biblioteca/Oftalmo.pdf> >. Acesso em: 14 jun. 2012.

DA COSTA, F. D. A. et al. Estudo experimental com heteroenxertos valvares descelularizados – a prótese do futuro. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 19, n. 1, p. 74-82, 2004.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 663 p.

FALKE, D. G. et al. Reemplazo traqueal con matriz de colágeno traqueal descelularizada en perros. **Revista de Cirurgia Infantil**, Santos, v. 14, n. 1, 2, 3, 4, p. 59-63, 2004.

FRANCISCO, J. C. **Desenvolvimento de biomaterial a partir de matriz amniótica humana**. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, Pennsylvania, v. 27, p. 3675-3683, 2006.

GONÇALVES, G. F. et al. Ceratoplastia lamelar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina – Aspectos macroscópicos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 6, n. 1, p. 31-37, 2003.

GRIFFITH, M.; HARKIN, D. G. Recent advances in the design of artificial corneas – Review. **Wolters Kluwer Health**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 240-247, 2014.

HASHIMOTO, Y. et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. **Biomaterials**, Pennsylvania, v. 31, p. 3941-3948, 2010.

JU, C. et al. A human corneal endothelium equivalent constructed with acellular porcine corneal matrix. **Indian Journal of Medical Research**, Mumbai, v. 153, p. 887-894, 2012.

KEANE, T. J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, Pennsylvania, v. 33, p. 1771-1781, 2012.

LYNCH, A. P.; AHEARNE, M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. **Experimental Eye Research**, San Diego, n. 108, p. 42-47, 2013.

MORANDINI, A. C. F.; SANTOS, C. F.; TABA JÚNIOR, M. Fundamentos e princípios biológicos da engenharia tecidual em periodontia – Revisão de literatura. **Revista Periodontia**, Belo Horizonte, v. 18, n. 2, p. 14-18, 2008.

NAVARRO, F. B. et al. Avaliação do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares descelularizados: estudo experimental em ovinos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 25, n. 3, p. 377-387, 2010.

OSÓRIO JÚNIOR, H. A. et al. Estudo da descelularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxerto. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 7, 2012, Natal. **Anais...** Natal, 2012. Versão eletrônica.

PEREIRA, L. R. **Preservação de córnea humana nos meios Eusol-C® e Optisol-GS®**. 2011. 160f. Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PERPÉTUA, P. C. G. et al. Preparo da matriz acelular de córnea suína e aplicabilidade em ceratites ulcerativas – estudo experimental em coelhos. In: MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5, 2010, Maringá. **Anais...**, Maringá, 2010. Versão eletrônica.

PIMENTEL, G. K. **Análise do comportamento biológico dos homoenxertos arteriais descelularizados em ovinos**. 2009. 82 f. Dissertação (Pós-Graduação em Cirurgia) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.

SAMPAIO, R. L.; RANZANI, J. J. T. Aplicação do adesivo sintético embucrilato (Hystoacril®) na reparação de úlceras profundas da córnea. Estudo experimental em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 434-446, 2005.

SANTODOMINGO, J.; VILLA, C. La córnea. Parte II. Córnea central frente a córnea periférica. **Gaceta optometria y óptica oftálmica**, Madrid, v. 455, 2011.

SHAFIQ, M. A. et al. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. **Tissue Engineering: Part C**, Chicago, v. 18, n. 5, p. 340-348, 2012.

SHAO, Y. et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications. **International Journal of Ophthalmology**, Shaanxi, v. 5, n. 4, p. 415-418, 2012.

SLATTER, D. H. **Fundamento de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. 686 p.

SOUZA, J. C. M. C. **Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto.

TRAMONTIN, M. H. **Contribuição ultrassonográfica na avaliação de bulbos Oculares de animais domésticos e selvagens**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TURNER, S. M. **Oftalmologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 370 p.

WOLLMANN, L. C. F N. et al. Efeito da criopreservação e/ou da descclularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 3, n. 26, p. 490-496, 2011.

YOERUEK, E. et al. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. **Acta Ophthalmologica**, Tuebingen, v. 90, p. 206 – 210, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Utilizar matriz corneal suína descelularizada em ceratoplastias

3.2 Específicos

- Avaliar a eficiência da descelularização das córneas de suínos utilizando solução de hidróxido de sódio 0,5 Molar;
- Avaliar as matrizes corneais descelularizadas através da análise microbiológica, histológica e histoquímica após diferentes períodos de conservação;
- Realizar a extração e quantificação do DNA antes e após a descelularização;
- Usar a matriz corneal descelularizada em ceratoplastias.

Ceratoplastia lamelar em cão utilizando matriz corneal suína descelularizada com hidróxido de sódio

O artigo será submetido à Revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*

Ceratoplastia lamelar em cão utilizando matriz corneal suína descclularizada com hidróxido de sódio¹

Ana Greice B. Leite², Elton H.L.S. Souza², Jéssika T.A. Ferreira², Pedro P.F. Albuquerque², Taciana P. Spinelli² e Fabrício B. Sá^{2*}

ABSTRACT.- Leite A.G.B., Souza E.H.L.S., Ferreira J.T.A., Albuquerque P.P.F., Spinelli T.S. & Sá F.B. 2015. [**Lamellar keratoplasty in dog using porcine corneal matrix decellularized with sodium hydroxide**] Ceratoplastia lamelar em cão utilizando matriz corneal suína descclularizada com hidróxido de sódio. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00):00-00. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. Email: crleucas@yahoo.com.br

Corneal ulcer is a commonly diagnosed disease in veterinary medicine, there are several causes and when untreated may lead to vision loss. One alternative treatment to this condition is the use of corneal scaffolds. In Brazil, there are few studies using corneal decellularized matrices, thus, development of research in this area is necessary. The aim of this study was to evaluate the efficiency of decellularized porcine corneas using sodium hydroxide solution (0.5 M); evaluate conservation of decellularized matrices in Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640®) and glycerol in the ratio of 1:1 and monitor clinical progress of corneal lamellar keratoplasty using decellularized matrix in a dog. Corneas were obtained from a local butcher from the metropolitan region of Recife and transported to the Experimental Ophthalmology Laboratory at the Federal Rural University of Pernambuco, where they were sterilized in 10% povidone iodine (vic pharma®), decellularized using sodium hydroxide solution (0.5 M) and maintained in RPMI 1640® and glycerol (1:1) at - 20°C. Histological and histochemical studies were performed to verify cellular and collagen fiber organization in corneal stroma, DNA extraction was performed to verify the presence of cell residues from control corneas and decellularized corneas, and microbiological analysis of the conservation medium. Patient that received lamellar graft using decellularized corneal matrix had ophthalmic evaluation in different postoperative periods. Results demonstrated that sodium hydroxide solution (0.5 M) was effective in decellularizing porcine cornea, microbiological analysis was negative for bacteria and fungi, corneas presented adequate preservation in RPMI-1640® and glycerol (1:1) medium. Lamellar keratoplasty in a dog using corneal decellularized matrix demonstrated satisfactory results.

INDEX TERMS: Cornea, Keratoplasty, Bioengineering, Descclularization.

RESUMO.- As ulcerações corneais são enfermidades comuns na medicina veterinária, podem ser causadas por vários fatores e se não tratadas corretamente podem levar a perda da visão. Uma das formas de tratamento destas doenças é a utilização de arcabouços corneais. No Brasil são escassos os estudos com matrizes corneais descclularizadas e isso gera a necessidade de desenvolvimento de pesquisas nessa área. Com este estudo objetivou-se avaliar a eficiência da descclularização de córneas suínas utilizando solução de hidróxido de sódio (0,5 M), a conservação das matrizes descclularizadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640®) e glicerol na proporção de 1:1, a utilização da matriz corneal descclularizada em

ceratoplastia lamelar em cão com acompanhamento clínico da evolução do tratamento. As córneas foram coletadas em abatedouros da região metropolitana do Recife e transportadas para o Laboratório de Oftalmologia Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram esterilizadas em iodopovidona 10% (vic pharma®), descelularizadas utilizando solução de hidróxido de sódio (0,5 M) e conservadas em meio RPMI-1640® e glicerol (1:1) sob temperatura de 20°C negativos. Foram realizados estudos histológicos e histoquímicos para verificar a presença de células residuais e organização das fibras colágenas no estroma, a extração e quantificação do DNA das córneas controle e descelularizadas, e análise microbiológica do meio de conservação. O paciente que recebeu o enxerto lamelar utilizando a matriz corneal suína descelularizada foi avaliado oftalmologicamente em diferentes períodos pós operatórios. Como resultado a solução de hidróxido de sódio (0,5 M) foi eficiente na descelularização da córnea suína, a análise microbiológica teve resultado negativo para bactérias e fungos, as córneas apresentaram conservação adequada em meio RPMI-1640® e glicerol (1:1), e a ceratoplastia lamelar em cão utilizando a matriz corneal suína descelularizada apresentou resultados satisfatórios.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Córnea, Ceratoplastia, Bioengenharia, Descelularização.

INTRODUÇÃO

Novas oportunidades de tratamentos vêm sendo oferecidas pela engenharia de tecidos por meio do desenvolvimento de matrizes acelulares que permitem a substituição ou regeneração estrutural e funcional de tecidos lesionados, tornando-se comum a utilização de suportes biológicos obtidos por meio de tecidos descelularizados de animais em diversos procedimentos cirúrgicos reconstrutivos (Badylak & Gilbert 2008, Perpétua et al. 2010, Sousa 2011, Ju et al. 2012, Keane et al. 2012). Acredita-se que uma matriz íntegra, com seus fatores de crescimento e ausência de células, seja essencial para a obtenção de enxertos que venham a ser adequadamente repovoados por células específicas do receptor (Wollmann et al. 2011).

Os motivos que impulsionam a realização de diversos estudos acerca da produção de arcabouços descelularizados são os componentes que formam a matriz extracelular dos diferentes tecidos, que geralmente são semelhantes entre as espécies, o que torna as matrizes sem conteúdo celular bem toleradas mesmo em receptores xenogênicos (Osório Júnior et al. 2013).

A descelularização é um método que tenta diminuir as chances de rejeições das matrizes enxertadas. A avaliação dos enxertos descelularizados é bastante complexa e envolve não somente a sua caracterização histológica, mas também sua caracterização biomecânica, biocompatibilidade, imunogenicidade e o potencial de repovoamento celular. Quanto à aplicabilidade clínica dos arcabouços acelulares, a fase final e decisiva do enxerto das matrizes é a ausência de rejeição por parte do receptor (Wollmann et al. 2011, Osório Júnior et al. 2013).

As matrizes heterólogas são facilmente obtidas em abatedouros comerciais e uma rigorosa metodologia que garanta a remoção eficiente do material celular, minimizando quaisquer efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica na matriz extracelular remanescente permite a formação de uma reserva para diferentes enxertos. Desse modo, a formulação de protocolos para a descelularização de tecidos pode estabelecer uma nova dimensão da bioengenharia voltada para o tratamento de ulcerações corneais tendo como

potencial a superação do problema de escassez de enxertos corneanos (Ju et al. 2012, Yoeruek et al. 2012a, Yoeruek et al. 2012b, Griffith & Harkin 2014).

Com este trabalho objetivou-se descelularizar córneas de suínos usando solução de hidróxido de sódio 0,5 Molar e utilizá-las em ceratoplastia lamelar em cão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas córneas de suínos em matadouros da região metropolitana do Recife. Logo após o abate cada bulbo do olho foi avaliado verificando a ausência de alterações e infecções, garantindo a higidez das córneas. Após certificada a integridade dos olhos, as córneas foram coletadas pelo método de incisão *in situ* do disco corneal e transportadas em recipientes de vidro contendo Ringer-Lactato e acondicionadas em caixa isotérmica refrigerada para o Laboratório de Oftalmologia Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram esterilizadas por imersão em solução de iodopovidona 10% (vic pharma®) durante 10 minutos (Yoeruek et al. 2012b) e lavadas três passagens em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Em seguida a descelularização foi realizada utilizando solução de hidróxido de sódio (0,5 Molar), na qual as córneas foram imersas por três minutos e ao serem retiradas da solução foram friccionadas em ambas as faces (externa e interna) utilizando bastões envolvidos em algodão estéreil e novamente lavadas por três vezes em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Após a descelularização as córneas foram conservadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640®) associado ao glicerol (1:1) sob temperatura de 20°C negativos.

Para as avaliações histológicas e histoquímicas as córneas controle e as matrizes descelularizadas, foram fixadas em solução de paraformaldeído em tampão fosfato a 0,2 Molar com pH 7,4 por 24 horas, em seguida foram processadas pelas técnicas de rotina e impregnadas e incluídas em paraplast (Paraplast Plus®). Foram realizadas quatro avaliações, uma após a descelularização e as outras com um, dois e três meses de conservação. Nestas foram verificadas a presença de células, por meio de contagem em cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina, observados em microscopia de luz com aumento de 100 vezes e cortes corados com o 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich®) visualizados em um microscópio de epifluorescência AxioPlan® (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), a organização das fibras de colágeno e espessura do estroma realizado em cinco pontos distintos das córneas controle e de cada matriz descelularizada coradas com Tricrômico de Gomori. Foram ainda realizadas as análises microbiológicas das matrizes descelularizadas e dos meios de conservação através da coleta e cultivo em ágar sangue, ágar levine e ágar sabouraud. Por último, o DNA remanescente das matrizes descelularizadas e das corneas controle foi extraído e quantificado. A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®) seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, Macerou-se 0,25 g do material adicionando 180 µl do tampão ATL e agitou-se no vórtex, em seguida foi adicionado 20 µl de proteinase K e incubado em banho maria a 56 °C em overnight. Foi adicionado 200 µl do tampão AL e 200 µl de etanol absoluto agitado no vórtex e centrifugado à 8000 rpm durante 1'30". Foi adicionado mais 500 µl do tampão AW1 e centrifugado à 8000 rpm durante 1'30", acrescido com mais 250 µl de tampão AW2 e centrifugado à 14000 rpm durante 3'30", por ultimo mais 200 µl do tampão AE e centrifugado por 1'30" e armazenado no freezer até a quantificação. A quantificação foi efetivada usando o Qubit® 2.0 Fluorometer e o kit comercial Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™). Adicionou-se 1 µl da amostra extraída em 199 µl do Qubit® working solution, a mistura foi agitada em vórtex

por três segundos e em seguida esperou-se dois minutos em temperatura ambiente para realizar a leitura.

As medidas da espessura do estroma das matrizes descelularizadas e das córneas controle foram realizadas utilizando o programa ImageJ®. Os valores médios das medidas da espessura e da contagem das células do estroma foram avaliados estatisticamente pelo programa Statistic® utilizando o teste-T e o teste de Wilcoxon, respectivamente, com grau de significância $p < 0,05$.

A paciente submetida à ceratoplastia foi atendida no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco no setor de Oftalmologia Veterinária, era uma cadela, sem raça definida com oito anos de idade. A proprietária relatou que o animal já havia retirado uma massa de cor escura no canto lateral do olho direito e que a mesma voltou a crescer com um ano depois. Foi realizada oftalmoscopia direta (Oftalmoscópio HEINE MINI 2000®), indireta (Oftalmoscópio indireto HEINE SIGMA 150®), biomicroscopia de fenda (Portable Slit Lamp LYL-S®), tonometria de rebote (Tonovet®) e ultrassonografia de modo B com probe de 10MHz, no exame oftálmico foi verificada a presença de um tumor de limbo que acometia parte da córnea e da esclera. A indicação do tratamento foi a ceratoplastia lamelar com a retirada cirúrgica do tumor e enxerto com matriz corneal suína descelularizada na região corneoescleral acometida. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRPE com o número de licença 23082.021124/2014.

A matriz corneal suína descelularizada foi utilizada para preencher a área anteriormente acometida pelo tumor e fixada com pontos simples isolados utilizando fio de vicryl® (8-0 Poligalactin 910) (Fig.1). A massa tumoral coletada foi encaminhada para o exame histopatológico. A terapia instituída no pós-operatório durante 21 dias foi tobramicina colírio 0,3% (Tobrex®, Alcon) a cada oito horas, diclofenaco sódico colírio (Still®, Allergan) a cada oito horas, dextrano 70 0,1% e hipromelose 0,3% (Lacrima Plus®, Alcon) a cada seis horas. Ao final deste período e com o teste negativo para a retenção da fluoresceína tópica, foi instituído o tratamento com neomicina 3,5 mg/ml, polimixina B 6000 UI/ml e dexametasona 0,001 g/ml colírio (Maxitrol®, Alcon) a cada seis horas por mais 15 dias e depois reduziu para cada oito horas por mais 30 dias.

RESULTADOS

A análise histológica revelou que as córneas descelularizadas perderam o epitélio e o endotélio, e o estroma permaneceu com as fibras de colágeno organizadas (Fig.2 B e D). Foi verificada uma diminuição média de 69,2% no número de queratócitos presentes no estroma das matrizes descelularizadas e um edema do mesmo (média: 868,76 μm e desvio padrão: 47,35) em relação às córneas controle (média: 788,04 μm e desvio padrão: 38, 27) (Gráf.1), sendo verificada uma diferença estatística entre os valores.

Na avaliação histoquímica com a coloração específica para núcleos (DAPI) foi verificada uma grande redução na quantidade dos mesmos (Fig.3 B e D), o que foi confirmado pela extração e quantificação do DNA que revelou uma diminuição de 71% após a descelularização (Gráf.2).

Com relação à técnica de coleta e a eficiência da esterilização, dez amostras foram analisadas e apenas uma teve resultado positivo para *Staphylococcus* sp, e nenhuma apresentou contaminação fúngica. Na avaliação histológica foi verificada que não ocorreu nenhuma modificação estrutural em até três meses de armazenamento utilizando o meio conservante RPMI associado ao glicerol (1:1).

Os resultados dos exames hematológicos da paciente, solicitados no pré-operatório, foram todos sem alterações confirmando o bom estado geral da mesma. No exame oftálmico foi observado um tumor de limbo de aspecto liso e arredondado apresentando ao seu redor edema corneal e vasos superficiais. Na ultrassonografia ocular não foi detectada nenhuma infiltração intraocular da massa tumoral e nem sinais de uveíte. O resultado histopatológico revelou um melanoma de limbo. Como tratamento complementar a paciente foi encaminhada para realização de quimioterapia.

No pós-operatório a paciente foi avaliada com oito, 21, 36 e 52 dias, apresentando melhoras progressivas. Com oito dias após a cirurgia a matriz descelularizada enxertada apresentava-se edemaciada, mas bem aderida à córnea e sem sinais de rejeição pelo hospedeiro (Figura 4A). Com 21 dias pode-se observar intensa vascularização sobre o enxerto e a córnea clara adjacente (Figura 4B). Aos 36 dias de tratamento o enxerto apresentava uma transparência progressiva (Figura 4C) e aos 52 dias foi verificada a ausência de vasos e transparência corneal com discreta nébula (Figura 4D).

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, houve um crescimento nas pesquisas com biomateriais voltadas para a medicina com a finalidade de realizar reconstruções de órgãos e tecidos lesionados funcionalmente e estruturalmente (Sousa 2011, Francisco 2012). Apesar dos avanços já conquistados, a bioengenharia ainda apresenta algumas limitações. Os grandes avanços na produção de células progenitoras ou aplicação de células *in natura* ou *in vitro* ainda não permitem que os tecidos e órgãos sejam reproduzidos em sua totalidade com toda a sua complexidade fisiológica (Olsson et al. 2008).

Acompanhando esse processo, a bioengenharia tem apresentado progressos significativos em estudos com córnea. Pesquisas envolvendo técnicas que visam reconstituir parte ou a totalidade da espessura danificada da córnea estão sendo realizadas oferecendo um maior campo de oportunidades terapêuticas (Griffith et al. 2009, Ju et al. 2012, Griffith & Harkin 2014), como a utilização de biomateriais em ulcerações corneais, por exemplo, membrana amniótica descelularizada (Moreira & Oliveira 2000, Pontes et al. 2011, Ferreira et al. 2013), conjuntiva descelularizada de suíno (Zhao et al. 2014), mucosa oral autóloga (Nishida et al. 2004, Ma et al. 2009) e matriz corneal descelularizada suína (Perpétua et al. 2010, Yoeruek et al. 2012). Isso porque entre todos os transplantes, o corneano tem sido o mais realizado nos últimos tempos, sendo a demanda maior que a oferta (Chalita et al. 2000, Hos et al. 2014), por ser um procedimento padrão e eficiente no tratamento de certas enfermidades (Schroeter et al. 2012). No estudo realizado por Perpétua et al. (2010) e Yoeruek et al. (2012) foi realizado o enxerto de matriz corneal suína descelularizada em coelhos, diferente do nosso estudo que realizou o enxerto em cão.

No processo de descelularização corneal, vários métodos para lisar as células e remover o material celular são discutidos. A retirada dos componentes celulares e as moléculas de antígenos mantendo os componentes da matriz extracelular são necessárias para gerar suportes capazes de produzir enxertos de tecidos funcionais adequados (Lynch & Ahearne 2013). O procedimento de enxertos corneais geralmente é bem sucedido, mas a rejeição por parte do hospedeiro pode causar sérias complicações (Chalita et al. 2000). Várias estratégias para lisar a célula e remover o material celular de um tecido são utilizadas, entre elas estão os métodos físicos, químicos e biológicos (Gilbert et al. 2006, Lynch & Ahearne 2013). De acordo com

Saghizadeh et al. (2013) entre os métodos químicos tem-se o uso do hidróxido de sódio (NaOH), que tem como vantagens a sua velocidade e eficiência. Por ser um agente inorgânico é rapidamente neutralizado em tampão fosfato salino (PBS) produzindo apenas sal. Em sua pesquisa Saghizadeh et al. (2013) realizaram um estudo comparativo sobre a eficiência no processo de descélularização da membrana amniótica humana com soluções de EDTA e NaOH e concluíram que o NaOH apresentou melhores resultados, realizando a remoção das células sem causar lesões na estrutura das membranas. O mesmo resultado foi obtido em nosso trabalho que utilizou solução de NaOH (0,5 M), no qual foi possível retirar uma grande parte das células da córnea de suíno preservando a matriz extracelular em curto tempo e baixo custo.

Existe uma variedade de métodos disponíveis para determinar a eficiência da remoção do material celular a partir de tecidos tratados (Gilbert et al. 2006). Entre eles está a coloração do material com DAPI, que tem como função marcar os núcleos celulares remanescentes, no caso da córnea são corados os núcleos das células do epitélio, do estroma e do endotélio. Segundo Yoeruek et al. (2012), depois da descélularização, foi verificado com essa técnica que apenas 3,2% dos núcleos celulares estavam presentes na matriz corneal descélularizada suína, indicando uma grande redução no número de células. Em nossos resultados também foi verificado a ausência do epitélio e endotélio corneal, e uma grande redução no número de células estromais com o uso do DAPI. Pelo método de contagem por campo foi verificada a presença de 30,8% de células remanescentes no estroma das córneas tratadas, valor quase dez vezes mais alto que o encontrado por Yoeruek et al. (2012), o que pode ser atribuído ao fato da contagem ter sido realizada em lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina que não difere claramente os núcleos íntegros dos restos celulares.

Outra técnica muito utilizada é a realização da extração do DNA e sua quantificação, que são importantes para avaliar o processo de descélularização. No trabalho realizado por Yoeruek et al. (2012b), essa técnica evidenciou a eficácia do protocolo, que utilizou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), aprotinina, dodecil sulfato de sódio (SDS), desoxirribonuclease e ribonuclease, mostrando que o conteúdo do DNA das córneas suínas antes da descélularização estava em $75,45 \pm 13,71$ ng/mg e depois do procedimento ficou em $9,87 \pm 2,04$ ng/mg, o que indica uma redução de mais de 80% do material genético. O protocolo utilizado em nossos estudos consistiu apenas no uso da solução de hidróxido de sódio (0,5 M), conseguindo-se uma diminuição de 71% do material genético sem utilizar agentes citotóxicos como o SDS (Cruz et al. 1998) e reduzir em mais de 90% nos custos. Apesar de ainda restar, em ambos os estudos, uma quantidade de DNA remanescente os resultados com os enxertos das matrizes descélularizadas foram satisfatórios o que condiz com a hipótese de Badylak & Gilbert (2008) que parece ser improvável que fragmentos de DNA possam causar reações de rejeição no hospedeiro. No entanto, segundo Keane et al. (2012), apesar dos bons resultados encontrados não se sabe se a quantificação do DNA é um bom indicador de uma descélularização eficiente.

A necessidade de estudos aprofundados sobre a utilização de matrizes descélularizadas é evidente, visto que ainda não foi determinado um limiar para uma quantidade mínima de material celular remanescente causar uma reação imunogênica por parte do receptor. Sabe-se que os protocolos utilizados na descélularização buscam retirar o máximo de células e componentes celulares, uma vez que os tecidos descélularizados são na maioria de origem alogênica ou xenogênica e que as técnicas de descélularização não removem 100% do material celular (Gilbert et al. 2006, Capro et al. 2011). Segundo Keane et al. (2012), as consequências do uso de uma matriz extracelular incompletamente descélularizada sobre a resposta do hospedeiro ainda não foram sistematicamente investigadas e uma compreensão mais completa dos efeitos das células remanescentes sobre a resposta do hospedeiro é necessário.

A coleta das córneas pode ser realizada de duas formas: a enucleação total e a excisão *in situ* do disco corneal. Ambos os métodos apresentam diferentes pontos positivos e negativos com relação à contaminação microbiológica. A enucleação total é um método que não parece apresentar vantagens no que diz respeito à taxa de contaminação microbiana comparada a excisão *in situ*, que foi a técnica utilizada nesse experimento por ser considerada mais eficaz e segura por Schroeter et al. (2012). Com relação ao processamento e armazenamento do material, mesmo que estes procedimentos tenham sido realizados evitando qualquer tipo de contaminação, a esterilização das matrizes biológicas é necessária antes da sua implantação em um organismo ou utilização *in vitro*, para eliminar endotoxinas, vírus, bactérias e fungos que possam estar presentes (Capro et al. 2011). Uma solução comumente utilizada para esterilizar materiais biológicos é o iodopovidona (Moriya & Módena 2008) que na pesquisa realizada por Yoeruek et al. (2012b) foi utilizado na concentração de 10% durante 10 minutos para esterilizar as córneas de suíno obtendo um bom efeito. Essa mesma metodologia foi utilizada em nossos estudos apresentando também resultados satisfatórios o que foi comprovado por análises microbiológicas das matrizes descclularizadas e do meio conservante.

O armazenamento das matrizes corneais descclularizadas pode ser realizado utilizando uma variedade de meios conservantes, entre eles está o Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640®) que é um meio de cultivo e conservação de células e tecidos muito utilizado em pesquisas, além de ser um meio comercialmente disponível no Brasil possui baixo custo e apresenta bons resultados. Outra vantagem é que ele contém em sua composição dois antibióticos (penicilina e estreptomicina) e um antifúngico (anfotericina B) (Lira & Sá 2012), e pode ser associado a um agente crioprotetor como o glicerol que atua reduzindo o estresse físico e químico causado pelo congelamento e descongelamento do tecido (Lima 2011) devido a sua capacidade de ligação com a água, baixa dissociação no meio e atravessar facilmente a membrana celular (Gonzalez 2004). Estas propriedades também foram verificadas em nossos resultados por meio de análises histológicas e histoquímicas que comprovaram a ausência de alterações morfológicas nas matrizes armazenadas em meio RPMI-1640® associado ao glicerol (1:1) refrigerado a 20°C negativos por um período de três meses.

Há tempos o homem vem buscando alternativas para tentar contornar os entraves dos tratamentos corneais que necessitem de transplantes e enxertos. Um estudo realizado por Chaves et al. (1996) mostrou que há mais de 15 anos o homem já buscava uma alternativa para substituir a córnea de um cão por uma suína, não obtendo bons resultados por usar córneas suínas frescas, o que causou intensa reação imunológica por parte dos receptores, apesar de terem recebido tratamento imunossupressor. Ao contrário desses resultados, o desenvolvimento de matrizes corneais heterólogas descclularizadas para enxertos lamelares vem tornando-se importante diante dos entraves encontrados na medicina veterinária quando se fala em transplantes corneais em animais. Em oposto aos transplantes que é uma prática pouco realizada por diversos fatores, o enxerto de matriz corneal descclularizada heteróloga vem ganhando espaço devido seus bons resultados, como o trabalho realizado por Yoeruek et al. (2012b) que enxertaram matriz corneal suína descclularizada em coelhos e observam que com quatro semanas de pós-operatório a transparência da córnea foi notada. O mesmo resultado foi verificado em nosso trabalho que utilizou a técnica de ceratoplastia lamelar com o enxerto de matriz corneal suína descclularizada em cão e que apresentou transparência em seis semanas de pós-operatório.

Nas injúrias corneais complicadas é comum a formação de neovascularizações durante o processo cicatricial (Turner 2010). Assim como os resultados encontrados nesse estudo, Norman et al. (2008) e Townsend et al. (2008) também observaram intensa vascularização na

segunda semana após as ceratoplastias com enxertos corneais, que foi tratada com o uso de anti-inflamatórios esteroidais por ser este um fator comumente associado a um alto risco de rejeição do enxerto (Wilson & Kaufman 1990). Associado aos anti-inflamatórios também foram utilizados antibióticos e lacrimomiméticos em todos os tratamentos.

Diante das limitações terapêuticas associadas a técnicas de enxertia disponíveis na atualidade que a descclularização tecidual torna-se uma opção promissora pela possibilidade de obtenção de arcabouços que visam ter funcionalidade semelhante aos enxertos autólogos, sem as inconveniências atreladas a estes (Osório Júnior 2013). No entanto, apesar do grande avanço no conhecimento da biologia celular alcançado, passos ainda devem ser dados em direção a melhor compreensão do que é preciso para se desenvolver um material feito pela engenharia de tecidos, comercialmente disponível. Quanto à viabilidade clínica, deve-se ressaltar que não podemos deixar de pensar no custo/benefício desses materiais, equilibrando o nosso cotidiano com a realidade econômica e social em que estamos inseridos como profissionais (Morandini et al. 2008).

CONCLUSÃO

A descclularização de córneas suínas com solução de hidróxido de sódio (0,5 M) foi eficiente e a ceratoplastia lamelar em cão utilizando matriz corneal suína descclularizada obteve resultados satisfatórios.

Agradecimento.- À todos que fazem parte do Laboratório de Oftalmologia Experimental (UFRPE) pela valiosa ajuda na realização deste estudo, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Badylak S.F. & Gilbert T.W. 2008. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*. 20: 109-116.
- Chalita M.R.C., Diazgranados E.B.M., Sato E.H., Branco B.C. & Freitas D. 2000. Rejeição corneana pós transplante de córnea: análise de dados do Banco de Olhos do Hospital São Paulo - Escola Paulista de Medicina. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*. 63(1): 55-58.
- Chaves N.S.T., Barros P.S.M., Martins A.F., Araújo E.G., Araújo L.F., Eurides D. & Silva L.A.F. 1996. Estudo histopatológico nas córneas dos cães tratados com 2-1 fosfatodissódico de betametasona e fosfato dissódico/acetato de Dexametasona, que receberam transplantes com córneas de suínos. *Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária*. 26(2): 37-43.
- Crapo P.M., Gilbert T.W. & Badylak S.F. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 32: 3233-3243.
- Cruz A.S., Figueiredo C.A., Ikeda T.I., Vasconcelos A.C.E., Cardoso J.B. & Sales-Gomes L.F. 1998. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade "in vitro" de materiais biocompatíveis. *Revista de Saúde Pública*. 32(2): 153-159.
- Ferreira G.T.N.M., Souza T.F.B., Sakamoto S.S., Silva T.T.C. & Andrade A.L. 2013. Aspectos clínicos do enxerto conjuntival 360º e do implante da membrana amniótica criopreservada no tratamento de úlceras de córnea em cães. *Ciências Agrárias*. 34(3): 1239-1252.

- Francisco J.C. 2012. Desenvolvimento de biomaterial a partir de matriz amniótica humana. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 100p.
- Gilbert T.W., Sellaro T.L. & Badylak S.F. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 27: 3675–3683.
- Gonzalez R.A.F. 2004. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. Tese de Doutorado em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP. 94p.
- Griffith M., Jackson W.B., Lagali N., Merrett K., Li F. & Fagerholm. 2009. Artificial corneas: a regenerative medicine approach. *Eye Journal*. 23: 1989-1985.
- Griffith M. & Harkin D.G. 2014. Recent advances in the design of artificial córneas – Review. *Wolters Kluwer Health*. 25(3): 240-247.
- Hos D. Van Essen T.H., Bock F., Chou C.H., Pan H.A. Lin C.C., Huang M.C., Chen S.C., Cursiefen C. & Jager M.J. 2014. Dezellularisierte kollagen matrix aus der schuppe des tilapia-fisches als hornhautersatz (Biocornea). *Der Ophthalmologe*. 111(11): 1027-1032.
- Keane T.J., Londono R., Turner N.J. & Badylak S.F. 2012. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 33(6): 1771-1781.
- Ju C., Gao L., Wu X. & Panq K. 2012. A human corneal endothelium equivalent constructed with acellular porcine corneal matrix. *Indian Journal of Medical Research*. 153(6): 887-894.
- Lima D.T. 2011. Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas. Tese de Doutorado em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 120p.
- Lira F. & Sá F.B. 2012. Uso do meio Roswell Park Memorial Institute como conservante de córneas de camundongos Swiss. *Revista Medicina Veterinária*. 6(2): 18-25.
- Lynch A.P. & Ahearne M. 2013. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Experimental Eye Research*. 108: 42-47.
- Ma D.H.K., Kuo M.T., Tsai Y.J., Chen H.C., Chen X.L., Wanq S.F., Li L., Hsiao C.H. & Lin K.K. 2009. Transplantation of cultivated oral mucosal epithelial cells for severe corneal burn. *Eyes*. 23(6): 1442-1450.
- Morandini A.C.F., Santos C.F. & Taba Júnior M. 2008. Fundamentos e princípios biológicos da engenharia tecidual em periodontia – Revisão de literatura. *Revista Periodontia*. 18(2): 14-18.
- Moreira H. & Oliveira C.S. 2000. Transplante de membrana amniótica. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 63(4): 303-305.
- Moriya T. & Módena J. L. P. 2008. Assepsia e antissepsia: técnica de esterilização. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 41(3): 265-273.
- Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., Watanabe K., Yamamoto K., Adachi E., Nagai S., Kikuchi A., Maeda N., Watanabe H., Okano T. & Tano Y. 2004. Corneal reconstruction with tissue – engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England Journal of Medicine*. 351(12): 1187-1196.
- Norman J.C., Urbanz J.L. & Calvarese S.T. 2008. Penetrating keratoscleroplasty and bimodal grafting for treatment of limbal melanocytoma in a dog. 11(5): 340–345.

- Olsson D.C., Pippi N.L., Tognoli G.K. & Raiser A.G. 2008. Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea. *Ciência Rural*. 38(8): 2403-2412.
- Osório Júnior, H.A. 2013. Estudo da descellularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxerto. 2013. Dissertação de Mestrado em Saúde Coletiva, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 64p.
- Perpétua P.C.G., Liberati M.N., Didoni N. & Quitzan. 2010. Preparo da matriz acelular de córnea suína e aplicabilidade em ceratites ulcerativas – estudo experimental em coelhos. *Anais 5ª Mostra interna de trabalhos de iniciação científica, Maringá, SP*, p. 5. (Resumo)
- Pontes K.C.S., Borges A.P.B., Eleotério R.B., Favarato L.S.C. & Duarte T.S. 2011. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. *Ciência Rural*. 41(12): 2120-2127.
- Saghizadeh M., Winkler M.A., Kramerov A.A., Hemmati D.M., Ghiam C.A., Dimitrijevič S.D., Sareen D., Ornelas L., Ghiasi H., Brunken W.J., Maguen E., Rabinowitz Y.S., Svendsen C.N., Jirsova K. & Ljubimov A.V. 2013. A simple alkaline method for decellularizing human amniotic membrane for cell culture. *PlosOne*. 8(11): 1-10.
- Schroeter J., Wilkemeyer I., Herrlinger F. & Pruss A. 2012. Comparison of in situ corneoscleral disc excision versus whole globe enucleation in cornea donors regarding microbial contamination in organ culture medium – a prospective monocentric study over 9 years. *Transfusion Medicine Hemotherapy*. 39(6): 391-394.
- Sousa J.C.M.C. 2011. Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto. 78p.
- Townsend W.M., Rankin A.J., Stiles J. & Krohne S.G. 2008. Heterologous penetrating keratoplasty for treatment of a corneal sequestrum in a cat. 11(4): 273-278.
- Turner S.M. 2010. *Oftalmologia em pequenos animais*. Elsevier, Rio de Janeiro. 370p.
- Wilson S.E. & Kaufman H.E. 1990. Graft failure after penetrating keratoplast. *Survey of Ophthalmology*. 34: 325-356.
- Wollmann L.C.F.N. 2011. Efeito da criopreservação e/ou da descellularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 3(26): 490-496.
- Yoeruek E., Bayyoud T., Maurus C., Hofmann J., Spitzer M.S., Bartz-Schmidt K.U. & Szurman P. 2012a. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta Ophthalmologica*. 90(2): 125-131.
- Yoeruek E., Bayyoud T., Maurus C., Hofmann J., Spitzer M.S., Bartz-Schmidt K.U. & Szurman P. 2012b. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. *Acta Ophthalmologica*. 90(3): 206-210.
- Zhao H., Qu M., Wang Y., Wang Z. & Shi W. 2014. Xenogeneic acelular conjunctiva matrix as a scaffold of Tissue-Engineered corneal epithelium. *Plos One*. 9(11): e111846.

Legendas das Figuras

Fig.1. Cão apresentando tumor de limbo (A), lesão corneoescleral depois de retirar o tumor (B) e enxerto de matriz corneal suína descellularizada (C).

Fig.2. Fotomicrografias de córneas de suíno. Comparação entre as córneas controle (A e C) e as matrizes corneais descellularizadas (B e D) com solução de NaOH (0,5M) durante três minutos,

sob agitação e friccionada ao final do procedimento. A/B – coradas com Hematoxilina-Eosina e C/D – Tricômico de Gômori, Asterístico (Epitélio), E (Estroma) e Seta (Endotélio).

Gráf.1. Medidas média da espessura (μm) do estroma das córneas controle e das matrizes corneais descclularizadas logo após o tratamento e armazenadas por períodos de um, dois e três meses em meio RPMI-1640® e glicerol (1:1).

Fig.3. Fotomicrografias de córneas de suíno. Comparação entre as córneas controle (A/C) e as matrizes corneais descclularizadas (B/D), verificando a presença de restos celulares nas matrizes e diminuição na quantidade de núcleos íntegros. A/B – coradas com Hematoxilina-Eosina e C/D – DAPI.

Gráf.2. Extração e quantificação do material genético (DNA) da córnea controle e da matriz corneal descclularizada com solução de hidróxido de sódio (0,5 M).

Fig.4. Fotomicrografias do olho de cadela submetida à ceratoplastia, observa o enxerto de matriz corneal suína descclularizada com oito (A), 21 (B), 36 dias (C) e 52 dias (D) pós-operatório.



Figura 1

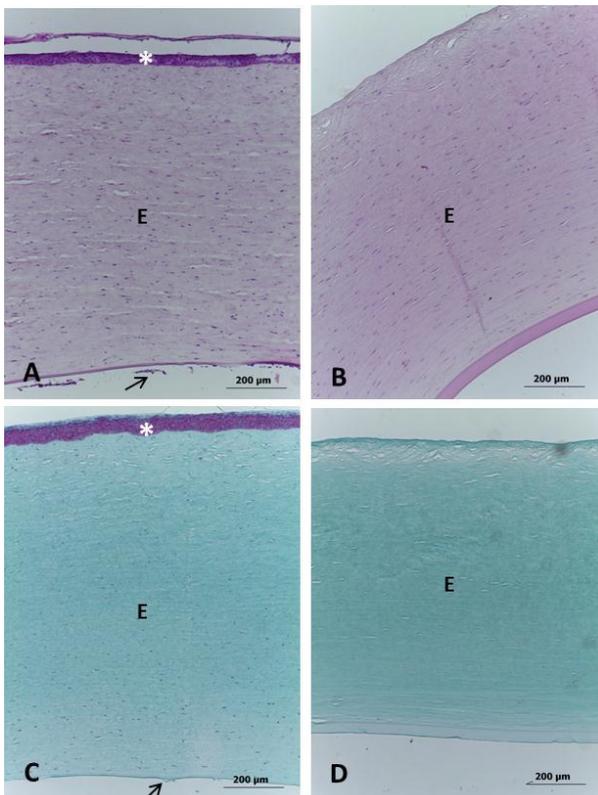


Figura 2

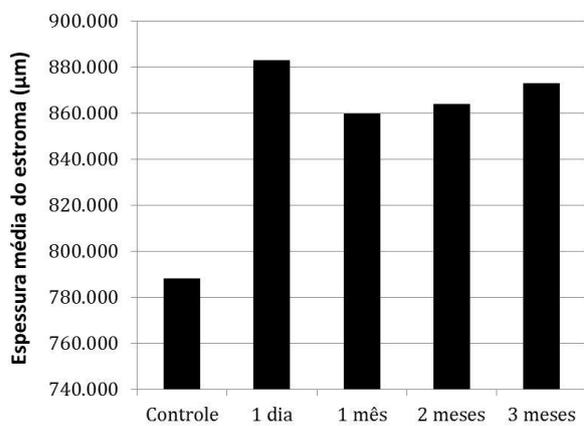


Gráfico 1

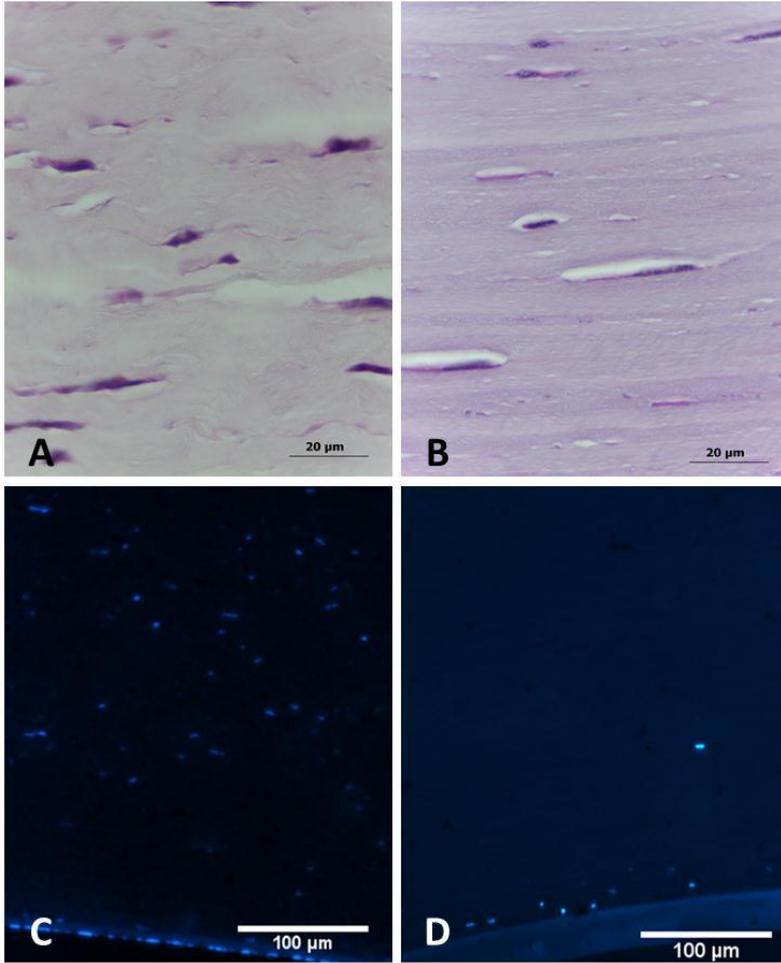


Figura 3

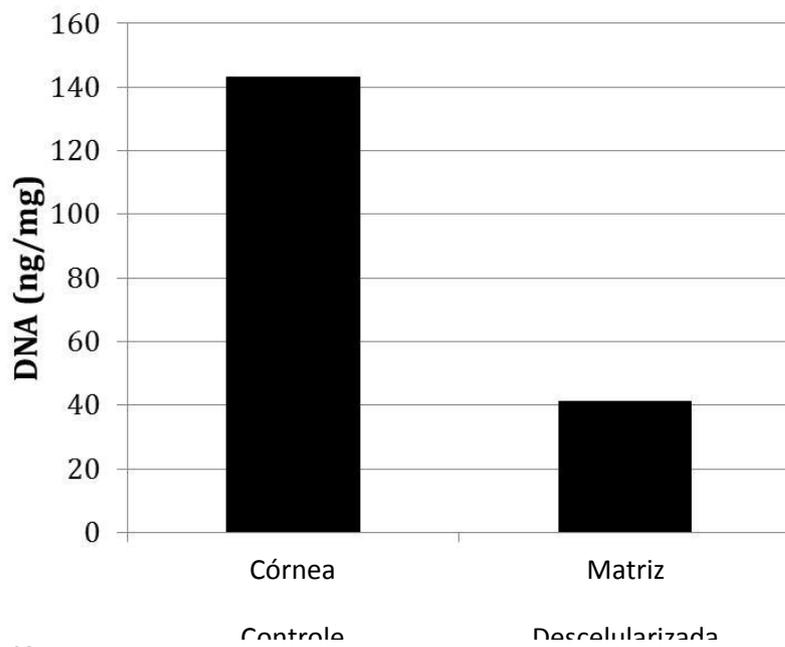


Gráfico 2

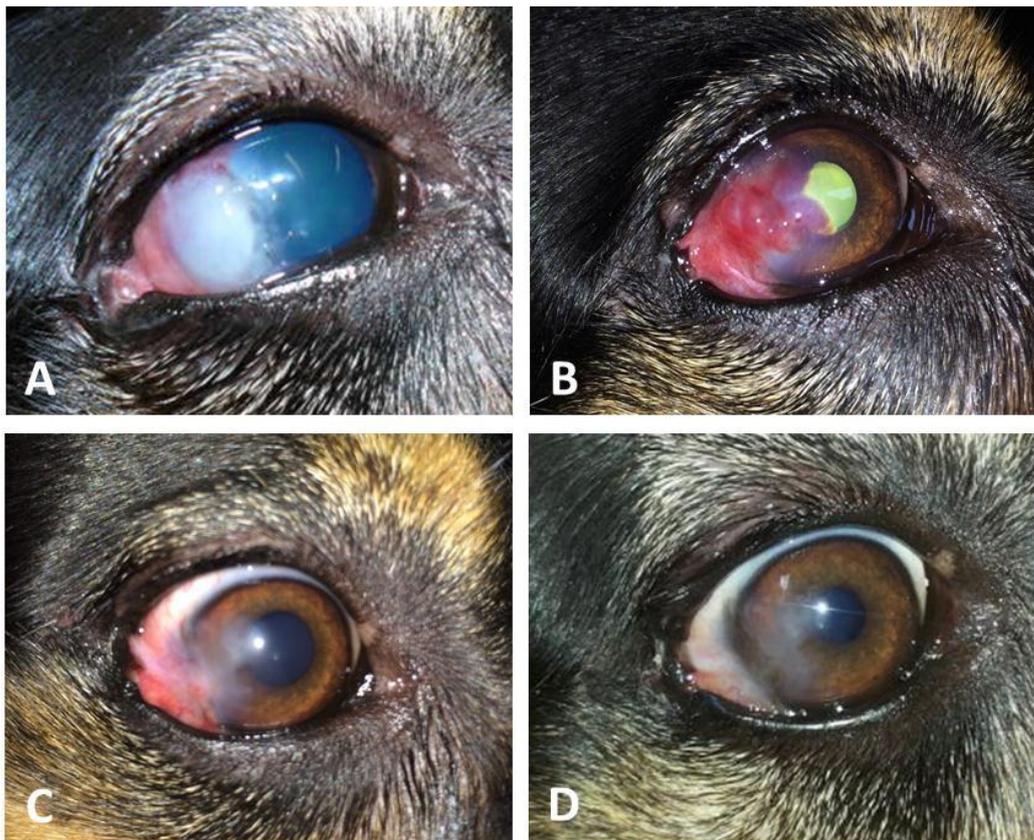


Figura 4