

THAÍS MARIA DA MATA MARTINS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÓRNEAS HUMANAS
DESCELULARIZADAS E RECELULARIZAÇÃO COM CÉLULAS-TRONCO
VISANDO REGENERAÇÃO DO EPITÉLIO CORNEANO ANTERIOR**

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Julho/2017**

THAÍS MARIA DA MATA MARTINS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÓRNEAS HUMANAS
DESCELULARIZADAS E RECELULARIZAÇÃO COM CÉLULAS-TRONCO
VISANDO REGENERAÇÃO DO EPITÉLIO CORNEANO ANTERIOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes

Coorientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

Julho/2017



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
THAÍS MARIA DA MATA MARTINS**

182/2017
entrada
2º/2013
2013716650

Às **doze horas e trinta minutos** do dia **25 de julho de 2017**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÔRNEAS HUMANAS DESCELULARIZADAS E RECELULARIZAÇÃO COM CÉLULAS-TRONCO VISANDO REGENERAÇÃO DO EPITÉLIO CORNEANO ANTERIOR**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Alfredo Miranda de Góes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Alfredo Miranda de Góes	UFMG/ICB	Aprovado
Dr. Dawison Assis Gomes	UFMG	Aprovado
Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba	UFJF	Aprovado
Dra. Giselle Foureaux Heida	UFMG	Aprovada
Dr. Joel Edmur Boteon	UFMG	Aprovada
Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara	USP	Aprovado

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 25 de julho de 2017.**

Dr. Alfredo Miranda de Góes (Orientador) Alfredo Miranda de Góes

Dr. Dawison Assis Gomes (Co-orientador) Dawison A. Gomes

Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba Carlos M. C. Maranduba

Dr^a. Giselle Foureaux Heida Giselle Foureaux Heida

Dr. Joel Edmur Boteon Joel Edmur Boteon

Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara Niels Olsen Saraiva Câmara

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof.ª Fernanda Rüdiger C. L. de Almeida
SUB-COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

*Dedico esta tese à minha família e, de forma especial,
a todos os doadores de tecidos e órgãos para transplante e seus familiares.*

*“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério,
inclusive os fatos. Ou a ausência deles.
Duvida?”*

(João Guimarães Rosa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, imensamente, ao Professor Alfredo, grande exemplo de sabedoria, humanidade e serenidade, pelas ideias brilhantes e ousadia ao fazer ciência. É um orgulho ter você como chefe!

Ao Professor Dawidson, pela disponibilidade e entusiasmo constante em ajudar.

Agradeço, de forma especial, a todos os doadores de órgãos e tecidos para transplante e seus familiares, pela beleza e grandeza do ato.

Ao coordenador do Banco de Tecidos Oculares do MG Transplantes, Dr. Paulo Lener Filho, pelo fornecimento dos botões corneoesclerais e a todos os funcionários, em especial à Aline, pela competência, simpatia e alegria. Ao Daniel Amorim pela ajuda no contato inicial com a equipe do Banco.

A todos os funcionários e doadores da Santa Casa e da Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, pelo fornecimento dos produtos da blefaroplastia.

Agradeço a todos os meus familiares, de forma muito especial aos meus pais, à Telma, Tia Dalva, Dindinha, Juliene, pelo incentivo, carinho e orações. Aos meus sobrinhos, Marco Túlio e Télió Júnior, que me mostram, mesmo que em outro plano, o que realmente tem valor na vida.

Aos membros e ex-membros da grande família LICM, obrigada por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável, por todo apoio e ajuda. Obrigada por doarem amor e sangue a essa pesquisa! É um presente conviver com todos vocês! Especialmente, à Ana, Carolzinha, Ju, Ana Carol, Lelê, Alê, Thalita, Joy, Junnia, Eliza, Lud, pela amizade, incentivo e todos os ensinamentos (que vão muito além da bancada). À Betinha, por adoçar nossas vidas.

À Pri, pela atenção sempre tão carinhosa e toda ajuda nos experimentos de real time.

À Michele, pela ajuda nos experimentos de imunofluorescência. À Maira, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Thadeu, por compartilhar das minhas expectativas, alegrias e tristezas e pela companhia durante as constantes idas ao laboratório nos fins de semana e feriados! À família do Thadeu, por me acolher com tanto carinho, especialmente à Mirtes.

A todos os amigos, antigos e recentes, aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, obrigada pela torcida!

Aos professores e alunos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, pela ajuda e alegria, especialmente ao Ricardo, pela simpatia e disponibilidade.

Ao professor José Carlos, pelo entusiasmo, ajuda no isolamento dos fibroblastos límbicos e todos os ensinamentos sobre o sistema da visão.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, pelo apoio à minha formação científica.

Aos membros da banca de defesa, pela compreensão e disponibilidade em avaliar este trabalho.

A todos os funcionários do CAPI, Centro de Microscopia e Laboratório de Apoio Didático do Departamento de Morfologia, em especial, à Maristane.

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e INCT-REGENERA, pelo apoio financeiro.

E, por fim, agradeço a Deus, por colocar em meu caminho pessoas tão especiais como vocês sem as quais esse trabalho não existiria.

RESUMO

A córnea pode ser afetada por uma série de doenças que levam à deficiência visual e à cegueira. O único tratamento para a maioria destas doenças consiste no transplante de córnea. Entretanto, esse procedimento apresenta algumas desvantagens, dentre as quais as duas mais relevantes são a escassez de doadores e o risco de rejeição do enxerto. Nesse contexto, o desenvolvimento de córneas artificiais com base em métodos de descelularização representa uma alternativa promissora para contornar os problemas relacionados ao transplante de córnea. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar córneas humanas descelularizadas, colonizar a membrana basal dessas córneas com células-tronco e promover a diferenciação das mesmas em células do epitélio corneano (CECs) utilizando meio indutor suplementado com soro humano. Para tanto, as córneas foram descelularizadas por dois diferentes métodos: 1) tratamento com NaCl, 2) tratamento com NaCl + Nucleases. A total remoção dos componentes celulares assim como a integridade da matriz extracelular das córneas descelularizadas (CDs) foram avaliadas por meio de análises histológicas, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, quantificação de DNA genômico, imunofluorescência e marcação nuclear com a sonda Hoechst. Posteriormente, as CDs foram recelularizadas com células-tronco humanas isoladas das bolsas de gordura da pálpebra (OFSCs), células-tronco embrionárias (hESCs) ou células-tronco de pluripotência induzida (hiPSCs) e a biocompatibilidade das CDs foi analisada por meio do ensaio de Calceína-AM. Avaliou-se a capacidade das OFSCs, hESCs e hiPSCs em se diferenciar em CECs quando cultivadas sobre as CDs ou laminina na presença de meio de cultura suplementado com soro humano em substituição ao soro fetal bovino. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento apenas com NaCl resultou em remoção incompleta dos componentes celulares. Em contraste, verificou-se completa remoção das células, núcleos, fragmentos celulares e DNA nas córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases. Além disso, esse tratamento preservou a composição e ultraestrutura da matriz extracelular das CDs, as quais suportaram a adesão e cultivo das OFSCs, hESCs e hiPSCs. As OFSCs não foram capazes de se comprometer com a linhagem de CECs, enquanto as hESCs e hiPSCs alcançaram um fenótipo epitelial corneano mais maduro quando cultivadas sobre a membrana basal das CDs do que quando cultivadas sobre a laminina. Os achados do presente estudo demonstraram que o tratamento das córneas humanas com NaCl + Nucleases resultou em uma matriz completamente descelularizada e biocompatível com propriedades estruturais e funcionais preservadas com potencial aplicação na engenharia de tecidos da córnea.

ABSTRACT

Numerous diseases can affect corneal structure, leading to visual impairment and even blindness. Currently, the only treatment for most corneal illnesses is transplantation of corneal allografts. However, graft rejection and the lack of donors are the two major disadvantages associated to this procedure. Generation of artificial corneas based on decellularization methods is a promising alternative to overcome these problems. Therefore, the present study aimed to develop and characterize decellularized human corneas, recellularize these decellularized corneas (CDs) with human stem cells and promote the differentiation of these cells into corneal epithelial-like cells (CECs) in culture medium supplemented with allogeneic human serum (SH) replacing fetal bovine serum. Two decellularization protocols were tested: 1- sodium chloride (NaCl) treatment, 2 - NaCl plus nucleases treatment. The success of each method on the removal of cells from the cornea and the integrity of the extracellular matrix were investigated by histology, electron microscopy, DNA quantification, immunofluorescence and nuclear staining with Hoechst. The CDs were recellularized with human orbital fat-derived stem cells (OFSCs), human embryonic stem cells (hESCs), or human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and the biocompatibility of the CDs was analyzed by calcein-AM staining. The ability of the OFSCs, hESCs and hiPSCs to differentiate into CECs when cultured on CDs or on laminin in culture medium supplemented with SH was evaluated. The results showed that corneas processed using NaCl resulted in incomplete removal of cellular material. In contrast, corneas decellularized with NaCl plus nucleases method resulted in total removal of the cellular components. This treatment also kept the epithelial basement membrane and stroma completely intact. Calcein-AM staining demonstrated the viability, adhesion and a normal morphology of the OFSCs, hESCs and hiPSCs seeded on CDs. OFSCs did not differentiate towards the CECs lineage, while hESCs and hiPSCs differentiated into terminally differentiated CECs when seeded on CDs. These results showed that NaCl plus nucleases treatment of human corneas generates an acellular and biocompatible matrix with adequate histologic properties which have potential applications in corneal tissue engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático do bulbo ocular.....	1
Figura 2: Histologia da córnea humana.....	2
Figura 3: Exemplo da padronização das reações de PCR quantitativa em tempo real.....	41
Figura 4: Visão macroscópica dos botões corneoesclerais controles não submetidos ao processo de descelularização (A) e dos botões corneoesclerais após tratamento com NaCl (B e C) ou após tratamento com NaCl + Nucleases.....	43
Figura 5: Cortes histológicos da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases (C) corados com hematoxilina e eosina.....	44
Figura 6: Imagens de microscopia de fluorescência, após marcação nuclear com a sonda Hoechst, de corte da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases.....	44
Figura 7: Quantificação do conteúdo de DNA extraído das córneas controles e das córneas após tratamento com NaCl (A) ou NaCl + Nucleases.....	45
Figura 8: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície epitelial da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases.....	46
Figura 9: Micrografias eletrônicas de transmissão da região estromal da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases.....	46
Figura 10: Micrografias eletrônicas de transmissão da córnea controle e descelularizada.....	47
Figura 11: Corte histológico da córnea corado pelo PAS e imagens de microscopia de fluorescência da expressão de colágeno tipo IV, fibronectina e laminina nas CDs.....	48
Figura 12: Corte histológico da córnea corado pelo Alcian Blue pH 2,5.....	49
Figura 13: Micrografias eletrônicas de transmissão da região estromal da córnea controle (A) e descelularizada (B).....	49
Figura 14: Fotomicrografia demonstrando aspecto morfológico das OFSCs.....	50
Figura 15: Análise imunofenotípica das OFSCs por meio de citometria de fluxo.....	50
Figura 16: Indução da diferenciação osteogênica das OFSCs.....	52
Figura 17: Indução da diferenciação adipogênica das OFSCs.....	53
Figura 18: Indução da diferenciação condrogênica das OFSCs.....	54
Figura 19: Caracterização da pluripotência das hESCs.....	55
Figura 20: Caracterização da pluripotência das hiPSCs.....	56
Figura 21: Fotomicrografia demonstrando aspecto morfológico dos fibroblastos extraídos do limbo corneoescleral	57

Figura 22: Viabilidade das OFSCs (A), hESCs (B) e hiPSCs (C) cultivadas sobre a membrana basal das CDs.....	58
Figura 23: Detecção da expressão gênica de OCT-4, NANOG, SOX2, hTERT, AFP, Sox17, GFAP, PAX6 e Brachyuri pelas hESCs (A) e hiPSCs (B) cultivadas sobre as córneas descelularizadas.....	59
Figura 24: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes OCT-4, SOX2, NANOG, PAX6, p63, CK3 e CK12 pelas hESCs (A) e hiPSCs (B) após sete dias de cultivo sobre as CDs	60
Figura 25: Viabilidade das OFSCs (A), hESCs (B) e hiPSCs (C) cultivadas sobre a membrana basal das CDs na presença do MCFL por 21 dias.....	60
Figura 26: Fotomicrografias das OFSCs (A), hESCs (B) e hiPSCs (C) no estado indiferenciado (A.1, B.1 e C.1) e após 14 dias de cultivo sobre a laminina na presença do meio indutor da diferenciação.....	61
Figura 27: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes PAX6 (A), p63 (B), CK3 (C) e CK12 (D) durante 21 dias de indução da diferenciação das OFSCs.....	62
Figura 28: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes PAX6 (A), p63 (B), CK3 (C) e CK12 (D) durante 21 dias de indução da diferenciação das hESCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs.....	64
Figura 29: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes PAX6 (A), p63 (B), CK3 (C) e CK12 (D) durante 21 dias de indução da diferenciação hiPSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs.	65
Figura 30: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes OCT-4 (A), SOX2 (B) e NANOG (C) durante 21 dias de indução da diferenciação das hESCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs.....	67
Figura 31: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes OCT-4 (A), SOX2 (B) e NANOG (C) durante 21 dias de indução da diferenciação das hiPSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs.....	68
Figura 32: Imagens de microscopia confocal da expressão de CK3 pelas hESCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs.....	70
Figura 33: Imagens de microscopia confocal da expressão de CK3 pelas hiPSCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs.....	71
Figura 34: Imagens de microscopia confocal da expressão de CK12 pelas hESCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs.....	73
Figura 35: Imagens de microscopia confocal da expressão de CK12 pelas hiPSCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados para avaliar a multipotencialidade das OFSCs por PCR.....	32
Tabela 2 - Dados dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados para avaliar a pluripotência das hESCs e hiPSCs.....	34
Tabela 3 - Sequências de <i>primers</i> utilizados nas reações de qPCR.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

AgNO₃ - Nitrato de prata

AFP - *alpha fetoprotein*

bp – pares de base

BSA - Albumina do Soro Bovino

CAAE – Certificado de Apresentação para Aquisição Ética

CCs – Córneas controles

CECs - Células epiteliais da córnea - *corneal epithelial-like cells*

cDNA - Ácido Desoxirribonucléico Complementar

CDs – Córneas descelularizadas

CK3 - Citoqueratina 3

CK12 - Citoqueratina 12

cm - Centímetro

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

Col I - Colágeno tipo I

COL X - Colágeno tipo X

COMP - *Cartilage oligomeric matrix protein*

Cq - Ciclo de quantificação

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA - Ácido Tetracético Etilenodiamidina

ESCs – Células-tronco embrionárias - *embryonic stem cells*

FA – Fosfatase alcalina

FLs - fibroblastos do limbo corneoescleral

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH - *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*

GFAP - *Glial fibrillary acidic protein*

GLUT 4 - Transportador de glicose GLUT 4

hASC - Células-tronco derivadas do tecido adiposo humano

hESCs – Células-tronco embrionárias humanas - *Human embryonic stem cells*

hiPSCs - Células-tronco de pluripotência induzida humanas – *human induced pluripotent stem cells*

HLA - Antígeno leucocitário humano
hTERT - *human telomerase reverse transcriptase*
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB - Instituto de Ciências Biológicas
iPSCs - Células-tronco de pluripotência induzida – *induced pluripotent stem cells*
Kg – Quilograma
Lep – leptina
LSCs - *limbal stem cells*
M – Molar
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MCFL – Meio epitelial condicionado pelos fibroblastos do limbo corneoescleral
mg - Micrograma
mL - Mililitro
mm - Milímetro
mM - Milimolar
MSCs - Células-tronco mesenquimais
NaCl - cloreto de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
ng - nanograma
nm - nanômetro
nM - Nanomolar
°C - graus Celsius
OCT-4 - *Octamer- Binding Transcription Factor 4*
OFSCs - células-tronco isoladas das bolsas de gordura da pálpebra - *Orbital fat-derived stem cells*
OMS – Organização Mundial da Saúde
OSP – osteopontina
PAX6 - *paired box 6*
PBS - Tampão fosfato de sódio
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PE - Ficoeritrina
PPARG2 - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos

RNA - Ácido Ribonucléico
qPCR - PCR quantitativa em tempo real
rpm - Rotações por minuto
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SFB - Soro fetal bovino
SH - Soro alogênico humano
SOX2 - (*sex determining region Y*)-box 2
Sox17 - (*sex determining region Y*)-box 17
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
µg - Micrograma
µl - Microlitro
µm - Micrômetro
µM - Micromolar

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
SUMÁRIO	xvi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1. Córnea – Estrutura anatômica e histológica	1
1.2. Deficiência visual e transplante de córnea.....	6
1.3. Engenharia de tecidos da córnea.....	8
1.4. Fontes de células para aplicação na engenharia de tecidos da córnea	10
1.5. Células-tronco e reconstrução da superfície corneana.....	13
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Descelularização de córneas humanas	20
4.2. Avaliação da remoção dos componentes celulares e preservação da matriz extracelular das CDs	20
4.2.1. Análises histológicas	21
4.2.2. Imunofluorescência e marcação nuclear com a sonda Hoechst	22
4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura	23
4.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	23
4.2.5. Extração, quantificação e amplificação de DNA genômico.....	24
4.3. Meios de cultura.....	24
4.3.1. Meio de cultura basal	24
4.3.2. Obtenção do <i>pool</i> de soro alogênico humano (SH).....	25
4.3.3. Meios de diferenciação.....	25
4.3.3.1. Meio osteogênico.....	25
4.3.3.2. Meio adipogênico	25

4.3.3.3. Meio epitelial.....	25
4.4. Isolamento e cultivo das OFSCs.....	26
4.4.1. Caracterização imunofenotípica das OFSCs.....	27
4.4.2. Caracterização funcional das OFSCs.....	28
4.4.2.1. Diferenciação osteogênica.....	28
4.4.2.2. Diferenciação adipogênica.....	29
4.4.2.3. Diferenciação condrogênica.....	29
4.4.3. Avaliação da expressão gênica de marcadores das linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.....	30
4.4.3.1. Extração de RNA total.....	30
4.4.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA.....	31
4.4.3.3. Reação em cadeia da polimerase.....	31
4.5. Cultivo e caracterização das células-tronco embrionárias e das células-tronco de pluripotência induzida.....	33
4.6. Isolamento e cultivo dos fibroblastos límbicos.....	35
4.6.1. Caracterização dos fibroblastos límbicos.....	36
4.7. Obtenção do meio de cultura condicionado por fibroblastos límbicos.....	36
4.8. Colonização das córneas descelularizadas com as células-tronco.....	37
4.8.1. Análise da adesão e viabilidade das OFSCs, hESCs e hiPSCs cultivadas nas CDs.....	37
4.9. Indução da diferenciação das células-tronco em células epiteliais da córnea (CECs).....	38
4.9.1. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	38
4.9.1.1. Quantificação relativa dos transcritos gênicos por (qPCR).....	39
4.9.2. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por imunofluorescência.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Avaliação da remoção dos componentes celulares.....	43
5.2. Avaliação da preservação da matriz extracelular das córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases.....	47
5.3. Isolamento, cultivo e caracterização das OFSCs.....	49
5.3.1. Caracterização do imunofenótipo das OFSCs.....	50
5.3.2. Caracterização funcional das OFSCs.....	51
5.3.2.1. Potencial de diferenciação osteogênico.....	51
5.3.2.2. Potencial de diferenciação adipogênico.....	52

5.3.2.3. Potencial de diferenciação condrogênico	53
5.4. Cultivo e caracterização das hESCs e hiPSCs	54
5.5. Isolamento, cultivo e caracterização dos fibroblastos do limbo corneoescleral	56
5.6. Colonização da córnea descelularizada com as OFSCs, hESCs e hiPSCs	57
5.7. Indução da diferenciação em CECs	60
5.7.1. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por qPCR	61
5.7.2. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por imunofluorescência	69
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	84
8. PERSPECTIVAS.....	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
10. ANEXOS.....	100
10.1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	100
10.1.1. Artigos publicados	100
10.1.2. Apresentações em Congressos	101
10.2. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – COEP.....	103
10.3. Artigo publicado.....	103

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Córnea – Estrutura anatômica e histológica

A visão é um processo fisiológico complexo que possibilita a percepção de formas, relevos, cores e movimentos. O bulbo ocular ou globo ocular recebe os raios luminosos emitidos ou refletidos pelos objetos e os focalizam sobre a retina, na qual ocorre a formação da imagem e a conversão da energia luminosa em impulsos elétricos que são enviados ao córtex visual, onde são processados e interpretados (Nogueira 2015).

A parede do bulbo ocular é estruturada em três túnicas concêntricas, sendo da mais externa para a mais interna, respectivamente: a túnica externa ou fibrosa ou corneoescleral, a túnica média ou vascular ou úvea e a túnica interna ou retina. A túnica externa é formada pela córnea e esclera e, na transição entre essas duas estruturas, há uma faixa estreita, circular, denominada limbo corneoescleral (Figura 1-A e B). A túnica média é composta pela coróide, corpo ciliar e íris, enquanto a túnica interna é constituída pela retina fotossensível e retina cega. Internamente, o globo ocular é formado pelo humor aquoso, lente ou cristalino e corpo vítreo (Figura 1-B) (Nishida 2005; Nogueira 2015).

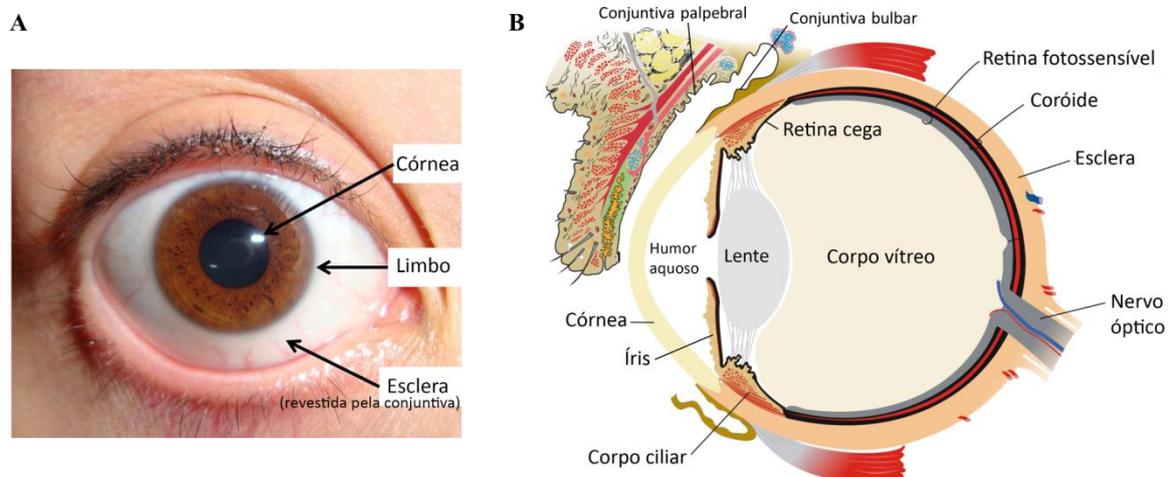


Figura 1: Fotografia do bulbo ocular (Baylis et al. 2011) (A). Desenho esquemático do bulbo ocular. Adaptado e reproduzido com permissão de Nogueira (2015).

A córnea é uma estrutura transparente e avascular que forma a porção anterior da túnica externa do globo ocular. Ela contribui, juntamente com a esclera, para a definição da forma do bulbo ocular e protege as estruturas oculares internas contra agentes externos (microorganismos, traumas físicos e químicos). Além disso, a córnea é considerada o elemento refrativo primário do sistema visual sendo responsável por, aproximadamente, 75% do poder de refração total do olho, desempenhando, assim, papel fundamental na formação da visão (Nishida 2005, Hamrah & Sahin 2015).

A ausência de vasos sanguíneos e linfáticos é um dos fatores que permite a transparência da córnea. Sendo, então, uma estrutura avascular, a oxigenação da córnea ocorre, principalmente, pelo filme lacrimal, uma fina camada de fluido que recobre a superfície exposta do bulbo ocular. A nutrição ocorre por difusão de nutrientes a partir do humor aquoso, do filme lacrimal e da rede capilar presente no limbo e nas pálpebras (Nishida 2005; DelMonte & Kim 2011; Nogueira 2015).

Anatomicamente, a face anterior da córnea humana é elíptica possuindo diâmetro horizontal de 11,7 mm e vertical de 10,6 mm. Em humanos, a córnea é mais fina no centro, apresentando espessura de 0,5 a 0,7 mm, e mais espessa na periferia, próxima do limbo, onde apresenta espessura entre 0,67 e 1,1 mm. Além disso, a córnea é esférica, já que sua curvatura não é uniforme, sendo mais curva na região central, com um raio de 7,8 mm, e mais aplainada na zona periférica, com raio de curvatura de 6,5 mm em média. A forma e a espessura da córnea variam entre as espécies e, até mesmo, entre as diferentes raças (Nishida 2005, DelMonte & Kim 2011).

Histologicamente, a córnea é constituída por seis camadas, sendo da mais externa para a mais interna, respectivamente: epitélio anterior, camada de Bowman ou membrana limitante anterior, estroma ou substância própria, camada pré-Descemet ou camada de Dua, membrana de Descemet ou membrana limitante posterior e epitélio posterior ou endotélio (Figura 2). O epitélio anterior origina-se, embriologicamente, do ectoderma superficial, enquanto o estroma e endotélio derivam da crista neural (Ross & Wojciech 2011; Nogueira 2015).

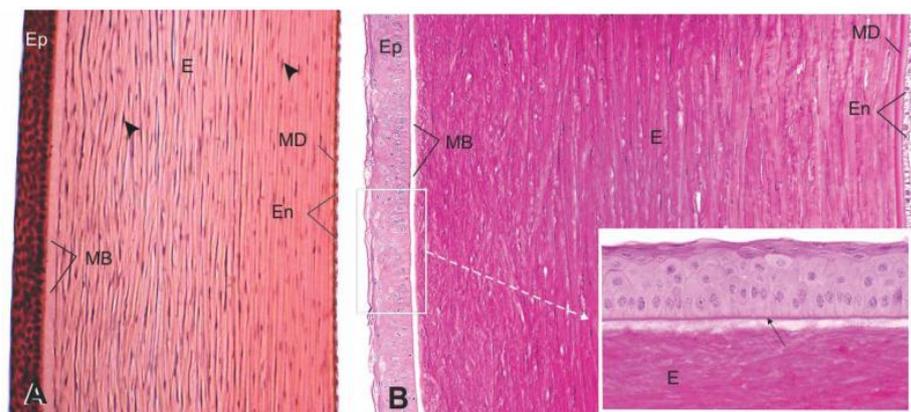


Figura 2: Histologia da córnea humana nas regiões central (A) e periférica (B). Camadas estruturais: epitélio anterior (Ep), camada de Bowman (MB), estroma (E), membrana de Descemet (MD) e epitélio posterior ou endotélio (En). Cabeças de seta apontam núcleos de ceratócitos. Seta aponta membrana basal do epitélio anterior. Reproduzido com permissão de Nogueira (2015).

O epitélio anterior da córnea é estratificado, pavimentoso, não-queratinizado e corresponde, aproximadamente, a 10% da espessura total da córnea. Este epitélio é constituído por cinco a sete camadas de células (CECs – *corneal epithelial cells*), sendo da mais externa para a mais interna: duas ou três camadas de células superficiais, duas ou três camadas de células aladas e uma camada de células basais. O epitélio anterior possui espessura total de 50 a 60 µm, sendo mais espesso na periferia, onde possui cerca de dez camadas celulares (Hamrah & Sahin 2015; Nogueira 2015).

As células superficiais formam entre duas e três camadas de células pavimentosas e alongadas com núcleos picnóticos basais e microvilos apicais. Essas células são mantidas sempre úmidas pelo filme lacrimal. Os microvilos e micropregas apicais aumentam a superfície de contato e retêm o filme lacrimal, o qual preenche pequenas irregularidades da superfície celular tornando-a lisa e uniforme, criando assim, uma superfície ideal para a correta refração da luz. As células da camada superficial estão fortemente unidas entre si por interdigitações de membrana, desmossomos e zônulas de oclusão, que permite a elas atuarem como uma barreira à penetração de substâncias estranhas e, também, evita a descamação prematura e excessiva dessas células. As zônulas de oclusão formam uma barreira mecânica e regulam o trânsito de fluidos para o estroma da córnea. Após tempo de vida de alguns dias, as células superficiais descamam, gradativamente, e são liberadas no filme lacrimal (Ross & Wojciech 2011; Nogueira 2015).

A camada média ou das células aladas é composta por duas a três camadas de células poligonais, sendo que seu número aumenta em direção à periferia da córnea, podendo alcançar até cinco camadas celulares nessa região. Interdigitações de membrana, desmossomos e zônulas de adesão mantêm unidas as células contíguas (Nogueira 2015).

A camada basal é constituída por células prismáticas com núcleo ovoide ou redondo, sendo as células que apresentam maior atividade celular, com alta taxa de mitose. Essas células unem-se entre si e às células aladas por meio de interdigitações de membrana, desmossomos e zônulas de oclusão. As células basais proliferam e migram, progressivamente, para a superfície, repondo as células que são perdidas pela descamação do epitélio. À medida que migram para a superfície, as células epiteliais tornam-se pavimentosas e sua atividade metabólica declina progressivamente. As células basais, por sua vez, derivam de células-tronco localizadas na camada basal do epitélio límbico (LSCs - *limbal stem cells*). As LSCs proliferam por mitoses e células-filhas resultantes (células amplificadoras transitórias) migram centriptamente, a partir do limbo e, verticalmente, a partir da camada basal para a

superfície promovendo, dessa forma, a renovação constante e reparação do epitélio corneano anterior. Esse epitélio possui grande capacidade de regeneração e cicatrização, sendo totalmente renovado em cerca de sete dias (Dua & Azuara-Blanco 2000; Hamrah & Sahin, 2015).

As CECs presentes em cada camada do epitélio anterior expressam diferentes marcadores bioquímicos do processo de diferenciação. As LSCs e as células mais indiferenciadas presentes na camada basal expressam o fator de transcrição deltaN-p63, que possui papel essencial no desenvolvimento e proliferação das células epiteliais (Pellegrini et al. 2001; Arpitha et al. 2005). As células maduras presentes nas camadas mais superficiais do epitélio corneano anterior expressam citoqueratina 3 (CK3) e citoqueratina 12 (CK12), consideradas marcadores específicos de CECs terminalmente diferenciadas (Shiraishi et al. 1998; Tanifuji-Terai et al. 2006).

As células basais do epitélio corneano anterior estão aderidas, por meio de hemidesmossomos, à membrana basal do epitélio. Os principais componentes dessa membrana são: colágeno tipo IV, fibronectina, glicoproteínas (laminina e entactina), colágeno tipo VII e proteoglicanos. Além de fornecer um suporte firme para o epitélio sobrejacente, a membrana basal regula os processos de proliferação e diferenciação celular e atua como rota para a migração das LSCs. Dessa forma, a membrana basal desempenha papel importante na renovação contínua e reparação do epitélio corneano (Hamrah & Sahin, 2015; Nogueira 2015).

Além das CECs, encontram-se também no epitélio anterior da córnea, pequeno número de células de defesa imunológica (células de Langerhans) e grande densidade de terminações nervosas não mielinizadas, conferindo acentuada sensibilidade à córnea, a qual corresponde à estrutura mais densamente inervada do corpo (Nishida 2005, DelMonte & Kim 2011; Nogueira 2015).

Abaixo da membrana basal situa-se a camada de Bowman, uma estrutura acelular e homogênea, com espessura de 6 a 15 μm , composta por fibrilas colágenas dispostas aleatoriamente e proteoglicanos (Nishida 2005).

O estroma está localizado subjacente à camada de Bowman e corresponde, aproximadamente, a 90% da espessura total da córnea, provendo suporte mecânico e estrutural à mesma. É constituído por múltiplas camadas de fibras colágenas (lamelas) dispostas paralelamente entre si e à superfície corneana, organizadas regularmente em planos sucessivos e em vários ângulos. Essas fibras colágenas são constituídas, predominantemente,

por colágeno do tipo I e, também, por fibrilas colágenas dos tipos V, III, VI e XII. As fibras de uma lamela passam para outras, unindo-as firmemente entre si, conferindo à córnea grande resistência a deformações e forças de tração. A substância fundamental do estroma é formada por proteoglicanos e glicosaminoglicanos. A disposição estrutural altamente organizada das lamelas de colágeno e a afinidade da matriz extracelular pela água são responsáveis pela transparência da córnea e refração adequada da luz. O estroma possui baixa densidade de células, dentre as quais destacam-se os ceratócitos, que apresentam características de fibroblastos e são responsáveis pela síntese, manutenção e reparação da matriz extracelular estromal. Raramente, macrófagos e leucócitos são encontrados no estroma (Nishida 2005, DelMonte & Kim 2011; Nogueira 2015).

Em 2013, foi descrita uma nova camada na córnea humana, denominada camada pré-Descemet ou camada de Dua, localizada no estroma posterior (Dua et al. 2013).

Internamente à camada de Dua, está localizada a membrana de Descemet, que é uma estrutura acelular composta por fibrilas colágenas e glicoproteínas que são continuamente sintetizadas e excretadas pelas células do endotélio, se espessando, lentamente, com a idade. Corresponde a uma das membranas basais mais espessas do corpo humano, podendo alcançar até 10 μm de espessura (Nishida 2005, DelMonte & Kim 2011).

A superfície interna da córnea é revestida pelo endotélio, que, apesar dessa denominação imprópria, é um epitélio simples pavimentoso constituído por uma camada única de células hexagonais que possuem baixa ou nenhuma capacidade de replicação e regeneração *in vivo*. Essas células ajudam a manter a hidratação corneana em torno de 78%, por meio da ação de bombas de Na/K-ATPase, que transportam água para o interior da córnea e, também, para o humor aquoso. Esse mecanismo é fundamental para a manutenção da transparência da córnea. Além disso, zônulas de oclusão, presentes nas células do epitélio posterior, formam uma barreira entre o humor aquoso e o estroma, contribuindo para manter constante o nível de hidratação da córnea (Nishida 2005; Ross & Wojciech 2011; Hamrah & Sahin, 2015; DelMonte & Kim 2011; Nogueira 2015).

A integridade estrutural e funcional de todas as camadas que compõem a córnea é fundamental para a manutenção da transparência da mesma e para a visão. Assim, alterações nessas camadas podem levar à diminuição da acuidade visual e, até mesmo à cegueira.

1.2. Deficiência visual e transplante de córnea

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número estimado de pessoas com deficiência visual no mundo é de 285 milhões, sendo que destas, 39 milhões apresentam cegueira e 246 milhões de pessoas possuem deficiência visual moderada ou severa. O censo demográfico realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2010) em 2010 apontou que a deficiência visual é a deficiência física de maior ocorrência no Brasil, afetando 18,6% da população brasileira, o que corresponde a 35,6 milhões de pessoas. Segundo a OMS, as doenças corneanas são consideradas a quarta causa de cegueira no mundo, precedidas apenas pela catarata, glaucoma e degeneração macular relacionada com a idade. Estima-se que 10 milhões de pessoas, no mundo, possuam deficiência visual associada a doenças da córnea (Whitcher, Srinivasan, & Upadhyay 2001).

A córnea pode ser afetada por diversas doenças e injúrias, como lesões ulcerativas, ceratocone, leucoma, ceratopatia bolhosa, distrofias (sendo a mais comum a distrofia de Fuchs), infecções, inflamações, perfurações, dentre várias outras. Essas doenças levam à sua opacificação, deficiência visual moderada ou severa e até mesmo à cegueira (Moreira et al. 2013; Hamrah & Sahin 2015).

Muitas das doenças que afetam a córnea levando à diminuição da acuidade visual podem ser clinicamente tratadas pelo uso de medicamentos, óculos ou lentes de contato. No entanto, quando o dano à córnea é mais intenso, há a necessidade de substituir, total ou parcialmente, o tecido opacificado, degenerado ou irregular por um tecido sadio sendo necessária a realização de ceratoplastia ou transplante de córnea. Levando em consideração as suas variações técnicas, as ceratoplastias podem ser classificadas como penetrantes ou lamelares. A ceratoplastia penetrante consiste na substituição da córnea em sua espessura total, enquanto no transplante lamelar apenas as camadas doentes da córnea são seletivamente substituídas. A ceratoplastia lamelar pode ser anterior ou posterior (endotelial). A ceratoplastia lamelar anterior consiste na remoção do epitélio e estroma enquanto o endotélio saudável do receptor é conservado. Já o transplante lamelar endotelial envolve a substituição seletiva da membrana de Descemet e endotélio doente (Moreira et al. 2013).

Embora seja considerado o tipo de alotransplante mais frequente no mundo, o transplante de córnea apresenta algumas desvantagens dentre as quais as duas mais relevantes são: o risco de rejeição do enxerto levando à falência do transplante e a escassez de doações de córneas viáveis resultando em longa fila de espera (Gain et al. 2015; Borderie et al. 2011).

Estudos retrospectivos reportam que a taxa de sobrevivência do enxerto varia de 35% a 89% após dez anos da ceratoplastia penetrante, dependendo da condição patológica inicial que levou ao transplante (Williams et al. 2008; Wagoner et al. 2009; Tan et al. 2008). Nos casos de retransplante, obtém-se uma taxa de sucesso em torno de 53% aos cinco anos e 41% aos dez anos. As causas não imunológicas da falência do enxerto estão relacionadas à qualidade do mesmo, complicações pós-operatórias ou técnica cirúrgica imprópria, dentre outros fatores. Entretanto, apesar da córnea ser um tecido imunoprivilegiado, a maior parte das falências do transplante ocorre por rejeição imunológica, dos quais cerca de 20% são irreversíveis. A incidência de rejeição do enxerto é de mais de 10% no primeiro ano da ceratoplastia e aumenta para 25 a 50% a longo prazo (Moreira et al. 2013). Um estudo retrospectivo demonstrou que a incidência de rejeição do enxerto é de 23,2% após três anos do transplante de córnea (Borderie et al. 2011). Apesar dos avanços nas técnicas de ceratoplastia lamelar anterior, na qual o endotélio do receptor é conservado reduzindo o risco de rejeição do enxerto, esta não é uma técnica aplicável quando há comprometimento endotelial ou da espessura total da córnea. Assim, a rejeição imunológica permanece uma das principais desvantagens do transplante de córnea, aliada à disponibilidade limitada de córneas de qualidade (Moreira et al., 2013).

Embora o Brasil possua o maior programa público de transplantes de órgãos, tecidos e células do mundo, o Sistema Nacional de Transplantes não consegue suprir a alta demanda por transplante de córnea. Em 2016, foram realizados 14.534 transplantes de córnea no Brasil, mas ingressaram na lista de espera 21.192 pacientes. Apenas no primeiro trimestre de 2017, 4.454 pacientes ingressaram na lista, de tal forma que, em março de 2017, a lista nacional de espera por um transplante de córnea era de 11.072 pacientes ativos, sendo excedida apenas pela lista de espera para transplante renal, segundo dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (2017). A situação mundial não é diferente. Em um estudo recente, Gain e colaboradores quantificaram a escassez mundial de córneas para transplante e verificaram que há apenas 1 córnea disponível para 70 necessárias (Gain et al. 2015). Esses autores concluem que, para suprir a demanda mundial, além das políticas de incentivo à doação de órgãos, é essencial o desenvolvimento de estratégias complementares como a produção de córneas artificiais utilizando princípios da engenharia de tecidos.

1.3. Engenharia de tecidos da córnea

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida no desenvolvimento de substitutos biológicos com o intuito de regenerar, reparar e melhorar a função de tecidos ou órgãos lesados ou perdidos. Essa estratégia se baseia no cultivo de células em matrizes estruturais associadas à incorporação de moléculas sinalizadoras, visando a regeneração tecidual (Langer & Vacanti 1993).

O desenvolvimento de matrizes estruturais com características ideais é fundamental para o sucesso da engenharia de tecidos, uma vez que são elas que se ajustam anatomicamente ao tecido lesado e permitem a manutenção das células no local do implante, além de permitir a proliferação e diferenciação das mesmas favorecendo a regeneração tecidual. Diferentes biomateriais, sintéticos ou naturais, estão sendo investigados para o desenvolvimento dessas matrizes de suporte (Kim et al. 2000).

No campo da engenharia de tecidos da córnea, a matriz estrutural desenvolvida deve possuir propriedades semelhantes às da córnea nativa, ou seja, deve ser transparente e biocompatível; fornecer proteção contra insultos mecânicos, químicos e microbianos; ser não imunogênico e ter um índice de refração similar ao da córnea nativa a fim de permitir a refração adequada da luz (Ghezzi, Rnjak-kovacina, & Kaplan 2015).

Diferentes biomateriais, naturais e sintéticos, estão sendo estudados para o desenvolvimento de córneas artificiais em sua espessura total ou camadas individuais, como: nanofibras de poli(ϵ -caprolactona) com hidrogel de álcool polivinílico, hidrogel de nanohidroxiapatita e álcool polivinílico, poli(éster uretano) uréia, hidrogel de poli(etilenoglicol)/poli(ácido acrílico), poli(ácido láctico), hidrogel de gelatina, hidrogel de colágeno, filme de seda, hidrogel de fibrina e agarose, hidrogel de colágeno e quitosana, dentre outros (Mimura et al. 2008; Bakhshandeh et al. 2011; Fenglan et al. 2007; Wu et al. 2012; Levis et al. 2013; Lawrence et al. 2012; Ionescu et al. 2011). A maioria desses estudos consiste em testes *in vitro*, e alguns envolvem testes *in vivo* em modelo animal. Além disso, há um estudo clínico envolvendo o uso de colágeno humano recombinante tipo III na reconstrução corneana (Fagerholm et al. 2014).

Atualmente, lentes artificiais ou ceratopróteses são utilizadas clinicamente para substituir córneas de pacientes com grave perda visual e que possuem alto risco de rejeição imunológica após transplante de córnea convencional. Diversos tipos de materiais como polimetilmetacrilato, Teflon, Goro-Tex, poli (2-hidroxietil metacrilato), Dacron, estão sendo estudados e utilizados na confecção de ceratopróteses (Moreira et al.2013). No entanto, as

mais utilizadas, atualmente, são a ceratoprótese de Dohlman-Doane (Boston Kpro), composta por dois platôs de polimetilmetacrilato e um anel de titânio e; a AlphaCor, fabricada com poli (2-hidroxietil metacrilato) (Khan et al. 2007; Gomaa et al. 2010). Apesar da evolução no desenvolvimento das ceratopróteses, o risco de extrusão devido à baixa biointegração com os tecidos oculares ainda é uma das principais complicações desse tipo de implante. Além disso, complicações como inflamações crônicas, glaucoma e deslocamento de retina também limitam o uso de ceratopróteses, fazendo com que poucos implantes desse tipo sejam realizados no mundo (Moreira et al.2013).

Diante do exposto, fica claro que o desenvolvimento de córneas artificiais com propriedades adequadas permanece um desafio. Embora tenham ocorrido avanços ao longo dos anos, os substitutos desenvolvidos até o momento estão associados com vários problemas como descrito acima.

Nesse contexto, a descelularização de órgãos e tecidos humanos emerge como uma ferramenta promissora para contornar os problemas relacionados ao transplante de córnea e à dificuldade de produção de substitutos ideais utilizando materiais sintéticos. O desenvolvimento de córneas artificiais com base em métodos de descelularização tem o potencial de gerar matrizes com propriedades semelhantes às das córneas humanas no que diz respeito à biocompatibilidade, integridade mecânica e transparência óptica (Gonzalez-Andrades et al. 2011). Além disso, o processo de descelularização resulta na completa remoção dos componentes celulares diminuindo assim a chance de rejeição do enxerto (Crapo, Gilbert, & Badylak 2011).

Quando comparadas com matrizes sintéticas, as córneas descelularizadas (CDs) fornecem um microambiente mais natural e específico para o crescimento, migração e diferenciação celulares (Shafiq et al. 2012). Esses processos celulares dependem de uma perfeita organização estrutural da matriz extracelular da córnea, a qual é muito difícil mimetizar em laboratório utilizando materiais sintéticos (Nara et al. 2016; Gonzalez-Andrades et al. 2011).

A descelularização de órgãos e tecidos humanos apresenta um grande potencial para a engenharia de tecidos da córnea devido, também, à disponibilidade de material para descelularização. Várias córneas são desprezadas para transplante devido ao tempo de preservação superior a 14 dias ou à baixa contagem de células. No entanto, muitas dessas córneas que são descartadas, possuem a matriz extracelular intacta e saudável (Wilson et al. 2015). Dessa forma, essas córneas podem ser descelularizadas e, posteriormente, colonizadas

com tipos celulares adequados permitindo a reconstrução das suas camadas e abrindo perspectiva de transplantes utilizando córneas que, geralmente, são descartadas (Hashimoto et al. 2015; Wilson et al. 2015).

Apesar da disponibilidade de material, há poucos trabalhos de descelularização de córneas humanas (Alio del Barrio et al. 2015; Shafiq et al. 2012; He et al. 2016; Zhang et al. 2015). Em contrapartida, a descelularização de córneas xenogênicas tem sido amplamente investigada (Fu et al. 2010; Hashimoto et al. 2010; Zhang et al. 2012; Bayyoud et al. 2012; Yoeruek et al. 2012; Yoeruek et al. 2012 a; Hashimoto et al. 2015; González-Andrades et al. 2015; Lynch, Wilson, & Ahearne 2016; Nara et al. 2016; Huang et al. 2017; Lee et al. 2014; Wu et al. 2014; Dai et al. 2012). Entretanto, do ponto de vista terapêutico, os transplantes xenogênicos implicam em maiores riscos de indução da resposta imunológica e falência do enxerto, além de maiores riscos de transmissão de patógenos (Kasimir et al. 2006). Dessa forma, transplantes de órgãos e tecidos de origem humana são preferíveis.

Além do desenvolvimento de matrizes estruturais com características ideais, outro desafio para o desenvolvimento de córneas artificiais se refere à escolha do tipo celular que será utilizado, tendo em vista que a fonte de células empregada na engenharia de tecidos exerce um papel essencial para o seu sucesso.

1.4. Fontes de células para aplicação na engenharia de tecidos da córnea

A utilização de células especializadas no campo da medicina regenerativa é limitada, tendo em vista que estas não podem ser coletadas em grande quantidade e, além disso, possuem limitada capacidade de expansão *in vitro*. Já as células-tronco possuem grande capacidade de proliferação e autorrenovação, além de possuírem a capacidade de responder a estímulos externos e se diferenciarem em linhagens celulares especializadas. Dessa forma, as células-tronco apresentam grande potencial para uso na medicina regenerativa (Mountford et al. 2008; Gepstein 2002).

As células-tronco estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto, no qual estão presentes em uma variedade de tecidos. As células-tronco podem ser classificadas, segundo seu potencial de diferenciação, em três grandes grupos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Wagers & Weissman, 2004).

O zigoto e as células do blastômero são considerados células-tronco totipotentes já que são capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários assim como os anexos embrionários (Fischbach & Fischbach, 2004).

As células-tronco embrionárias (ESCs - *embryonic stem cells*), extraídas da massa celular interna do blastocisto, são pluripotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular derivado dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma). As ESCs expressam os fatores de transcrição OCT-4, NANOG e SOX2 responsáveis pela manutenção do estado de pluripotência (Gokhale & Andrews 2009). O estabelecimento das primeiras linhagens de células-tronco embrionárias humanas (hESCs – *human embryonic stem cells*), em 1998, gerou enorme expectativa para seu uso terapêutico (Thomson et al. 1998; Gearhart 1998). Entretanto, o uso dessas é limitado devido ao envolvimento em questões éticas, religiosas e políticas referentes à utilização de embriões derivados da fertilização *in vitro* para sua obtenção (Schwindt et al. 2005). No Brasil, a Lei de Biossegurança número 11.105/05 regulamenta o uso de embriões humanos (Pereira, 2008). Outro problema referente ao uso das células-tronco embrionárias é a sua capacidade de formar teratomas (Mountford, 2008).

Uma forma de contornar os problemas referentes ao uso de ESCs pode ser a utilização de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs – *induced pluripotent stem cells*). Células diferenciadas podem ser induzidas ao estado de pluripotência semelhante ao das ESCs por meio da indução da expressão dos fatores de transcrição Oct3/4, SOX2, c-Myc e Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006). Estas células são denominadas células-tronco de pluripotência induzida. Embora muitos aspectos referentes à indução, cultivo e manutenção dessas células ainda devam ser esclarecidos, elas demonstram ser uma fonte promissora de células autólogas para utilização na medicina regenerativa (Volarevic et al. 2011, Takahashi & Yamanaka 2006). No entanto, assim como as ESCs, as iPSCs possuem potencial de formação de teratomas se injetadas em um estado indiferenciado (Schmitt et al. 2012).

Estudos demonstram a capacidade das ESCs e iPSCs em se diferenciarem em células do epitélio da córnea, sugerindo o potencial emprego dessas células para reconstrução e reparação da superfície ocular (Ahmad et al. 2007; Hayashi et al. 2017; Hayashi et al. 2012; Homma et al. 2004; Brzeszczynska et al. 2014; Aberdam et al. 2017; Cieślar-Pobuda et al. 2016).

Outra fonte promissora de células autólogas para utilização na medicina regenerativa são as células-tronco adultas. Estas são consideradas multipotentes, pois são capazes de originar células de diversos tecidos, mas não de todos os folhetos embrionários (Schwindt et al. 2005). Em relação às células-tronco pluripotentes, as células-tronco adultas apresentam capacidade de proliferação e diferenciação celular mais limitada.

As células-tronco adultas melhor estudadas e caracterizadas são as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais. As células-tronco hematopoiéticas dão origem a todas as células dos sistemas hematopoiético e imunológico e são utilizadas em transplantes para regeneração do sistema hematopoiético desde 1956 (Hipp & Atala, 2008).

As células-tronco mesenquimais foram primeiramente descritas como uma população de células aderentes extraídas da medula óssea com grande capacidade proliferativa e foram denominadas células formadoras de colônias fibroblásticas (Friedenstein 1968). Durante as décadas de 70 e 80, estudos demonstraram que essas células possuem a capacidade de diferenciação em linhagens celulares de origem mesodérmica como osteoblastos, condroblastos e adipócitos (Friedenstein et al. 1972). Em 1991, Caplan popularizou o termo células-tronco mesenquimais (MSCs - mesenchymal stem cells). Em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs o uso do termo células estromais mesenquimais multipotentes, mantendo o acrônimo MSC (Horwitz et al. 2005). Atualmente, é comum a utilização dos dois termos pela comunidade científica.

Estudos demonstram que as MSCs não se diferenciam apenas em tipos celulares da linhagem mesodérmica, sob condições especiais, elas também podem se transdiferenciar em linhagens celulares de origem ectodérmica e endodérmica (Kopen, 1999; Sato 2005; Li & Ikehara, 2013). Além da capacidade de diferenciação, as MSCs apresentam propriedades importantes de imunossupressão e imunorregulação, sendo capazes de modular a função de células do sistema imune inato e adaptativo, podendo induzir tolerância imune (Nauta & Fibbe, 2007; Williams & Joshua, 2011). Tem sido demonstrado também, que as MSCs apresentam fenótipo hipoinmunogênico, devido à baixa expressão de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias (Le Blanc & Ringdén, 2005). Assim, trabalhos sugerem que as MSCs possam ser transplantadas de forma autóloga (o paciente é seu próprio doador), alogênica (entre membros da mesma espécie) e em xenoenxertos (entre membros de espécies diferentes) (Vieira et al. 2008; Law & Chaudhuri, 2013).

Acredita-se que as MSCs se localizem por todo o organismo associadas à parede dos vasos sanguíneos e que contribuam para a manutenção da homeostasia tecidual e do sistema imune e que, diante de uma lesão, elas exerçam um papel de proteção dos tecidos injuriados contra repostas imunes exacerbadas, promovendo reposição celular e regeneração tecidual (da Silva Meirelles et al. 2008; Crisan et al. 2008; Schmitt et al. 2012).

Atualmente, células com características semelhantes às MSCs da medula óssea foram isoladas de diversos tecidos como tecido adiposo (Zuk et al. 2001), líquido amniótico (De

Coppi et al. 2007), sangue menstrual (Musina et al. 2008), polpa dental (Gronthos et al. 2000), sangue periférico (Kuznetsov et al. 2001), cordão umbilical (Secco et al. 2008), dentre outros.

Devido ao grande número de estudos descrevendo a presença de MSCs em diferentes tecidos e à variedade de métodos de isolamento, expansão e caracterização utilizados, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs os seguintes critérios mínimos para a definição de MSCs humanas (Dominici et al. 2006): (i) aderência à superfície plástica; (ii) no mínimo, 95% da população celular deve expressar os antígenos de superfície CD73, CD90, CD105 e, não devem expressar os antígenos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 α e HLA-DR (no máximo, 2% da população positiva); (iii) multipotência *in vitro*.

O tecido adiposo pode ser considerado a fonte mais abundante e acessível de MSCs para uso na medicina regenerativa (Strem et al. 2005; Mizuno, 2009), tendo em vista que esse tecido é um subproduto descartável de cirurgias plásticas obtido em grandes quantidades e por métodos pouco invasivos. Além disso, as MSCs derivadas do tecido adiposo apresentam frequência e taxa de proliferação maior e podem ser cultivadas por maior tempo sem senescer quando comparadas com as MSCs derivadas da medula óssea (Kern et al. 2006; Nakagami et al. 2006; Fraser et al. 2006).

Inúmeros estudos têm identificado a presença de fontes abundantes de MSCs em diferentes depósitos anatômicos de tecido adiposo, como no tecido adiposo subcutâneo do abdômen, do quadril e da região da tíbia, no tecido adiposo do omento e do mesentério e, no tecido adiposo infrapatelar (Dragoo et al. 2003; Tchkonina et al. 2006; Mochizuki et al. 2006; Fraser et al. 2007; Maiorana et al. 2009). Korn et al. (2009) desenvolveram o primeiro estudo de identificação de células-tronco nas bolsas de gordura da pálpebra humana capazes de se diferenciarem em adipócitos, células musculares lisas e em linhagens neuronais e gliais. Ho et al. (2011) evidenciaram que além do potencial de diferenciação em tipos celulares de origem mesodérmica, as células-tronco isoladas das bolsas de gordura da pálpebra humana (OFSCs - *orbital fat-derived stem cells*) também possuem o potencial de se diferenciar em células epiteliais da córnea. Estudo *in vivo* demonstrou a regeneração da superfície corneana promovida pela administração tópica de OFSCs (Lin et al. 2013).

1.5. Células-tronco e reconstrução da superfície corneana

O epitélio anterior da córnea é fundamental para a manutenção da transparência da córnea e para a visão. As LSCs, células-tronco responsáveis pela renovação constante e

reparação desse epitélio, estão localizadas na camada basal do epitélio límbico (Shortt et al. 2007). Além de ser fonte de células-tronco epiteliais para a superfície corneana, o limbo corneoescleral atua como uma importante barreira entre o epitélio corneano e o epitélio conjuntival impedindo a neovascularização e a invasão da superfície corneana pelo epitélio conjuntival ajudando a manter assim a transparência e integridade da córnea (Dua & Azuara-Blanco, 2000; Baylis et al. 2011).

A deficiência parcial ou total de LSCs (LSCD - *limbal stem cell deficiency*) pode ocorrer devido a uma variedade de causas como queimaduras químicas ou térmicas, Síndrome de Stevens-Johnson, ceratopatia induzida por lente de contato, penfigóide ocular cicatricial, tumores, infecções, dentre outras (Casaroli-Marano et al. 2013). Estas afecções que acometem a região límbica podem desencadear alterações significativas na córnea como a ocorrência de defeitos epiteliais persistentes, conjuntivalização (invasão da superfície corneana pelo epitélio conjuntival), opacificação, neovascularização, inflamação crônica e cicatrização estromal, levando à fotofobia, dor, diminuição da acuidade visual, podendo conduzir à cegueira (Ricardo, 2010). Estima-se que a deficiência de LSCs afeta milhões de pessoas ao redor do mundo sendo um dos grandes fatores responsáveis pelas doenças da córnea (Kolli et al. 2010; Sharma et al. 2011).

O tratamento para a LSCD unilateral consiste no transplante autólogo de limbo. Apesar da vantagem de não ser necessária a utilização de imunossupressores, esse procedimento apresenta o risco de provocar LSCD no olho doador, devido à remoção das LSCs. Nos casos bilaterais, são realizados transplantes alogênicos. Para minimizar a perda de tecido límbico e a possibilidade de induzir LSCD no olho doador, novas técnicas utilizam LSCs cultivadas *ex vivo* para transplante. Os transplantes autólogos ou alógenos de células epiteliais do limbo e da mucosa oral expandidas *ex vivo* são opções de tratamento para a deficiência de LSC (Pellegrini et al. 1997; Blazejewska et al. 2009; Sharma et al. 2011).

Devido à similaridade entre a composição proteica da membrana basal do epitélio límbico e a da membrana amniótica humana, esta última tem sido utilizada clinicamente na reconstrução da superfície ocular nos casos mais graves de defeitos epiteliais persistentes. No entanto, as propriedades mecânicas e ópticas da membrana amniótica não são adequadas e apresentam grande variabilidade inter e intra-tecido, tornando desvantajoso seu uso em contexto clínico (Crove et al. 2011).

Apesar do desenvolvimento de estratégias terapêuticas como o transplante de células epiteliais do limbo e da mucosa oral ainda não há terapias seguras para as formas mais severas

de LSCD, especialmente quando esta é bilateral. Assim, é importante pesquisar fontes alternativas de células-tronco autólogas para a reparação e reconstrução da superfície corneana deficiente de LSCs (Blazejewska et al. 2009). Nos últimos anos, pesquisas estão sendo conduzidas utilizando células-tronco epiteliais da conjuntiva (Tanioka et al. 2006), células-tronco da epiderme (Gao et al. 2007), ESCs (Wang et al. 2016; Homma et al. 2004; Ahmad et al. 2007), células-tronco epiteliais do folículo piloso (Blazejewska et al. 2009), células-tronco da polpa dental (Gomes et al. 2010), iPSCs (Hayashi et al. 2017; Cieślak-Pobuda et al. 2016).

A fim de direcionar a diferenciação das células-tronco em CECs, vários trabalhos buscam replicar, *in vitro*, os fatores presentes no nicho (microambiente) das LSCs (Aberdam et al. 2017; Ahmad et al. 2007; Blazejewska et al. 2009). Isso se deve ao fato de ser bem estabelecido que o nicho desempenha importante papel na manutenção das propriedades das células-tronco (Li & Neaves, 2006). Dessa forma, a manutenção das características de indiferenciação e proliferação das células-tronco do epitélio corneano são controladas por fatores presentes no seu nicho, incluindo colágeno IV, laminina, fibronectina e fibroblastos do limbo (Li et al. 2007; Ordonez & Girolamo, 2012). Estes fibroblastos constituem o principal componente do estroma celular do limbo e produzem várias citocinas e fatores de crescimento que promovem a cicatrização de feridas do epitélio da córnea pelas LSCs (Li & Tseng, 1996). Por essa razão, os fibroblastos do limbo são utilizados para condicionar o meio de cultura que é utilizado, posteriormente, para induzir a diferenciação de células-tronco em CECs (Brzeszczynska et al. 2014; Ahmad et al. 2007; Blazejewska et al. 2009; Notara et al. 2010; Amirjamshidi et al. 2011).

Tendo em vista a importante influência do nicho nos processos de proliferação e diferenciação celular e que as propriedades indutivas do nicho estão sendo utilizadas para direcionar a diferenciação das células-tronco em linhagens especializadas em vários trabalhos (Zeng et al. 2004; Vodyanik et al. 2005; Qiu et al. 2005; Ahmad et al. 2007), nosso grupo de pesquisa hipotetiza que a descellularização das córneas humanas permitirá a criação de um microambiente mais natural que poderá contribuir para a indução da diferenciação das células-tronco em CECs.

A maioria dos protocolos de indução da diferenciação das células-tronco em CECs ou de produção de meio condicionado por fibroblastos límbicos (MCFL) utilizam soro fetal bovino (SFB) como suplemento do meio de cultura (Homma et al. 2004; Aberdam et al. 2017; Notara et al. 2012, Sareen et al. 2014; Zhu et al. 2013; Ahmad et al. 2007; Gao et al. 2007;

Cièslar-Pobuda et al. 2016). No entanto, a ausência de elementos xenobióticos em culturas celulares é preconizada pelos protocolos de Boas Práticas de Manipulação como uma das formas seguras para utilização terapêutica das células-tronco e dos produtos da engenharia de tecidos (Lindroos et al. 2011).

O SFB é uma fonte indesejável de proteínas xenogênicas que podem ser internalizadas ou aderir à superfície das células-tronco provocando reações imunológicas (Spees et al. 2004; Martin et al. 2005; Heiskanen et al. 2007). Esse soro pode conter endotoxinas e ser uma fonte de microorganismos patogênicos, como vírus, bactérias e príons (Mannello & Tonti, 2007). Além disso, o SFB apresenta variações nas concentrações de nutrientes de um lote para o outro e sua composição não é completamente conhecida (Brunner et al. 2010; Isaac et al. 2011).

Dessa forma, diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de substituir o SFB por suplementos livres de componentes animais no cultivo celular como o soro humano alogênico ou autólogo (Pérez-Illarbe et al. 2009; Paula et al. 2013; Paula et al. 2015), o plasma humano autólogo (Lin et al. 2005), soro humano AB alogênico ou autólogo (Shahdadfar et al. 2005; Kocaoemer et al. 2007; Lindroos et al. 2010), plasma rico em plaquetas – trombina ativada (Bieback et al. 2009; Cho et al. 2011), lisado plaquetário humano (Bernardo et al. 2007; Bieback et al. 2009; Pérez-Illarbe et al. 2009) e meios de cultura quimicamente definidos, livres de soro (van der Valk et al. 2010; Gottipamula et al. 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS, as doenças corneanas são consideradas a quarta causa de cegueira no mundo, precedidas apenas pela catarata, glaucoma e degeneração macular relacionada com a idade. O único tratamento, no momento, para a maioria dessas doenças consiste no transplante de córnea. Entretanto, esse procedimento apresenta desvantagens como o risco de rejeição do enxerto levando à falência do transplante e a escassez de doações de córneas viáveis resultando em longa fila de espera. Um estudo mundial demonstrou que há apenas 1 córnea disponível para 70 necessárias para transplante necessárias (Gain et al. 2015). No Brasil, em março de 2017, a lista nacional de espera por um transplante de córnea excedia 11.000 pacientes, segundo dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos.

Nesse contexto, a pesquisa por novos substitutos de córneas humanas é imprescindível, sendo que o desenvolvimento de córneas artificiais com base em métodos de descclularização representa uma alternativa promissora. Muitas córneas são desprezadas para transplante devido à baixa contagem de células ou tempo de preservação, muitas das quais possuem a matriz extracelular intacta e saudável. Essas córneas podem ser descclularizadas e, posteriormente, colonizadas com tipos celulares adequados permitindo a reconstrução das suas camadas, abrindo perspectiva de transplantes utilizando córneas que, geralmente, são descartadas.

No entanto, não há, até o momento, nenhum protocolo padronizado e seguro para descclularização de córneas humanas, sendo que a maioria dos protocolos publicados utilizam córneas xenogênicas e não apresentam caracterização completa do tecido descclularizado levando a resultados imprecisos e conflitantes. Dos poucos trabalhos envolvendo córneas de origem humana, a maioria desenvolveu fatias do estroma corneano descclularizado (Choi et al. 2010; Alio del Barrio et al. 2015; He et al. 2016; Zhang et al. 2015). Entretanto, para a regeneração do epitélio corneano, é importante preservar a membrana basal das CDs, tendo em vista a importância do contato das CECs com esta estrutura no processo de diferenciação, migração e proliferação das mesmas. Dessa forma, no presente trabalho, pretendeu-se descclularizar córneas humanas inteiras e fazer uma caracterização ampla das mesmas, utilizando diferentes técnicas a fim de comprovar que os tratamentos empregados resultaram na total remoção dos componentes celulares e preservaram as propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular, especialmente da membrana basal.

Dentre os diferentes tipos de células disponíveis, as hESCs, hiPSCs e OFSCs apresentam grande potencial para utilização na engenharia de tecidos da córnea visando a

regeneração do epitélio corneano, tendo em vista que estudos demonstram a capacidade de diferenciação dessas células-tronco em CECs. Entretanto, nenhum estudo avaliou, até o momento, a capacidade dessas células em regenerar o epitélio de CDs humanas. O único trabalho que recelularizou a superfície epitelial de CDs com CECs derivadas de células-tronco utilizou córnea suína e hESCs (Zhu et al. 2013). Sendo assim, este é um estudo pioneiro, que visa colonizar a membrana basal de CDs humanas com OFSCs, hESCs e hiPSCs e promover a diferenciação dessas células em CECs. Pretende-se assim, analisar o efeito do contato direto das OFSCs, hESCs e hiPSCs com a membrana basal das CDs na indução da diferenciação das mesmas em CECs.

Para futura utilização clínica segura dos produtos da engenharia de tecidos é fundamental estabelecer condições de cultivo livres de componentes xenogênicos. A fim de eliminar os elementos xenobióticos no desenvolvimento da córnea artificial proposta neste estudo, além de descelularizar córneas de origem humana, utilizou-se também um *pool* de soro alogênico humano em substituição ao SFB para produção de todos os meios de cultura empregados tanto para isolamento, proliferação ou diferenciação de todos os tipos celulares.

O desenvolvimento deste projeto poderá contribuir para a criação de uma córnea artificial com potencial aplicação no campo da medicina regenerativa ocular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar córneas humanas descelularizadas, colonizar a membrana basal dessas córneas com OFSCs, hESCs ou hiPSCs e promover a diferenciação das mesmas em células do epitélio corneano utilizando meio indutor suplementado com soro humano.

3.2. Objetivos Específicos

- Descelularizar córneas humanas.
- Avaliar a remoção dos componentes celulares das córneas submetidas ao tratamento com NaCl ou NaCl + Nucleases.
- Analisar a preservação da matriz extracelular das córneas descelularizadas (CDs).
- Isolar, cultivar e caracterizar, fenotípica e funcionalmente, as células-tronco das bolsas de gordura da pálpebra humana (OFSCs) em meio suplementado com soro humano.
- Cultivar e caracterizar as hESCs e hiPSCs.
- Isolar, cultivar e caracterizar fibroblastos do limbo corneoescleral em meio suplementado com soro humano.
- Produzir o meio condicionado pelos fibroblastos límbicos.
- Colonizar a membrana basal das córneas descelularizadas com as OFSCs, hESCs e hiPSCs .
- Avaliar a adesão e viabilidade das OFSCs, hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs.
- Avaliar a capacidade de diferenciação das OFSCs, hESCs e hiPSCs em células do epitélio corneano quando cultivadas sobre as CDs ou laminina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Descelularização de córneas humanas

Botões corneoesclerais (n = 151) preservados em meio Optisol GS (Bausch e Lomb) e inviáveis para transplante, devido ao tempo de preservação ou baixa contagem de células, foram obtidos do Banco de Tecidos Oculares Humano do MG Transplantes/Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (Fhemig) de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (CAAE: 49967715.0.0000.5149) – Anexo (item 10.2). A idade dos doadores variou de 27 a 78 anos. Os seguintes métodos foram empregados para remover as células das córneas:

1. Tratamento com NaCl: O excesso de esclera foi removido e as córneas foram incubadas com solução de NaCl 1,5 M (Sigma-Aldrich) por 48 horas. Posteriormente, as córneas foram lavadas com tampão fosfato salina 0,15M, pH 7,2 (PBS – *Phosphate buffered saline*) por 72 horas (modificado de Shafiq et al. 2012).

2. Tratamento com NaCl + Nucleases: após a remoção do excesso de esclera, as córneas foram incubadas com solução de NaCl 1,5 M por 48 horas. Posteriormente, as córneas foram tratadas com 5U/mL de DNase e 150 µg/mL de RNase (ambas da Invitrogen) por 48 horas. As córneas foram, então, lavadas com PBS por 72 horas (Shafiq et al. 2012).

Todos os passos dos tratamentos 1 e 2 foram realizados sob agitação contínua e à temperatura ambiente, exceto o tratamento com nucleases que foi realizado a 37°C. A córnea direita foi submetida ao processo de descelularização, enquanto a córnea esquerda, proveniente do mesmo doador, foi utilizada como controle (CCs).

Após o processo de descelularização, avaliou-se se a opacificação das córneas ocasionada pelos tratamentos era reversível por meio da desidratação das mesmas em glicerol 100% (Sigma-Aldrich) por 10 minutos.

4.2. Avaliação da remoção dos componentes celulares e preservação da matriz extracelular das CDs

A ausência de componentes celulares assim como a integridade da membrana basal e do estroma das CDs foram avaliadas por meio de análises histológicas (coloração com hematoxilina eosina - H&E, método do Ácido Periódico de Schiff - PAS e *Alcian Blue* 8GX pH 2,5), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), quantificação de

DNA genômico, imunofluorescência e marcação nuclear com a sonda Hoechst conforme descrito abaixo:

4.2.1. Análises histológicas

Para processamento histológico, as CDs e CCs foram divididas ao meio e metade de ambas as córneas foram fixadas em Bouin (solução aquosa saturada de ácido pícrico/formol 37%/ácido acético) por 24 horas e, posteriormente, incluídas em parafina com a região central da córnea orientada transversalmente para a superfície de corte. Para tal, as amostras foram desidratadas com imersão em séries crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto I, II e III) e diafanizadas por meio da imersão em xilol. Em seguida, foi realizada a fase de infiltração, com imersão das amostras em três banhos de parafina a 58°C e, posteriormente, foi feita a inclusão em parafina. Cortes transversais de 7 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas e submetidos ao método de coloração com H&E, método do PAS ou *Alcian Blue* 8 GX, pH 2,5.

Para coloração com H&E, as lâminas foram desparafinizadas em xilol. Após, foi feita a hidratação dos cortes histológicos em uma série gradual de etanol (absoluto I e II, 95%, 80%, 70%) e incubação dos mesmos com hematoxilina por 40 segundos. As lâminas foram, então, incubadas com eosina por 40 segundos. Posteriormente, foi feita a desidratação em séries crescentes de etanol (70%, 90%, 100% I e II), a diafanização em xilol, e, por fim, a montagem das lâminas.

A preservação da membrana basal das CDs foi analisada, inicialmente, por meio da coloração com PAS. Para tanto, as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas com ácido periódico 0,5% por 15 minutos. As lâminas foram, então, lavadas com água e incubadas com reativo de Schiff por 20 minutos. Após banhos em água sulfurosa e água, as lâminas foram incubadas com hematoxilina por 5 minutos. Posteriormente, foi feita a desidratação, diafanização e montagem das lâminas.

Para coloração com *Alcian Blue*, após desparafinização e hidratação, as lâminas foram incubadas com o corante *Alcian Blue* 8 GX, pH 2,5, por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e os núcleos foram contracorados com hematoxilina por 40 segundos. Após desidratação e diafanização, foi feita a montagem das lâminas.

Os cortes histológicos foram observados e fotografados ao microscópio de luz (Olympus BX-41/câmera digital colorida Q-Color3 da QImaging).

4.2.2. Imunofluorescência e marcação nuclear com a sonda Hoechst

As CDs e CCs foram divididas ao meio e metade de ambas córneas foram fixadas em paraformaldeído tamponado 4% pH 7,2 *overnight* a 4°C. Após fixação, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas em soluções de sacarose 20% e 40% por duas horas em cada. Em seguida, as amostras foram embebidas em solução de inclusão para criostato (*OCT compound, Tissue-Tek - Optimal Cutting Temperature*) com a região central da córnea orientada transversalmente para a superfície de corte. Logo após inclusão em OCT, as amostras foram congeladas à -80°C. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos em criostato (Leica CM3050 S) e mantidos a -20°C até o momento de realizar a marcação para imunofluorescência.

Para tanto, os cortes foram lavados em PBS (3 vezes/5 minutos) para remoção do OCT e foi feita a permeabilização da membrana plasmática por meio da incubação em solução de triton-100X 0,3% em PBS por 20 minutos. Em seguida, foi feito o bloqueio de reações inespecíficas utilizando solução de albumina de soro bovino 1% (BSA – *bovine serum albumin*) em PBS (PBS/BSA) por 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados, *overnight*, a 4°C, com os seguintes anticorpos monoclonais não conjugados produzidos em camundongo diluídos em PBS/BSA: anti-colágeno tipo I (1:200, Abcam), anti-colágeno tipo IV (1:100, Santa Cruz Biotechnology). Foram utilizados também o anticorpo monoclonal não conjugado anti-laminina produzido em coelho (1:200, Abcam) e o anticorpo policlonal anti-fibronectina não conjugado produzido em coelho (1:100, Rockland), respectivamente. Após incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados com PBS (3 vezes/5 minutos) e incubados com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 anti-IgG de camundongo produzido em cabra, Alexa Fluor 555 anti-IgG de coelho feito em cabra ou Alexa Fluor 555 anti-IgG de cabra produzido em jumento (ambos da Invitrogen) diluídos em PBS/BSA 1%, 1:500, por 1 hora, em câmara úmida, protegidos da luminosidade e em temperatura ambiente. Controles negativos foram feitos adicionando o anticorpo secundário a cortes não marcadas com o anticorpo primário. A seguir, foi feita a incubação com a sonda Hoechst 33258 (Invitrogen), 1 µg/mL em PBS, por 20 minutos para marcação dos núcleos. Após lavagens com PBS (3 vezes/10 minutos), foi feita a montagem das lâminas utilizando *Hydromount* (National Diagnostics). As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas no Microscópio Confocal (Zeiss 5 Live) utilizando-se o programa ZEN (Zeiss) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG.

4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura

As CDs e CCs foram fixadas em solução de Karnovsky: glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, *overnight* a 4°C. Em seguida, as córneas foram lavadas em tampão fosfato (3 vezes/5 minutos) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato por 2 horas a 4°C. Após lavagens com água destilada (3 vezes/10 minutos), as amostras foram desidratadas em uma série ascendente de etanol: 30 - 50 - 70 - 80 - 95% (2 vezes/10 minutos cada) e, por fim, em álcool absoluto (3 vezes/10 minutos). Finalizada a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO₂ (Balzers, CPD-020). A seguir, as córneas foram montadas em suporte de alumínio padrão com a face anterior orientada para cima e foram, então, submetidas ao processo de metalização em ouro (Edwards Scancoat six). As imagens foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura (DSM-950 Zeiss) do CAPI do ICB UFMG.

4.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, *overnight*, a 4°C e, posteriormente, lavadas em tampão fosfato (3 vezes/5 minutos). As amostras foram, então, pós-fixadas utilizando fixador secundário composto por tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 1,5% e tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por 90 minutos. Após lavagens com água destilada (5 vezes/10 minutos), as amostras foram desidratadas em uma série ascendente de etanol: 35 - 50 - 70 - 85 - 95% (2 vezes/10 minutos cada) e, por fim, em álcool absoluto (3 vezes/10 minutos). Após essa etapa de desidratação, as amostras foram incubadas em acetona absoluta (2 vezes/20 minutos) para dar início ao processo de infiltração da resina. Foi realizada, então, uma pré-infiltração em resina epon diluída em acetona, sob agitação e nas respectivas proporções: 1:1 por 1 hora, 3:1 *overnight* e 4:1 por 1 hora. Por fim, as amostras foram fragmentadas e os fragmentos resultantes foram incluídos em resina epon, contendo o agente polimerizador Benzildimetilamina (DMP- 30), seguindo-se a polimerização sequencial em estufas a 45°C e 60°C por 18 e 24 horas, respectivamente. Os cortes transversais ultrafinos (90 nm) foram obtidos, montados em telas de cobre (200 mesh) e contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 10 minutos e citrato de chumbo (solução de Reynolds) por 5 minutos. Os cortes foram analisados no microscópio eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV, do Centro de Microscopia da UFMG.

4.2.5. Extração, quantificação e amplificação de DNA genômico

As CDs também foram caracterizadas quanto ao conteúdo de DNA residual por meio da quantificação de DNA genômico. Para extração do DNA total das CCs e CDs utilizou-se o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Os tecidos (25 mg) foram lisados pela incubação com o tampão ATL (Tissue Lysis Buffer) e proteinase K a 56°C por 2 horas sob agitação constante (900 rpm). Em seguida, adicionou-se o tampão AL às amostras que foram incubadas a 70°C por 10 minutos. Após adição de etanol, as amostras foram transferidas para colunas QIAamp Mini spin column e centrifugadas a 6000 x g durante 1 minuto. As colunas foram transferidas para tubos de coleta limpos e lavadas com o tampão AW (Wash Buffer) 1 e 2. O DNA presente nas colunas foi eluído com o tampão AE (elution buffer) após incubação por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação a 6000 x g por 1 minuto. Todos os reagentes, tubos e colunas foram fornecidos pelo kit. A quantificação do DNA obtido foi então determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer – Thermo Scientific). Esse experimento foi realizado três vezes em triplicata e os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão. Através do programa GraphPad Prism 5.0, os resultados foram plotados na forma de gráfico e comparados utilizando o teste *t-student*, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0.05$.

O DNA extraído foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme descrito abaixo (item 4.4.3.3). Para tanto, foram utilizados os iniciadores para DNA genômico: F: GTGAATCTCCCCGACAGC e R: TGTTTTGGGACACATTCAAAGC, que amplificam um fragmento específico do gene *Sox17* gerando um produto de 373 pb.

4.3. Meios de cultura

4.3.1. Meio de cultura basal

Foi utilizado o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Vetec); 100 unidades/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (PSA - Sigma-Aldrich); 60 mg/L de gentamicina (Schering-Plough) e 10% de soro humano (SH). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e este foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore).

4.3.2. Obtenção do *pool* de soro alogênico humano (SH)

O SH foi obtido de nove doadores voluntários, entre 20 e 37 anos, submetidos à técnica de coleta de sangue convencional com tubos para coleta de sangue a vácuo e sem anticoagulante (Vacuplast), de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG CAAE: 49967715.0.0000.5149) – Anexo (item 10.2). Nenhuma evidência clínica e laboratorial de doenças metabólicas, hepatites, vírus da imunodeficiência humana e outras complicações sistêmicas foram relatadas para estes doadores. Após a coagulação espontânea, o sangue total foi centrifugado a 252 g, à temperatura ambiente, por 10 minutos, para a separação do soro. O soro de diferentes doadores foi removido dos tubos de coleta e misturados para produzir o *pool* de SH. Posteriormente, o soro foi inativado a 56°C, por 30 minutos e congelado a -20°C.

4.3.3. Meios de diferenciação

4.3.3.1. Meio osteogênico

Ao meio de cultura basal suplementado com 10% de SH foram adicionados os seguintes fatores indutores: 10 mM de β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL de ácido ascórbico (Ecibra) e 0,1 µM dexametasona (Aché) (Zuk et al. 2001; Paula et al. 2013). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm.

4.3.3.2. Meio adipogênico

Ao meio de cultura basal suplementado com 10% de SH foram adicionados 1 µM de dexametasona, 10 µM de insulina (Eli Lilly), 200 µM de indometacina (Sigma-Aldrich) e 0,5mM de isobutil-metilxantina (Sigma-Aldrich) (Zuk et al. 2001). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, a seguir, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm.

4.3.3.3. Meio epitelial

Foi constituído pelo meio DMEM:F12 (Gibco), 10% de SH, 10 ng/mL do fator de crescimento epidermal humano (Invitrogen), 0,5 µg/mL hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 5 µg/mL insulina (Invitrogen), 5 µg/mL de transferrina (Invitrogen), 2nmol/L de triiodotironina (Santa Cruz Biotechnology), 0,1 µg/mL de toxina colérica (Sigma-Aldrich), 0,2 nM de adenina (Sigma-Aldrich), 5 mM de bicarbonato de sódio, 100 unidades/mL de

penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B e 60 mg/L de gentamicina (Ahmad et al. 2007). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm.

4.4. Isolamento e cultivo das OFSCs

As bolsas de gordura da pálpebra superior foram removidas durante blefaroplastia de sete pacientes saudáveis, com idade entre 51 e 69 anos, internados na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou na Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 49967715.0.0000.5149) – Anexo (item 10.2). Logo após a remoção da gordura, esta foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL contendo meio de cultura basal sem soro. O tecido foi então encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) localizado no ICB - UFMG.

Em capela de fluxo laminar, as bolsas de gordura palpebrais foram lavadas com PBS e picotadas. Em seguida, o tecido foi tratado com solução de colagenase tipo I 0,10% (Life Technologies) em PBS, por 1 hora, em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ para digestão da matriz extracelular. Durante esse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo a gordura era agitado vigorosamente. Decorrido o período de 1 hora, a digestão foi interrompida pela adição de meio de cultura basal. A seguir, o tubo foi centrifugado a 252 g por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo a fração celular foi ressuspensão em meio de cultura basal e transferido para garrafas de cultura celular T-25 (Sarstedt) que foram mantidas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Após dois dias de cultivo, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para tubos de polietileno (50 mL) e centrifugado a 252 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado suspenso em meio de cultura basal e acondicionado em nova garrafa de cultura celular T-25.

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS para remoção de células sanguíneas residuais e não aderentes. Quando as células atingiram 70-80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e tratadas com tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal e a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura celular. As OFSCs foram expandidas, dessa maneira, até a terceira ou quarta passagem para serem utilizadas nos experimentos.

4.4.1. Caracterização imunofenotípica das OFSCs

As OFSCs foram caracterizadas por meio da análise da expressão protéica das moléculas de superfície celular CD105, CD73, CD90, CD166 e CD9 que são marcadores comuns de MSCs. Para verificar a existência de contaminações na cultura com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34, CD45, CD14 e CD19 que são marcadores expressos em células-tronco hematopoiéticas. As células também foram caracterizadas em relação à expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II: HLA-ABC e HLA-DR, respectivamente (Lindroos et al. 2010; Dominici et al. 2006; Mitchel et al. 2006; Halfon et al. 2011).

As OFSCs foram caracterizadas por citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos monoclonais não conjugados produzidos em camundongo: anti-CD34 (Santa Cruz Biotechnology), anti-CD14, anti-CD19, anti-CD45, anti-CD166, anti-CD9 e anti-CD90 (BD Biosciences). Os seguintes anticorpos monoclonais conjugados produzidos em camundongo foram utilizados: anti-CD73 conjugado à ficoeritrina (PE), anti-CD105 conjugado à fluoresceína de isotiocianato (FITC) (BD Biosciences) HLA-ABC-FITC e HLA-DR-FITC (Abcam).

As células, na quarta passagem, foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células/poço em placa de 96 poços (fundo em U) e incubadas com 0,4 µg de anticorpos primários a 4°C, por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-IgG de camundongo feito em cabra (Invitrogen), na diluição de 1:500 à 4 °C por 30 minutos. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e fixadas em formaldeído a 4% (Cromaline). Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade com a finalidade de estabelecer a população a ser analisada.

A obtenção dos dados foi realizada por meio do citômetro de fluxo Guava easyCyte 6-2L (Millipore). Foram adquiridos 5000 eventos, em triplicata, e os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo. Primeiramente, a população de células de cada cultura a ser avaliada foi delimitada a partir do gráfico de tamanho *versus* granulosidade gerado pela análise das células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, um gráfico de histograma foi criado para determinar a região do controle negativo de

fluorescência referente às células incubadas apenas com o anticorpo secundário. Definidos estes parâmetros, foram realizadas as análises das células marcadas, com anticorpos primários e secundários.

4.4.2. Caracterização funcional das OFSCs

As OFSCs foram caracterizadas, funcionalmente, quanto à capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. A fim de comprovar o comprometimento das OFSCs com essas linhagens celulares, foram realizadas colorações histológicas e avaliação da expressão gênica de marcadores dessas linhagens conforme descrito a seguir:

4.4.2.1. Diferenciação osteogênica

Para promover a diferenciação osteogênica, as OFSCs, na quarta passagem, foram semeadas na densidade de 5×10^2 células/poço em placas de 6 poços e cultivadas na presença do meio osteogênico (item 4.3.3.1). As placas foram incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 21 dias. Como controle, as células também foram cultivadas em meio de cultura basal, na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Todas as culturas e experimentos envolvendo o meio de diferenciação osteogênico foram realizados em condições de mínima luminosidade.

Ao término do período de 21 dias de indução da diferenciação osteogênica, foi feita a avaliação qualitativa da formação de matriz mineralizada por meio da coloração de von Kossa. Para tanto, as células foram lavadas com PBS e fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas. Após a fixação, as células foram lavadas com água destilada e incubadas em solução de nitrato de prata 5% (AgNO₃) (Vetec) em água e expostas a luz ultravioleta por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada para posterior adição de solução de 5% de tiosulfato de sódio (Cinética Química Ltda) em água, por 5 minutos. Foi realizada lavagem com água destilada e, posteriormente, as células foram coradas com eosina por 40 segundos. Foi feita a observação ao microscópio de luz (OLYMPUS IX70) e fotodocumentação (Olympus Evolt E-300) para demonstração da presença de mineralização indicada pela coloração negra ou marrom.

A fim de avaliar a deposição de cálcio durante indução da diferenciação osteogênica, foi feita a coloração com *Alizarin Red S*, que cora a matriz extracelular rica em cálcio em vermelho. Para tanto, após 21 dias de cultivo, as células foram lavadas com PBS e fixadas

com álcool etílico 70% por 1 hora a 4°C. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e, posteriormente, com água Mili-Q. Foi adicionado 1 mL do corante *Alizarin Red S* a 2% e as células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este período, o excesso de corante foi retirado e as células foram lavadas abundantemente com água Mili-Q. Após, foi feita lavagem com PBS por 15 minutos seguida de lavagem rápida com água Mili-Q e secagem à temperatura ambiente. As células foram observadas ao microscópio de luz (OLYMPUS IX70) e fotografadas (Olympus Evolt E-300).

4.4.2.2. Diferenciação adipogênica

No intuito de promover a diferenciação adipogênica, as OFSCs, na quarta passagem, foram semeadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 6 poços e cultivadas na presença do meio adipogênico (item 4.3.3.2). As placas foram incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 21 dias. Como controle, as células também foram cultivadas em meio de cultura basal, na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias.

Ao término do período de indução, a coloração com *Oil Red O* foi realizada a fim de confirmar a diferenciação adipogênica por meio da coloração de lipídeos presentes no interior das células. Para tanto, as células lavadas com PBS e fixadas com formalina 10% (Cromaline) por 60 minutos. Foi preparada uma solução de uso do *Oil Red O* (Thermo Scientific) composta por 3 partes da solução estoque (300 mg de *Oil Red O* em 100 mL de isopropanol 99%) para 2 partes de água destilada. Após o preparo, essa solução de uso foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, filtrada em papel filtro. Após o período de fixação, as células foram lavadas com água destilada e isopropanol 60% (Vetec) por 5 minutos. As células foram, então, incubadas com solução de uso de *Oil Red O* por 5 minutos. Após lavagem com água destilada, foi feita a contracoloração com hematoxilina por 1 minuto. A seguir, as células foram lavadas novamente com água destilada, analisadas ao microscópio de luz (OLYMPUS IX70) e fotodocumentadas (Olympus Evolt E-300) para demonstração da presença de lipídeos corados em vermelho.

4.4.2.3. Diferenciação condrogênica

Para promover a diferenciação condrogênica, as OFSCs, na quarta passagem, foram cultivadas em um sistema de *pellet* de células. Para tanto, 5×10^5 células foram centrifugadas a 800 g por 5 minutos em tubos de polietileno de 15 mL (Sarstedt). O sobrenadante foi

desprezado e o *pellet* de células formado foi cultivado na presença do meio comercial StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies) por 21 dias. Os tubos de polietileno contendo os *pellets* celulares foram incubados em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 21 dias. O meio de cultura foi renovado duas vezes por semana.

A fim de visualizar a deposição de proteoglicanos e glicosaminoglicanos durante a indução da diferenciação condrogênica, foi feita a coloração com *Alcian Blue*, o qual cora proteoglicanos da matriz extracelular em azul. Para tanto, ao término do período de 21 dias, os *pellets* de células foram lavados com PBS e fixados com formaldeído 10% por 1 hora. Após a fixação, os *pellets* foram incluídos em parafina conforme descrito no item 4.2.1. Cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas e corados com *Alcian Blue* 8GX 1% (Sigma-Aldrich) em ácido acético 3%, pH 2,5. Para tanto, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas conforme descrito no 4.2.1. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o corante *Alcian Blue* 1%, pH 2,5, por 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente e os núcleos foram contracorados com hematoxilina por 40 segundos. Após lavagem em água corrente e desidratação, foi feita a montagem das lâminas. As secções dos *pellets* foram observados ao microscópio de luz e fotografados (Olympus BX-41/acoplado a câmera Q-Color3 digital da QImaging).

4.4.3. Avaliação da expressão gênica de marcadores das linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica

A capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica das OFSCs também foi avaliada por meio da análise da expressão gênica de marcadores dessas linhagens celulares por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Para tanto, após 21 dias de cultivo, o RNA total das células controle (mantidas em meio basal) e das células induzidas às diferenciações foi extraído, a primeira fita de cDNA foi sintetizada e, por fim, foi realizada a PCR, conforme descrito a seguir.

4.4.3.1. Extração de RNA total

O RNA total foi isolado das células utilizando-se 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) por poço da placa de 6 poços. Após incubação com o Trizol, por 5 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) à solução formada. Após agitação vigorosa, a solução foi centrifugada a 12000 x g, por 15 minutos, a 4°C. A fase superior aquosa foi transferida para novo tubo de 1,5 mL (Axygen), onde foram adicionados

500 µL de álcool isopropílico (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Sigma-Aldrich). Após centrifugação a 7500 x g, por 5 minutos, a 4°C e remoção do sobrenadante, o RNA foi solubilizado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer – Thermo Scientific). A qualidade do RNA foi testada em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich). As amostras foram estocadas a -80°C até o momento de uso.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 DNase Promega) à 37°C por 30 minutos em tampão apropriado. A seguir, foi feita a extração do RNA com fenol-clorofórmio (Sigma-Aldrich) e a precipitação com etanol.

4.4.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total, utilizando-se o RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. 1 µg de cada amostra de RNA total foi incubado com 0,5 µg de oligo(dT)₁₈ a 65°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados às amostras, 5X *reaction buffer*, 20 unidades Ribolock™ RNase inhibitor, 2 µL de dNTP mix (10mM) e 200 unidades da enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV RT e as amostras foram incubadas por 60 minutos à 42°C. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70°C por 10 minutos. A concentração do cDNA obtido foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer – Thermo Scientific). A primeira fita de cDNA obtida foi utilizada nas reações de PCR descritas a seguir.

4.4.3.3. Reação em cadeia da polimerase

A primeira fita de cDNA sintetizada foi utilizada na PCR objetivando a amplificação específica de fragmento dos genes *fosfatase alcalina*, *osteopontina*, *colágeno tipo I*, *leptina*, *transportador de glicose GLUT 4 (GLUT 4)*, *receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARG2)*, *proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP)*, *colágeno tipo X*, *agrecan*. Como controle interno da reação também foi amplificado o segmento gênico que codifica a *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, enzima expressa constitutivamente pelas células. Para reações de 10 µL de volume final, foram utilizados: 1X

Green Go Taq Reaction Buffer, 0,2mM de cada dNTP, 2mM MgCl₂, 5pM dos iniciadores (*primers*) específicos, 0,25 u de Go Taq DNA polimerase (Promega) e 100 ng de cDNA. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 1.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (PTC-100 MJ Research. Inc.) programado para um aquecimento inicial de 95°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45 segundos à temperatura de anelamento específica para cada par de *primer*, 72°C por 45 segundo. Para uma extensão completa dos produtos amplificados, adicionou-se um passo final de 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram fracionados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio (10 µg/mL) analisados em transluminador de luz ultravioleta no qual as imagens foram capturadas.

Tabela 1 – Dados dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para avaliar a multipotencialidade das OFSCs por PCR

Gene alvo* N° de acesso (NCBI)	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>FA</i> NM_000478.5	F: TGGTGGGAAGGAGGCAGAATTGAC R: CAGGACGCTCAGGGGGTAGA	581	56
<i>Col I</i> NM_000088.3	F: TGACGAGACCAAGAACTG R: CCATCCAAACCACTGAAACC	600	62
<i>OSP</i> NM_001040058.1	F: GCCGAGGTGATAGTGTGGTT R: TGCTTGTGGCTGTGGGTTTC	253	51
<i>GLUT 4</i> NM_001042.2	F: TCTTCGAGACAGCAGGGGTA R: AGATGGCCACAATGGAGACG	228	60
<i>Lep</i> NM_000230.2	F: GAACCCTGTGCGGATTCTTG R: TGAAGTCCAACCGGTGACT	177	60
<i>PPARG2</i> NM_015869.4	F: CTCCTATTGACCCAGAAAGCGA R: GCAGGCTCCACTTTGATTGC	310	60
<i>COMP</i> NM_000095.2	F: CTTCGGGAACTGCAGGAAAC R: GTTGATGCACACGGAGTTGG	495	59
<i>COL X</i> NM_000493.3	F: ACAGGCATAAAAGGCCCACT R: GCACACCTGGTTTCCCTACA	247	59
<i>Aggrecan</i> NM_001135.3	F: GAATCAACTGCTGCAGACCAGG R: TCCCCTTCGATGGTCCTGTC	230	60
<i>GAPDH</i> NM_002046.5	F: ACATCGCTCAGACACCATG R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	143	60

*FA – fosfatase alcalina; Col I - colágeno tipo I; OSP – osteopontina; GLUT 4 - transportador de glicose GLUT 4; Lep – leptina; PPAR γ 2 - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos; COMP - cartilage oligomeric matrix protein; COL X - colágeno tipo X ;GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base.

4.5. Cultivo e caracterização das células-tronco embrionárias e das células-tronco de pluripotência induzida

As linhagens de células-tronco pluripotentes humanas utilizadas no presente trabalho incluíram a linhagem de células-tronco embrionárias humanas (hESCs – *human embryonic stem cells*) H1, isoladas por Thomson et al. (1998) (Thomson et al. 2012) e a linhagem de células-tronco de pluripotência induzida iPS-DF19-9-11T (hiPSCs - *human induced pluripotent stem cells*), produzidas por Yu et al. (2009) a partir da reprogramação de fibroblastos dérmicos sem a utilização de vetores virais (Yu et al. 2009). Essas células foram gentilmente disponibilizadas pelo Professor Dr. Timothy Kamp, da University of Wisconsin. O cultivo das hESCs e hiPSCs foi realizado em placa de 6 poços recobertas previamente com Matrigel (Corning) utilizando meio mTeSRTM (Life Technologies). O meio foi renovado diariamente e, a cada 4-5 dias, foi realizada passagem manual das células na proporção 1:3-5 utilizando Edta 0,5mM (Sigma-Aldrich).

As hESCs e hiPSCs foram caracterizadas quanto à expressão de genes indicadores do estado de pluripotência: *OCT-4* (*Octamer- Binding Transcription Factor 4*), *NANOG*, *SOX2* (*sex determining region Y*)-*box 2* e *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*). Também foi avaliada a expressão de genes indicadores das diferenciações endodérmica (*AFP* - *alpha fetoprotein* e *Sox17* - (*sex determining region Y*)-*box 17*), ectodérmica (*GFAP* - *Glial fibrillary acidic protein*; *PAX6* - *paired box 6*) e mesodérmica (Brachyuri). Para tanto, foi feita a extração do RNA total, a síntese da primeira fita de cDNA que foi utilizada na PCR visando a amplificação específica de fragmento dos genes descritos acima conforme descrito no item 4.4.3.3. Os primers utilizados estão relacionados na tabela 2.

Tabela 2 – Dados dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para avaliar a pluripotência das hESCs e hiPSCs

Gene alvo* Nº de acesso (NCBI)	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>OCT-4</i> NM_002701.5	F: ATGTGGTCCGAGTGTGGTTC R: GACCCAGCAGCCTCAAAATCC	94	60
<i>NANOG</i> NM_024865.3	F: CAGAAGGCCTCAGCACCTAC R: ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC	111	60
<i>SOX2</i> NM_003106.3	F: TGGGTTCCGGTGGTCAAGTCC R: CTGGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC	67	60
<i>hTERT</i> NM_198253.2	F: CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA R: GGATGAAGCGGAGTCTGGA	145	60
<i>AFP</i> NM_001134.2	F: AGAGTTGCTAAAGGATACCAGGA R: AGGCCAATAGTTTGTCTCAC	301	52
<i>Sox17</i> NM_022454.3	F: GGCATGACTCCGGTGTGAAT R: CACACGTCAGGATAGTTGCAGTAA	103	60
<i>GFAP</i> NM_002055.4	F: CCCTGGACATCGAGATCGC R: TGTGCTCCTGCTTGGACTC	213	58
<i>PAX6</i> NM_000280.4	F: TCACAAACACCTACAGCGCT R: ATAACTCCGCCCATTCACCG	143	60
<i>Brachyuri</i> NM_003181.3	F: TCTACATCCACCCCGACT R: GCTGTCTCCGGGTTCTCTC	341	52
<i>GAPDH</i> NM_002046.5	F: ACATCGCTCAGACACCATG R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	143	60

* *OCT-4* - Octamer- Binding Transcription Factor 4; *SOX2* - (*sex determining region Y*)-box 2; *hTERT* - human telomerase reverse transcriptase; *AFP* - alpha fetoprotein; *Sox17* - (*sex determining region Y*)-box 17; *GFAP* - Glial fibrillary acidic protein; *PAX6* - paired box 6; *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base.

Foram feitas também análises, por imunofluorescência, da expressão dos fatores de transcrição relacionados à pluripotência, *OCT-4* e *NANOG*, pelas hESCs e hiPSCs. Para tanto, as células foram cultivadas por dois dias em lamínulas de vidro de 22 x 22 mm previamente revestidas com Matrigel e, posteriormente, fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS e foi feita a

permeabilização da membrana plasmática utilizando-se PBS/Triton-100X 0.2%, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5 minutos) e foi feito o bloqueio de reações inespecíficas com PBS/BSA 1% por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas, *overnight*, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários diluídos em PBS/BSA 1%: anticorpo monoclonal não conjugado anti-OCT-3/4 produzido em camundongo (1:100, Santa Cruz) ou anticorpo policlonal não conjugado anti-NANOG produzido em coelho (1:250, Abcam).

Após incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com PBS (3 vezes/5 minutos) e incubadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 anti-IgG de camundongo produzido em cabra, Alexa Fluor 555 anti-IgG de coelho produzido em cabra diluídos em PBS/BSA 1%, 1:500, por 1 hora em câmara úmida, protegido da luminosidade e em temperatura ambiente. Controles negativos foram feitos adicionando o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário.

A seguir, foi feita a incubação com a sonda Hoechst 33258 (Invitrogen), 1 µg/mL em PBS, por 20 minutos para marcação dos núcleos. Após lavagens com PBS (3 vezes/10 minutos), foi feita a montagem das lâminas utilizando *Hydromount* (National Diagnostics). As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas no microscópio (Olympus IX70) e fotografadas utilizando câmera acoplada (Qimaging).

4.6. Isolamento e cultivo dos fibroblastos límbicos

Para extração dos fibroblastos do limbo corneoescleral (FLs), vinte e um botões corneoesclerais preservados em meio Optisol GS e inviáveis para transplante foram obtidos do Banco de Tecidos Oculares do MG Transplantes/Fhemig.

Em capela de fluxo laminar, os botões corneoesclerais foram transferidos para placa de cultura celular de 10 centímetros. Após remoção da córnea central com trépano de 8 mm e da esclera, o tecido límbico foi lavado com PBS, cortado em pedaços de, aproximadamente, 1 mm², os quais foram tratados com solução de colagenase tipo I 3 mg/mL em PBS por 3 horas, em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. No decorrer desse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo o tecido límbico foi vigorosamente agitado. Decorrido o período de 3 horas, a digestão enzimática foi interrompida pela adição de meio de cultura basal. A seguir, o tubo foi centrifugado a 252 g por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo a fração celular foi suspenso em meio de cultura basal e

transferido para placa de 6 poços (Techno Plastic Products AG) que foi mantida em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Após dois dias de cultivo, o conteúdo da placa foi transferido para tubos de polietileno (50 mL) e centrifugado a 252 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado suspenso em meio de cultura basal e acondicionado em novo poço.

O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Quando as células atingiram 80-90% de confluência, elas foram tratadas com tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal e a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura celular. Os FLs foram expandidos, dessa maneira, até a terceira ou quarta passagem para serem utilizados nos experimentos.

4.6.1. Caracterização dos fibroblastos límbicos

Os FLs foram caracterizados quanto à expressão dos marcadores CD44, colágeno tipo I, fibronectina, CD106, *p63*, citoqueratinas 12 e 3 (*CK12* e *CK3*, respectivamente) por meio da técnica de imunofluorescência conforme proposto por Ahmad et al. (2007) (Ahmad et al. 2007). Para tal, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais não conjugados produzidos em camundongo: anti-*p63*, anti-citoqueratina 3/2p (ambos 1:100, Santa Cruz Biotechnology) e anti-CD106 (1:10, Abcam). Foram utilizados também os seguintes anticorpos monoclonais não conjugados produzidos em coelho: anti-CD44 (1:250, Abcam) e anti-colágeno tipo I (1:200, Rockland) e os anticorpos policlonais não conjugados produzidos em cabra e coelho: anti-citoqueratina 12 (1:100, Santa Cruz Biotechnology) e anti-fibronectina (1:100, Rockland), respectivamente. Os fibroblastos, na quarta passagem, foram fixados com paraformaldeído 4%, por 15 minutos. Posteriormente, foram submetidos à técnica de imunofluorescência, conforme metodologia descrita no item 4.5.

4.7. Obtenção do meio de cultura condicionado por fibroblastos límbicos

Os FLs, na quarta passagem e ao atingirem 100% de confluência, foram mitoticamente inativados com adição de 10 µg/mL de mitomicina C (Sigma-Aldrich) ao meio de cultura basal e incubação a 37°C por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio de cultura basal em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. No dia seguinte, o meio basal foi substituído por 200 µl/cm² do meio epitelial (Ahmad et al. 2007). O meio epitelial condicionado pelos FLs foi coletado diariamente e substituído por meio fresco durante sete dias. O meio obtido durante os sete dias foi misturado e centrifugado a 1000 rpm

por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm e estocado a -80°C. Após descongelamento, o meio condicionado foi misturado com meio epitelial fresco na proporção de 3:1 (75% de meio condicionado: 25% do meio epitelial fresco). O meio assim obtido foi denominado meio condicionado pelos fibroblastos límbicos (MCFL).

A fim de comprovar a inativação mitótica dos fibroblastos, foi feita a contagem dos mesmos utilizando um hemocítmetro (HBG) após 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após tratamento com mitomicina.

4.8. Colonização das córneas descélularizadas com as células-tronco

As CDs foram distribuídas em placas de 24 poços, com a superfície da membrana basal voltada para cima, sendo disposta uma CD por poço. As CDs foram incubadas em meio DMEM ou meio DMEM/F12 contendo 0,1 mg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B e 60 mg/L de gentamicina em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

No dia seguinte, as hESCs, hiPSCs (proporção de 1 poço confluyente de placa de 6 poços : 6 CDs) ou OFSCs (1x10⁴ células/CD) foram semeadas sobre a membrana basal das CDs e mantidas em cultivo com meio de cultura basal ou mTeSR™ por 7 dias.

4.8.1. Análise da adesão e viabilidade das OFSCs, hESCs e hiPSCs cultivadas nas CDs

A avaliação da adesão, viabilidade e distribuição das OFSCs, hESCs e hiPSCs cultivadas sobre a membrana basal das CDs, após 7 dias, foi realizada por meio de MEV e do ensaio de Calceína-AM (*Calcein Acetoxymethyl ester*). A Calceína-AM é um composto não fluorescente e permeável à membrana celular que, uma vez dentro de células viáveis é hidrolisado por esterases intracelulares em um composto fluorescente e impermeável à membrana. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 30 min em estufa a 37°C, 5% CO₂ com 5 µM de Calceína-AM (Invitrogen) em meio basal sem soro ou meio mTeSR™. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e visualizadas em Microscópio Confocal LSM 880 (Zeiss) utilizando-se o programa Zen (Zeiss).

A preparação para a MEV seguiu a metodologia descrita no item 4.2.3.

A fim de avaliar se as hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs mantiveriam o estado de pluripotência analisou-se a expressão dos genes *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, *hTERT*, *AFP*, *Sox17*, *GFAP*, *PAX6* e *Brachyuri* pelas células cultivadas sobre as CDs na presença do meio mTeSR™ por 7 dias. Para tal, foi feita a extração do RNA total, a síntese da primeira fita de

cDNA que foi utilizada na PCR visando a amplificação específica de fragmento dos genes descritos acima conforme descrito no item 4.4.3.3. Como controle interno da reação foi utilizado o gene *GAPDH*.

Um possível efeito indutor de diferenciação das matrizes descelularizadas sobre as hESCs e hiPSCs foi avaliado, também, por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Analisou-se a expressão relativa de transcritos gênicos para *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, *p63*, *PAX6*, *citoqueratinas 3 e 12* conforme metodologia descrita abaixo (item 4.9.1).

4.9. Indução da diferenciação das células-tronco em células epiteliais da córnea (CECs)

As hESCs, hiPSCs (proporção de 1 poço confluyente de placa de 6 poços:6 CDs) ou OFSCs (1×10^4 células/CD) foram semeadas sobre a membrana basal das CDs e mantidas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Dois dias após, o meio de cultura basal ou o meio mTeSR™ foi substituído pelo MCFL e as células foram cultivadas por 3, 6, 7, 9, 14 ou 21 dias na presença desse meio.

Após 21 dias, foi realizado o ensaio de Calceína-AM, conforme descrito no item 4.8.1, a fim de avaliar a viabilidade das células cultivadas sobre as CDs e mantidas na presença do MCFL.

Também foi avaliada a capacidade de diferenciação das OFSCs, hESCs e hiPSCs em CECs quando cultivadas sobre laminina. As OFSCs, hESCs e hiPSCs foram, inicialmente, cultivadas em placas de 6 poços previamente revestidos com laminina (Sigma-Aldrich). Para tanto, após descongelamento lento a 4°C, 2 µg/cm² de laminina em água foram adicionados a placas de 6 poços. Após incubação em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por duas horas, o excesso de laminina foi removido e os poços foram lavados três vezes com PBS.

As OFSCs, na quarta passagem, foram semeadas na densidade de 5×10^3 células/poço. As hESCs e hiPSCs foram semeadas na proporção de 1:3. Os três tipos celulares foram cultivados na presença do MCFL durante 3, 6, 9, 14 ou 21 dias, sendo os meios de cultura renovados a cada dois dias.

4.9.1. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A avaliação da diferenciação das OFSCs, hESCs e hiPSCs em CECs foi feita por meio da análise da expressão relativa de transcritos gênicos relacionados a essa linhagem. Analisou-se também a expressão relativa de transcritos gênicos indicativos do estado de

pluripotência (*OCT-4*, *NANOG* e *SOX2*) pelas hESCs e hiPSCs induzidas à diferenciação. Para tanto, após 3, 6, 9, 14 e 21 dias de indução da diferenciação, o RNA total foi extraído e a primeira fita de cDNA foi sintetizada conforme descrito no item 4.4.3.1 e 4.4.3.2.

4.9.1.1. Quantificação relativa dos transcritos gênicos por (qPCR)

Para as reações de qPCR, foram elaborados, com o auxílio do programa Primer3, versão 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene de interesse (Tabela 3 e Tabela 2 – dados dos *primers OCT-4*, *SOX2* e *NANOG*). Os parâmetros selecionados no programa para o desenho dos iniciadores foram: apresentar conteúdo de GC entre 40 e 60%, amplificar fragmentos com tamanho entre 70 e 150 pares de base (pb), apresentar temperatura de hibridização de 60°C.

Análises de parâmetros tais como conteúdo GC, formação de homodímero, heterodímero e estruturas secundárias estáveis (*hairpins*) foram realizadas usando o *software* OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). A especificidade das sequências selecionadas foi verificada usando o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), de forma a garantir que cada par de iniciadores amplificasse somente a sequência codificadora de interesse.

Tabela 3 - Sequências de *primers* utilizados nas reações de qPCR

Gene alvo* Nº de acesso (NCBI)	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)	Concentração <i>primers</i> (µM)
PAX6 NM_000280.4	F: TCACAAACACCTACAGCGCT R: ATAACTCCGCCCATTCACCG	143	0,1
p63 NM_001114982.1	F: ACGAAGATCCCCAGATGATG R: TGCTGTTGCCTGTACGTTTC	141	0,5
CK3 NM_057088.2	F: GAGAGTGTCCGAGTGCTGTC R: GCCGTAACCTCCTCCATAGC	86	0,4
CK12 NM_000223.3	F: GTTATGGGGGAAGTGCCTTTGG R: GCCGGAAGTACTAGAACCAACATG	83	0,1
GAPDH NM_002046.5	F: ACATCGCTCAGACACCATG R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	143	0,2

*PAX6 - paired box 6; p63 - tumor protein p63; CK3 - citoqueratina 3; CK12: citoqueratina 12;

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base.

A especificidade de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores foi confirmada por meio de experimentos de PCR e eletroforese em géis de agarose 2% (presença de *amplicons* únicos e dos tamanhos esperados para cada par de iniciadores). A especificidade da amplificação também foi confirmada por meio da análise das curvas de dissociação nas reações de qPCR, nas quais foram observadas a presença de um pico único e bem definido, sugerindo a presença de apenas um fragmento de DNA amplificado por cada par de iniciadores (Figura 3-A).

A seguir, foi realizado o teste de concentração de oligonucleotídeos iniciadores, sendo testadas as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 μM . A partir desse teste determinou-se a concentração ótima de cada par de iniciadores (Tabela 3).

Posteriormente, a eficiência de amplificação dos iniciadores foi determinada por meio de curvas padrão geradas por ensaios de qPCR contendo diluições logarítmicas seriadas de cDNA: 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 e/ou 10^{-1} ng (Figura 3-B). Para cada par de iniciadores foi utilizada uma amostra de cDNA controle (cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de córnea humana para os iniciadores *p63*, *PAX6*, *CK3* e *CK12* e cDNA sintetizado a partir de RNA extraído das hESCs para *NANOG*, *OCT-4*, *SOX2* e *GAPDH*). Cada diluição foi testada em triplicata. A partir dos valores de Cq (ciclo de quantificação) obtidos foi feita uma curva-padrão para cada par de iniciadores (Figura 3-C). O coeficiente angular da reta obtida (a, em $y = ax+b$) foi utilizado para cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores, por meio da seguinte fórmula: $E = 10^{[-1/a]}$ (sendo E = eficiência, a = coeficiente angular da reta). Foram aceitos valores de eficiência entre 1.85 e 2.1.

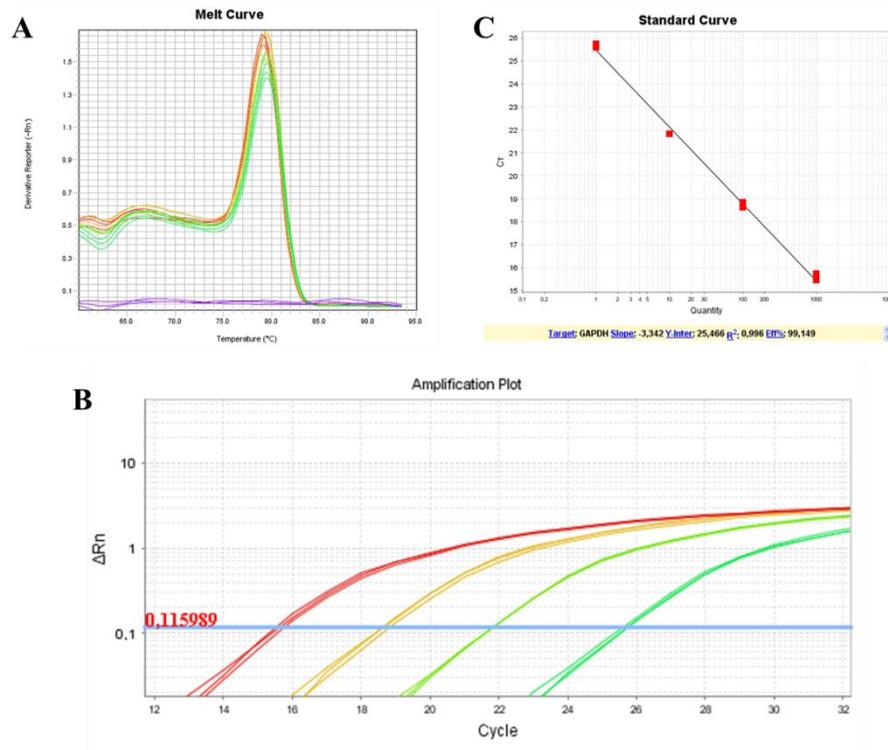


Figura 3: Exemplo da padronização das reações de PCR quantitativa em tempo real. (A) Curvas de dissociação obtidas para os transcritos relativos ao gene referência utilizado no presente estudo (*GAPDH*). É possível observar a presença de um pico único e bem definido, indicando a presença de um *amplicon* específico, cuja temperatura de *melting* é, aproximadamente, 80°C. É possível observar também que não ocorreu amplificação inespecífica e formação de dímeros de *primers*. (B) Resultado das amplificações com emprego dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *GAPDH*. É possível observar as curvas de amplificação referentes a cada diluição de cDNA testada. É notável a relação inversa existente entre a quantidade de cDNA presente na reação e o valor obtido de *Cq*. (C) Curva padrão correspondente à amplificação do gene *GAPDH* utilizando quatro diluições seriadas de cDNA (10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 ng). *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Todas as reações de qPCR foram feitas em triplicata e cada reação continha 5 μ L do reagente SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 ng de cDNA, cada par de oligonucleotídeos iniciadores em sua concentração ótima e água *nuclease-free* para um volume final de 10 μ L. Controles negativos foram feitos contendo água *nuclease-free* em substituição à amostra. As condições de amplificação consistiram em um passo inicial de 50°C por 2 minutos e desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por

15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). Todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de dissociação após os 40 ciclos de amplificação. Todos os ensaios de qPCR foram feitos na plataforma de instrumentação Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) e os dados foram processados utilizando o 7500 Software, versão 2.0.6 (Applied Biosystems).

A expressão relativa dos genes alvos foi determinada usando o método descrito por Pfaffl (Pfaffl 2001) no qual a quantificação relativa é determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CT alvo}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT ref}}}$$

na qual,

E_{alvo} = eficiência de amplificação do *primer* do gene alvo;

E_{ref} = eficiência de amplificação do *primer* do gene normalizador (*GAPDH*);

ΔCT = Ct controle – Ct amostra.

O grupo controle do experimento, correspondente ao cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de células indiferenciadas (tempo 0 de diferenciação), foi usado como calibrador e *GAPDH* foi utilizado como normalizador nos cálculos da expressão relativa.

Os resultados foram analisados utilizando o software REST (*Relative Expression Software Tool* 2009) que utiliza o modelo estatístico Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test para comparar a diferença de expressão relativa entre as células induzidas à diferenciação e as células indiferenciadas (Pfaffl, Horgan, & Dempfle 2002). Foram consideradas 2000 permutações e os valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram plotados na forma de gráfico utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os resultados apresentados representam a média \pm o erro padrão.

4.9.2. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por imunofluorescência

O comprometimento das hESCs e hiPSCs com a linhagem de CECs foi avaliado, também, por imunofluorescência. Para tal, após sete dias de indução da diferenciação, as células-tronco cultivadas sobre a laminina ou sobre as CDs foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 ou 60 minutos, respectivamente. Foram utilizados os anti-citoqueratina 3/2p e anti-citoqueratina 12 seguindo metodologia descrita no item 4.5.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da remoção dos componentes celulares

As córneas submetidas aos dois diferentes métodos de descclularização (tratamento com NaCl apenas ou tratamento com NaCl + Nucleases) mantiveram a sua estrutura tridimensional, embora tenham ficado edemaciadas e opacas como revelado por análises macroscópicas (Figura 4-B e D). Entretanto, essa opacificação foi revertida e a transparência foi recuperada após desidratação das CDs com glicerol (Figura 4-C e E).

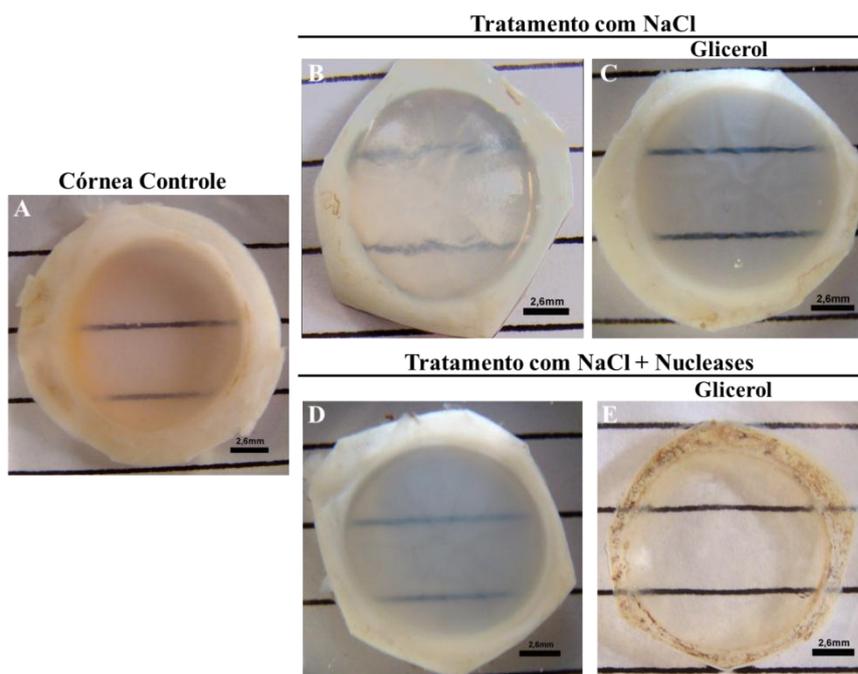


Figura 4: Visão macroscópica dos botões corneoesclerais controles não submetidos ao processo de descclularização (A) e dos botões corneoesclerais após tratamento com NaCl (B e C) ou após tratamento com NaCl + Nucleases (D e E). Após deturgência com glicerol, as CDs recuperaram a transparência (C e E). Barra = 2,6 mm. Imagem representativa de n = 3.

A capacidade dos dois diferentes métodos de descclularização empregados em remover totalmente as células das córneas foi avaliada, inicialmente, por coloração H&E. Foi possível visualizar, nos cortes histológicos das córneas submetidas ao tratamento apenas com NaCl, a presença de estruturas semelhantes a núcleos celulares no interior do estroma (Figura 5-B). Em contraste, verificou-se completa remoção das células, núcleos e restos celulares nas córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases (Figura 5-C).

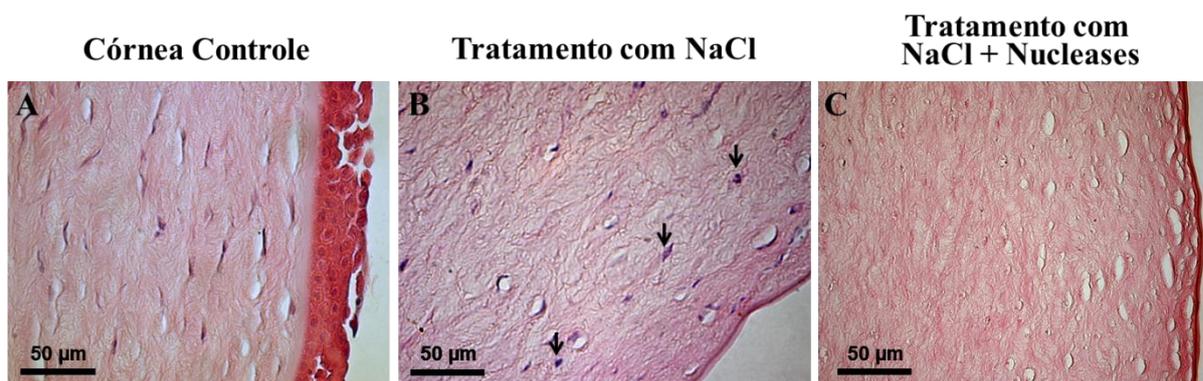


Figura 5: Cortes histológicos da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases (C) corados com hematoxilina e eosina. Setas apontam estruturas semelhantes a núcleos celulares corados pela hematoxilina no estroma das córneas submetidas ao tratamento apenas com NaCl (B). Barra=50 µm. Imagem representativa de n=3.

A partir das análises das imagens de microscopia de fluorescência após marcação nuclear com a sonda Hoechst confirmou-se que o tratamento apenas com NaCl resultou em remoção incompleta dos componentes celulares, já que foi possível visualizar a presença de núcleos celulares no interior do estroma das córneas submetidas a esse tratamento (Figura 6-B). Foi possível confirmar também que os núcleos celulares presentes no epitélio, estroma e endotélio das córneas controles (Figura 6-A) estão ausentes nas CDs pelo tratamento com NaCl + Nucleases (Figura 6-C).

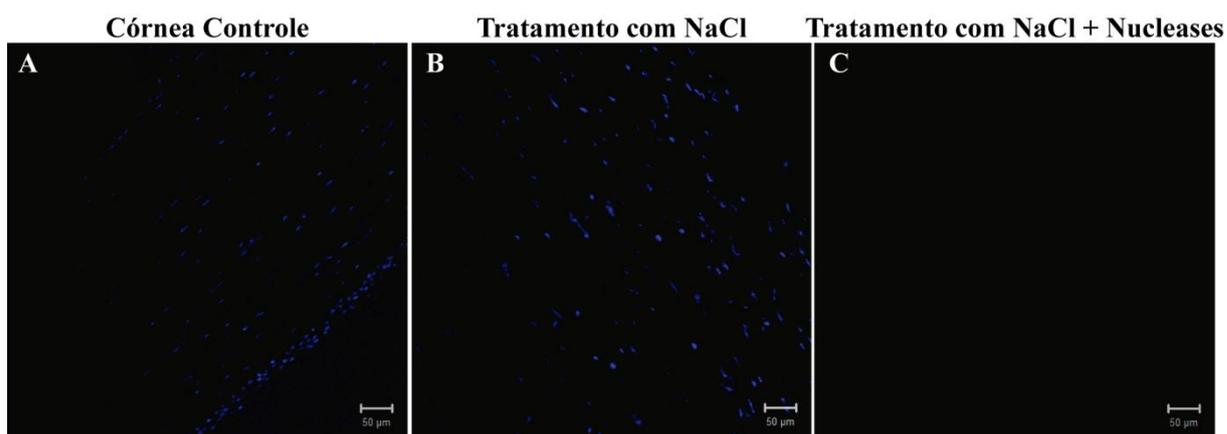


Figura 6: Imagens de microscopia de fluorescência, após marcação nuclear com a sonda Hoechst, de corte da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases (C). Presença de núcleos no estroma das córneas submetidas ao tratamento apenas com NaCl (B) e ausência de núcleos no epitélio, estroma e endotélio das córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases. Barra = 50 µm. Imagem representativa de n = 3.

Por meio da quantificação de DNA genômico, verificou-se a presença de DNA remanescente nas córneas submetidas ao tratamento apenas com NaCl, o qual levou à remoção de, em média, 43,6% do conteúdo de DNA das córneas (Figura 7-A). Em contraposição, as CDs por meio do tratamento com NaCl + Nucleases não continham DNA detectável em espectrofotômetro, indicando que, em média, 99,6% do conteúdo de DNA foi removido após esse tratamento (Figura 7-B). O DNA isolado das CCs e CDs foi usado como molde para PCR utilizando iniciadores para DNA genômico. Foi possível verificar a presença de banda referente à amplificação de segmento do DNA genômico nas amostras de córneas submetidas ao tratamento com NaCl (Figura 7-C). Em contraste, não houve amplificação detectável em gel de agarose nas amostras de córneas descelularizadas com NaCl + Nucleases como demonstrado na Figura 7-D.

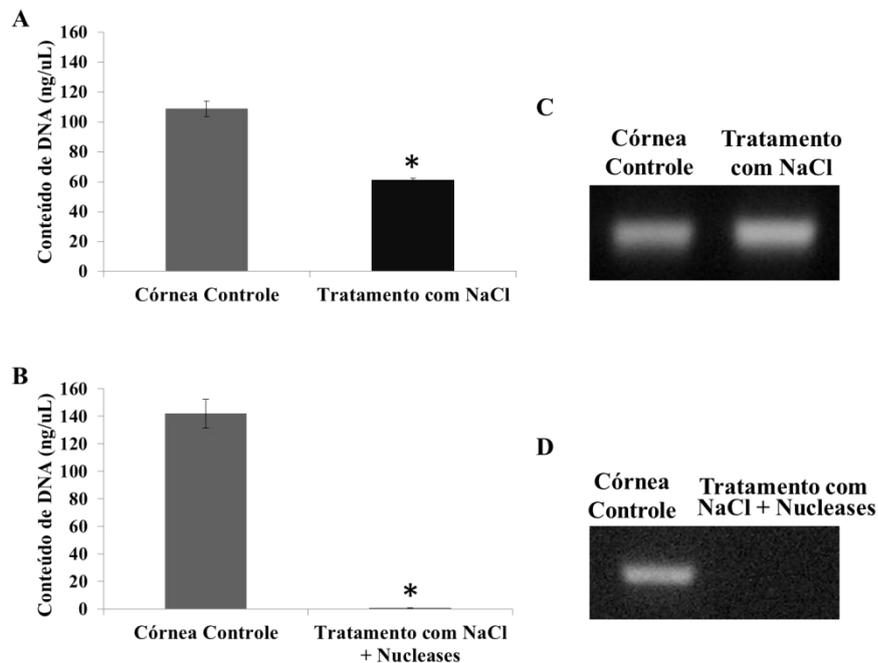


Figura 7: Quantificação do conteúdo de DNA extraído das córneas controles e das córneas após tratamento com NaCl (A) ou NaCl + Nucleases (B). Presença de DNA remanescente nas córneas submetidas ao tratamento apenas com NaCl (A). Ausência de DNA nas córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases (B). Amplificação de DNA genômico, demonstrando presença de DNA nas córneas após tratamento com NaCl (C) e ausência de DNA após tratamento com NaCl + Nucleases mesmo após amplificação por PCR (D). n=3; * córnea controle *versus* córnea descelularizada ($p < 0,05$), teste *t-student*.

Análises por MEV comprovaram que os dois métodos de descelularização empregados, tratamento com NaCl apenas ou tratamento com NaCl + Nucleases, levaram à total remoção das CECs (Figura 8).

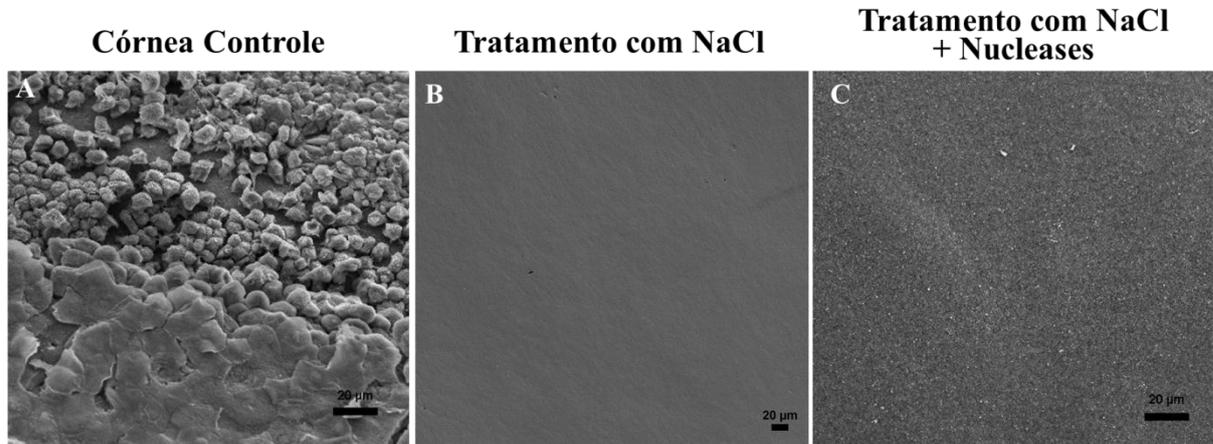


Figura 8: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície epitelial da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases (C). Ausência de células no epitélio das córneas após descelularização apenas com NaCl (B) ou NaCl + Nucleases (C). Barra = 20 μm . Imagem representativa de $n = 3$.

Por fim, foram feitas análises, por MET, do estroma das córneas após os dois métodos de descelularização testados. As micrografias eletrônicas confirmaram a presença de células remanescentes no estroma das córneas após tratamento apenas com NaCl (Figura 9-B). Em contraposição, não foram observadas células no estroma das córneas tratadas com NaCl + Nuclease (Figura 9-C).



Figura 9: Micrografias eletrônicas de transmissão da região estromal da córnea controle (A) e das córneas após tratamento com NaCl (B) ou após tratamento com NaCl + Nucleases (C), demonstrando presença de células (*) na córnea controle (A) e nas córneas tratadas apenas com NaCl (B). Ausência de células nas córneas após tratamento com NaCl + Nucleases (C). Barra = 500 nm (B). Imagem representativa de $n = 3$.

Todos os resultados apresentados acima confirmaram que o tratamento apenas com NaCl resultou em remoção incompleta dos componentes celulares, em contraposição ao tratamento com NaCl + Nucleases, o qual levou à completa descelularização das córneas. Dessa forma, seguiu-se a caracterização completa somente das córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases.

5.2. Avaliação da preservação da matriz extracelular das córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases

A integridade da membrana basal e do estroma das córneas após descelularização com NaCl + Nucleases foi avaliada por meio de colorações histológicas, MET e imunofluorescência.

A estrutura da membrana basal da córnea foi preservada após descelularização com NaCl + Nucleases como revelado por MET. As análises das micrografias eletrônicas de transmissão revelaram a similaridade ultraestrutural das membranas basais das CDs e CCs (Figura 10).

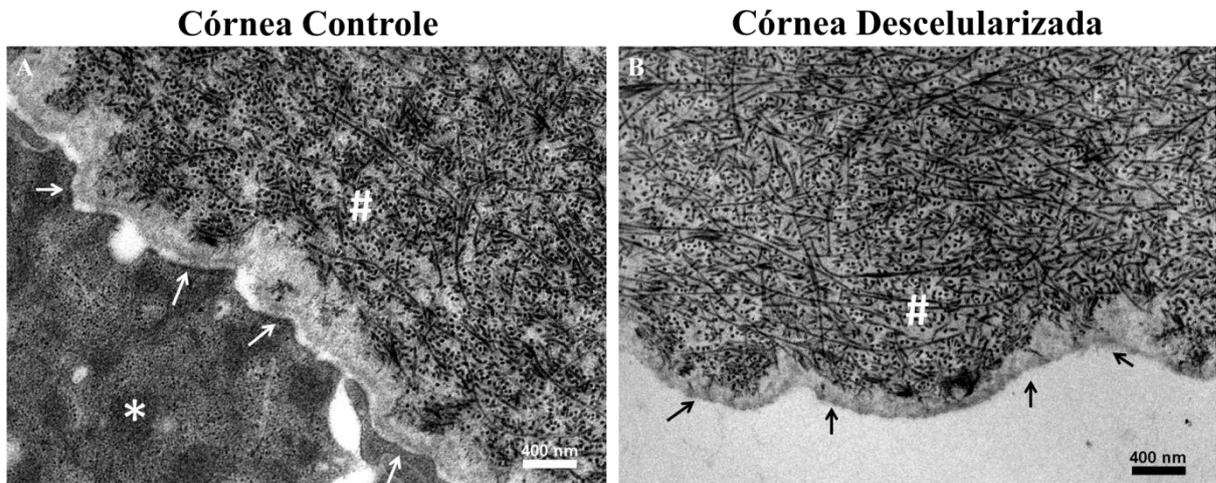


Figura 10: Micrografias eletrônicas de transmissão da córnea controle (A) e descelularizada (B). As setas brancas em A apontam regiões de ancoragem da célula epitelial (*) e a sua membrana basal. As setas pretas em B apontam a membrana basal da córnea descelularizada demonstrando a preservação da sua ultraestrutura e a ausência de células epiteliais nas córneas submetidas ao tratamento com NaCl + Nucleases. # indica a camada de Bowman, demonstrando a similaridade ultraestrutural entre essa camada nas córneas controle e descelularizada. Barra = 400 nm. Imagem representativa de n = 3.

A composição protéica da membrana basal da córnea foi preservada após tratamento com NaCl + Nucleases como revelado pela coloração com PAS (Figura 11-A) e detecção da expressão de colágeno tipo IV, fibronectina e laminina por imunofluorescência (Figura 11-B, C e D).

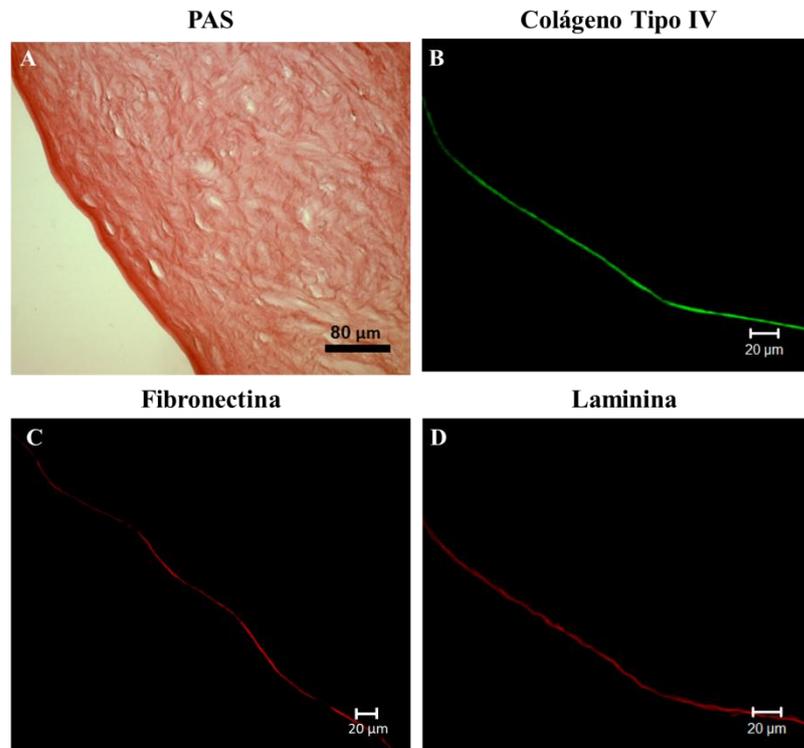


Figura 11: Corte histológico da córnea corado pelo PAS (A) e imagens de microscopia de fluorescência da expressão de colágeno tipo IV (B), fibronectina (C) e laminina (D) nas CDs demonstrando a preservação das proteínas constituintes da membrana basal após tratamento das córneas com NaCl + Nucleases. Barra = 80 μm (A). Barra = 20 μm (B, C, D). Imagem representativa de n = 3.

A preservação do conteúdo de glicosaminoglicanos presentes no estroma corneano foi comprovada por meio da coloração com *Alcian Blue* pH 2,5 (Figura 12-A). A integridade do estroma das CDs também foi comprovada pela detecção da expressão de colágeno tipo I (Figura 12-B) e por MET. As análises das micrografias eletrônicas de transmissão demonstraram a preservação do conteúdo, estrutura, orientação e distribuição das fibras colágenas presentes no estroma das CDs, que apresentam ultraestrutura similar àquelas encontradas nas CCs (Figura 13). Esses resultados indicam que não ocorreram mudanças na organização lamelar do estroma corneano após tratamento das córneas com NaCl + Nucleases.

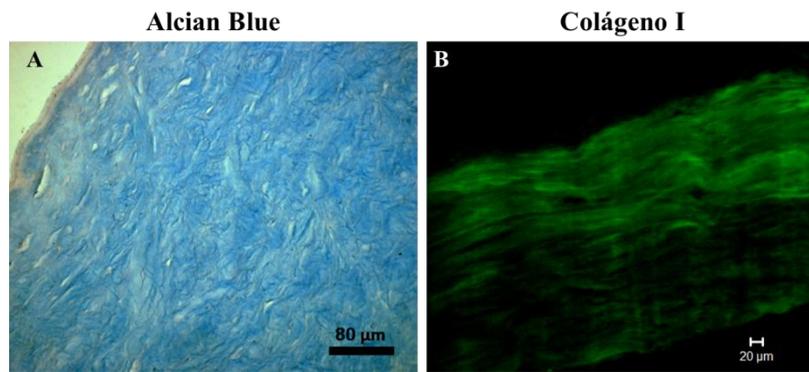


Figura 12: Corte histológico da córnea corado pelo *Alcian Blue* pH 2,5 evidenciando a presença de proteoglicanos no estroma das CDs (A). Detecção da expressão de colágeno tipo I no estroma da córnea descelularizada (B). Barra = 80 µm (A). Barra = 20 µm (B). Imagem representativa de n = 3.

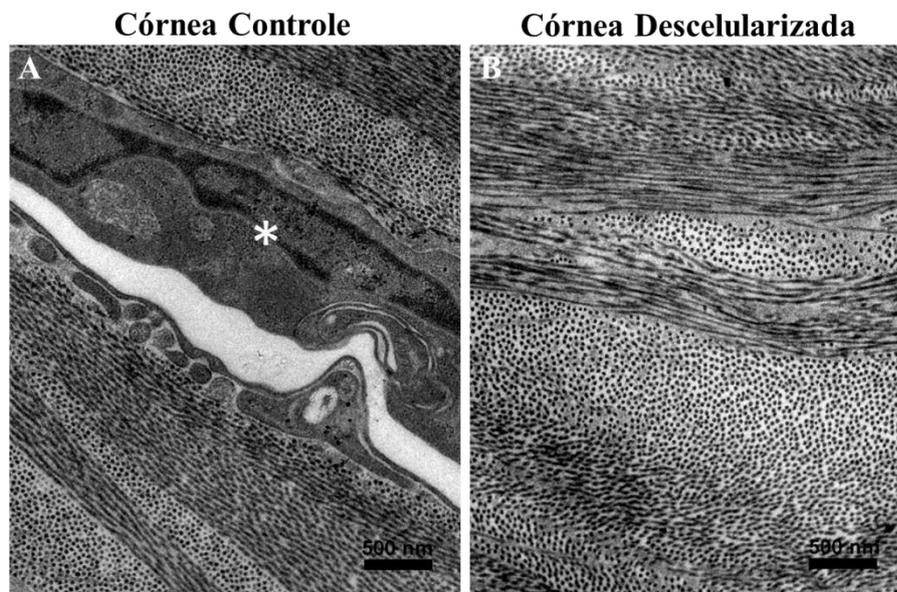


Figura 13: Micrografias eletrônicas de transmissão da região estromal da córnea controle (A) e descelularizada (B) demonstrando similaridade na organização das fibras colágenas entre ambas e a presença de células (*) apenas na córnea controle. Barra = 500 nm (B). Imagem representativa de n = 3.

5.3. Isolamento, cultivo e caracterização das OFSCs

Células-tronco foram isoladas das bolsas de gordura da pálpebra por digestão enzimática seguida por centrifugação. Após o processamento enzimático e incubação em meio de cultura basal suplementado com SH, foi obtida uma população heterogênea de células, contendo células aderentes à superfície plástica, de morfologia fusiforme e células não aderentes, de formato arredondado. Por meio das trocas sucessivas do meio de cultura e

expansão celular, as células não aderentes foram removidas ao longo do cultivo e, a partir da segunda passagem, obteve-se uma população homogênea de células aderentes de formato fusiforme e potencial de autorrenovação (Figura 14). Essas células foram caracterizadas fenotípica e funcionalmente.

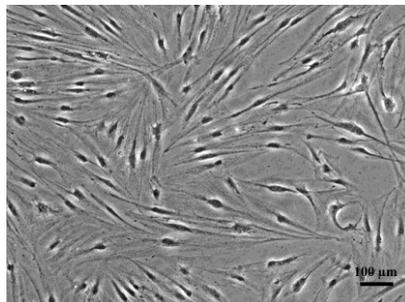


Figura 14. Fotomicrografia demonstrando aspecto morfológico das OFSCs na terceira passagem. As OFSCs apresentaram aderência à superfície plástica e morfologia fusiforme. Barra = 100 μm .

5.3.1. Caracterização do imunofenótipo das OFSCs

Na quarta passagem, foi feita a análise do imunofenótipo das OFSCs cultivadas no meio de cultura basal suplementado com SH por citometria de fluxo e, a seguir, estão representados os histogramas das populações celulares. As análises dos histogramas (Figura 15) demonstraram que mais de 98,5% das OFSCs expressaram os antígenos CD73, CD105, CD90, CD166 e CD9, que são marcadores comumente expressos em MSCs. Já os marcadores de células-tronco hematopoiéticas CD34, CD19, CD14, CD45 e HLA-DR foram expressos em menos de 2% da população celular. Além disso, 100% das OFSCs expressaram o antígeno HLA-ABC.

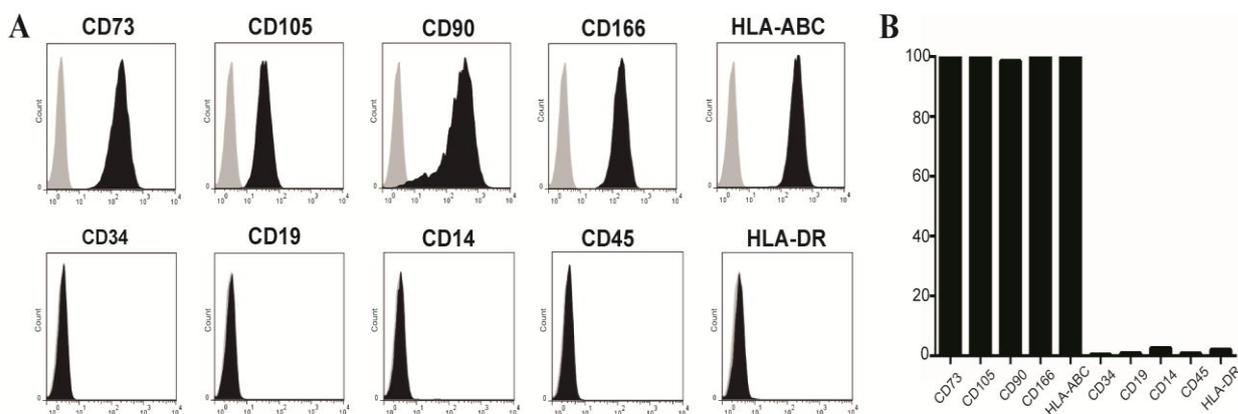


Figura 15: Análise imunofenotípica das OFSCs por meio de citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva cinza é o controle negativo e a curva preta representa a população de células avaliadas para

cada marcador específico (o deslocamento para direita indica a existência de maior marcação) (A). O gráfico de barras demonstra a quantificação do percentual de células positivas para cada marcador avaliado (B). Imagem representativa de $n = 3$.

5.3.2. Caracterização funcional das OFSCs

As OFSCs foram caracterizadas, funcionalmente, quanto à capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. A fim de comprovar o comprometimento das OFSCs com essas linhagens celulares, foram realizadas colorações histológicas e avaliação da expressão gênica de marcadores dessas linhagens.

5.3.2.1. Potencial de diferenciação osteogênica

As OFSCs foram induzidas à diferenciação osteogênica por meio do cultivo em meio de cultura contendo os fatores indutores por 21 dias. Após esse período, a coloração pelo método de *von Kossa* revelou a presença de nódulos de mineralização, representada por coloração negra ou marrom, apenas no grupo de OFSCs cultivadas em meio de cultura osteogênico (Figura 16-B).

A avaliação da deposição de cálcio durante indução da diferenciação osteogênica foi feita por meio da coloração com *Alizarin Red S*. Foi possível verificar que apenas as OFSCs cultivadas na presença do meio indutor osteogênico apresentaram matriz extracelular rica em cálcio, representada pela coloração vermelha, após 21 dias de indução da diferenciação (Figura 16-D).

Análises por PCR demonstraram que houve aumento qualitativo na expressão de *FA* nas OFSCs cultivadas no meio osteogênico quando comparadas com as células cultivadas em meio de cultura basal. Banda referente à amplificação do segmento gênico da *osteopontina* foi detectada apenas nas OFSCs cultivadas no meio osteogênico. Em contraste, as OFSCs cultivadas nos dois meios de cultura (basal e osteogênico) apresentaram expressão gênica de *colágeno tipo I* (Figura 16-E).

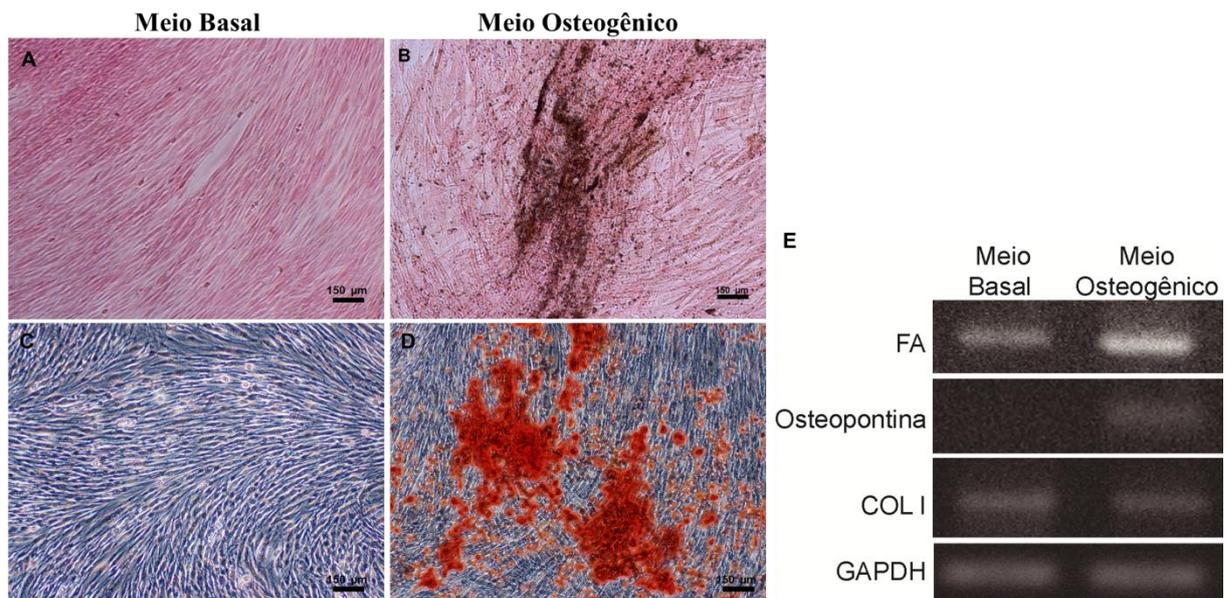


Figura 16: Indução da diferenciação osteogênica das OFSCs. Fotomicrografias das OFSCs coradas pelo método de *von Kossa* (A e B) e com *Alizarin Red S* (C e D). OFSCs cultivadas em meio de cultura basal (A e C) e em meio indutor osteogênico (B e D) por 21 dias. Detecção da expressão de *FA*, *osteopontina* e *COL I*, por PCR, nas OFSCs cultivadas em meio de cultura basal ou em meio osteogênico por 21 dias (E). *GAPDH* é controle interno da reação. *FA*, *fosfatase alcalina*; *COL I*, *colágeno tipo I*; *GAPDH*, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*. Barra = 150 μm . Imagem representativa de $n = 3$.

5.3.2.2. Potencial de diferenciação adipogênico

As OFSCs foram induzidas à diferenciação adipogênica por meio do cultivo em meio indutor por 21 dias. Durante esse período, foi possível visualizar o acúmulo de lipídeos intracelulares corados em vermelho pela coloração com *Oil Red O* apenas nas OFSCs cultivadas no meio indutor adipogênico (Figura 17-B e D).

Análises por PCR demonstraram que houve expressão gênica de *PPARG2*, *GLUT 4* e *leptina* nas OFSCs cultivadas no meio indutor adipogênico. Em contraste, não foram detectadas bandas referentes à amplificação desses segmentos gênicos nas OFSCs cultivadas no meio basal (Figura 17-E).

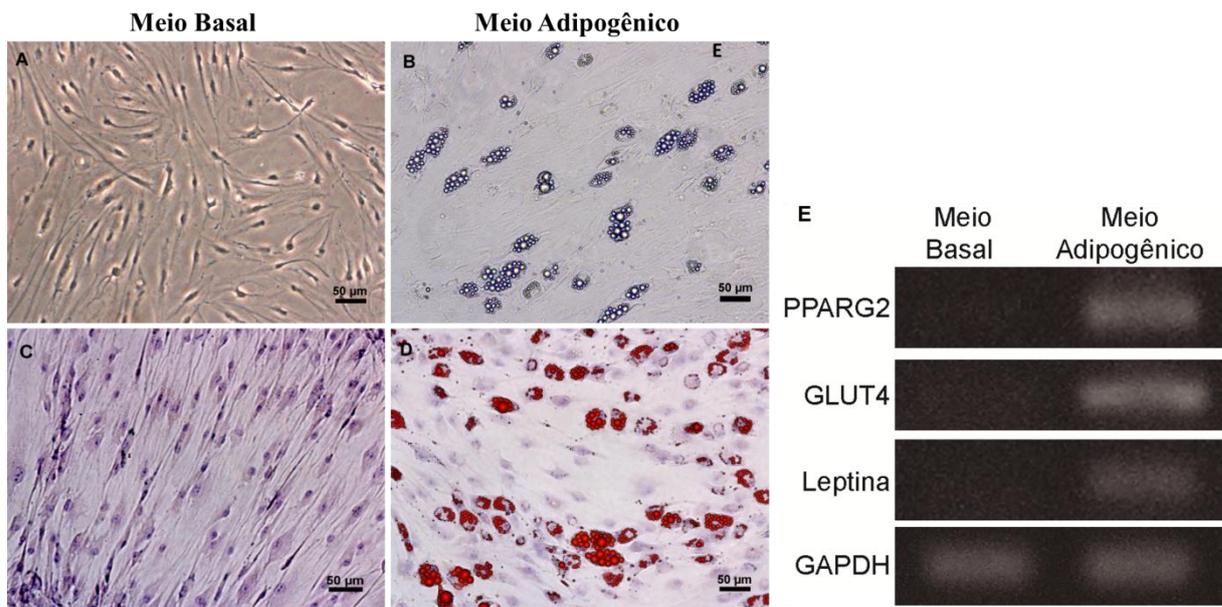


Figura 17: Indução da diferenciação adipogênica das OFSCs. Fotomicrografias das OFSCs do grupo controle, cultivadas em meio de cultura basal por 21 dias, antes (A) e após (C) a coloração com *Oil Red O*. Fotomicrografias das OFSCs cultivadas em meio indutor adipogênico, por 21 dias, antes (B) e após (D) a coloração com *Oil Red O*. Detecção da expressão de *PpARG2*, *GLUT 4* e *leptina*, por PCR, nas OFSCs cultivadas em meio de cultura basal ou em meio adipogênico por 21 dias (E). *GAPDH* é controle interno da reação. *PPARG2* - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos; *GLUT 4*, transportador de glicose *GLUT 4*; *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Barra = 50 μm . Imagem representativa de $n = 3$.

5.3.2.3. Potencial de diferenciação condrogênica

Para promover a diferenciação condrogênica, as OFSCs foram cultivadas em um sistema de *pellet* tridimensional, por 21 dias, na presença do meio indutor (Figura 18-A). Após esse período, verificou-se que os pellets formados apresentaram marcação positiva para a coloração de *Alcian Blue* pH 2,5, evidenciando que houve deposição de proteoglicanos na matriz extracelular, sugerindo assim que matriz cartilaginosa foi sintetizada (Figura 18-B).

Análises por PCR revelaram que houve expressão gênica de *COMP* e *COL X* nas OFSCs após indução da diferenciação condrogênica, o que não foi observado nas OFSCs mantidas em meio basal. Em contraste, as OFSCs cultivadas nos dois meios de cultura (basal e condrogênico) apresentaram expressão gênica de *aggrecan* (Figura 18-C).

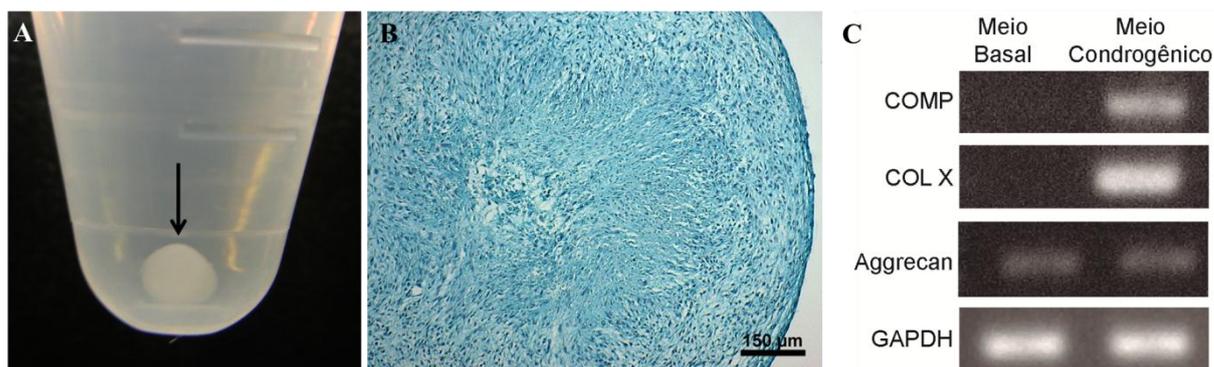


Figura 18: Indução da diferenciação condrogênica das OFSCs. Em A, seta aponta *pellet* de células que foi cultivado na presença do meio condrogênico por 21 dias. Em B, fotomicrografia do *pellet* corado com *Alcian Blue* pH 2,5 após indução da diferenciação condrogênica. Em C, detecção da expressão de *COMP*, *COL X* e *aggrecan*, por PCR, nas OFSCs cultivadas em meio de cultura basal ou induzidas à diferenciação condrogênica por 21 dias. *GAPDH* é controle interno da reação. *COMP*, *proteína oligomérica da matriz da cartilagem*; *Col X*, *colágeno tipo X*; *GAPDH* - *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*. Barra = 150 μ m. Imagem representativa de n = 3.

5.4. Cultivo e caracterização das hESCs e hiPSCs

As hESCs e hiPSCs cultivadas sobre Matrigel e mantidas em meio mTeSRTM foram caracterizadas quanto à pluripotência por imunofluorescência e por meio da análise da expressão de um painel de genes indicativos do estado de pluripotência (*OCT-4*, *NANOG*, *SOX2* e *hTERT*) e genes indicativos da diferenciação endodérmica (*AFP* e *Sox17*), ectodérmica (*GFAP* e *PAX6*) e mesodérmica (*Brachyuri*). Como controle interno da reação foi utilizado o gene *GAPDH*.

Análises por PCR demonstraram que as hESCs (Figura 19-A) e hiPSCs (Figura 20-A) apresentaram padrão de expressão gênica compatível com o estado de pluripotência, uma vez que expressaram os genes *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, e *hTERT* e não expressaram os genes indicativos da diferenciação em linhagens endodérmica, ectodérmica e mesodérmica.

As imagens de microscopia de fluorescência revelaram a expressão proteica dos marcadores *OCT-4* e *NANOG* pelas hESCs (Figura 19-B e C) e hiPSCs (Figura 20-B e C).

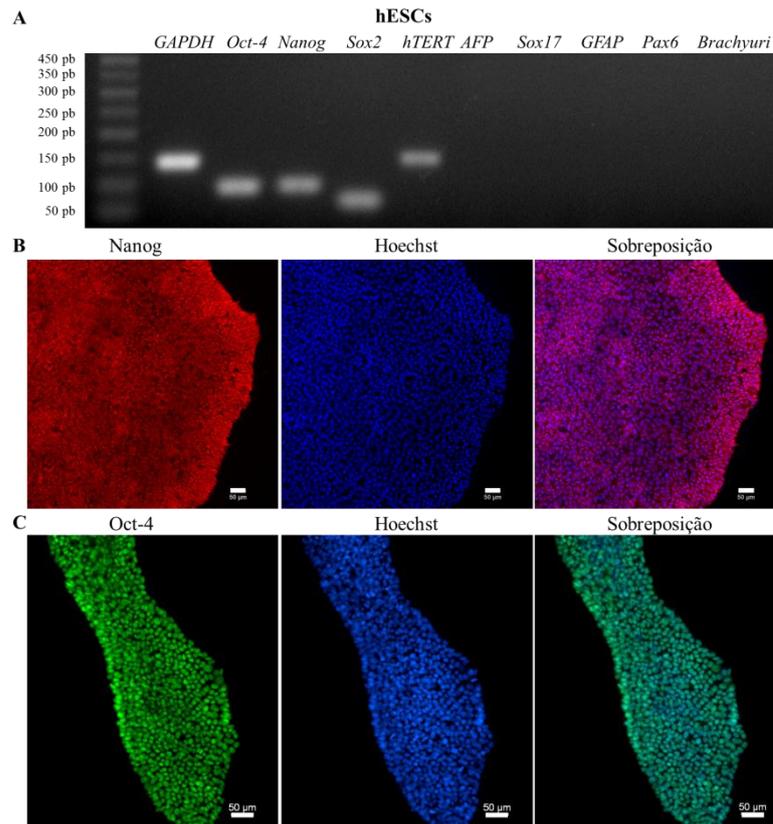


Figura 19: Caracterização da pluripotência das hESCs. Detecção da expressão gênica de *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, *hTERT*, *AFP*, *Sox17*, *GFAP*, *PAX6* e *Brachyuri* pelas hESCs cultivadas sobre Matrigel e mantidas em meio mTeSR™ (A). *GAPDH* é controle interno da reação. Imagens de microscopia de fluorescência da expressão de *NANOG* (B) e *OCT-4* (C) pelas hESCs. *OCT-4* - Octamer- Binding Transcription Factor 4; *SOX2* - (sex determining region Y)-box 2; *hTERT* - human telomerase reverse transcriptase; *AFP* - alpha fetoprotein; *Sox17* - (sex determining region Y)-box 17; *GFAP* - Glial fibrillary acidic protein; *PAX6* - paired box 6; *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base. Barra = 50 µm. Imagem representativa de n = 3.

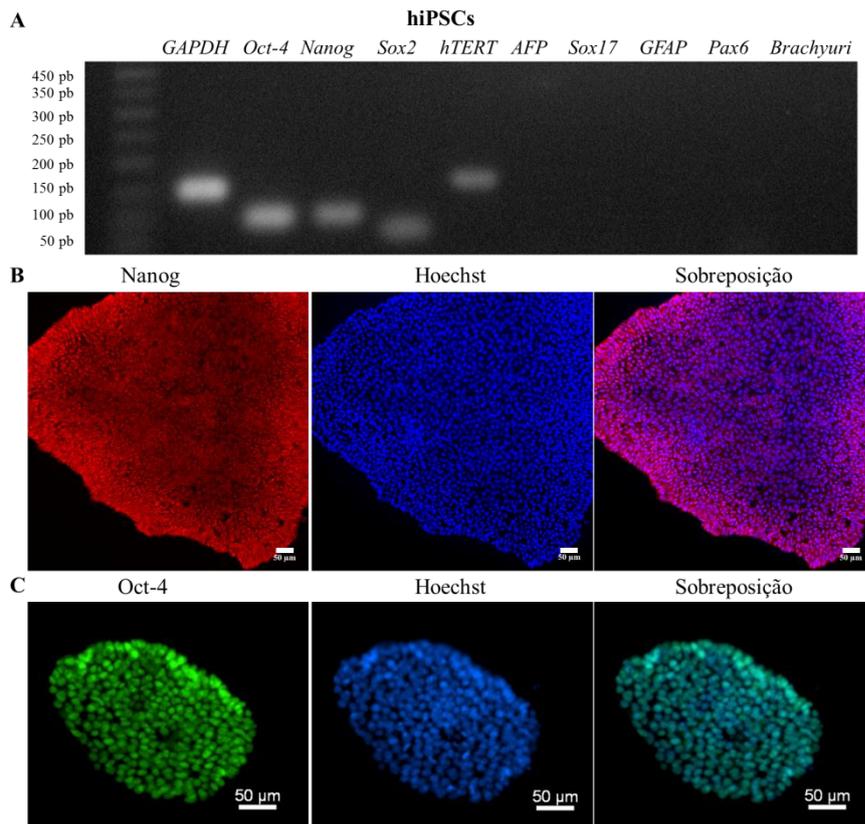


Figura 20: Caracterização da pluripotência das hiPSCs. Detecção da expressão gênica de *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, *hTERT*, *AFP*, *Sox17*, *GFAP*, *PAX6* e *Brachyuri* pelas hiPSCs cultivadas em Matrigel e mantidas em meio mTeSR™ (A). *GAPDH* é controle interno da reação. Imagens de microscopia de fluorescência da expressão de *NANOG* (B) e *OCT-4* (C) pelas hiPSCs. *OCT-4* - Octamer- Binding Transcription Factor 4; *SOX2* - (sex determining region Y)-box 2; *hTERT* - human telomerase reverse transcriptase; *AFP* - alpha fetoprotein; *Sox17* - (sex determining region Y)-box 17; *GFAP* - Glial fibrillary acidic protein; *PAX6* - paired box 6; *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base. Barra = 50 μm. Imagem representativa de n = 3.

5.5. Isolamento, cultivo e caracterização dos fibroblastos do limbo corneoescleral

Os fibroblastos do tecido límbico foram isolados e cultivados com sucesso no meio de cultura basal suplementado com SH. Após trocas do meio ao longo do cultivo, foram obtidas populações homogêneas de células aderentes à superfície plástica, com morfologia fusiforme e potencial de autorrenovação (Figura 21-A).

Por meio da técnica de imunofluorescência verificou-se que os FLs expressaram CD44 (receptor de ácido hialurônico), colágeno tipo I e fibronectina e, em contraposição, essas

células não expressaram CD106 (V-CAM1), *p63* e citoqueratinas 3 e 12, confirmando a natureza fibroblástica dessas células (Figura 21-A).

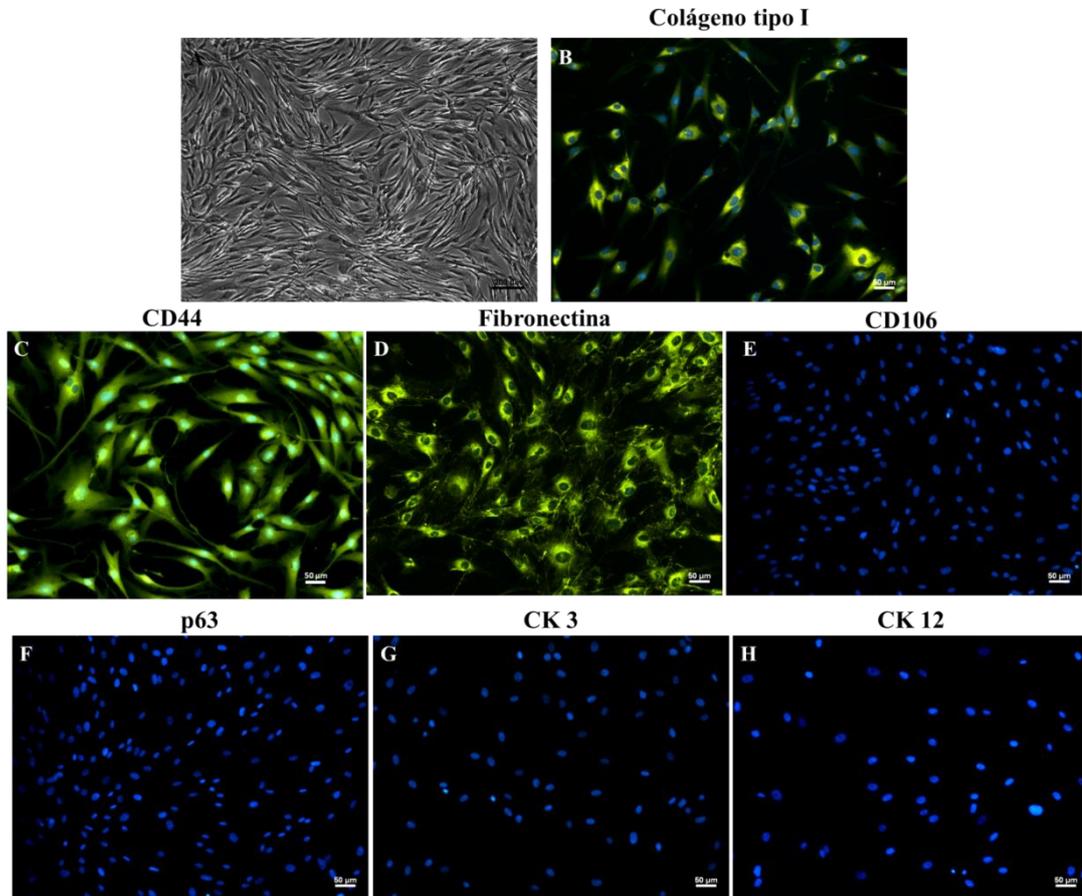


Figura 21: Fotomicrografia demonstrando aspecto morfológico dos fibroblastos extraídos do limbo corneoescleral na terceira passagem (A). Imagens de microscopia de fluorescência da expressão de colágeno tipo I (B), CD44 (C), fibronectina (D), CD106 (E), *p63* (F), *CK3* (G) e *CK12* (H) pelos fibroblastos límbicos. Barra = 200 μm (A), barra = 50 μm (B – H). Imagem representativa de n = 3.

5.6. Colonização da córnea descelularizada com as OFSCs, hESCs e hiPSCs

A habilidade das CDs em suportar a adesão e cultivo celular foi avaliada por meio do ensaio de Calceína-AM e por MEV. Para tanto, as OFSCs, hESCs ou hiPSCs foram semeadas sobre a membrana basal das CDs e, a partir do ensaio de Calceína-AM, foi possível demonstrar que os três tipos celulares foram capazes de aderir à membrana basal das CDs e mantiveram-se viáveis após 7 dias de cultivo, uma vez que apresentaram a emissão de fluorescência resultante da metabolização do composto Calceína-AM (Figura 22-A, B e C).

Análises das micrografias eletrônicas de varredura também demonstraram que as células estavam bem aderidas e distribuídas pela superfície da membrana basal das CDs (Figura 22-D, E e F).

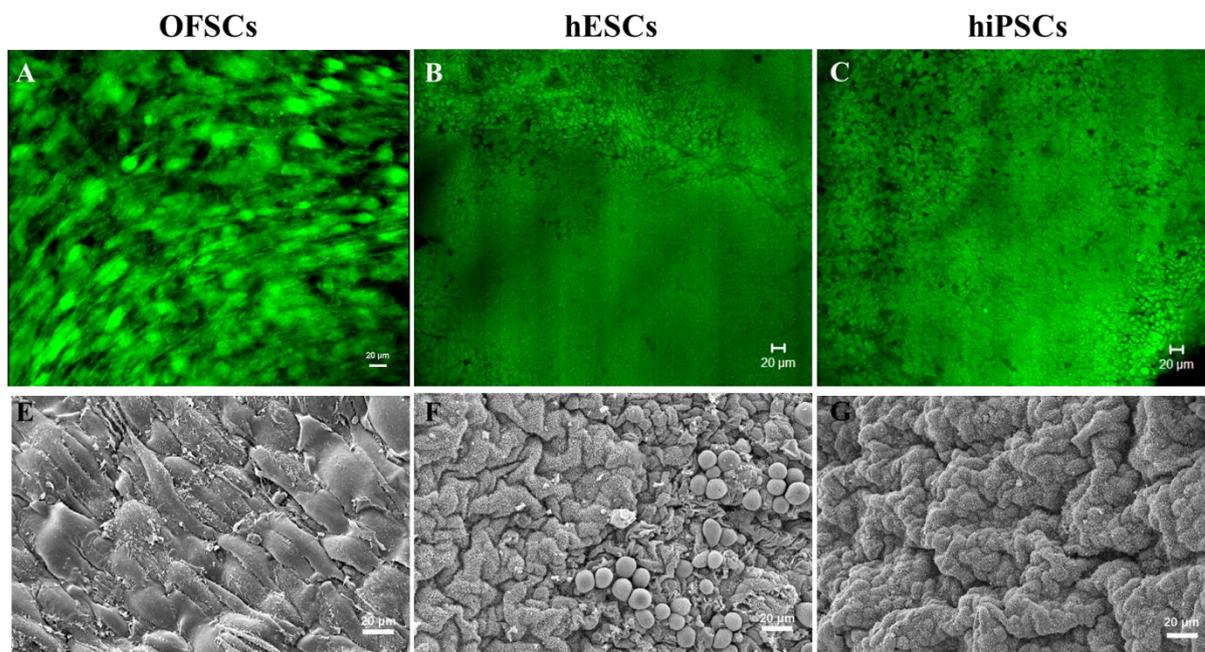


Figura 22: Viabilidade das OFSCs (A), hESCs (B) e hiPSCs (C) cultivadas sobre a membrana basal das CDs por 7 dias. Imagens de microscopia confocal, verde: calceína-AM. Micrografias eletrônicas de varredura das OFSCs (E), hESCs (F) e hiPSCs (G) aderidas às CDs. Barra = 20 µm. Imagem representativa de n = 3.

Após comprovação da viabilidade das células cultivadas sobre as CDs, avaliou-se se as hESCs e hiPSCs mantiveram o estado de pluripotência nessa nova condição de cultivo. Para tanto, foi feita análise da expressão dos genes indicativos do estado de pluripotência pelas células cultivadas sobre as CDs na presença do meio mTeSRTM por sete dias. Análises por PCR revelaram que as hESCs (Figura 23-A) e hiPSCs (Figura 23-B) cultivadas sobre as CDs mantiveram o padrão de expressão gênica compatível com o estado de pluripotência, uma vez que expressaram os genes *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, e *hTERT* e não expressaram os genes indicativos da diferenciação em linhagens endodérmica (*AFP* e *Sox17*), ectodérmica (*GFAP* e *PAX6*) e mesodérmica (*Brachyuri*). Como controle interno da reação foi utilizado o gene *GAPDH*.

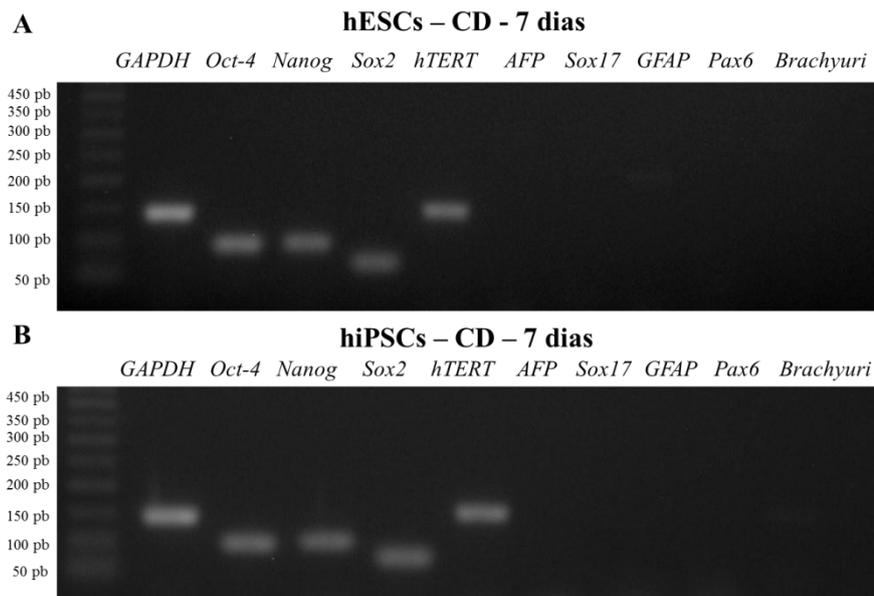


Figura 23: Detecção da expressão gênica de *OCT-4*, *NANOG*, *SOX2*, *hTERT*, *AFP*, *Sox17*, *GFAP*, *PAX6* e *Brachyuri* pelas hESCs (A) e hiPSCs (B) cultivadas sobre as córneas descclularizadas e mantidas em meio mTeSR™. *GAPDH* é controle interno da reação. *OCT-4* - Octamer- Binding Transcription Factor 4; *SOX2* - (sex determining region Y)-box 2; *hTERT* - human telomerase reverse transcriptase; *AFP* - alpha fetoprotein; *Sox17* - (sex determining region Y)-box 17; *GFAP* - Glial fibrillary acidic protein; *PAX6* - paired box 6; *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base. Imagem representativa de n = 3.

A avaliação de um possível efeito indutor de diferenciação das matrizes descclularizadas sobre as hESCs e hiPSCs foi verificado, também, por qPCR. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças estatísticas entre os níveis de expressão dos genes *OCT-4*, *SOX2*, *NANOG* e *p63* pelas hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs quando comparadas com as respectivas células cultivadas sobre o Matrigel (Figuras 24). Entretanto, houve redução da expressão de transcritos gênicos para *CK3* e aumento da expressão de transcritos para *CK12*, tanto nas hESCs quanto nas hiPSCs cultivadas sobre as CDs. A expressão de *PAX6* foi menor nas hESCs cultivadas sobre as CDs e maior nas hiPSCs semeadas sobre as CDs, quando comparadas com as respectivas células cultivadas sobre Matrigel (Figura 24).

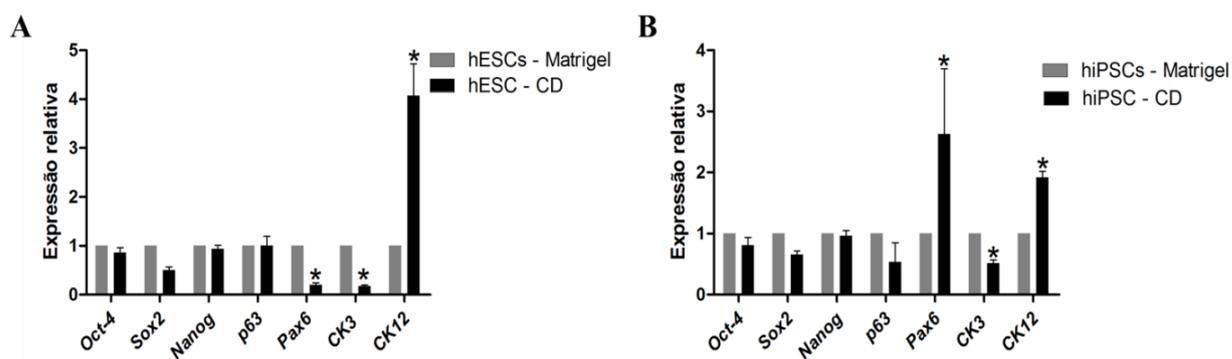


Figura 24: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes *OCT-4*, *SOX2*, *NANOG*, *PAX6*, *p63*, *CK3* e *CK12* pelas hESCs (A) e hiPSCs (B) após sete dias de cultivo sobre as CDs na presença do meio MTeSR™. A expressão relativa foi determinada utilizando o *software* REST (Relative Expression Software Tool 2009). O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador dos dados e as células indiferenciadas foram utilizadas como calibrador. n=3; * células cultivadas sobre as CDs na presença do meio MTeSR™ *versus* células indiferenciadas (p<0,05), Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test.

5.7. Indução da diferenciação em CECs

As OFSCs, hESCs e hiPSCs, semeadas sobre as CDs, foram induzidas à diferenciação em CECs por meio do cultivo em MCFL por até 21 dias. Após esse período, foi realizado o ensaio de Calceína-AM, demonstrando a viabilidade dos três tipos celulares nessa condição de cultivo (Figura 25).

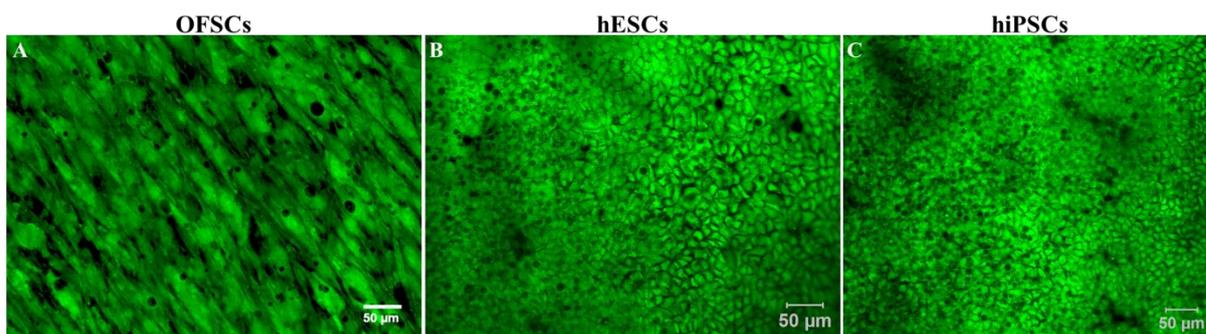


Figura 25: Viabilidade das OFSCs (A), hESCs (B) e hiPSCs (C) cultivadas sobre a membrana basal das CDs na presença do MCFL por 21 dias. Imagens de microscopia confocal, verde: calceína-AM. Barra = 50 µm.

As OFSCs, hESCs e hiPSCs também foram semeadas sobre superfície de cultivo previamente revestida com laminina e cultivadas por 3, 6, 9, 14 ou 21 dias na presença do MCFL. Não foram observadas mudanças morfológicas nas OFSCs induzidas à diferenciação

(Figura 26-A.2). Em contraposição, verificou-se mudanças na morfologia das hESCs (Figura 26-B.2) e hiPSCs (Figura 26-C.2) ao longo dos 21 dias de indução da diferenciação. Esses dois tipos celulares perderam a capacidade de crescer em colônias, apresentaram aumento do tamanho celular e adquiriram uma morfologia poligonal.

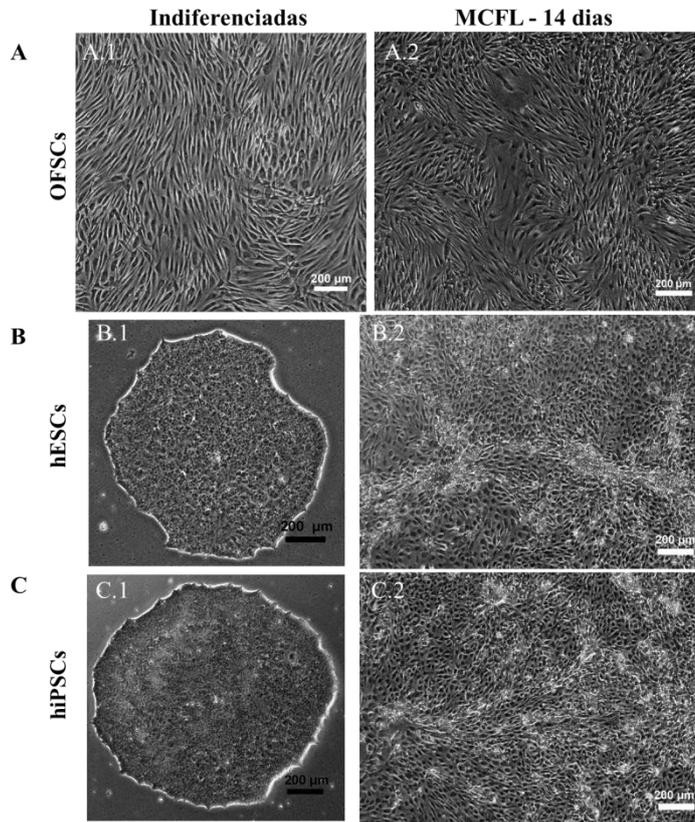


Figura 26: Fotomicrografias das OFSCs (A), hESCs (B) e hiPSCs (C) no estado indiferenciado (A.1, B.1 e C.1) e após 14 dias de cultivo sobre a laminina na presença do meio indutor da diferenciação (A.2, B.2 e C.2). Barra = 200 µm. Imagem representativa de n = 3.

5.7.1. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por qPCR

A fim de avaliar o comprometimento das OFSCs, hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina com a linhagem de CECs, foram feitas análises da expressão relativa de transcritos gênicos relacionados a diferentes estágios do processo de diferenciação após 3, 6, 9, 14 e 21 dias de cultivo na presença do MCFL.

Os resultados obtidos demonstraram que, quando comparadas com as células indiferenciadas (tempo 0 de diferenciação), as OFSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina apresentaram diminuição significativa na expressão dos genes *PAX6* e *p63* em, praticamente, todos os tempos avaliados (Figura 27-A e B). Houve também redução na expressão de *CK12*

após 9 e 14 dias de cultivo sobre as CDs e, após 3, 9, 14 e 21 dias de cultivo sobre a laminina (Figura 27-D). Apenas no terceiro dia de indução da diferenciação, as OFSCs semeadas sobre as CDs apresentaram aumento significativo na expressão de *CK3* sendo que, a partir do sexto dia, os níveis de expressão desse gene foram similares aos das células indiferenciadas (Figura 27-C). As OFSCs cultivadas sobre a laminina não apresentaram níveis de expressão detectáveis de *CK3* em nenhum tempo avaliado, sendo os Cq obtidos muito elevados (>39) ou indeterminados, portanto, esses resultados não foram representados graficamente.

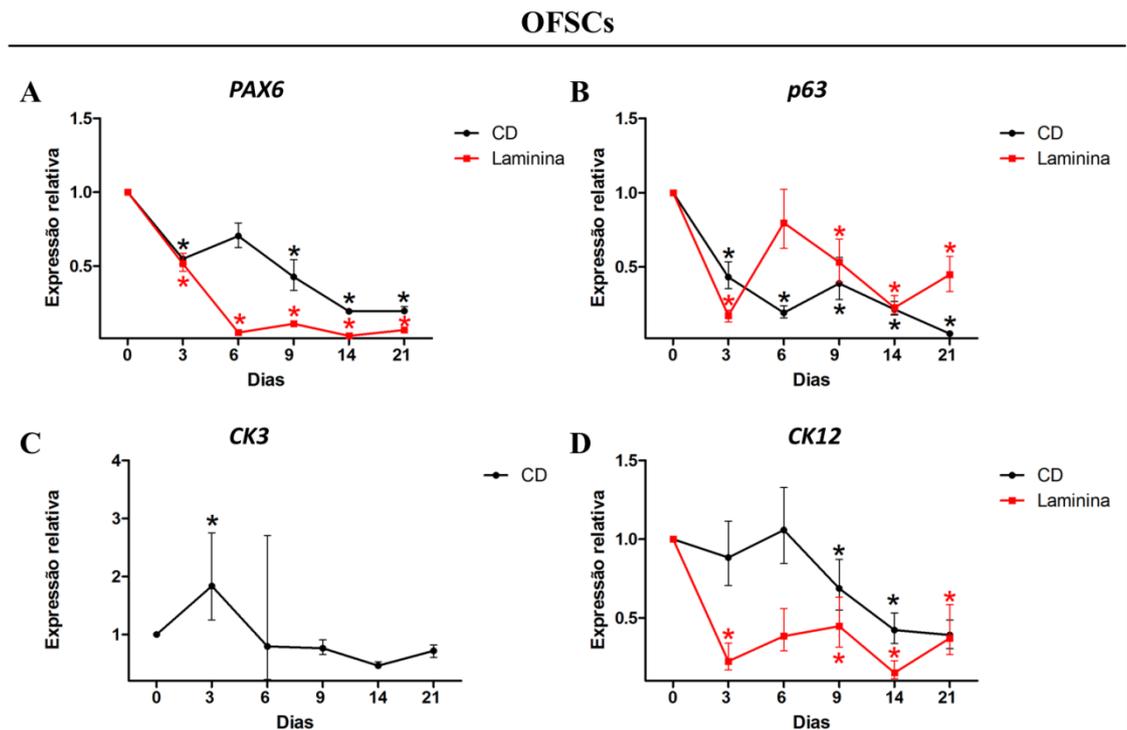


Figura 27: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes *PAX6* (A), *p63* (B), *CK3* (C) e *CK12* (D) durante 21 dias de indução da diferenciação das OFSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs. A expressão relativa foi determinada utilizando o *software* REST (Relative Expression Software Tool 2009). O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador dos dados e as células indiferenciadas foram utilizadas como calibrador. n=3; * células cultivadas sobre as CDs ou laminina na presença do meio indutor da diferenciação *versus* células indiferenciadas ($p < 0,05$), Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test.

Quando comparadas com as células indiferenciadas (tempo 0 de diferenciação), as hESCs semeadas sobre as CDs, apresentaram aumento significativo na expressão de *PAX6* após 3, 9, 14 e 21 dias de indução da diferenciação, sendo o pico de expressão desse gene

observado no 14^o dia, quando houve um aumento de, em média, 79 vezes na sua expressão. Em contraposição, as hESCs cultivadas sobre a laminina apresentaram um menor pico de expressão de *PAX6* no terceiro dia de indução da diferenciação, quando foi observado um aumento de, aproximadamente, 7 vezes na sua expressão. Após 6 e 9 dias de cultivo sobre a laminina na presença do meio indutor da diferenciação, as hESCs apresentaram aumento de 4 e 2 vezes na expressão de *PAX6*, respectivamente, e, a partir de 14 dias, houve redução significativa da expressão de transcritos gênicos para esse gene (Figura 28-A).

Foi observado aumento da expressão de *p63* pelas hESCs a partir do terceiro dia de cultivo sobre as CDs ou laminina, alcançando maior expressão aos 21 dias, período no qual as hESCs cultivadas sobre as CDs apresentaram aumento de 49 vezes na expressão de *p63*, enquanto as células semeadas sobre a laminina apresentaram aumento de 237 vezes na expressão desse gene, quando comparadas com as células indiferenciadas (Figura 28-B).

A expressão de transcritos gênicos para *CK3* foi significativamente maior a partir do sexto dia de indução da diferenciação apenas nas hESCs cultivadas sobre as CDs, alcançando maior expressão aos 21 dias, período no qual as hESCs apresentaram aumento de, aproximadamente, 32 vezes na expressão desse gene. Em contraposição, os níveis de expressão de *CK3* pelas hESCs cultivadas sobre a laminina foram similares aos das células indiferenciadas em todos os tempos avaliados (Figura 28-C).

Em relação à expressão de transcritos gênicos para *CK12*, verificou-se que houve aumento significativo da expressão desse gene ao longo dos 21 dias de indução da diferenciação apenas nas hESCs semeadas sobre as CDs, sendo observado pico de expressão desse gene no sexto dia, quando houve um aumento de, em média, 193 vezes na sua expressão. Já as hESCs cultivadas sobre a laminina apresentaram aumento significativo da expressão de *CK12* apenas no sexto dia de indução da diferenciação, quando observou-se aumento de 2 vezes na expressão desse gene (Figura 28-D).

hESCs

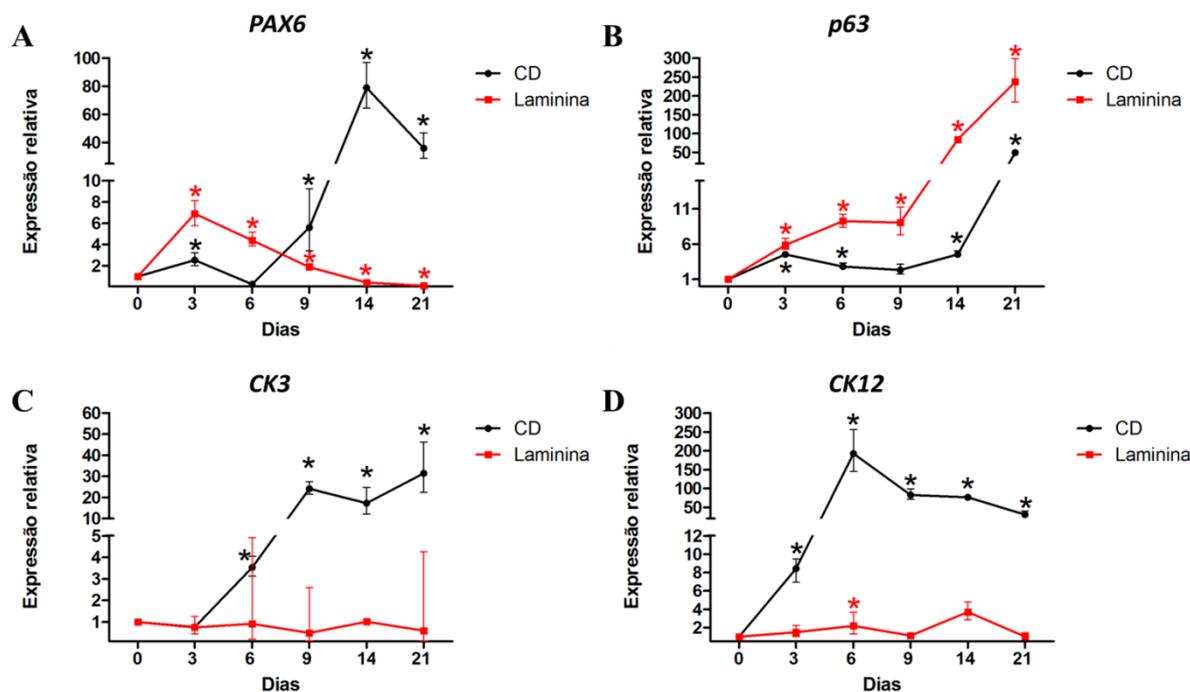


Figura 28: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes *PAX6* (A), *p63* (B), *CK3* (C) e *CK12* (D) durante 21 dias de indução da diferenciação das hESCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs. A expressão relativa foi determinada utilizando o *software* REST (Relative Expression Software Tool 2009). O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador dos dados e as células indiferenciadas foram utilizadas como calibrador. n=3; * células cultivadas sobre as CDs ou laminina na presença do meio indutor da diferenciação *versus* células indiferenciadas ($p < 0,05$), Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test.

As hiPSCs cultivadas sobre as CDs apresentaram aumento significativo na expressão de *PAX6* após 3, 6, 9 e 14 dias de indução da diferenciação, alcançando maior expressão ao 9º dia, quando houve um aumento de, aproximadamente, 84 vezes na expressão desse gene. Já as hiPSCs semeadas sobre a laminina apresentaram aumento na expressão de *PAX6* após 3, 6 e 14 dias de cultivo no MCFL, sendo o pico de expressão observado no terceiro dia, quando houve aumento de 146 vezes na expressão de *PAX6*. Após 9 e 21 dias de cultivo sobre a laminina, houve diminuição da expressão de *PAX6* pelas hiPSCs cultivadas na presença do MCFL quando comparadas com as células indiferenciadas (Figura 29-A).

Em relação à expressão de transcritos gênicos para *p63*, verificou-se, a partir do terceiro ou sexto dia, aumento gradual da expressão desse gene nas hiPSCs semeadas sobre a laminina ou CDs, respectivamente, alcançando maior expressão aos 21 dias. Nesse período, as

hiPSCs cultivadas sobre as CDs apresentaram aumento de 61 vezes na expressão de *p63*, enquanto as hiPSCs semeadas sobre a laminina apresentaram aumento de 94 vezes na expressão desse gene quando comparadas com as células indiferenciadas (Figura 29-B).

Houve aumento significativo da expressão de *CK3* após 6, 9, 14 e 21 dias de cultivo no meio indutor da diferenciação apenas nas hiPSCs semeadas sobre as CDs, sendo observado pico de expressão desse gene no 9º dia, quando verificou-se aumento de, aproximadamente, 17 vezes na sua expressão. Já as hiPSCs cultivadas sobre a laminina apresentaram aumento na expressão de *CK3* apenas no sexto dia de indução da diferenciação, quando houve aumento de, aproximadamente, 4 vezes na expressão desse gene. Observou-se redução da expressão de *CK3* após 14 e 21 dias de cultivo das hiPSCs sobre a laminina na presença do MCFL (Figura 29-C).

Em relação à expressão de transcritos gênicos para *CK12*, verificou-se que houve aumento significativo da expressão desse gene ao longo dos 21 dias de indução da diferenciação tanto nas hiPSCs semeadas sobre a laminina quanto nas células cultivadas sobre as CDs, alcançando maior expressão no terceiro e sexto dia, respectivamente (Figura 29-D).

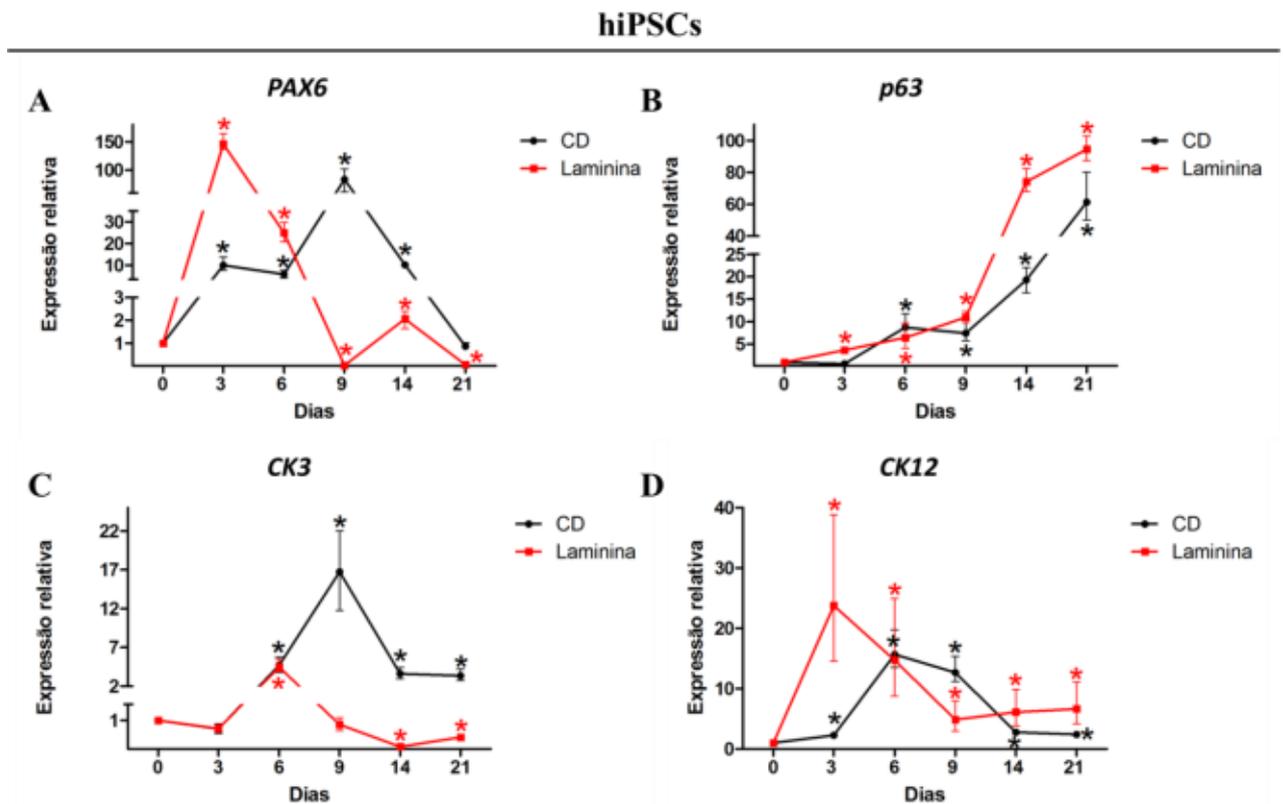


Figura 29: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes *PAX6* (A), *p63* (B), *CK3* (C) e *CK12* (D) durante 21 dias de indução da diferenciação hiPSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs. A expressão relativa foi determinada utilizando o

software REST (Relative Expression Software Tool 2009). O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador dos dados e as células indiferenciadas foram utilizadas como calibrador. n=3; * células cultivadas sobre as CDs ou laminina na presença do meio indutor da diferenciação *versus* células indiferenciadas ($p < 0,05$), Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test.

Foram feitas, também, análises da expressão relativa de transcritos gênicos indicativos do estado de pluripotência (*OCT-4*, *NANOG* e *SOX2*) após 3, 6, 9, 14 e 21 dias de cultivo das hESCs e hiPSCs sobre as CDs ou laminina na presença do MCFL.

Os resultados obtidos demonstraram que as hESCs cultivadas sobre as CDs apresentaram redução gradual e significativa na expressão de *OCT-4* após 3, 6, 9 e 14 dias de indução da diferenciação. Entretanto, após 21 dias, o nível de expressão desse gene foi similar ao das células indiferenciadas. Já as hESCs cultivadas sobre a laminina apresentaram menor expressão de *OCT-4* após 14 e 21 dias de indução da diferenciação quando comparadas com as células indiferenciadas (Figura 30-A).

Em relação à expressão de transcritos gênicos para *SOX2* pelas hESCs cultivadas sobre as CDs, verificou-se redução significativa nos tempos de 6, 9 e 14 dias e nível de expressão similar ao das células indiferenciadas após 21 dias. Em contrapartida, as hESCs cultivadas sobre a laminina apresentaram redução da expressão de *SOX2* apenas nos tempos de 14 e 21 dias (Figura 30-B).

Houve redução da expressão de transcritos gênicos para *NANOG* pelas hESCs cultivadas sobre as CDs após 9 e 14 dias. Entretanto, observou-se aumento na expressão desse gene pelas células induzidas à diferenciação após 21 dias em relação às células indiferenciadas (Figura 30-C). As hESCs cultivadas sobre a laminina apresentaram aumento na expressão de *NANOG* após 6 e 9 dias de indução da diferenciação, entretanto, a partir do 14º dia, houve redução na expressão de transcritos gênicos para esse gene.

hESCs

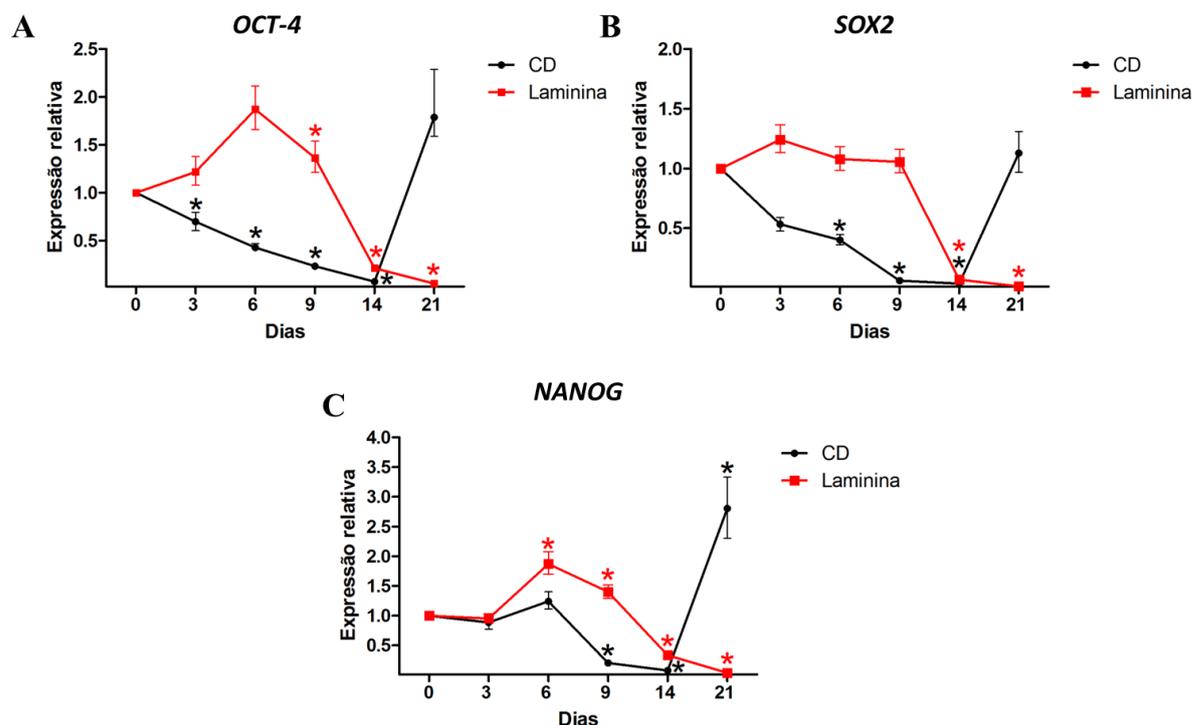


Figura 30: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes *OCT-4* (A), *SOX2* (B) e *NANOG* (C) durante 21 dias de indução da diferenciação das hESCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs. A expressão relativa foi determinada utilizando o *software* REST (Relative Expression Software Tool 2009). O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador dos dados e as células indiferenciadas foram utilizadas como calibrador. n=3; * células cultivadas sobre as CDs ou laminina na presença do meio indutor da diferenciação *versus* células indiferenciadas ($p < 0,05$), Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test.

As hiPSCs apresentaram redução significativa da expressão de *OCT-4* após 6, 14 e 21 dias de cultivo sobre as CDs na presença do MCFL. Já as hiPSCs cultivadas sobre a laminina apresentaram aumento da expressão de transcritos gênicos para *OCT-4* no sexto dia de indução da diferenciação e redução da expressão de transcritos para esse gene nos outros tempos avaliados (Figura 31-A).

Foi observado, a partir de 14 dias, redução significativa na expressão de transcritos gênicos para *SOX2* nas hiPSCs cultivadas sobre as CDs em relação às células indiferenciadas. Já as hiPSCs cultivadas sobre a laminina apresentaram aumento da expressão de *SOX2* no

sexto dia de indução da diferenciação e redução da expressão de transcritos para esse gene a partir do 9º dia (Figura 31-B).

As hiPSCs apresentaram redução significativa da expressão de *NANOG* após 14 e 21 dias de cultivo sobre as CDs. Já as hiPSCs cultivadas sobre a laminina apresentaram aumento da expressão de transcritos gênicos para *NANOG* no sexto dia de indução da diferenciação e redução da expressão de transcritos para esse gene nos outros tempos avaliados quando comparadas com as células indiferenciadas (Figura 31-C).

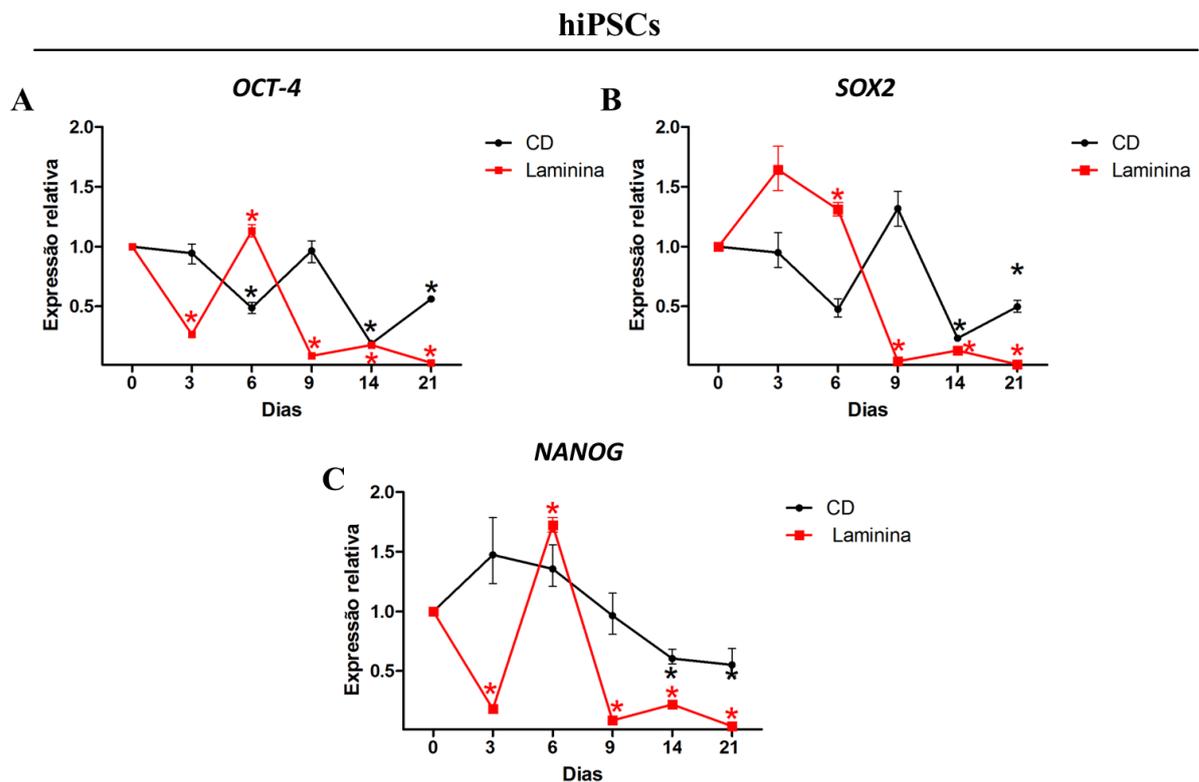


Figura 31: Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos genes *OCT-4* (A), *SOX2* (B) e *NANOG* (C) durante 21 dias de indução da diferenciação das hiPSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina em CECs. A expressão relativa foi determinada utilizando o *software* REST (Relative Expression Software Tool 2009). O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador dos dados e as células indiferenciadas foram utilizadas como calibrador. n=3; * células cultivadas sobre as CDs ou laminina na presença do meio indutor da diferenciação *versus* células indiferenciadas ($p < 0,05$), Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test.

5.7.2. Avaliação da diferenciação das células-tronco em CECs por imunofluorescência

As hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs ou laminina foram analisadas, também, por imunofluorescência, a fim de detectar a expressão proteica dos marcadores de células epiteliais da córnea, CK3 e CK12, após cultivo no MCFL por sete dias. As OFSCs não foram analisadas por imunofluorescência, tendo em vista que as análises por qPCR demonstraram que essas células não foram capazes de expressar genes característicos das CECs em nenhum tempo e condição experimental avaliado.

As imagens de microscopia confocal revelaram a expressão proteica de CK3 pelas hESCs e hiPSCs nas três condições experimentais avaliadas: células indiferenciadas mantidas no meio mTeSRTM, células semeadas sobre as CDs e mantidas em MCFL e células cultivadas sobre a laminina e mantidas em MCFL. Entretanto, foi possível observar mudanças na morfologia celular após cultivo no meio indutor da diferenciação tanto nas células semeadas sobre as CDs quanto na laminina (Figuras 32 e 33).

As hESCs e hiPSCs semeadas sobre as CDs apresentaram aumento no tamanho celular, perderam a capacidade de crescer em colônias e adquiriram uma morfologia poligonal, além de apresentarem um padrão de localização subcelular de CK3 diferente, quando comparadas com as células indiferenciadas (Figura 32 e 33 - B).

Observou-se que as culturas celulares, tanto de hESCs quanto de hiPSCS, induzidas à diferenciação sobre a laminina eram compostas por uma população heterogênea de células, que apresentaram dois padrões diferentes de expressão de CK3. Nessa condição experimental, foram observadas células que apresentavam menor expressão de CK3, com um padrão semelhante ao das células indiferenciadas (Figuras 32 e 33 - C1, C2 e C3) e, células apresentando maior expressão desse marcador (Figuras 32 e 33 - C4, C5 e C6). Entretanto, as hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs constituíram uma população homogênea em relação à morfologia e padrão de expressão proteica de CK3, sendo observadas, nessa condição experimental, apenas células que apresentavam maior expressão de CK3, não sendo notadas células com padrão de expressão semelhante aos das células indiferenciadas (Figuras 32 e 33 - B).

hESCs – CK3

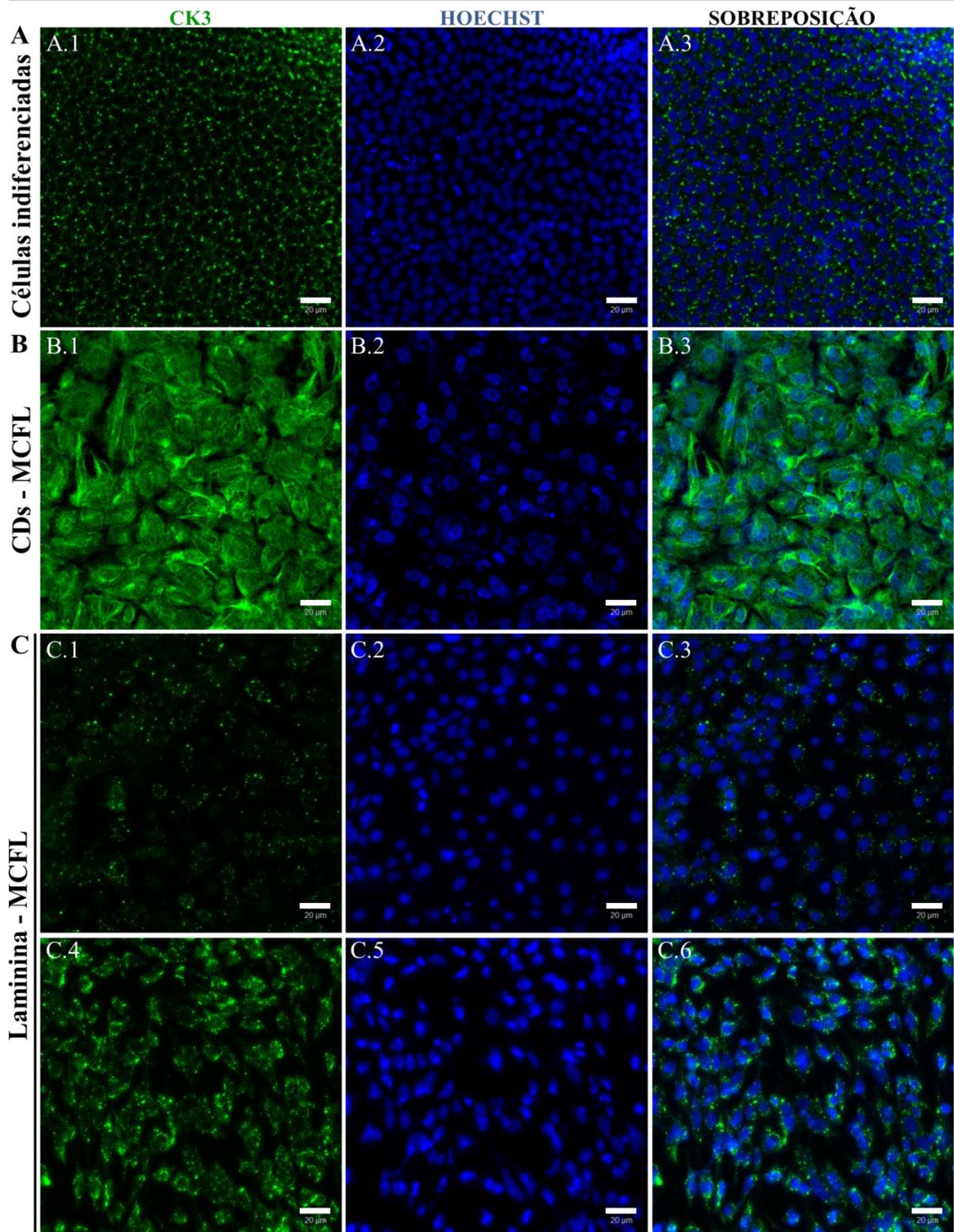


Figura 32 : Imagens de microscopia confocal da expressão de CK3 pelas hESCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs. hESCs indiferenciadas (A), hESCs cultivadas sobre as córneas descelularizadas e mantidas em MCFL (B), células cultivadas sobre a laminina e mantidas em MCFL (C). Verde: CK3, azul: núcleo (Hoechst). Barra = 20 µm.

hiPSCs – CK3

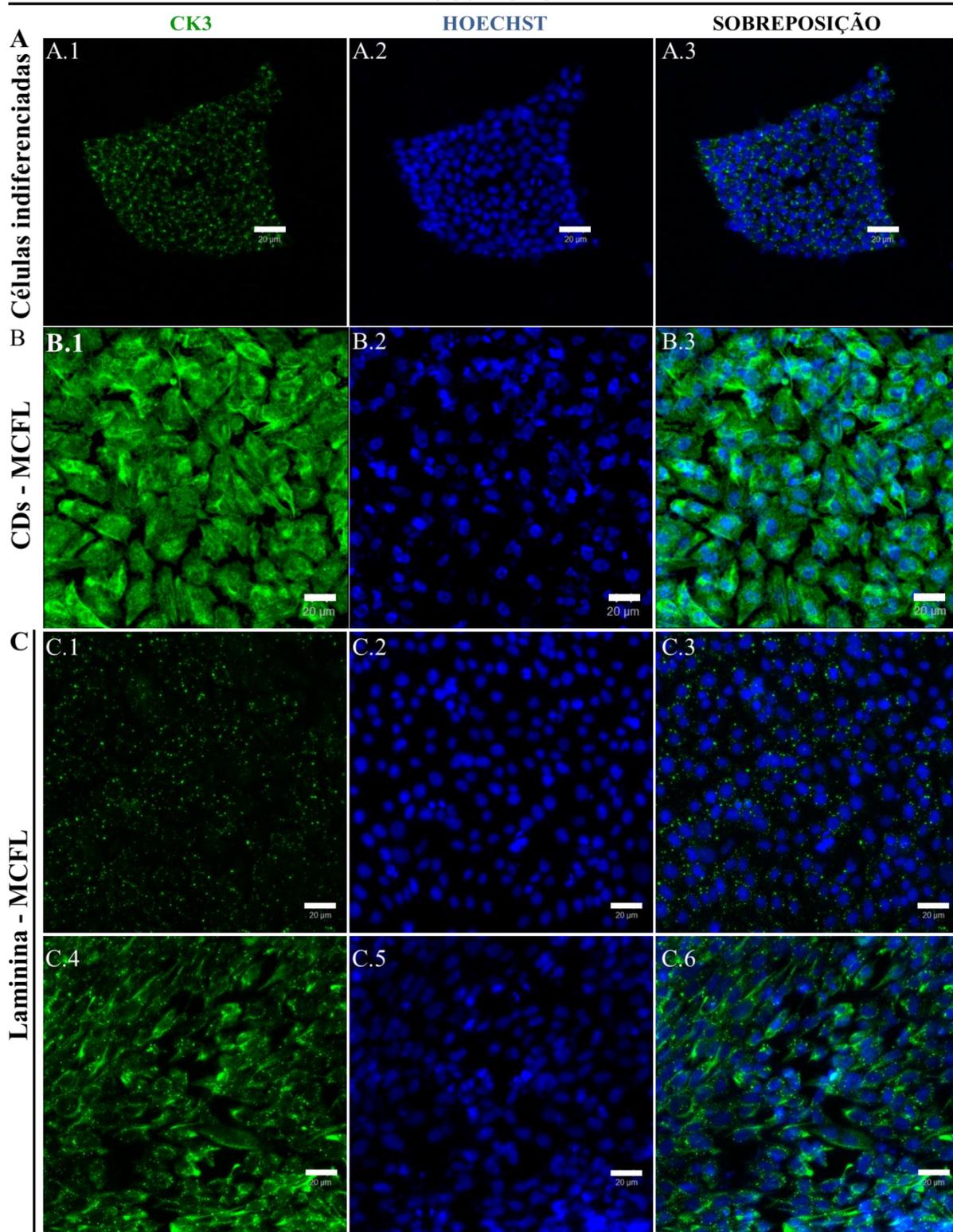


Figura 33: Imagens de microscopia confocal da expressão de *CK3* pelas hiPSCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs. hiPSCs indiferenciadas (A), hiPSCs cultivadas sobre as córneas descelularizadas e mantidas em MCFL (B), hiPSCs cultivadas sobre a laminina e mantidas em MCFL (C). Verde: *CK3*, azul: núcleo (Hoechst). Barra = 20 μm .

As hiPSCs e hESCs cultivadas sobre as CDs ou laminina e mantidas no meio indutor da diferenciação, assim como as células indiferenciadas, expressaram CK12, como revelado pelas imagens de microscopia confocal. Entretanto, as células induzidas à diferenciação apresentaram um padrão de expressão e distribuição proteica diferente quando comparadas com as células indiferenciadas. Além disso, verifica-se, novamente, a mudança na morfologia celular após indução da diferenciação, tanto nas células cultivadas sobre as CDs quanto na laminina (Figuras 34 e 35).

Foi possível observar, também, que as células cultivadas sobre a laminina apresentaram dois padrões diferentes de expressão e distribuição proteica, com células apresentando maior marcação para CK12 na região perinuclear e córtex celular (Figuras 34 e 35 - C1, C2 e C3) e células apresentando marcação uniforme, homogênea, de CK12 por toda a célula (Figuras 34 e 35 – C4, C5 e C6). Em contraposição, nas CDs, foram observadas apenas células que apresentaram marcação homogênea e uniforme de CK12 por todo o citoplasma (Figuras 34 e 35 – B).

hESCs – CK12

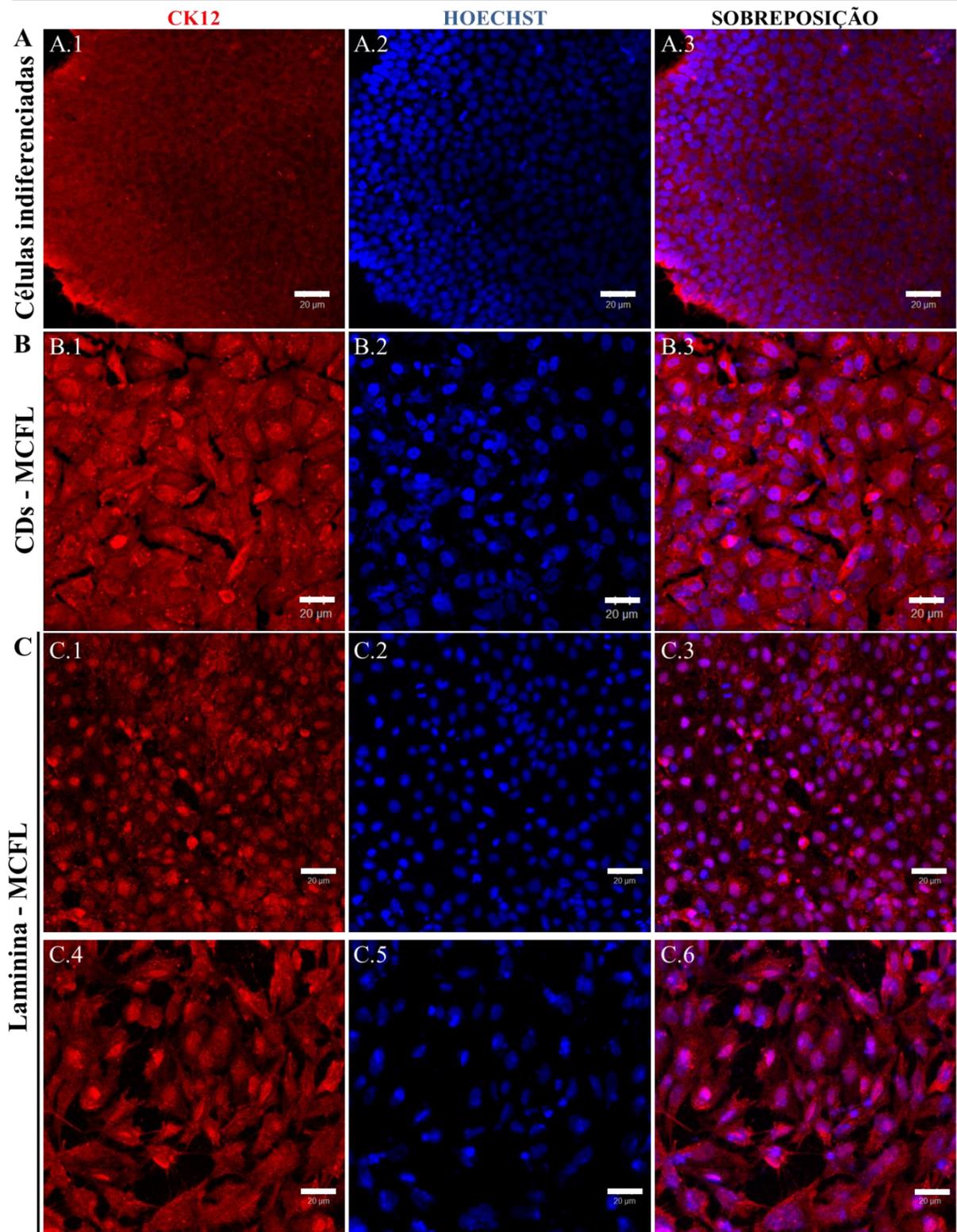


Figura 34: Imagens de microscopia confocal da expressão de *CK12* pelas hESCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs. hESCs indiferenciadas (A), células cultivadas sobre as córneas descelularizadas e mantidas em MCFL (B), hESCs cultivadas sobre a laminina e mantidas em MCFL (C). Vermelho: *CK12*, azul: núcleo (Hoechst). Barra = 20 μm .

hiPSCs – CK12

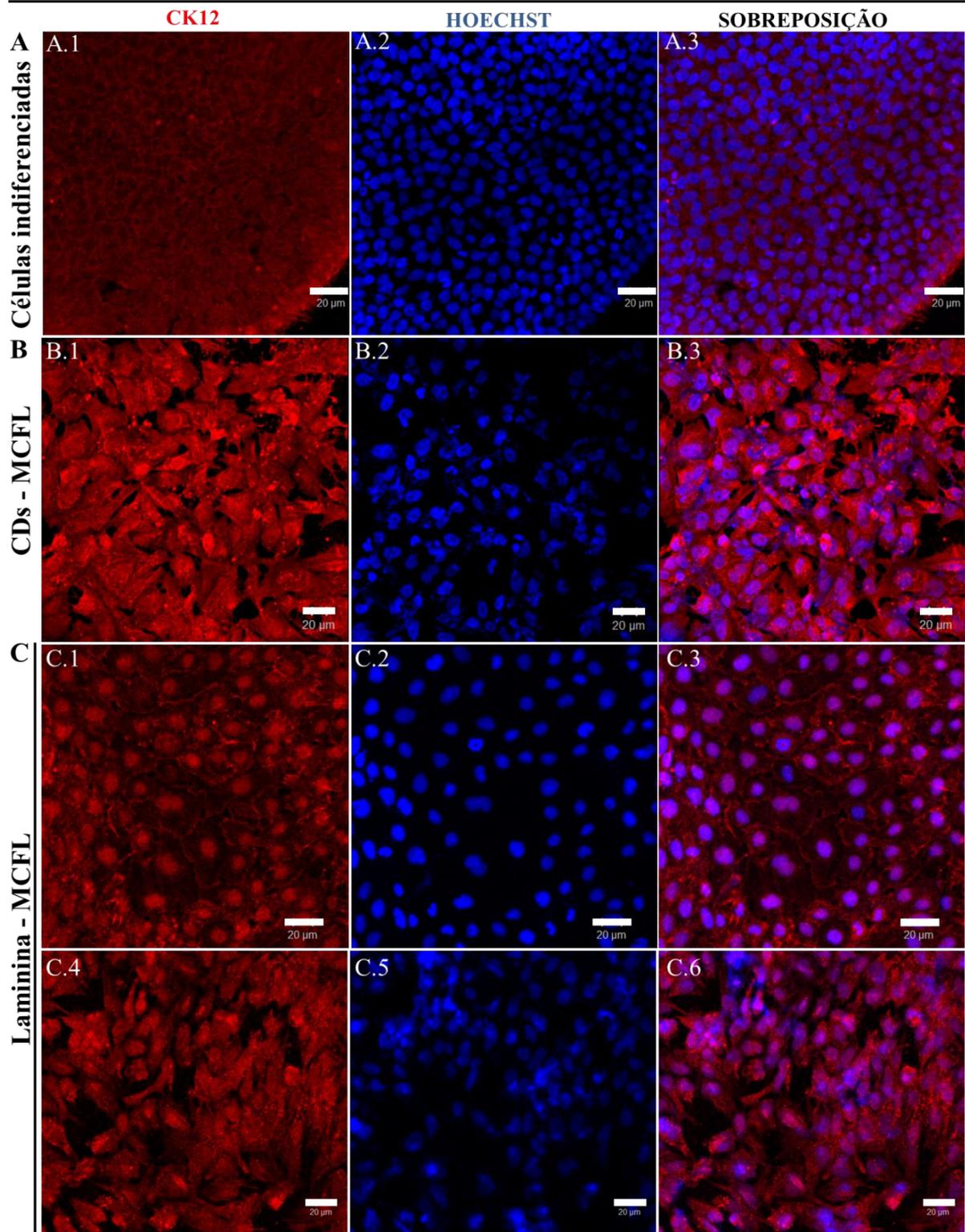


Figura 35: Imagens de microscopia confocal da expressão de *CK12* pelas hiPSCs após sete dias de indução da diferenciação em CECs. Células indiferenciadas (A), células cultivadas sobre as córneas descelularizadas e mantidas em MCFL (B), células cultivadas sobre a laminina e mantidas em MCFL (C). Vermelho: *CK12*, azul: núcleo (Hoechst). Barra = 20 μm .

6. DISCUSSÃO

A descclularização de órgãos e tecidos humanos emerge como uma ferramenta promissora no campo da engenharia de tecidos da córnea devido à similaridade das matrizes descclularizadas com as córneas nativas e à disponibilidade de material para descclularização (Gonzalez-Andrades et al. 2011). Várias córneas são desprezadas para transplante devido à baixa contagem de células ou tempo de preservação, muitas das quais possuem a matriz extracelular intacta e saudável (Wilson et al. 2016). Essas córneas podem ser descclularizadas e, posteriormente, repovoadas com tipos celulares adequados permitindo a reconstrução do epitélio, estroma e endotélio corneanos (Hashimoto et al. 2015). Dessa forma, abre-se a perspectiva de transplantes utilizando córneas que, geralmente, são desprezadas.

Apesar da disponibilidade, há poucos trabalhos de descclularização utilizando córneas humanas (Choi et al. 2010; Alio del Barrio et al. 2015; He et al. 2016; Shafiq et al. 2012; Z. Zhang et al. 2015), sendo que a maioria desses estudos desenvolveram apenas fatias do estroma corneano descclularizado e não a córnea em sua espessura total (Choi et al. 2010; Alio del Barrio et al. 2015; He et al. 2016; Shafiq et al. 2012; Zhang et al. 2015). Comparativamente, a descclularização de córneas xenogênicas, principalmente de origem suína e bovina, tem sido amplamente investigada (Fu et al. 2010; Hashimoto et al. 2010; Zhang et al. 2012; Bayyoud et al. 2012; Yoeruek et al. 2012; Yoeruek et al. 2012 a; Hashimoto et al. 2015; González-Andrades et al. 2015; Lynch, Wilson, & Ahearne 2016; Nara et al. 2016; Huang et al. 2017; Lee et al. 2014; Wu et al. 2014; Dai et al. 2012). Entretanto, do ponto de vista terapêutico, transplantes de órgãos e tecidos de origem humana são preferíveis, tendo em vista que os transplantes xenogênicos implicam em maiores riscos de transmissão de patógenos, indução da resposta imunológica e falência do enxerto (Kasimir et al. 2006).

Sabe-se que a composição da matriz extracelular, a sua arquitetura tridimensional e topografia de superfície influenciam os processos de proliferação, diferenciação e remodelamento celulares (Wilson et al. 2013). O suporte estrutural e biomecânico da membrana basal e do estroma subjacente é fundamental para a sobrevivência e função do epitélio corneano, tendo em vista que as interações entre essas camadas exercem um papel crítico na regulação da proliferação e diferenciação das células epiteliais durante o estado normal e patológico (Shafiq et al. 2012). Dessa forma, o processo de descclularização de córneas permite a criação de um microambiente natural e íntegro, que poderá contribuir para a

proliferação e diferenciação de células-tronco visando a regeneração do epitélio corneano (Zhu et al. 2013).

Entretanto, não há, até o momento, nenhum protocolo padronizado e seguro para descclularização de córneas humanas, sendo que a maioria dos protocolos publicados utilizam córneas xenogênicas e não apresentam a caracterização completa do tecido descclularizado levando a resultados imprecisos e conflitantes (Wilson et al. 2013; González-Andrades, Carriel, Rivera-Izquierdo, et al. 2015). Neste trabalho, pretendeu-se fazer uma caracterização ampla das córneas descclularizadas, utilizando diferentes técnicas, como histologia de rotina, MEV, MET, imunofluorescência, quantificação e amplificação de DNA genômico a fim de comprovar que os tratamentos empregados resultaram na total remoção dos componentes celulares e preservaram as propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular.

Muitos protocolos estão sendo propostos para o desenvolvimento de CDs, incluindo métodos físicos, químicos e enzimáticos como revisado por Wilson et al. (2013) e Lynch e Ahearne (2013). Estudos apontam que tratamentos utilizados com sucesso para descclularizar outros órgãos e tecidos, como congelamento/descongelamento cíclico, sonicação, hipóxia em nitrogênio líquido, incubação com Triton-100X resultam em remoção incompleta dos componentes celulares quando empregados na descclularização de córneas (Crapo, Gilbert, & Badylak 2011; González-Andrades et al. 2015; Wilson et al. 2015; Shafiq et al. 2012; Nara et al. 2016; Lee et al. 2014; Bayyoud et al. 2012; He et al. 2016). O tratamento com SDS, mesmo quando resulta na total remoção dos componentes celulares apresenta efeitos deletérios sobre a membrana basal e estroma, alterando a estrutura e orientação das fibras colágenas, dificultando assim a recelularização (Gonzalez-Andrades et al. 2011; Shafiq et al. 2012; Bayyoud et al. 2012; González-Andrades, Carriel, Rivera-Izquierdo, et al. 2015; Wilson et al. 2015; Nara et al. 2016; Lee et al. 2014; He et al. 2016). Em contrapartida, alguns estudos demonstram que o tratamento com NaCl, aliado ou não ao uso de nucleases, além de remover completamente as células e seus debris, preserva a estrutura da membrana basal e estroma sendo um promissor método para a descclularização de córneas humanas e, por isso, foi escolhido neste estudo (Shafiq et al. 2012; Zhang et al. 2015).

Trabalhos demonstram a eficiência do tratamento apenas com NaCl 1,5M na completa descclularização de córneas suínas (Gonzalez-Andrades et al. 2011; Ma et al. 2015; Lee et al. 2014), o que não foi observado no presente estudo, no qual verificamos que apenas esse tratamento não foi suficiente para remover totalmente os componentes celulares das córneas humanas. Esse achado demonstra que os protocolos de descclularização de matrizes

xenogênicas não mostram reprodutibilidade quando empregados em material de origem humana.

Para que o processo de descélularização seja bem-sucedido, as matrizes descélularizadas devem cumprir os seguintes critérios essenciais: (i) as análises histoquímicas não devem mostrar nenhuma evidência visível de fragmentos celulares e de DNA, (ii) o conteúdo de DNA deve ser igual ou inferior a 50 ng/mg de tecido, (iii) as propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular nativa do tecido descélularizado devem ser preservadas e (iv) a matriz descélularizada obtida não pode apresentar citotoxicidade (Nara et al. 2016; Klama-baryla et al. 2017).

No presente trabalho, ao adicionar o passo de incubação com nucleases após tratamento com NaCl verificou-se a total remoção dos componentes celulares das córneas. Sendo assim, optou-se por seguir a caracterização completa somente das CDs pelo tratamento com NaCl + Nucleases, já que o tratamento apenas com NaCl não apresentou resultados satisfatórios quanto à remoção dos componentes celulares como comprovado pelas análises histológicas, MEV, MET, marcação nuclear com a sonda Hoechst e quantificação de DNA genômico. Esta última análise revelou que o tratamento apenas com NaCl levou à remoção de, aproximadamente, 43,6% do conteúdo de DNA das córneas. Por outro lado, as córneas tratadas com NaCl + Nucleases não continham, praticamente, nenhum conteúdo de DNA, já que, em média, 99,6% do conteúdo de DNA foi removido. A média do conteúdo de DNA nas CDs com NaCl + Nucleases foi 0,57 ng/25 mg de tecido, ou seja, 0,02 ng/mg de tecido, sendo que não foi detectado DNA nem mesmo após amplificação de DNA genômico por PCR.

O tratamento com NaCl + Nucleases não apresentou efeito deletério sobre a matriz extracelular das córneas, tendo em vista que preservou a composição proteica, os glicosaminoglicanos e a ultraestrutura da membrana basal e estroma após a descélularização, como revelado pelas análises de imunofluorescência, MEV, MET e coloração com PAS e *Alcian Blue*.

A manutenção estrutural e funcional da matriz extracelular, incluindo a orientação das fibras colágenas e a preservação das moléculas de glicosaminoglicanos, é fundamental para a conservação das funções biológicas da córnea (Shafiq et al. 2012; Dai et al. 2012; Bayyoud et al. 2012). O alinhamento paralelo e uniforme das fibras colágenas é indispensável para a manutenção da transparência da córnea, assim este é um aspecto de extrema importância na concepção de protocolos de descélularização. Esses protocolos, geralmente, causam inchaço e opacificação nas córneas (Shafiq et al. 2012), o que também foi observado neste estudo após

os dois tratamentos propostos. Entretanto, após a deturgescência com glicerol, as matrizes descelularizadas recuperaram a transparência, sugerindo que os tratamentos não alteraram a distribuição das fibras colágenas estromais. Análises ultraestruturais mais precisas, por MET, demonstraram a preservação da estrutura, orientação e distribuição das fibras colágenas presentes no estroma das CDs comprovando que não ocorreram mudanças na organização lamelar do estroma corneano após tratamento das córneas com NaCl + Nucleases.

A preservação da estrutura e composição da matriz extracelular é importante para que a córnea descelularizada suporte a recelularização, permitindo a adesão e mantendo a viabilidade das células nela cultivadas (Shafiq et al. 2012). No presente trabalho, demonstramos a biocompatibilidade *in vitro* das CDs desenvolvidas com diferentes tipos de células-tronco humanas, incluindo OFSCs, hESCs e hiPSCs humanas. Esses resultados indicam que a metodologia empregada permitiu também a total remoção do NaCl e das enzimas utilizadas, uma vez que a incompleta remoção dessas substâncias comprometeria a recelularização afetando a viabilidade celular.

A fim de eliminar os elementos xenobióticos no desenvolvimento da córnea artificial proposta neste estudo, além de descelularizar córneas de origem humana, utilizou-se também um *pool* de soro alogênico humano (SH) em substituição ao SFB para produção de todos os meios de cultura empregados tanto para isolamento, proliferação ou diferenciação de todos os tipos celulares.

A ausência de elementos xenobióticos no cultivo celular é preconizada pelos protocolos de Boas Práticas de Manipulação como uma das formas seguras para utilização terapêutica das células-tronco (Lindroos et al. 2010). No entanto, a maioria dos protocolos de diferenciação de células-tronco em CECs e de produção do meio indutor (MCFL), suplementam, com SFB, o meio de cultura utilizado nas etapas de isolamento, expansão e indução da diferenciação celular (Homma et al. 2004; Aberdam et al. 2017; Notara et al. 2012, Sareen et al. 2014; Zhu et al. 2013; Ahmad et al. 2007; Gao et al. 2007; Cièslar-Pobuda et al. 2016).

Os trabalhos existentes na literatura, até o momento, envolvendo as OFSCs utilizaram meio DMEM suplementado com 10% SFB ou meio MesenPro, que contém 2% de SFB (Korn et al. 2009; Ho et al. 2011; Chien et al. 2012; Ong et al. 2013; Lee et al. 2013). Gregory et al. (2006), demonstraram que ocorre acúmulo intracelular de antígenos bovinos pelas MSCs mesmo quando estas são cultivadas em meio contendo baixas concentrações de SFB como 2%. A internalização ou aderência de proteínas xenogênicas à superfície celular pode

provocar reações imunológicas severas quando transplantadas. Dados da literatura apontam que não foram detectados anticorpos alogênicos contra o SH em pacientes que foram transplantados com MSCs cultivadas na presença desse suplemento, enquanto pacientes que receberam células expandidas em SFB exibiram anticorpos contra antígenos bovinos e reações imunológicas que, possivelmente, afetaram o resultado clínico do tratamento (Lindroos et al. 2010; Horwitz et al. 2002; Le Blanc et al. 2007). Além disso, o SFB pode conter contaminantes nocivos como vírus, bactérias, micoplasma, príons e endotoxina (Mannello & Tonti 2007; Gottipamula et al. 2012). Dessa forma, o soro humano é uma boa alternativa para substituir o SFB devido à disponibilidade desse suplemento e à possibilidade de realização de testes para patógenos humanos antes da utilização no cultivo e transplante celular (Aldahmash et al. 2011).

Foi observado que as OFSCs apresentaram formato fusiforme, potencial de autorrenovação e aderência à superfície plástica na presença do meio de cultura suplementado com SH. Verificou-se também que mais de 98% da população de OFSCs expressaram marcadores comuns de MSCs CD73, CD105 e CD90, enquanto menos de 2% da população celular expressou os marcadores de células-tronco hematopoiéticas CD34, CD19, CD14, CD45 e HLA-DR. Adicionalmente, as OFSCs se diferenciaram nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica após estímulos específicos. Esses resultados mostram que o SH não afetou o padrão de expressão das moléculas de superfície celular características das MSCs e não alterou o potencial de diferenciação multilinhagem das OFSCs. Fenotipicamente e funcionalmente, essas células estão de acordo com o perfil proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para a definição de MSCs humanas (Dominici et al. 2006; Bourin et al. 2013). (Esses dados referentes à caracterização das OFSCs em meio de cultura suplementado com SH foram publicados na revista *Stem Cell Reviews and Reports*, em 2014 – Anexo – item 10.3).

Os fibroblastos límbicos também foram isolados e cultivados com sucesso no meio de cultura suplementado com SH, apresentando aderência à superfície plástica, morfologia fusiforme e potencial de autorrenovação. A análise do perfil fenotípico por imunofluorescência comprovou a homogeneidade da população celular assim como a sua natureza fibroblástica, tendo em vista que essas células apresentaram expressão proteica de CD44, colágeno tipo I e fibronectina, mas não expressaram CD106, p63, CK3 e CK12. Após isolamento e cultivo dos FLs foi possível produzir o meio epitelial condicionado por eles, suplementado com SH. Esse meio foi utilizado para induzir a diferenciação das células-tronco em CECs.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que as OFSCs não foram capazes de expressar genes característicos da linhagem de CECs quando cultivadas sobre as CDs ou laminina na presença do MCFL. Ho et al. (2011) verificaram que as OFSCs expressaram marcadores de CECs apenas quando cultivadas em contato direto com CECs na presença de meio epitelial. Esses autores mostraram que os efeitos parácrinos não são suficientes para induzir a diferenciação das OFSCs já que, nem mesmo após cultivo em sistema Transwell com CECs na presença de meio epitelial não condicionado, as OFSCs adquiriram um fenótipo epitelial corneano, ou seja, o sistema Transwell não exerceu o mesmo efeito indutor que o contato direto dos dois tipos celulares. Entretanto, devido às limitações dessa técnica para futura aplicação clínica dessas células, tendo em vista a necessidade da purificação das células diferenciadas e as dificuldades técnicas para tal, nossa proposta foi investigar se o contato das OFSCs com a matriz extracelular descelularizada natural da córnea, juntamente com o MCFL, induziria a diferenciação dessas células em CECs. Entretanto, verificamos que essas condições de cultivo não foram suficientes para induzir tal diferenciação.

Sabe-se que as células-tronco adultas possuem potencial de diferenciação mais limitado do que as células-tronco pluripotentes. Por isso, investigamos também se as condições de indução propostas, cultivo sobre as CDs na presença do MCFL suplementado com SH, levaria à diferenciação das hESCs e hiPSCs na linhagem de CECs. As células-tronco também foram cultivadas sobre a laminina na presença do MCFL a fim de comparar se a indução da diferenciação sobre as CDs seria mais eficiente para promover a diferenciação em CECs do que o cultivo sobre um componente isolado da membrana basal.

A interação entre as células epiteliais e a membrana basal da córnea desempenha um papel importante na regulação de atividades celulares como a proliferação, migração e diferenciação. Saaren et al. (2014), ao cultivarem hiPSCs sobre a superfície de córneas humanas que tiveram seu epitélio previamente removido por NaOH, verificaram que houve maior expressão dos marcadores terminais de diferenciação, CK3 e CK12, pelas células nessa condição de cultivo em relação às hiPSCs cultivadas sobre a membrana amniótica ou sobre uma mistura de componentes da membrana basal (fibronectina, colágeno tipo IV e laminina). Com esses achados, os autores supracitados sugerem que o contato das células-tronco com um microambiente mais natural ajuda a direcionar a diferenciação das mesmas em CECs maduras. Da mesma forma, no presente trabalho, foi observado, por análises de qPCR, maior expressão de *CK3* pelas hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs do que pelas células

cultivadas sobre a laminina. As hESCs apresentaram, em todos os tempos avaliados, maiores níveis de expressão relativa de *CK12* quando cultivadas sobre as CDs, do que quando cultivadas sobre a laminina. Além disso, foi observado que o cultivo das hESCs e hiPSCs sobre as CDs por sete dias, mesmo na ausência do MCFL, levou à aumento da expressão de transcritos gênicos para *CK12* tanto pelas hESCs quanto pelas hiPSCs.

Embora CK3 e CK12 sejam considerados marcadores específicos de CECs, no presente estudo, verificou-se a expressão proteica de ambos os marcadores pelas hESCs e hiPSCs indiferenciadas. Outros trabalhos também demonstraram que células-tronco pluripotentes indiferenciadas apresentaram expressão gênica e /ou proteica de CK12 e/ou CK3 (Notara et al. 2012, Homma et al. 2004; Brzeszczynska et al. 2014).

Por meio das análises de imunofluorescência, verificou-se também que as culturas celulares, tanto de hESCs quanto de hiPSCs, induzidas à diferenciação sobre a laminina eram compostas por uma população heterogênea de células, com células apresentando maior expressão de CK3 e células apresentando menor expressão desse marcador (com padrão de expressão semelhante ao das células indiferenciadas). Em contrapartida, as hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs constituíram uma população homogênea em relação à morfologia e padrão de expressão proteica de CK3, sendo que, nessa condição experimental, as células apresentaram, qualitativamente, maior expressão de CK3 em relação às células indiferenciadas, corroborando com os dados de qPCR obtidos.

O padrão de expressão proteica de CK12 pelas hESCs e hiPSCs cultivadas sobre as CDs também foi homogêneo. Entretanto, os dois tipos celulares induzidos à diferenciação sobre a laminina, apresentaram padrões diferentes de expressão e distribuição proteica de CK12. Embora as análises por imunofluorescência não tenham mostrado aumento qualitativo da expressão proteica de CK12 pelas hESCs e hiPSCs induzidas à diferenciação, as análises por qPCR demonstraram aumento significativo da expressão gênica desse marcador pelos dois tipos celulares ao longo da indução da diferenciação sobre as CDs ou laminina. Esse aumento de expressão de *CK12* foi mais acentuado nas hESCs cultivadas sobre as CDs ao longo de todo período avaliado, sendo que no sexto dia, foi verificado aumento de 193 vezes na expressão desse gene por essas células quando comparadas com as hESCs indiferenciadas.

Foi observado, tanto nas hESCs quanto nas hiPSCs, pico de expressão de *CK12* anterior ao pico de expressão de *CK3* e *p63*. Ahmad et al. (2007), ao induzirem a diferenciação de duas linhagens de hESCs cultivadas sobre colágeno tipo IV em CECs, também observaram pico de expressão de *CK12* antecedendo o pico de expressão de *CK3* nos

dois tipos celulares, sendo esses picos alcançados após 9 e 15 dias, respectivamente. Em estudo realizado por Cièslar-Pobuda et al. (2016), no qual hiPSCs foram cultivadas sobre gelatina de derme suína e induzidas à diferenciação em CECs, verificou-se pico de expressão de *CK12* e *CK3* aos 14 dias, antecedendo o pico de expressão de *p63*, que foi alcançado aos 21 dias. No presente trabalho, os picos de expressão de *CK12*, *CK3* e *p63* foram alcançados após 6, 9 e 21 dias de indução da diferenciação sobre as CDs, respectivamente. Comparado com os dois trabalhos citados anteriormente, observa-se que o cultivo sobre as CDs levou à expressão precoce dos marcadores *CK12* e *CK3*.

Foi observado, de forma geral, aumento contínuo da expressão de *p63* pelas hESCs e hiPSCs ao longo de todo período de indução da diferenciação, alcançando maior expressão ao 21 dias. Padrão semelhante foi observado em outros trabalhos que verificaram aumento contínuo da expressão de *p63* com pico de expressão nos períodos mais avançados de indução da diferenciação (Cièslar-Pobuda et al. 2016; Mikhailova et al. 2014; Brzeszczynska et al. 2014). Um estudo clínico mostrou uma correlação positiva entre a expressão de *p63* e a sobrevivência de enxertos de LSCs (Rama et al. 2010), de forma que alguns autores sugerem que a alta expressão de *p63* pelas CECs ou LSC derivadas de células-tronco indica grande potencial para aplicações clínicas futuras dessas células (Mikhailova et al. 2016; Mikhailova et al. 2014).

As hESCs e hiPSCs, após indução da diferenciação sobre as CDs ou laminina, apresentaram aumento da expressão de *PAX6* na maioria dos tempos avaliados. O *PAX6* é um fator de transcrição essencial para a expressão de *CK12*, além de regular a expressão de genes envolvidos na morfogênese do olho e desenvolvimento da superfície ocular, é também importante no desenvolvimento pós natal e manutenção da córnea adulta, sendo expresso pelas CECs (Collinson et al. 2003). Assim, a expressão de *PAX6* pelas células-tronco durante a indução da diferenciação é considerada um fator chave para o comprometimento dessas células com a linhagem de CECs (Brez).

Embora as hESCs e hiPSCs tenham apresentado mudanças similares na morfologia após indução da diferenciação sobre as CDs ou sobre a laminina, as análises de qPCR revelaram diferenças na capacidade de diferenciação dessas células. De forma geral, as hESCs apresentaram níveis mais acentuados de expressão dos genes relacionados à linhagem de CECs, enquanto as hiPSCs apresentaram picos menos pronunciados de expressão desses marcadores. Outros estudos evidenciam que diferentes linhagens de células-tronco pluripotentes apresentam diferenças na capacidade de diferenciação (Ahmad et al. 2007;

Hayashi et al. 2016; Hayashi et al. 2012; Osafune et al. 2008; Toivonen et al. 2013). Essa variação na propensão à diferenciação pode ser devido às diferenças no status epigenético das diferentes linhagens de célula-tronco pluripotentes (Bock et al. 2011; Nasu et al. 2013).

O risco de formação de teratomas após transplante de células derivadas de células-tronco pluripotentes é um dos fatores que dificultam a utilização clínica das mesmas. Portanto, analisou-se a expressão gênica dos marcadores de pluripotência (*OCT-4*, *Nanog* e *SOX2*) pelas hESCs e hiPSCs ao longo da indução da diferenciação em CECs. Verificou-se que as hiPSCs, de forma geral, apresentaram redução significativa, mas não completa, da expressão desses marcadores após 14 e 21 dias de cultivo. Foi observado menores níveis graduais de expressão desses marcadores pelas hESCs cultivadas sobre as CDs em relação às células cultivadas sobre a laminina ao longo dos 14 dias de indução da diferenciação. Entretanto, no tempo de 21 dias, houve um aumento da expressão desses genes pelas hESCs cultivadas sobre as CDs, que apresentaram níveis de expressão similares (*OCT-4* e *SOX2*) ou maiores (*Nanog*) aos das células indiferenciadas. Cièslar-Pobuda et al. (2016) verificaram padrão semelhante de expressão dos marcadores de pluripotência pelas hiPSCs induzidas à diferenciação em CECs na presença do MCFL, com redução dos níveis de expressão ao longo dos 14 dias e aumento após 21 dias. Outros trabalhos também demonstraram a expressão de marcadores de pluripotência por diferentes linhagens de células-tronco pluripotentes cultivadas na presença do MCFL no final do protocolo de diferenciação (Ahmad et al. 2007; Brzezczynska et al. 2014). Dessa forma, sugere-se que esses protocolos de diferenciação utilizando MCFL, incluindo o utilizado no presente estudo, induzam a diferenciação em células semelhantes às CECs, porém a purificação dessas células não é alcançada, permanecendo nas culturas células indiferenciadas ou células com “traços” de pluripotência (Hayashi et al. 2017; Hayashi et al. 2012; Shalom-Feuerstein et al. 2012). Assim, são necessários passos adicionais de purificação seletiva das CECs derivadas das células-tronco pluripotentes para aperfeiçoamento do processo de diferenciação visando a aplicação clínica futura dessas células.

7. CONCLUSÕES

Os achados do presente estudo demonstraram que o tratamento das córneas humanas apenas com NaCl resultou em remoção incompleta dos componentes celulares. Em contraposição, o tratamento com NaCl + Nucleases resultou em uma matriz completamente descelularizada com propriedades estruturais e funcionais preservadas e biocompatível com diferentes tipos de células-tronco: OFSCs, hESCs e hiPSCs. Foi possível isolar e cultivar com sucesso as OFSCs e fibroblastos do limbo corneoescleral em meio de cultura suplementado com SH, assim como produzir o meio epitelial condicionado por esses fibroblastos. Após cultivo nesse meio indutor e sobre as CDs ou laminina, as OFSCs não foram capazes de se comprometer com a linhagem de CECs. Em contrapartida, as hESCs e hiPSCs alcançaram um fenótipo epitelial corneano mais maduro quando cultivadas sobre a membrana basal das CDs na presença do meio indutor do que quando cultivadas sobre a laminina. Dessa forma, podemos concluir que as CDs desenvolvidas no presente estudo apresentaram um efeito positivo sobre a diferenciação das células-tronco pluripotentes em CECs e possuem grande potencial para utilização no campo da engenharia de tecidos da córnea.

8. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos, podem-se traçar algumas perspectivas:

- Aprimorar o protocolo de diferenciação a fim de alcançar uma estabilidade fenotípica das CECs derivadas das hESCs e hiPSCs;

- Avaliar o processo de regeneração do epitélio corneano em modelo animal de deficiência de células-tronco do limbo após o transplante das CDs colonizadas com as células-tronco induzidas à diferenciação em CECs;

- Promover a reconstrução do estroma das CDs utilizando OFSCs, hESCs e hiPSCs;

- Promover a reconstrução do endotélio das CDs utilizando OFSCs, hESCs e hiPSCs.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberdam, E.; Isabelle, P.; Linda, S.; Daniel, A. Induced pluripotent stem cell-derived limbal epithelial cells (lipsc) as a cellular alternative for in vitro ocular toxicity testing. *PloS One*, v. 12, n. 6, p. 1–10, 2017.

Ahmad, S.; Stewart, R.; Yung, S. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*, v. 25, n.5, p. 1145–1155, 2007.

Aldahmash, A.; Haack-Sørensen, M.; Al-Nbaheen, M. et al. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Reviews*, v. 7, n. 4, p. 860–68, 2011.

Alio del Barrio, J. L.; Chiesa, M.; Garagorri, N. et al. Acellular human corneal matrix sheets seeded with human adipose-derived mesenchymal stem cells integrate functionally in an experimental animal model. *Experimental Eye Research*, v. 132, p. 91–100, 2015.

Amirjamshidi, H.; Milani, B. Y.; Sagha, H. M. et al. Limbal fibroblast conditioned media: a non-invasive treatment for limbal stem cell deficiency. *Molecular Vision*, v. 17, p. 658–666, 2011.

Arpitha, P.; Namperumalsamy, V. P.; Muthiah, S.; Veerappan, M. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: implications on epithelial stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 46, n. 10, p. 3631–3636, 2005.

Bakhshandeh, H.; Soleimani, M.; Hosseini, S. S. et al. Poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous ring surrounding a polyvinyl alcohol hydrogel for the development of a biocompatible two-part artificial cornea. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 1509–1515, 2011.

Moreira, H.; Sousa, L. B.; Sato, E. H.; Faria, M. A. R. Banco de olhos, transplante de córnea. Coordenador: Alves, M. R., 3.ed., Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2013.

Baylis, O.; Figueiredo, F.; Henein, C. et al. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 112, p. 993–1002, 2011.

Bayyoud, T.; Thaler, S.; Hofmann, J. et al. Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Current Eye Research*, v. 37, n. 3, p. 179–186, 2012.

Bernardo, M. E.; Avanzini, M. A.; Perotti, C. et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *Journal of Cellular Physiology*, v. 211, p. 121–130, 2007.

Bieback, K.; Hecker, A.; Kocaömer, A. et al. Bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, v. 27, p. 2331–2341, 2009.

Blazejewska, E. A.; Schlotzer-Schrehardt, U.; Zenkel, M. et al. Corneal limbal microenvironment can induce trans differentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. *Stem Cells*, v. 27, p. 642–652, 2009.

Bock, C.; Kiskinis, E.; Verstappen, G. et al. Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*, v. 144, p. 439–452, 2011.

Borderie, V. M.; Guilbert, E.; Touzeau, O.; Laroche, L. Graft rejection and graft failure after anterior lamellar versus penetrating keratoplasty. *American Journal of Ophthalmology*, v. 151, n. 6, p. 1024–1029, 2011.

Bourin, P.; Bunell, B.; Casteilla, L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. Cytotherapy, v. 15, n. 6, p. 641–648, 2013.

Brunner, D.; Frank, J.; Appl, H. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*, v. 27, p. 53–62, 2010.

Brzeczczynska, J.; Samuel, K.; Greenhough, S. et al. Differentiation and molecular profiling of human embryonic stem cell-derived corneal epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 33, n. 6, p. 1597–1606, 2014.

Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopedic Research*, v. 9, n. 5, p. 641–650, 1991.

Carvalho, J. L., Carvalho, P. H.; Gomes, D. A.; Goes, A. M. Characterization of decellularized heart matrices as biomaterials for regular and whole organ tissue engineering and initial in-vitro recellularization with iPS cells. *Journal of Tissue Science & Engineering*, v. S11, p. 1–15, 2012.

Carvalho, J. L.; Campos, D. R.; Oliveira, M. S. et al. Mesenchymal stem cells express low levels of cardiomyogenic genes and show limited plasticity towards cardiomyogenic phenotype. *Journal of Live Sciences*, v. 7; n. 9, p. 950–964, 2013.

Casaroli-Marano, R. P.; Nieto-Nicolau, N.; Martínez-Conesa, E. M. Progenitor cells for ocular surface regenerative therapy. *Ophthalmic Research*, v. 49, p. 115–121, 2013.

Chien, M. H.; Bien, M. Y.; Ku C. C. et al. Systemic human orbital fat-derived stem/stromal cell transplantation ameliorates acute inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Critical Care Medicine*, v. 40, n. 4, p. 1245–1253, 2012.

Cho, H. S.; Song, I. H.; Park, S. et al. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich PH and its influence on human mesenchymal stem cells. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, v. 31, p. 212–218, 2011.

- Choi, J. S.; Williams, J. K.; Greven, M. et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials*, v. 31, n. 26, p. 6738–6745, 2010.
- Cieślak-Pobuda, A.; Rafat, M.; Knoflach, V. et al. Human induced pluripotent stem cell differentiation and direct transdifferentiation into corneal epithelial-like cells. *Oncotarget*, v. 7, n. 27, p. 42314–42329, 2016.
- Collinson, J. M.; Quinn, J. C.; Hill, R. E.; West, J. D. The roles of pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo, *Developmental Biology*, v. 255, p. 303–312, 2003.
- Covre, J. L.; Loureiro, R. R.; Cristovam, P. C. et al. Comparação entre membrana amniótica com e sem epitélio como substrato para cultura de células epiteliais do limbo ex vivo. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v. 74, n. 2, p. 114–117, 2011.
- Crapo, P. M.; Gilbert, T. W. Badyak. S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2011.
- Crisan, M.; Yap, S.; Casteilla, L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, v. 3, p. 301–313, 2008.
- Da Silva Meirelles, L.; Telles, P. C.; Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 11, p. 2204–2213, 2006.
- Dai, Y.; Jiansu, C.; Hongyang, L. et al. Characterizing the effects of VPA, VC and RCCS on rabbit keratocytes onto decellularized bovine cornea. *PloS One*, v. 7, n. 11, p. e50114, 2012.
- De Coppi, P.; Bartsch, G. J.; Siddiqui, M M. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 1, p. 100–106, 2007.
- DelMonte, D. W.; Kim, T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 37, p. 588–598, 2011.
- Sareen, D.; Saghizadeh, M.; Ornelas, L. et al. Differentiation of human limbal-derived induced pluripotent stem cells into limbal-like epithelium. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 3; p. 1002–1012, 2014.
- Dominici, M; Le Blanc, K.; Mueller, I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- Dragoo, J. L.; Samimi, B.; Zhu, M. et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *Journal of Bone Joint Surgery-British*, v. 85, p. 740–747, 2003.
- Dua, H. S.; Azuara-Blanco, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*, v. 44, n. 5, p. 415–425, 2000.

- Dua, H. S.; Faraj, L. A.; Said, D. G. et al. Human corneal anatomy redefined a novel pre-desemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*, v. 120, n. 9, p. 1778–1785, 2013.
- Fagerholm, P.; Lagali, N.S.; Ong, J.A. et al. Stable corneal regeneration 4 years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials*, v. 35, p. 2420, 2014.
- Fenglan, X.; Yubao, L.; Xiaoming Y. et al. Preparation and in vivo investigation of artificial cornea made of nano-hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol) hydrogel composite. *Journal of Material Science Materials in Medicine*, v. 18, n. 4, p. 635–640, 2007.
- Fischbach, G. D.; Fischbach, R. L. Stem cells: science, policy, and ethics. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 114, p. 1364–1370, 2004.
- Fraser, J. K.; Wulur, I.; Alfonso, Z. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 4, p. 150-154, 2006.
- Fraser, J. K.; Wulur, I.; Alfonso, Z. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. *Cytotherapy*, v. 9, p. 459, 2007.
- Friedenstein, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I. et al. Heterotopic of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, v. 6, p. 230–247, 1968.
- Friedenstein, A. J.; Lalykina, K. S. Thymus cells are inducible to osteogenesis. *European Journal Immunology*, v. 2, p. 602–603, 1972.
- Fu, Y.; Fan, X.; Chen, P. et al. Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold. *Cells Tissues Organs*, v. 191, n. 3, p. 193–202, 2010.
- Gao, N.; ZhiChong, W.; Bing, H. et al. Putative epidermal stem cell convert into corneal epithelium-like cell under corneal tissue in vitro. *Science in China Series C Life Sciences*, v. 50, n. 1, p. 101–110, 2007.
- Gearhart, J. New potential for human embryonic stem cells. *Science*, v. 6, p. 1061–1062, 1998.
- Gepstein, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circulation Research*, v. 91, n. 10, p. 866–876, 2002.
- Ghezzi, C. E.; Rnjak-kovacina, J.; Kaplan, D. L. Corneal Tissue Engineering: Recent Advances and Future Perspectives, v. 21, n. 3, p. 278–287, 2015.
- Gokhale, P. J.; Andrews, P. Human embryonic stem cells: 10 years on. *Laboratory Investigation*, v. 89, n. 3, p. 259–262, 2009.
- Gomaa A, Comyn O, Liu C. Keratoprotheses in clinical practice - a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 38, n. 2, 211–224, 2010.

Gomes, J. A.; Monteiro, B. G.; Melo, G. B. et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 51, n. 3, p. 1408–1414, 2010.

González-Andrades, M.; Cardona, J. C.; Ionescu, A. M. et al. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 52, n. 1, p. 215, 2011.

González-Andrades, M.; Carriel, V.; Rivera-Izquierdo, M. et al. Effects of detergent-based protocols on decellularization of corneas with sclerocorneal limbus. evaluation of regional differences. *Translational Vision Science & Technology*, v. 4, n. 2, p. 13, 2015.

Gottipamula, S.; Archana, S.; Sagar, K. et al. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnology Letters*, v. 34, n. 7, p. 1367–1374, 2012.

Gottipamula, S.; Muttigi, M. S.; Chaansa, S. et al. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 10, n.2, p. 108–119, 2013.

Gregory, C. A.; Reyes, E.; Whitney, et al. Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem cells*, v. 24, n. 10, p. 2232–2243, 2006.

Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 2000.

Hamrah, P.; Sahin, A. Epitélio do limbo e da córnea. In: Holland, E. J.; Mannis, M. J.; Lee, W. B. *Doenças da superfície ocular: córnea, conjuntiva e filmelacrimal*. 1ª ed. Brasil: Elsevier, p. 29–34, 2015.

Hashimoto, Y.; Funamoto, S.; Sasaki, S. et al. Biomaterials preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, n. 14, p. 3941–3948, 2010.

Hashimoto, Y.; Funamoto, S.; Sasaki, S. et al. Corneal regeneration by deep anterior lamellar keratoplasty (DALK) using decellularized corneal matrix. *PloS One*, v. 10, n. 7, p. e0131989, 2015.

Hayashi, R.; Ishikawa, Y.; Miyuki, I. et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PloS One*, v. 7, n. 9, p. e45435, 2012.

Hayashi, R.; Ishikawa, Y.; Sasamoto, Y. et al. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature*, v. 531, p. 376–380, 2016.

Hayashi, R.; Ishikawa, Y.; Katori, R. et al. Co-ordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nature Protocols*, v. 12, n. 4, p. 683–696, 2017.

He, Z.; Forest, F.; Bernard, A. et al. Cutting and decellularization of multiple corneal stromal lamellae for the bioengineering of endothelial grafts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 57, n. 15, p. 6639, 2016.

Heiskanen, A.; Satomaa, T.; Tiitinen, S. et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*, v. 25, p. 197–202, 2007.

Hipp, J.; Atala, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Review*, v. 4, n. 1, p. 3–11, 2008.

Ho, J. H. C.; Ma, W. H.; Tseng, T. C. et al. Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. *Tissue Engineering*, v. 17, n. 1, p. 255–266, 2011.

Homma, R.; Hideshi, Y.; Mitsuhiro, T.; Manae, S. K. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Investigative Ophthalmology*, v. 45, n. 12, p. 4320–4326, 2004.

Horwitz, E. M.; Gordon, P. L.; Winston, K K K. et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 13, p. 8932–8937, 2002.

Horwitz, E. M.; Le Blanc, K.; Dominici, M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005.

Huang, Y. H.; Tseng, F.W.; Chang, W.H. e al. Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology. *Acta Biomaterialia*, In press, 2017.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Contas Nacionais [internet]. IBGE, Brasília (DF); 2010. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br> [Acesso 10/04/2017].

Ionescu, A. M.; Alaminos, M., De la Cruz, C. J. et al. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *Journal of Mechanical Behavioral Biomedicin Material*, v. 4, n. 8, p.1963–1973, 2011.

Isaac, C.; Mattos, C. N.; Rêgo, F. M. P. et al. Substituição de soro bovino fetal por soro humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v. 26, n. 3, p. 379–384, 2011.

Kasimir, M. T.; Erwin, R.; Gernot, S. et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves, *Journal of Heart Valve Disease*, v. 15, n. 2, p. 278–286, 2006.

Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, v. 24, p. 1294–1301, 2006.

Khan B. F.; Harissi-Dagher, M.; Khan, D. M.; Dohlman, C. H. Advances in Boston keratoprosthesis: enhancing retention and prevention of infection and inflammation. *International Ophthalmology Clinic*, v. 47, n. 2, p. 61–71, 2007

Kim, B. S.; Baez, C. E.; Atala, A. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology*, v. 18, n. 1, p. 2–9, 2000.

Klama-Baryla, A.; Kitala, D.; Kraut, M. et al. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, p. 1–15, 2017.

Kocaoemer, A.; Kern, S.; Klüter, H. et al. Serum and thrombin-activated platelet-rich PH are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*, v. 25, p. 1270–1278, 2007.

Kolli, S.; Ahmad, S.; Lako, M. et al. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*, v. 28, p. 297–310, 2010.

Kopen, G. C.; Prockop, D. J.; Phinney, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 10711–10716, 1999.

Korn, B. S.; Kikkawa, D. O.; Hicok, K. C. Identification and characterization of adult stem cells from human orbital adipose tissue. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, v. 25, n. 1, p. 27–32, 2009.

Kuznetsov, S. A.; Mankani, M. H.; Gronthos, S. Circulating skeletal stem cells. *The Journal of Cell Biology*, v. 153, n. 5, p. 1133–1140, 2001.

Langer, R.; Vacanti, J. P. Articles *Tissue Engineering*. *Science*, v. 260, p. 920–926. 1993.

Law, S.; Chaudhuri, S. Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges: a review. *American Journal of Stem Cells*, v. 2, n. 1. p. 22–38, 2013.

Lawrence, B.D.; Pan, Z.; Liu, A. et al. Human corneal limbal epithelial cell response to varying silk film geometric topography in vitro. *Acta Biomaterial*, v. 8, p. 3732, 2012.

Le Blanc, K; Ringdén, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation biology of blood and marrow transplantation. *American Society for Blood and Marrow Transplantation*, v. 11, p. 321–334, 2005.

Le Blanc, K.; Samuelsson, H.; Lönnies, L. et al. Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. *Transplantation*, v. 84, n. 8, p. 1055–1059, 2007.

- Lee, W.; Yuko, M.; Cassandra, L. et al. A Comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity. *International Journal of Ophthalmology*, v. 7, n. 4, p. 587–593, 2014.
- Lee, J. Y.; Lee, K.; Shin, H. et al. Orbital volume augmentation after injection of human orbital adipose-derived stem cells in rabbits. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 54, n. 4, p. 2410–2416., 2013.
- Levis, H. J.; Massie, I.; Dziasko, M. A. et al. Rapid tissue engineering of biomimetic human corneal limbal crypts with 3D niche architecture. *Biomaterials*, v. 34, p. 8860, 2013.
- Li, D. Q.; Tseng, S. C. Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor- α , platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 β . *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 37, p. 2068–2080, 1996.
- Li, L.; Neaves, W. B. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Research*, v. 66, p. 4553–4557, 2006.
- Li, M., Ikehara, S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells International*, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- Li, W.; Hayashida, Y.; Chen, Y. T. et al. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Research*, v. 17, n. 1, p. 26–36, 2007.
- Lin, H. T.; Tarng, Y. W.; Chen, Y. C. et al. Using human PH supplemented medium to cultivate human bone marrow–derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. *Transplantation Proceedings*, v. 37, p. 4504–4505, 2005.
- Lin, K. J.; Loi, M. X.; Lien, G. S. et al. Topical administration of orbital fat-derived stem cells promotes corneal tissue regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 4, n. 3, p. 72, 2013.
- Lindroos, B.; Aho, K.; Kuokkanen, H. et al. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Engineering: Part A*, v. 16, p. 2281–2294, 2010.
- Lindroos, B.; Suuronen, R.; Miettinen, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*, v. 7, p. 269–291, 2011.
- Lynch, A. P.; Ahearne, M. strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Experimental Eye Research*, v. 108, p. 42–47, 2013.
- Lynch, A. P.; Wilson, S. L.; Ahearne, M. Dextran preserves native corneal structure during decellularization. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 22, n. 6, p. 561–72, 2016.
- Ma, X. Y.; Zhang, Y.; Zhu, D. et al. Corneal stroma regeneration with acellular corneal stroma sheets and keratocytes in a rabbit model. *PloS One*, v. 10, n. 7, p. e0132705, 2015.

Maiorana, A.; Fierabracci, A.; Cianfarani, S. Isolation and characterization of omental adipose progenitor cells in children: a potential tool to unravel the pathogenesis of metabolic syndrome. *Hormone Research*, v. 72, p. 348–358, 2009.

Mannello, F.; Tonti, G. A. Concise Review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or Ad Hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*, v. 25, p. 7, n. 1603–1609, 2007.

Martin, M. J.; Muotri, A.; Gage, F. et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine*, v. 11, n. 2, p. 228–232, 2005.

Mikhailova, A.; Tanja, I.; Hannu, U.; Heli, S. Small-molecule induction promotes corneal epithelial cell differentiation from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, v. 2, n. 2, p. 219–231, 2014.

Mikhailova, A.; Tanja, I.; Anjula, R. et al. Human pluripotent stem cell-derived limbal epithelial stem cells on bioengineered matrices for corneal reconstruction. *Experimental Eye Research*, v. 146, p. 26–34, 2016.

Mimura, T.; Amano, S.; Yokoo, S. et al. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Molecular Vision*, v. 14, p. 1819–1828, 2008.

Mizuno, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and literature review. *Journal of Nippon Medical School*, v. 76, p. 56–66, 2009.

Mochizuki, T.; Muneta, T.; Sakaguchi, Y. et al. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheumatism*, v. 54, p. 843, 2006.

Mountford, J.C. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine*, v. 18, p. 1–12, 2008.

Musina, R. A.; Belyavski A. V.; Tarusova, O. V. et al. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 145 n. 4, p. 539–543, 2008.

Nakagami, H.; Morishita, R.; Maeda, K. et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *Journal of Atherosclerosis Thrombosis*, v. 13, p. 77–81, 2006.

Nara, S.; Shibu, C.; Swati, M. et al. Preservation of biomacromolecular composition and ultrastructure of a decellularized cornea using a perfusion bioreactor. *Royal Society of Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 2225–2240, 2016.

Nasu, A. et al. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PLoS One*, v. 8, p. e53771, 2013.

Nauta, A. J.; Fibbe, W. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, v. 110, p. 3499–3506, 2007.

Nishida, T. Cornea. In: Krachmer, J. E. T.; Mannis, M. J.; Holland, E. J. Cornea. 2ªed. London: Elsevier Mosby, p. 3–26, 2005.

Nogueira, J. C. Olho: uma visão histológica [livro eletrônico]: texto e atlas. Belo Horizonte: Folium, 2015.

Notara, M. Characterization of the phenotype and functionality of corneal epithelial cells derived from mouse embryonic stem cells. *Regenerative Medicine*, v. 7, n. 2, p. 167–178, 2012.

Notara, M.; Shortt, A. J.; Galatowicz, G. et al. IL6 and the human limbal stem cell niche: a mediator of epithelial–stromal interaction. *Stem Cell Research*, v. 5, n. 3, p. 188–200, 2010.

Notara, M.; Shortt, A. J.; Daniels, J. T. The impact of age on the physical and cellular properties of the human limbal stem cell niche, *Age*, v. 35, n. 2, p. 289–300, 2013.

Ong, W. K.; Chen, H. F.; Tsai, C. T. et al. The activation of directional stem cell motility by green light-emitting diode irradiation. *Biomaterials*, v. 34, n. 8, p. 1911–1920, 2013.

Ordonez, P.; Di Girolamo, N. Concise review: limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. *Stem Cells*, v. 30, p. 100–107, 2012.

Osafune, K.; Caron, L.; Borowiak, M. et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature Biotechnology*, v. 26, p. 313–315, 2008.

Paula, A. C. C.; Zonari, A. A. C.; Martins, T. M. M. et al. Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. *Tissue Engineering: Part A*, v. 19, n. 1-2, p. 277-289, 2013.

Paula, A. C.; Martins, T. M. M, Zonari, A. et al. Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance c-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 6, n. 76, p. 1–19, 2015.

Pellegrini, G.; Traverso, C. E.; Franzi, A. T. et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *The Lancet*, v. 349, p. 990–993, 1997.

Pellegrini, G.; Dellambra, E.; Golisano, O. et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 6, p. 3156–3161, 2001.

Pereira, L. V. A importância do uso de células-tronco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

Pérez-Illzarbe, M.; Díez-Campelo, M.; Aranda, P. et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion*, v. 49, p. 1901–1910, 2009.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, p. 16–21, 2001.

Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L. Relative Expression Software Tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

Gain, P.; Rémy, J.; Zhiguo, H. et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmology*, v. 134, n.2, p. 167–173, 2015.

Qiu, C.; Hanson, E.; Olivier, E. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Experimental Hematology*, v. 33, p. 1450–1458, 2005.

Rama, P.; Matuska, S.; Paganoni, G. et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *New England Journal of Medicine*, v. 363, p. 147–155, 2010.

Registro Brasileiro de Transplantes. Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: Janeiro/Março - 2017. Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Ano XXIII, nº1, 2017. Disponível em: <http://www.abto.org.br>. [Acesso 20/02/2017].

Ricardo, J. R. S.; Gomes, J. A. P. Uso de células-tronco cultivadas ex vivo na reconstrução da superfície ocular. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v. 73, n. 6, p. 541-547, 2010.

Ross, M. H.; Wojciech, P. *Histology: a text and atlas*. Lippincott Williams & Wilkins. 6ª edição, 2011.

World Health Organization. Prevention of blindness and visual impairment: priority eye diseases. <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index8.html>. [Acesso 12/02/2017].

Sato, Y.; Araki, H.; Kato, J. et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, v. 106, p. 756–763, 2005.

Schmitt, A.; Griensven, M. V.; Imhoff, A. B. et al. Application of stem cells in orthopedics. *Stem Cells International*, v. 2012, p. 1-11, 2012.

Schwindt, T. T.; Barnabé, G. F.; Mello, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, v. 16, n. 1, p. 13–19, 2005.

Secco, M.; Zucconi, E.; Vieira, N. M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*, v. 26, p. 146-150, 2008.

Shafiq, M. A.; Gemeinhart, R. A.; Yue, B. Y. J. T.; Djalilian, A. R. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 18, n. 5, p. 340–348, 2012.

Shahdadfar, A.; Frønsdal, K.; Haug, T. et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, v. 23, p. 1357–1366, 2005.

Shalom-Feuerstein, R.; Serror, L., De La Forest, D. S. et al. Pluripotent stem cell model reveals essential roles for miR-450b-5p and miR-184 in embryonic corneal lineage specification. *Stem Cells*, v. 30, p. 898–909, 2012.

Sharma, S. M.; Fuchsluger, T.; Ahmad, S. et al. Comparative analysis of human-derived feeder layers with 3T3 fibroblasts for the ex vivo expansion of human limbal and oral epithelium. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 8, n. 3, p. 606–705, 2011.

Shiraishi, A.; Converse, R. L.; Liu, C.Y. et al. Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 39, n. 13, p. 2554–2561, 1998.

Shortt, A. J.; Secker, G. A.; Notara, M. D. et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: A review of techniques and clinical results. *Survey of Ophthalmology*, v. 52, p. 483–502, 2007.

Spees, J. L.; Gregory, C. A.; Singh, H. et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, v. 9, p. 447–456, 2004.

Strem, B. M.; Hicok, K. C.; Zhu, M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio of Journal of Medicine*, v. 54, n. 3, p. 132–141, 2005.

Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, p. 663–676, 2006.

Tan, D. T. H.; Janardhanan, P.; Zhou, H. J. et al. Penetrating keratoplasty in Asian eyes-the Singapore corneal transplant study. *Ophthalmology*, v. 115, p. 975–982, 2008.

Tanifuji-Terai, N.; Terai, K.; Hayashi, Y. et al. Expression of keratin 12 and maturation of corneal epithelium during development and postnatal growth. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 47, n. 2, p. 545–551, 2006.

Tanioka, H.; Kawasaki, S.; Yamasaki, K. et al. Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 47, n. 9, p. 3820–3827, 2006.

Tchkonina, T.; Giorgadze, N.; Pirskhalava, T. et al. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes*, v. 55, n. 9, p. 2571–2578, 2006.

Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v. 282, p. 1145–1147, 1998.

Toivonen, S.; Ojala, M.; Hyysalo, A. et al. Comparative analysis of targeted differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and human embryonic stem cells reveals variability associated with incomplete transgene silencing in retrovirally derived hiPSC lines. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 2, p. 83–93, 2013.

Van Der Valk, J.; Brunner, D.; De Smet, K. et al. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, v. 24, p. 1053–1063, 2010.

Vieira, N. M.; Bueno, C. R. JR; Brandalise, V. et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells*, v. 26, n. 9, p. 2391–2398, 2008.

Vodyanik, M. A.; Bork, J. A.; Thomson, J. A. et al. Human embryonic stem cell-derived cd34₊ cells: Efficient production in the coculture with op9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*, v. 105, p. 617– 626, 2005.

Volarevic, V.; Ljubic, B.; Stojkovic, P. et al. Human stem cell research and regenerative medicine: present and future. *British Medical Bulletin*, v. 99, p. 155-168, 2011.

Wagers, A. J.; Weissman, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v. 116, p. 639–648, 2004.

Wagoner, M. D.; Ba-Abbad, R.; Al-Mohaimed, M. et al. Postoperative complications after primary adult optical penetrating keratoplasty: prevalence and impact on graft survival. *Cornea*, v. 28, p. 385, 2009.

Wang, Z.; Zhou, Q.; Duan, H. et al. Immunological properties of corneal epithelial-like cells derived from human embryonic stem cells. *PloS One*, v. 11, n. 3, p. e0150731, 2016.

Williams, A. R.; Joshua, M. H. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation Research*, v. 109, p. 923–940, 2011.

Williams, K. A.; Lowe, M.; Bartlett, C. et al. Risk factors for human corneal graft failure within the Australian corneal graft registry. *Transplantation*, v. 86, p. 1720, 2008.

Whitcher, J. P, Srinivasan, M.; Upadhyay, M. P. Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the World Health Organization* v. 79, n. 3, p. 214–221, 2001.

Wilson, S. L.; Sidney, L. E., Dunphy, S. E. et al. keeping an eye on decellularized corneas: a review of methods, characterization and applications. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 4, n. 3, p. 114–161, 2013.

Wilson, S. L.; Sidney, L. E., Dunphy, S. E. et al. Corneal decellularization: a method of recycling unsuitable donor tissue for clinical translation? *Current Eye Research*, v. 3683 p. 1–14, 2015.

- Wu, J.; Du, Y.; Watkins, S. C.; Funderburgh, J. L.; Wagner, W. R. The engineering of organized human corneal tissue through the spatial guidance of corneal stromal stem cells. *Biomaterials*, v. 33, n. 5, p. 1343-1352, 2012.
- Wu, Z.; Qiang, Z.; Haoyun, D. et al. Reconstruction of auto-tissue-engineered lamellar cornea by dynamic culture for transplantation: a rabbit model. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, p. e93012, 2014.
- Yoeruek, E.; Bayyoud, T.; Maurus, C. et al. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta Ophthalmologica*, v. 90, n.2, p. e125–131, 2012a.
- Yoeruek, E.; Bayyoud, T.; Maurus, C. et al. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. *Acta Ophthalmologica*, v. 90, n.3, p. e206–210, 2012b.
- Yu, J.; Hu, K. Kim; Smuga-Otto, S. T. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, v. 324, n. 928, p. 797–801, 2009.
- Zeng, X.; Chen, J.; Liu, Y et al. A variant human embryonic stem cell line which exhibits rapid growth after passaging and reliable dopaminergic differentiation. *Restorative Neurology and Neuroscience*, v. 22, p. 421– 428, 2004.
- Zhang, J.; Huang, C.; Feng, Y. et al. Comparison of beneficial factors for corneal wound-healing of rat mesenchymal stem cells and corneal limbal stem cells on the xenogeneic acellular corneal matrix in vitro, *Molecular Vision*, v. 18, p. 161–173, 2012.
- Zhang, Z.; Guoguang, N.; Choi, J. S. et al. Bioengineered Multilayered Human Corneas from Discarded Human Corneal Tissue. *Biomedicine Materials*, v. 10, 2015.
- Zhu, J., Zhang, K; Sun, Y. et al. Reconstruction of functional ocular surface by acellular porcine cornea matrix scaffold and limbal stem cells derived from human embryonic stem cells. v. 19, p. 2412–25, 2013.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, p. 211–228, 2001.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, p. 4279–4295, 2002.

10. ANEXOS

10.1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

10.1.1. Artigos publicados

Artigo referente aos resultados apresentados nesta tese

Martins, T. M. M.; Paula, A. C. C.; Gomes, D. A.; Goes, A. M. Alkaline phosphatase expression/activity and multilineage differentiation potential are the differences between fibroblasts and orbital fat-derived stem cells – a study in animal serum-free culture conditions. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 10, n. 5, p. 697-711, 2014.

Artigos adicionais publicados durante o desenvolvimento da tese

Dantas, A. E.; Horta, C. C. R.; **Martins, T. M. M.**; Carmo, A. O.; Mendes, B. B. R. O.; Goes, A. M.; Kalapothakis, E.; Gomes, D. A. Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts. *Toxicon*, v. 84, p. 56-64, 2014.

Zonari, A.; **Martins, T. M. M.**; Paula, A. C. C.; Boeloni, J. N.; Novikoff, S.; Marques, A. P.; Correlo, V. M.; Reis, R. L.; Goes, A. M. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring. *Acta Biomaterialia*, v. 17, p. 170-181, 2015.

Paula, A. C. C.; **Martins, T. M. M.**; Zonari, A.; Frade, S. P. P. J., Angelo, P. C.; Gomes, D. A.; Goes, A. M. Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance C-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 6, n. 76, 2015.

Carvalho, J. L.; Zonari, A.; Paula, A. C. C.; **Martins, T. M. M.**; Gomes, D. A.; Goes, A. M.. Production of human endothelial cells free from soluble xenogeneic antigens for bioartificial small diameter vascular graft endothelization. *BioMed Research International*, 2015.

Neto, W. A. R.; Paula, A. C. C.; **Martins, T. M. M.**; Goes, A. M.; Averousc, L.; Schlatterc, G.; Bretas, R. E. S. Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polymer Degradation and Stability*, v. 120, p. 61-69, 2015.

Bertassoli, B. M.; Costa, E. S.; Sousa, C. A.; Albergaria, J. D. S.; Maltos, K. L. M.; Goes, A. M.; **Martins, T. M. M.**; Silva, G. A. B.; Jorge, E. C. Rat dental pulp stem cells: isolation and phenotypic characterization method aiming bone tissue bioengineering. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59, p. e16150613, 2016.

Cipreste, M. F.; Gonzalez, I. M. B.; **Martins, T. M. M.**; Goes, A. M.; Macedo, W.; Sousa, E. M. B. Attaching folic acid on hydroxyapatite nanorods surfaces: an investigation of the HA-FA interaction. *RSC Advances: an International Journal to Further the Chemical Sciences*, v. 6, p. 76390-76400, 2016.

Ferreira, R. V.; Goes, A. M.; **Martins, T. M. M.**; Domingues, R. Thermosensitive gemcitabine-magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy, *Nanotechnology*, 2016.

Soardi, F. C.; Machado-Silva, A.; Linhares, N. D.; Zheng, G. E.; Qu, Q.; Pena, H. B.; **Martins, T. M. M.**; Vieira, H. G. S.; Pereira, N. B.; Melo-Minardi, R. C.; Gomes, C. C.; Gomez, R. S.; Gomes, D. A.; Pires, D. E. V.; Ascher, D. B.; Yu, H.; Pena, S. D. J. Familial STAG2 germline mutation defines a new human cohesinopathy. *npj Genomic Medicine*, v. 2, p. 7, 2017.

10.1.2. Apresentações em Congressos

Apresentação oral

MARTINS, T. M. M.; CUNHA, P. S. ; RODRIGUES, M. A. ; CARVALHO, J. L. ; GOMES, D. A. ; GOES, A. M. . Desenvolvimento e caracterização de córneas humanas descelularizadas e recelularização com células-tronco visando regeneração do epitélio corneano. In: 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais e 13º

Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO, 2016, Foz do Iguaçu -PR.

Apresentação de pôster

Thais Maria da Mata Martins; Michele A. Rodrigues ; Dawidson Assis Gomes ; Alfredo Miranda de Goes . Development and characterization of decellularized human corneas and initial in-vitro recellularization with human orbital fat-derived stem cells. In: XIII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular & VIII International Symposium on Extracellular Matrix, 2015, Búzios.

Thais Maria da Mata Martins; Ana Cláudia Chagas de Paula ; Gomes, Dawidson Assis ; Alfredo Miranda de Goes . Comparison of mesenchymal stem cells and fibroblasts isolated from human orbital tissue. In: XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/VII International Symposium on Extracellular Matrix, 2013, Búzios.

Thais Maria da Mata Martins; Alessandra Zonari ; Ana Cláudia Chagas de Paula ; Alexandra Rodrigues Pereira da Silva ; Silviene Novikoff ; Gomes, Dawidson Assis ; Alfredo Miranda de Goes . Polycaprolactone nanofiber meshes associated with endothelial-differentiated cells support vascularization in bone tissue engineering implant. In: XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/VII International Symposium on Extracellular Matrix, 2013, Búzios.

Thais Maria da Mata Martins; ZONARI A ; Paula, Ana Cláudia Chagas de ; Silviene Novikoff ; Gomes, Dawidson Assis ; Alfredo Miranda de Goes . Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells on polycaprolactone nanofiber meshes. In: II Simpósio de Integração dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Celular e VI Simpósio de Biologia Celular da UFMG - Professor Hugo Pereira Godinho, 2013, Belo Horizonte.

Thais Maria da Mata Martins; Paula, Ana Cláudia Chagas de ; Gomes, Dawidson Assis ; Alfredo Miranda de Goes . Phenotypic and functional comparison of human orbital fat-derived stem cells and fibroblasts. In: II Simpósio de Integração dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Celular e VI Simpósio de Biologia Celular da UFMG - Professor Hugo Pereira Godinho, 2013, Belo Horizonte.

10.2. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 49967715.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 30 de novembro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Descelularização de córnea humana para reconstrução do epitélio corneano e estroma**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

10.3. Artigo publicado

Alkaline Phosphatase Expression/Activity and Multilineage Differentiation Potential are the Differences Between Fibroblasts and Orbital Fat-Derived Stem Cells – A Study in Animal Serum-Free Culture Conditions

Thaís Maria da Mata Martins · Ana Cláudia Chagas de Paula ·
Dawidson Assis Gomes · Alfredo Miranda Goes

© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Human orbital fat tissues are a potential source to isolate stem cells for the development of regenerative medicine therapies. For future safe clinical application of these cells, it is critical to establish animal component-free culture conditions as well as to clearly define the stem cell population characteristics differentiating them from other cell types, such as fibroblasts. Therefore, the present study aimed to compare phenotypic and functional characteristics of orbital fat-derived stem cells (OFSCs) and fibroblasts resident in the eyelid skin in donor-matched samples grown in culture medium supplemented with pooled allogeneic human serum (HS) replacing fetal bovine serum (FBS). We first investigated the proliferative effects of OFSCs on HS, and then we compared the alkaline phosphatase (AP) expression and activity, immunophenotypic profile, and *in vitro* multilineage differentiation potential of OFSCs side-by-

side with fibroblasts. The results showed that HS enhanced OFSCs proliferation without compromising their immunophenotype, AP activity, and osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation capacities. In contrast to OFSCs, the fibroblasts did not exhibit AP expression and activity and did not have multilineage differentiation potential. The results enabled us to successfully distinguish OFSCs from fibroblasts populations, suggesting that AP expression/activity and multilineage differentiation assays can be used reliably to discriminate mesenchymal stem cells from fibroblasts. Our findings also support the feasibility of pooled allogeneic HS as a safer and more effective alternative to FBS for clinical applications.

Keywords Cell culture medium · Human serum · Orbital fat-derived stem cells · Fibroblasts · Differentiation · Alkaline phosphatase

T. M. d. M. Martins
Department of Morphology, Institute of Biological Sciences,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas
Gerais, Brazil
e-mail: thaismmartins@gmail.com

A. C. C. de Paula · D. A. Gomes · A. M. Goes
Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological
Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627,
Minas Gerais, Brazil

A. C. C. de Paula
e-mail: ana.chagasdepaula@gmail.com

D. A. Gomes
e-mail: dawidson.gomes@gmail.com

A. M. Goes (✉)
Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Department of
Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences,
Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627,
Pampulha, ICB-UFMG, 31270-901 Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil
e-mail: goes@icb.ufmg.br

Introduction

Multipotent mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are plastic-adherent cells characterized by high proliferation, self-renewal and differentiation potential into cells of mesodermal origin such as osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes [1, 2]. MSCs also possess the capacity to transdifferentiate into ectoderm- and endoderm-derived cells [3, 4]. Given their unique multilineage differentiation potential, low-immunogenic, and high-immunosuppressive properties, MSCs are currently of particular interest in regenerative medicine and in immunomodulatory therapy.

Although MSCs were first isolated from bone marrow [5], similar cells have been reported in many other tissues, including adipose tissue [6], umbilical cord [7], dental pulp [8], and amniotic fluid [9]. In 2009, Korn *et al.* isolated and

characterized MSCs from human orbital fat tissues that could be induced to express smooth muscle, neuronal and glial antigens, and mature adipocyte phenotypes [10]. A subsequent study showed that orbital fat-derived stem cells (OFSCs) possess *in vitro* osteogenic, chondrogenic, and corneal epithelial differentiation capacities [11]. *In vivo* studies have demonstrated corneal tissue regeneration promoted by topical OFSCs administration [12] and the safety, tolerability, and immunomodulatory ability of OFSCs transplantation [13, 14].

Therefore, human orbital fat tissues represent a good source of MSCs for regenerative medicine purposes. However, because of the minimal volume of orbital fat that can be harvested during blepharoplasty surgeries and the relative scarcity of stem cells within adult tissues [15], OFSCs can be isolated in limited quantities. Thus, it is necessary to expand these cells *ex vivo* to obtain a sufficient cell number for clinical application without compromising their defining characteristics. All current protocols for the expansion of OFSCs use fetal bovine serum (FBS)-containing media [10–14, 16–18]. However, the use of FBS in the clinical context is associated with many risks because it can be a source of viruses, bacteria, prions, and endotoxins [19]. Moreover, FBS use can provoke adverse immunological reactions against xenogeneic proteins [20, 21]. Accordingly, a variety of human supplements have been postulated as alternatives to FBS, and human serum is a good replacement due to its availability and the possibility for testing for human pathogens before use [22].

Another concern regarding the therapeutic application of MSCs is the risk of contamination with other cells types, especially fibroblasts. A pre-clinical study demonstrated that the contamination of MSCs with dermal fibroblasts affected the clinical outcome in stem cell therapy protocols [23]. MSCs are similar to fibroblasts in morphology, growth property, surface marker expression, and immunomodulatory function, and there are no specific markers allowing a clear distinction between these two cell types [24–26]. Traditionally, differentiation potential has been used to distinguish MSCs from fibroblasts. However, recent studies have produced contradictory results. In some reports, fibroblasts were shown to lack multilineage differentiation potential [25–29], whereas other studies demonstrated that fibroblasts, such as MSCs, were able to differentiate into osteocytes, chondrocytes, and adipocytes [30–34]. Even studies of gene expression patterns have produced inconsistent results related to the distinction between MSCs and fibroblasts [25, 29, 31, 35]. These contradictory results may be because the majority of studies comparing MSCs and fibroblasts have been carried out using commercially available cells or cells isolated from different donors and developmental stages (e.g., fetal or adult tissues), leading to possible variation in cellular functions and gene expression patterns that cannot directly be related with distinct cell identities [35, 36].

In this context, the eyelids are an excellent source of dermal fibroblasts and MSCs for comparative study because usually both skin and fat pads are removed during blepharoplasty, allowing comparison between cells from the same donor. Moreover, fat is very sparse in eyelid skin [37]; therefore, dermal fibroblasts can be isolated with minimal risk of contamination with MSCs derived from subcutaneous adipose tissue. In addition, there is an anatomical separation between eyelid skin and adipose compartments [38]; therefore, OFSCs can be safely isolated from the fat pads without risk of contamination by dermal fibroblasts. Therefore, the aim of this study was to phenotypically and functionally compare OFSCs and fibroblasts resident in the eyelid skin in donor-matched samples grown in animal serum-free culture conditions. We first investigated the proliferative effects of OFSCs on human serum (HS), and then we compared the alkaline phosphatase (AP) expression and activity, immunophenotypic profile, and *in vitro* multilineage differentiation potential of OFSCs side-by-side with fibroblasts. Our results showed that HS enhanced OFSCs proliferation without compromising their immunophenotype, AP activity, and multilineage differentiation capacities, indicating that HS can be used safely as an alternative to FBS. In contrast to OFSCs, the fibroblasts did not exhibit AP expression and activity and did not have multilineage differentiation potential. The results enabled us to successfully distinguish OFSCs from fibroblasts populations, suggesting that AP expression/activity and multilineage differentiation assays can be used reliably to discriminate MSCs from fibroblasts.

Materials and Methods

Basal Medium

Dulbecco's modified Eagle's medium–high glucose (Sigma-Aldrich) was supplemented with 5 mM sodium bicarbonate (Cinética Química Ltda), penicillin (100U/mL), streptomycin (0.1 mg/mL), amphotericin B (0.25 mg/mL) (Sigma-Aldrich), gentamicin (60 mg/L; Schering-Plough), and 10 % allogeneic human serum (HS) or 10 % FBS (Cripion Biotecnologia Ltda). The pH was adjusted to 7.4, and the medium was filtered through a 0.22 μ m polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) before use.

Preparation of Allogeneic Human Serum (HS)

HS was obtained from the whole blood of consenting healthy donors. The whole blood was collected with vacutainer tubes (Vacuplast) without anticoagulants and was allowed to clot overnight at 4 °C. Subsequently, the serum was separated by centrifugation at 252 g at 20 °C for 10 min. Samples from at least five different donors were pooled to produce the HS from

all groups of blood types. The HS was incubated at 56 °C for 30 min to deactivate complement. HS aliquots were stored at –20 °C until use. This procedure was approved by the Ethics Committee in Research from the Universidade Federal de Minas Gerais (no. ETIC 02887512.6.0000.5149).

Isolation and Culture of OFSCs and Fibroblasts

Human orbital fat tissues and eyelid skin from the same donor were used to isolate OFSCs and fibroblasts, respectively. The tissues were harvested from six healthy patients ranging in age from 52 to 65 years during blepharoplasty surgeries at Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte and Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais. All samples were collected after obtaining informed consent from the patients according to procedures approved by Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (no. ETIC 02887512.6.0000.5149). Under local anesthesia, orbital fat tissues and eyelid skin of donors were removed. Adipose tissues and eyelid skin were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fragmented with surgical scissors; the extracellular matrix was digested with 0.1 % collagenase type I (Life Technologies) in PBS at 37 °C for 1 and 3 h, respectively. After centrifugation at 252 g for 10 min, the pellets were resuspended in the basal medium and plated into cell culture flasks (Sarstedt). The flasks were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. After 48 h of incubation, the medium was changed and non-adherent cells were removed. The OFSCs and fibroblasts were maintained at sub confluent levels with 3 weekly medium changes. When the cells reached approximately 80–90 % confluence, they were harvested by incubation with 0.05 % trypsin-EDTA (Life Technologies) for 5 min, counted in a Neubauer chamber (HBG) and used to perform the experiments.

Proliferation Kinetics

OFSCs and fibroblasts were expanded in the basal medium supplemented with 10 % HS or 10 % FBS. The cells were initially seeded at the density of 200 cells/cm² in T25 cell culture flasks (Sarstedt). The cells were passaged and counted once they reached a sub-confluence of 90 %. At each passage, the cells were re-plated at the initial density. If the cells did not reach a minimum confluence of 50 % after 15 days, the culture was discontinued. At each passage, the population doubling (PD) rate was calculated using the following formula: $PD = [\log_{10}N_2 - \log_{10}N_1] \div \log_{10}2$, where N1 is the plated cell number, and N2 is the cell number at harvest. To yield the cumulative population doublings (CPD) rate, the PD for each passage was calculated and then added to the PD of the previous passages. Because the cell number of plastic-

adherent cells could first be counted at passage 1, the cumulative doubling rates were calculated starting at passage 2 [39].

At the same time, the cell population doubling time (PDT) was calculated in the phase of exponential growth using the following formula: $PDT = (T_2 - T_1) \times \log_{10}2 \div \log_{10}(N_2 \div N_1)$, where N1 is the plated cell number, N2 is the cell number at harvest, T1 is the time in hours (h) when the cells were plated, and T2 is the time in h when the cells were harvested [40, 41].

In addition, a growth curve of OFSCs and fibroblasts was started at the fourth passage. Cells (200/cm²) were plated in T25 flasks. At days 3, 5, 7, 9, and 11, the cells were harvested and counted [42].

Alkaline Phosphatase Activity

Alkaline phosphatase (AP) activity was evaluated with the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) - nitroblue tetrazolium salt (NBT) kit assay as described by the manufacturer (Life Technologies). Briefly, OFSCs and fibroblasts at passage 4 were cultured with the basal medium supplemented with 10 % HS at 37 °C, 5 % CO₂, and humidified atmosphere. On days 7, 14, and 21, the supernatant was removed, cells were washed twice with PBS, and 200 µL of BCIP-NBT solution was added to each well. After 2 h of incubation, the insoluble purple precipitants were solubilized with 210 µL of sodium dodecyl sulfate (SDS)-10 % HCl. After 18 h of incubation, 100 µL of each well was transferred to a 96-well plate, and the optical density was measured at 595 nm. The value of optical density was divided by the number of cells counted in each culture time as normalization criterion.

Flow Cytometry Analysis

Immunophenotypic characterization was performed by flow cytometry using the following unconjugated mouse monoclonal antibodies: CD34 (Santa Cruz Biotechnology), CD9, CD14, CD19, CD45, CD90, and CD166 (BD Biosciences). The following conjugated mouse monoclonal antibodies were used: CD73-phycoerythrin (PE), CD105-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences), HLA-ABC-FITC, and HLA-DR-FITC (Abcam).

OFSCs and fibroblasts at passage 4 were harvested and washed with PBS. Approximately 5×10^5 cells were incubated for 30 min at 4 °C with 0.4 µg of the primary antibodies. After washing, the cells were incubated with a secondary antibody, for 30 min at 4 °C, washed again and suspended in PBS. The Alexa Fluor 488 goat anti-mouse immunoglobulin G (Life Technologies) was used for the unconjugated primary antibodies. As a control, cells were incubated with only the secondary antibody to exclude nonspecific binding. Flow cytometry was performed using a Guava® EasyCyte™ 6–2 L Flow Cytometer (Millipore). For each sample, a minimum

of 15,000 events were acquired using the software Incyte (Millipore) and analyzed using FlowJo 7.5.6.

Cell Differentiation

Osteogenic Differentiation

OFSCs and fibroblasts at passage 4 were seeded at 500 cells/cm² in 6-well culture plates (Techno Plastic Products AG) and induced to differentiate into osteogenic lineage by culturing with basal medium supplemented with 10 % HS, 50 µg/mL ascorbate-2-phosphate (Ecibra), 10 mM β-glycerophosphate (Sigma-Aldrich), and 0.1 µM dexamethasone (Aché) [6]. The osteogenic differentiation medium was changed every two days.

After 21 days in osteogenic differentiation medium, qualitative assessment of mineralized matrix formation was performed by the alizarin red S and von Kossa stainings. For alizarin red staining, the monolayer cultures were fixed in 70 % ethanol, incubated with alizarin red S staining solution (pH 4.1–4.3) for 15 min and rinsed with distilled water, followed by a wash with PBS. For von Kossa staining, the monolayer cultures were fixed in 70 % ethanol, incubated with 5 % silver nitrate and exposed to ultraviolet light for 2 h. Cells were rinsed with distilled water and 5 % sodium thiosulfate, to remove unreacted silver, and counterstained with eosin for 40 sec.

Adipogenic Differentiation

For adipogenic differentiation, OFSCs and fibroblasts at passage 4 were seeded at 500 cells/cm² in 6-well plates and cultured in basal medium supplemented with 10 % HS, 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich), 200 µM indomethacin (Sigma-Aldrich), 1 µM dexamethasone (Aché), and 10 µM insulin (Eli Lilly and Company) [6]. The adipogenic differentiation medium was changed every two days.

After 21 days in adipogenic differentiation medium, cells were washed with PBS, fixed in 10 % formalin for 60 min, followed by a wash with 60 % isopropanol. The cells were stained with an Oil-Red O (Thermo Scientific) solution in 60 % isopropanol for 5 min, rinsed with deionized water, and counterstained with hematoxylin for 1 min.

Chondrogenic Differentiation

The induction of chondrogenic differentiation was carried out in a three-dimensional pellet culture using the Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies). For pellet cultures, 5 × 10⁵ cells were centrifuged at 800 g for 5 min in a 15-ml polypropylene conical tube (Sarstedt). Pellets were then

cultured for 21 days, and the medium was changed twice a week.

For histologic analysis, cell pellets were fixed for 60 min in 10 % formalin, routinely processed, embedded in paraffin, and cut into 5-µm sections. The sections were stained for proteoglycans and glycosaminoglycans with alcian blue 8GX (1 % in acetic acid, pH 2.5) for 30 min and counterstained with hematoxylin for 1 min.

Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from OFSCs and fibroblasts cultured in basal medium or specific differentiation media with Trizol (Life Technologies) as described by the manufacturer. A NanoDrop ND-1000 Micro spectrophotometer was used to measure the total RNA amount (ng/µL). Total RNA samples were treated with DNase (Promega). First strand cDNA was synthesized using the RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to manufacturer's recommendations. Next, RT-PCR amplification was performed for AP, type I collagen (COL I), osteopontin, peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARG2), glucose transporter type 4 (GLUT 4), leptin, cartilage oligomeric matrix protein (COMP), type X collagen (COL X), aggrecan, and glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH; house-keeping gene) cDNA. The specific primers used are described in Table 1. The RT-PCR products were analyzed by 1 % agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide.

Statistical Analysis

All experiments were repeated three or more times with triplicate samples. The values are presented as the mean ± standard error of the mean. All variables were submitted to normality and homoscedasticity analyses, and analysis of variance (ANOVA) was performed. Parametric variables and those with normal distribution after logarithmic transformation were analyzed by student *T*-test or Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc test. Significance was considered for 5 % (*p* < 0.05). Analyses were conducted in the R (2.11 version) software program.

Results

Isolation and Proliferative Capacity of OFSCs

The isolation and expansion of OFSCs was successful for all donors. The adherent cells cultured in the basal medium

Table 1 List of primers for reverse transcriptase–polymerase chain reaction

Gene ^a	Sequence (5'–3')	Amplicon (bp)	Tm (°C)
AP	F: TGGTGAAGGAGGCAGAATTGAC R: CAGGACGCTCAGGGGGTAGA	581	56
COL I	F: TGACGAGACCAAGAAGCTG R: CCATCCAAACCACTGAAACC	599	62
Osteopontin	F: GCCGAGGTGATAGTGTGGTT R: TGCTTGTGGCTGTGGGTTTC	253	52
GLUT 4	F: TCTTCGAGACAGCAGGGGTA R: AGATGGCCACAATGGAGACG	228	60
Leptin	F: GAACCCTGTGCGGATTCTTG R: TGAAGTCCAAACCGGTGACT	177	60
PPARG2	F: CTCCTATTGACCCAGAAAGCGA R: GCAGGCTCCACTTTGATTGC	310	60
Aggrecan	F: GAATCAACTGCTGCAGACCAGG R: TCCCCTTCGATGGTCCTGTC	230	60
COL X	F: ACAGGCATAAAAGGCCCACT R: GCACACCTGGTTTCCCTACA	247	59
COMP	F: CTTCGGGAAGTGCAGGAAAC R: GTTGATGCACACGGAGTTGG	495	59
GAPDH	F: ACATCGCTCAGACACCATG R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	143	60

^a AP, alkaline phosphatase; COL I, type I collagen; GLUT 4, glucose transporter type 4; PPARG 2, peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2; COL X, type X collagen; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

supplemented with HS or FBS displayed a characteristic fibroblast-like morphology and were able to self-renew and form colonies. However, OFSCs cultivated in HS were smaller in size and had denser growth than cells cultured in FBS (Fig. 1a).

To evaluate the influence of different supplements on the proliferative capacity of OFSCs in long-term culture, CPDs were calculated for all passages (Fig. 1b). CPDs were higher when OFSCs were cultured in HS rather than in FBS ($p < 0.05$). HS exerted an early, strong and continuous proliferative effect on the growth of OFSCs, reaching a maximum population doubling of 35 ± 0.5 at passage 12. Conversely, OFSCs cultured in FBS exhibited a slow but continuous proliferation, reaching a maximum population doubling of 23 ± 1.3 at passage 10. The cultures in FBS were discontinued at passage 11 because the cells did not reach a minimum confluence of 50 % after 15 days, which happened to the cells maintained in HS at passage 13.

The PDT was calculated for all media conditions. The PDT was 32 ± 4 h for OFSCs cultured with HS and 89 ± 5 h for OFSCs in FBS. The cell cultures grown in HS had a PDT that was approximately three times shorter than the cultures grown in FBS.

To evaluate the influence of HS and FBS on the short-term growth of OFSCs, a growth curve was started at passage 4 (Fig. 1c). OFSCs were seeded at the same density, and cell numbers were counted and compared at days 3, 5, 7, 9, and 11. Proliferation kinetics of the growth curve showed a faster exponential growth of HS culture starting on day 3 compared with FBS ($p < 0.05$). Medium supplemented with HS reached

a final cell count of $1.66 \times 10^6 \pm 6.25 \times 10^4$ on day 11. In comparison, FBS exhibited a cell count of $1.08 \times 10^5 \pm 1.18 \times 10^4$ on day 11.

As HS induced greater OFSCs proliferation, it was used as the medium supplementation in all subsequent experiments.

Expansion Characteristics of OFSCs Versus Fibroblasts

The isolation of fibroblasts in the basal medium supplemented with HS was successful. Fibroblasts were plastic-adherent, spindle-shaped cells morphologically similar to OFSCs (Fig. 2a).

To compare the proliferative capacities of OFSCs and fibroblasts isolated from the same donors, CPDs were calculated from passage 1 to passage 7 (Fig. 2b). During all passages, both types of cells showed no significant differences in CPDs, except at passage 3, when OFSCs displayed higher CPDs than the fibroblasts ($p < 0.05$).

At the same time, the PDT was calculated to be 41 ± 4 h for fibroblasts and 38 ± 3 h for OFSCs. Additionally, the growth kinetics curve of fibroblasts was comparable to OFSCs (Fig. 2c).

AP Activity in OFSCs Versus Fibroblasts

An NBT-BCIP assay was used to compare the AP activity of OFSCs and fibroblasts at passage 4 (Fig. 3a, b). The results showed that AP activity is virtually absent in fibroblasts, in contrast to OFSCs, which exhibited high levels of this enzyme activity ($p < 0.05$).

Fig. 1 Morphology and proliferative capacity of OFSCs cultured in FBS or HS. **a** Morphology of OFSCs cultured in FBS (*left panel*) or HS (*right panel*) from a representative donor at passage 3. **b** Cumulative population doublings of OFSCs cultivated in FBS (*white*) or HS (*black*). Population doubling was determined for each culture passage and added to the population doublings of the previous passages. **c** Growth curve assessing the proliferation kinetics of OFSCs in FBS or HS at days 3, 5, 7, 9, and 11; $n=3$. * compared to FBS ($p<0.05$). Scale bar: 150 μm . FBS, fetal bovine serum; HS, pooled allogeneic human serum; P, passage

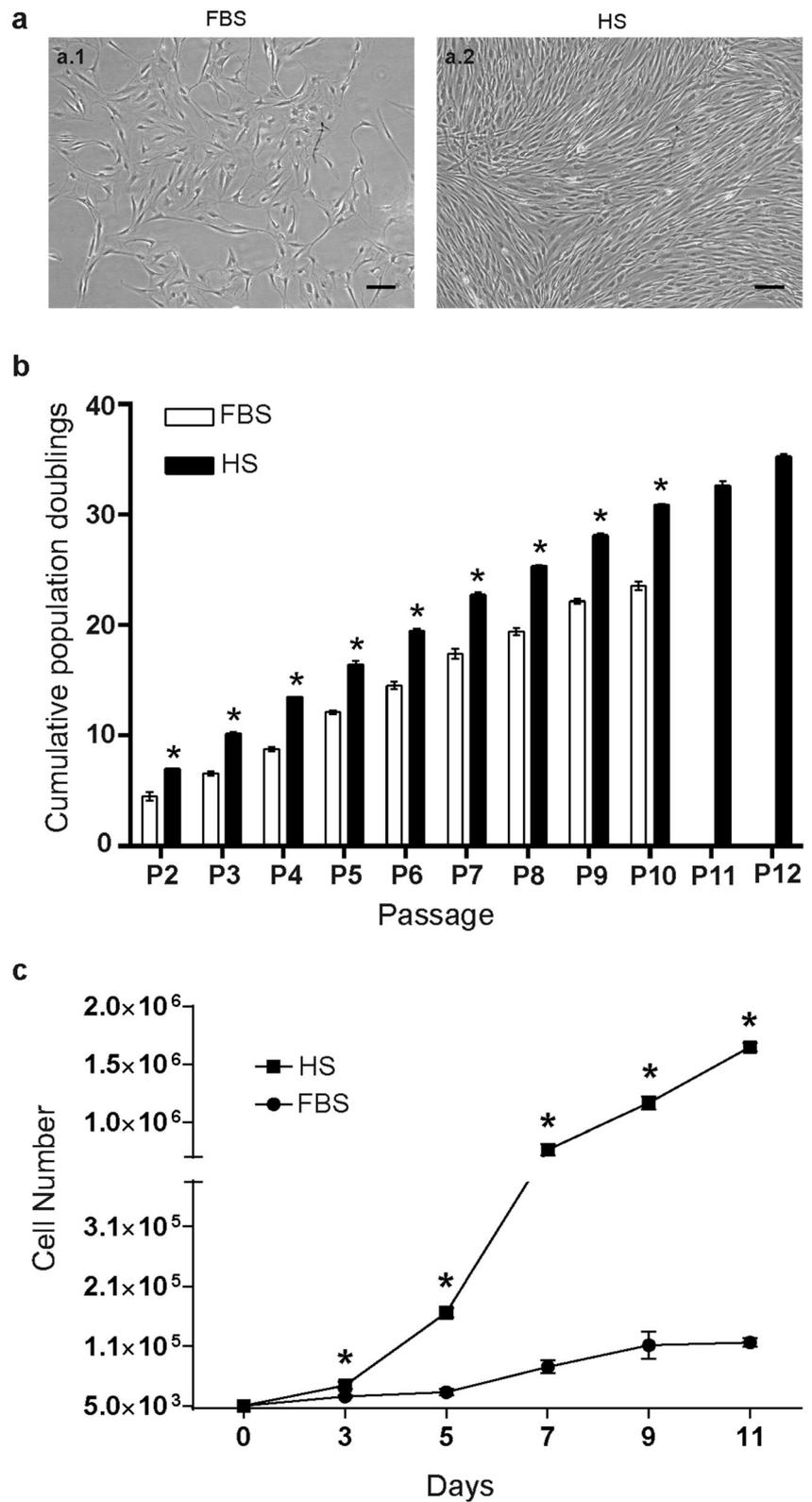
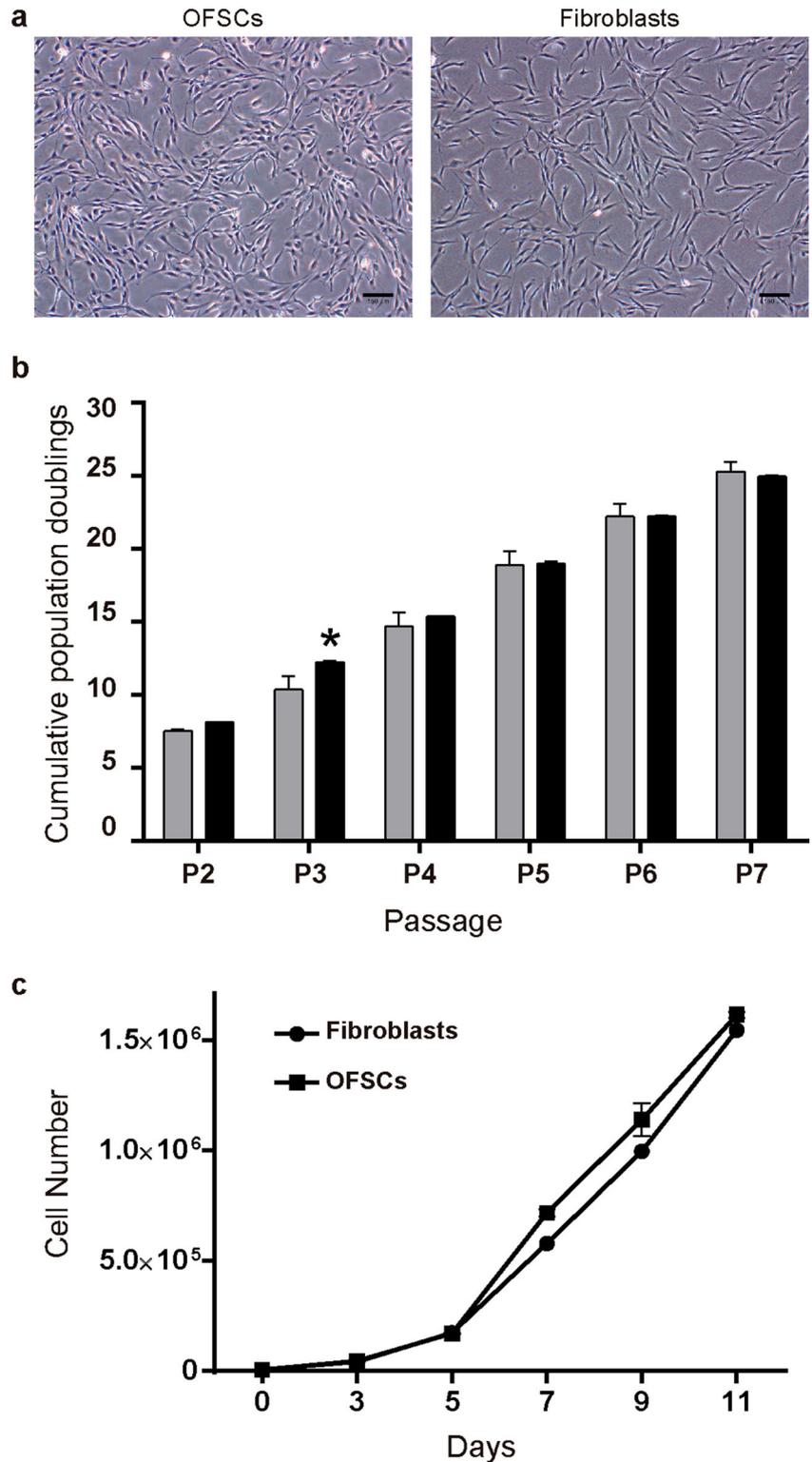


Fig. 2 Morphology and proliferative kinetics of OFSCs and fibroblasts. **a** Morphology of OFSCs (*left panel*) and fibroblasts (*right panel*) cultured with basal medium supplemented with 10 % HS from a representative donor at passage 3. **b** Cumulative population doublings of OFSCs (*black*) and fibroblasts (*gray*). Population doubling was determined for each culture passage and added to the population doublings of the previous passages. **c** Growth curve assessing the proliferation kinetics of OFSCs and fibroblasts at days 3, 5, 7, 9, and 11; $n=3$. * compared to fibroblasts ($p<0.05$). Scale bar: 150 μm . P, passage

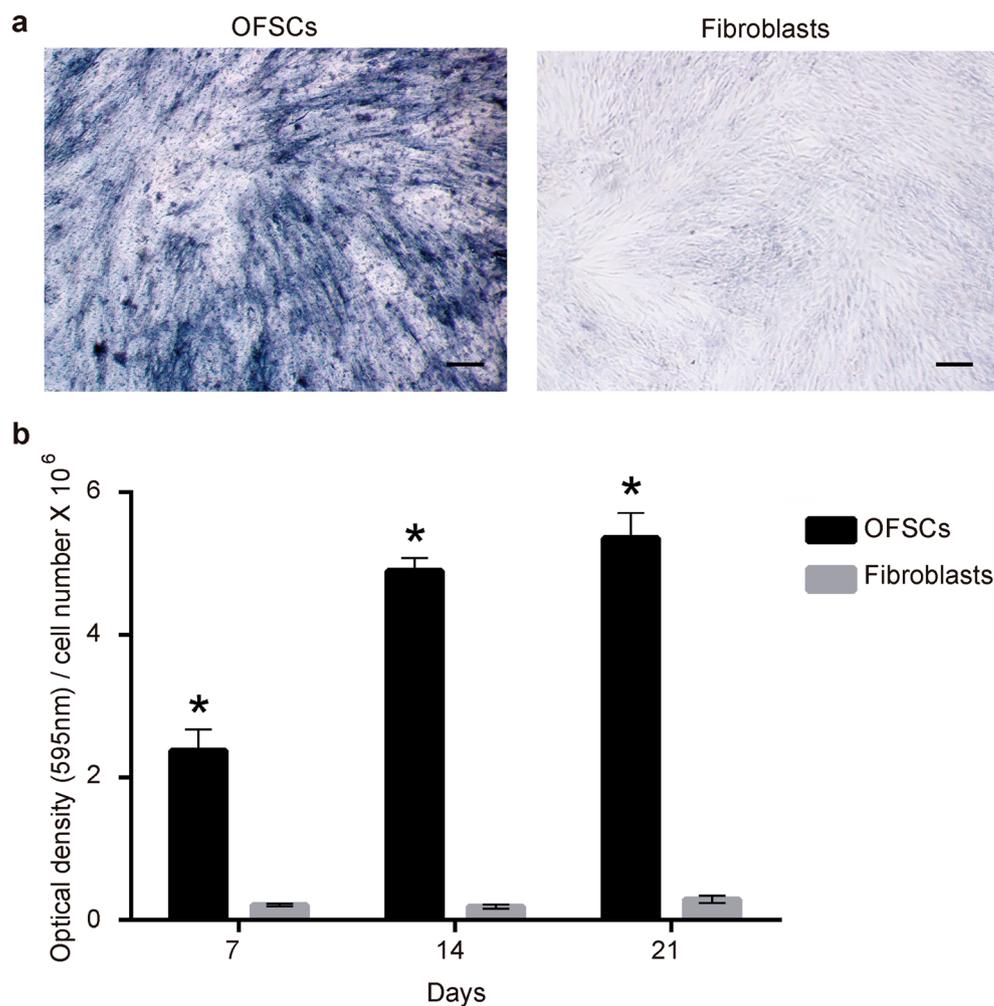


Immunophenotypic Comparison Between OFSCs and Fibroblasts

The immunophenotypic profile of OFSCs and fibroblasts was determined by flow cytometry analysis (Fig. 4), which

indicated that more than 98 % of the OFSC and fibroblast populations expressed surface molecules CD105, CD73, CD90, and CD166, which are characteristic to MSCs. Both cell types lacked the expression (<2 % positive) of hematopoietic stem cell markers CD45, CD34, CD14, CD19, and

Fig. 3 Alkaline phosphatase activity assay of the OFSCs and fibroblasts. OFSCs and fibroblasts at passage 4 were cultured with basal medium supplemented with 10 % HS and NBT-BCIP assay was performed on days 7, 14, and 21. **a** Insoluble purple precipitants were produced by OFSCs (*left panel*) but not by fibroblasts (*right panel*). **b** Bar graphs represent the mean of the optical density divided by the number of cells counted in each culture time \pm standard error of the means; $n=3$. * compared to fibroblasts ($p<0.05$). Scale bar: 150 μ m



HLA-DR. Moreover, 100 % of the OFSCs and fibroblasts expressed HLA-ABC. These observations suggest that OFSCs and fibroblasts share a highly similar cell surface phenotype.

Comparison of Differentiation Potentials

We compared the *in vitro* multipotent differentiation capacity of OFSCs and fibroblasts under the same differentiation culture conditions. OFSCs and fibroblasts were incubated under osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation conditions, and their differentiation potential was assessed by cytochemical staining and RT-PCR analysis of various differentiation marker genes.

After 21 days in osteogenic differentiation medium, the osteogenic differentiation of OFSCs was indicated by the deposition of a mineralized matrix stained with von Kossa and alizarin red S stains (Fig. 5a, b). The fibroblasts, however, showed no signs of staining. RT-PCR analysis indicated that the mRNA expression of AP was detected in the OFSCs cultured in basal medium but was upregulated after 21 days

in osteogenic differentiation medium (Fig. 5c). On the contrary, the fibroblasts cultured in basal medium or in osteogenic medium did not express the AP gene. The mRNA expression of osteopontin was detected only in the OFSCs cultured in osteogenic differentiation medium and in the fibroblasts cultivated in basal medium. COL I gene expression was detected in OFSCs and fibroblasts maintained in basal medium as in osteogenic medium.

OFSCs cultured in adipogenic differentiation medium successfully differentiated into the adipogenic lineage, as evidenced by intracellular accumulation of lipid-rich vacuoles that stained with Oil Red O (Fig. 6a). However, no lipid vacuoles could be observed in fibroblasts incubated under the same conditions. PPARG2, GLUT4, and leptin genes were expressed by OFSCs maintained in adipogenic medium, which were not observed in the OFSCs maintained in basal medium (Fig. 6b). However, the fibroblasts cultured in basal medium or in adipogenic medium did not express PPARG2 and GLUT4 mRNA, although they express leptin mRNA.

Chondrogenic differentiation was induced using a three-dimensional pellet culture (Fig. 7). The OFSC pellets

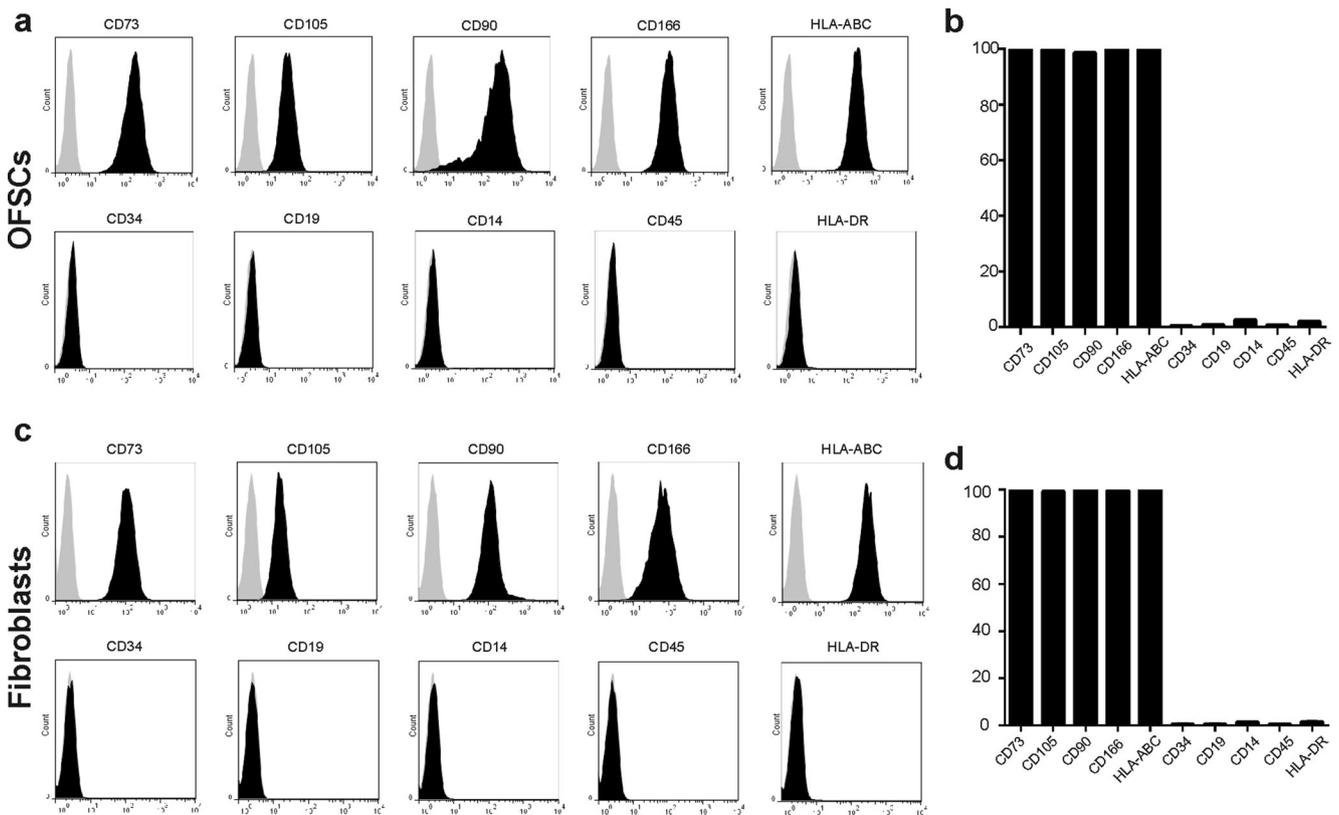


Fig. 4 Cell surface antigen profiles of OFSCs (**a–b**) and fibroblasts (**c–d**) by flow cytometry analysis. Cells were labeled with antibodies against the indicated antigens and analyzed by flow cytometry (*black curves*). The *gray curve* indicates the isotype-matched monoclonal antibody control.

Bar graphs represent the quantitative analysis of the expression pattern of OFSCs (**b**) and fibroblasts (**d**). $n=3$ (three experiments that were conducted independently)

gradually increased in size over the total cultivation period of 21 days, which was not observed in the fibroblast pellets (Fig. 7a). The examination of histological sections stained with alcian blue indicated the presence of proteoglycans and glycosaminoglycans in both OFSCs and fibroblasts pellets, suggesting that cartilaginous matrix had been synthesized (Fig. 7b). RT-PCR analysis demonstrated that COMP and COL X genes were expressed in OFSCs pellets after chondrogenic induction, which were not observed in the OFSCs maintained in basal medium (Fig. 7c). In contrast, the mRNA expression of COMP and COL X were detected in the fibroblasts cultured in basal medium, but were upregulated after 21 days in chondrogenic differentiation medium. Aggrecan gene expression was detected in OFSCs and fibroblasts maintained in basal medium as in chondrogenic medium.

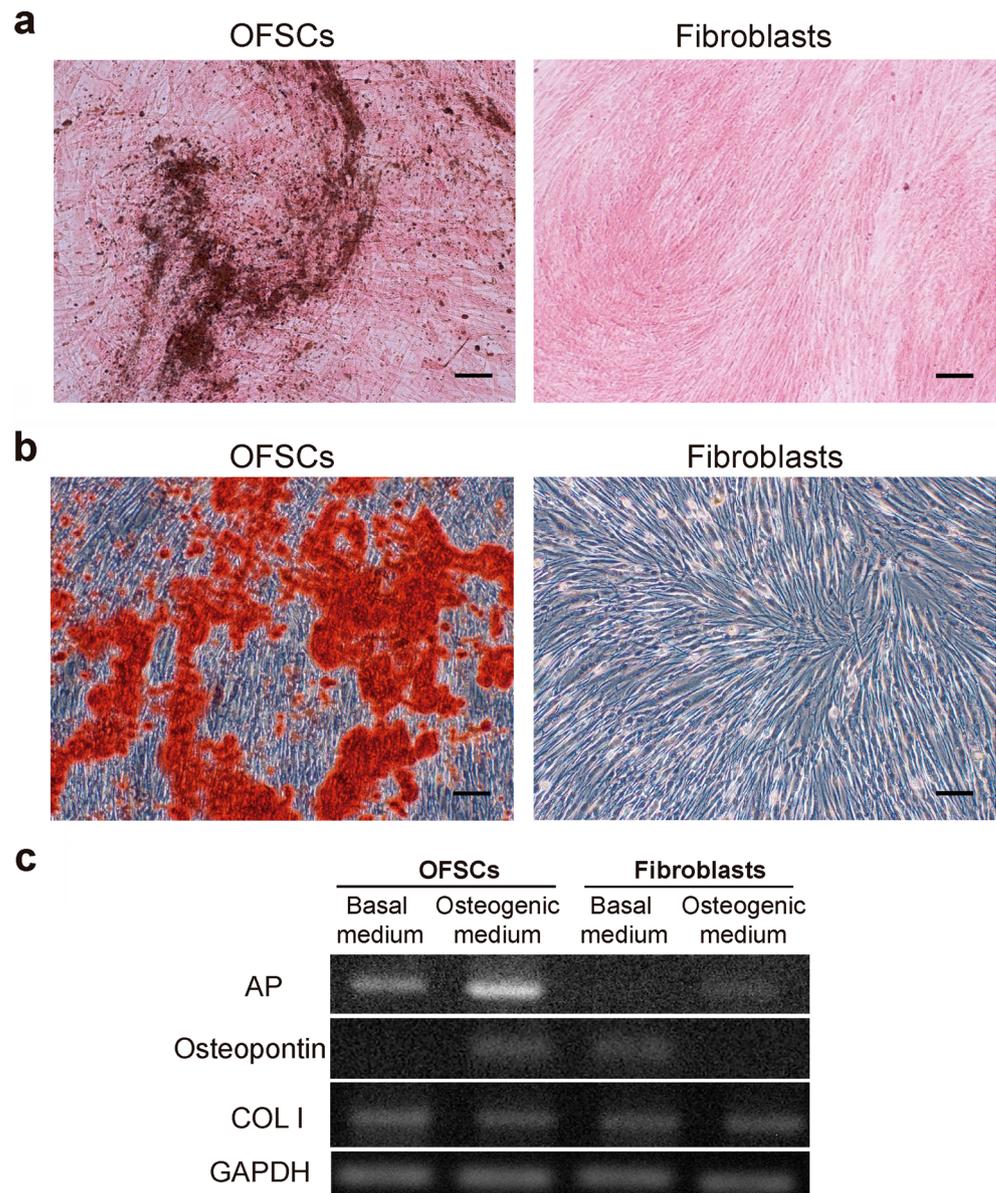
Discussion

OFSCs are an attractive candidate for cell therapy and tissue engineering, and they can have potential therapeutic uses in the treatment of a variety of diseases and injuries, including

ophthalmic disorders [10,11]. With the increased incidence of eyelid plastic surgery for cosmetic and functional reasons, orbital adipose tissue is easily and readily obtained under local anesthesia with little donor site morbidity and minimal patient discomfort [14]. However because of the limited amount of orbital fat tissues that can be obtained surgically and the low number of stem cells within adult tissues [15], OFSCs can be isolated in only very limited quantities. Therefore, the *ex vivo* expansion of OFSCs prior to clinical application is necessary to obtain therapeutic doses and requires a safe production process compliant with Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines to ensure the reproducibility, efficacy, and safety of the therapeutic product.

All protocols for the proliferation of OFSCs use DMEM supplemented with 10 % FBS [10, 14, 16, 17] or Mesen Pro Medium, which contain 2 % FBS [11–13, 18]. As FBS contains a large number of components, such as growth factors, attachment factors, proteins, vitamins, trace elements, and hormones, it promotes cell attachment to plastic surfaces as well as cell proliferation and differentiation [43, 44]. Nevertheless, FBS contains xenogeneic proteins that can be internalized or can adhere to the surface of the cells, leading to immunological reactions in the recipient [20, 45, 46]. Gregory *et al.* (2006) demonstrated that the uptake of FBS by MSCs is

Fig. 5 Osteogenic differentiation capacity of OFSCs and fibroblasts. Mineralization was visualized using von Kossa (a) and alizarin red S stains (b) in OFSCs (left panels) but not in fibroblasts (right panels) cultivated in osteogenic differentiation medium for 21 days. c Reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis of AP, osteopontin and COL I mRNA expression. Total RNA was extracted from OFSCs and fibroblasts cultured in basal medium or osteogenic differentiation medium. GAPDH was the house-keeping gene. Scale bar: 150 μ m. AP, alkaline phosphatase; COL I, type I collagen; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



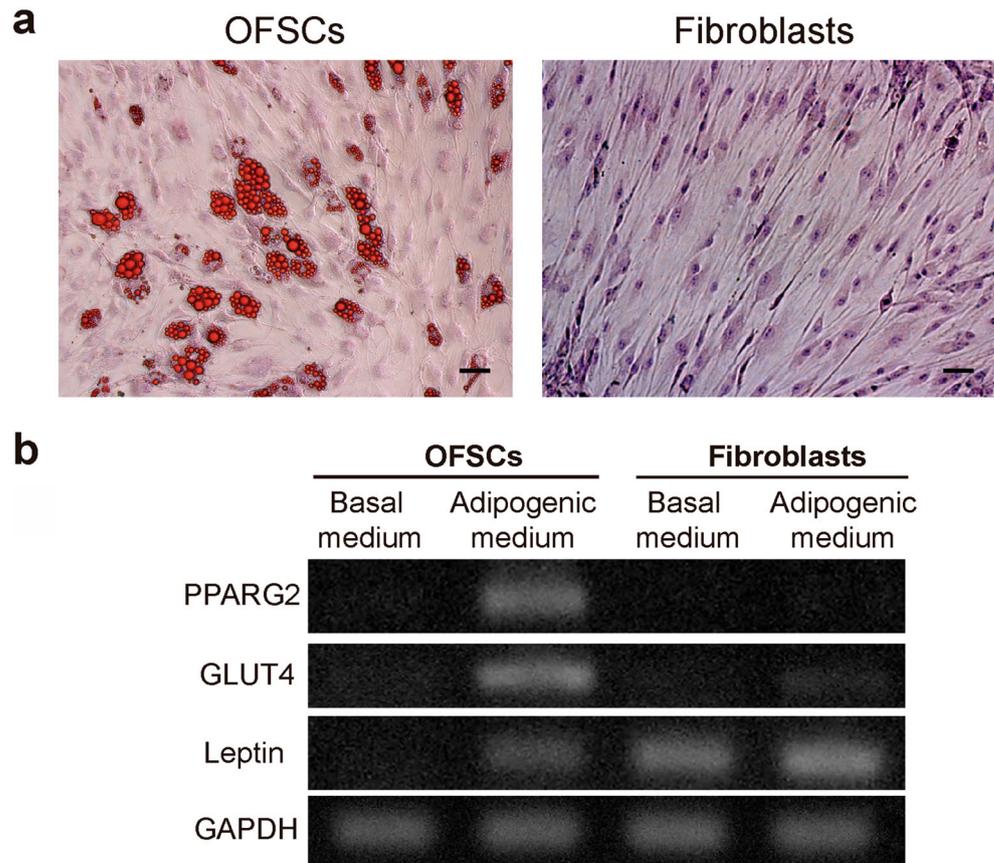
an active process that leads to an intracellular accumulation of bovine antigens, even under 2 % concentrations of FBS [47]. Moreover, FBS may contain harmful contaminants, such as viruses, prions, nanobacteria, mycoplasma, fungal agents, and endotoxins [19, 48]. Additionally, the poorly defined nature and the considerable batch-to-batch variation in FBS may result in a significant variation in MSC properties in an unknown way [49]. Therefore, it is essential to substitute FBS as a supplement of culture medium to ensure adherence to GMP and the delivery of MSCs as a clinically safe cell product [42].

Therefore, different studies have utilized serum-free defined media or human blood derivatives for the proliferation of MSCs to avoid the disadvantages of FBS use [50]. Although in recent years many chemically defined media have been developed for culturing MSCs, problems related to

efficient isolation, establishment of long-term cultures, and cost remain unresolved [48]. Moreover, the information about formulation provided by companies is often limited, and such supplements can therefore not be regarded as completely defined [43]. Therefore, the development of defined media is difficult, and a formulation allowing for both MSC isolation and expansion has not been achieved thus far [43, 48, 51].

Several studies have demonstrated that the replacement of FBS with autologous or allogeneic human serum, human plasma, platelet-rich plasma, umbilical cord blood serum, platelet lysate, or platelet-released growth factors is able to support equal or higher proliferation rates and multilineage differentiation capacity of bone marrow-derived stem cells (BMSCs) [40, 50, 52–59], adipose-derived stem cells from lipoaspirates (ASCs) [41, 42, 56, 60–62], synovium-derived

Fig. 6 Adipogenic differentiation potential of OFSCs and fibroblasts. **a** Intracellular accumulation of lipid-rich vacuoles was visualized using Oil Red O staining in OFSCs (*left panel*) but not in fibroblasts (*right panel*) cultivated in adipogenic differentiation medium for 21 days. **b** Reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis of PPARG2, GLUT4 and Leptin mRNA expression. Total RNA was extracted from OFSCs and fibroblasts cultured in basal medium or adipogenic differentiation medium. GAPDH was the house-keeping gene. *Scale bar*: 50 μ m. PPARG2, peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2; GLUT 4, glucose transporter type 4; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



MSCs [64], dental pulp stem cells [44] or MSC from chorionic villi [63]. To the best of our knowledge, there is not yet evidence in the current literature that human serum may constitute a suitable replacement for FBS for culture and differentiation of OFSCs. Therefore, this is the first study that compared the proliferative effects of pooled human serum on OFSCs with FBS.

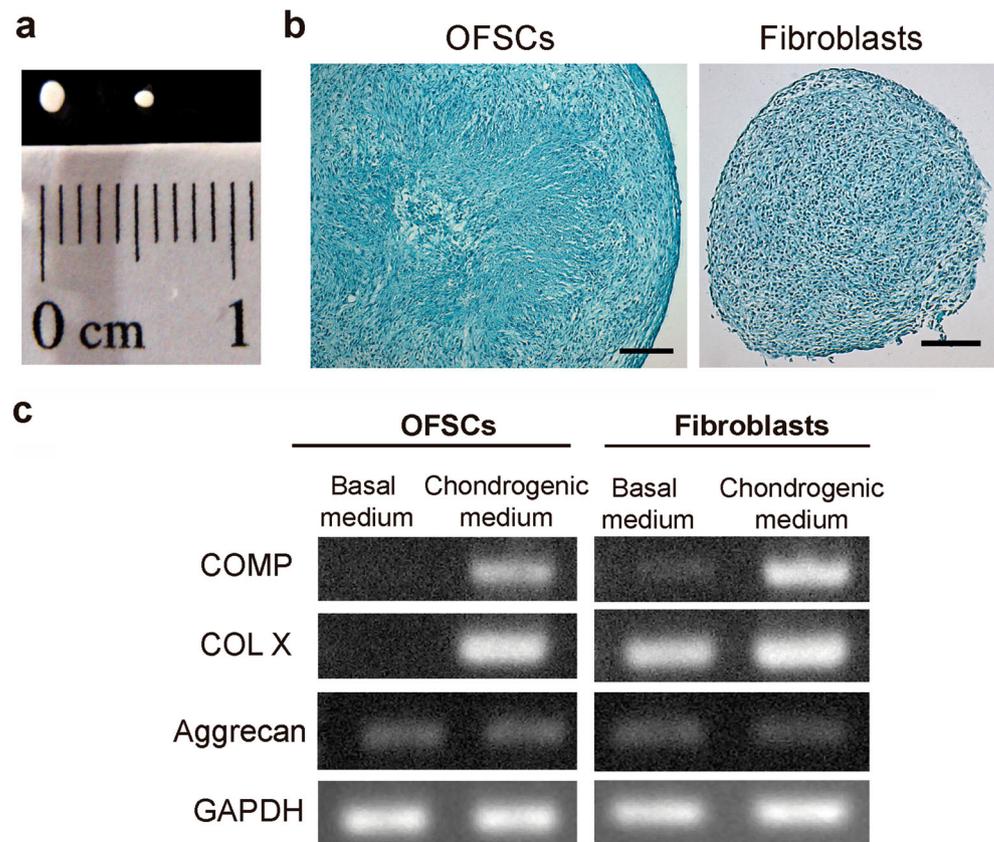
We decided to use pooled human serum instead of autologous serum because, for clinical use, a supplement that is available in large quantities is more desirable. The limited availability and high variability hinder the clinical applicability of autologous serum for large-scale stem cell production [60]. As the content and composition of low molecular weight components, growth factors and hormones vary considerably in human serum, growth and differentiation of MSCs with autologous serum may yield variable results [50]. To reduce such variability, in this study, samples from at least five different healthy donors were pooled and stored at -20°C for later use. We also proposed to use a pool of HS produced from all blood types, because the expression of immunogenic blood group antigens and other antigens based in proteins and carbohydrates are not found on MSCs [65]. HS is also a suitable replacement to FBS due to the possibility for testing for human pathogens before use [22]. Moreover, no allogeneic antibodies against HS are found in recipients that have

received cell transplantation with BMSCs expanded in allogeneic HS, whereas patients who have received cells expanded in FBS exhibit antibodies against bovine antigens and immunological reactions, which were considered to have possibly affected the clinical outcome [21, 60, 66, 67].

The OFSCs isolated and maintained in both FBS and HS displayed a characteristic fibroblast-like morphology and were adherent to the tissue culture plastic surface; however, some differences could be observed in the OFSCs cultured in HS, such as a smaller size and a much denser growth. Similar characteristics were described for human ASCs cultured in human AB serum, thrombin-activated platelet-rich plasma or pooled HS [41, 42].

Our results showed that HS had a significantly higher proliferative effect on OFSCs, providing a PDT that was approximately three times shorter than the cultures grown in FBS. These results indicate that HS is an appropriate supplement for clinical use because the large number of cells required for transplantation can be achieved in a shorter period of time. In addition, OFSCs cultured in HS exhibited the surface antigen expression pattern characteristic of MSCs and consistently differentiated into the osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages. These data showed that HS did not affect the surface antigen expression and the multilineage differentiation ability of OFSCs, which fulfilled

Fig. 7 Chondrogenic differentiation capacity of OFSCs and fibroblasts. **a** Three-dimensional pellet formed by OFSCs (*left*) and fibroblasts (*right*). **b** Alcian blue staining indicated the presence of proteoglycans in the pellet structure formed by OFSCs (*left panel*) and fibroblasts (*right panel*). **c** Reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis of COMP, COL X, and aggrecan mRNA expression. Total RNA was extracted from OFSCs and fibroblasts cultured in basal medium or chondrogenic differentiation medium. GAPDH was the house-keeping gene. Scale bar: 150 μ m. COMP, cartilage oligomeric matrix protein; COL X, type X collagen; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



all criteria described by the International Society of Cell Therapy for MSCs and ASCs [1, 69].

In parallel with the OFSC characterization in medium supplemented with HS, we compared, for the first time, the proliferation capacity and the phenotypic and functional features of OFSCs side-by-side with fibroblasts from the eyelid skin originating from the same donors. Knowing the differences between MSCs and fibroblasts is important for understanding the biology of these two cell types and for the future safe clinical application of these cells in the field of regenerative medicine [29, 31].

We could not find differences between OFSCs and fibroblasts with regard to morphological appearance and proliferative capacity. Several studies demonstrated that MSCs, although recognized as a unique cellular entity, share *in vitro* similarities with fibroblasts with respect to cell size, morphology, and growth property, which corroborates our results [25, 26, 29, 33]. Additionally, both cell types expressed the same antigen profiles: positive for typical MSCs markers (CD105, CD73, CD90, and CD166) and negative for hematopoietic markers (CD45, CD34, CD14, CD19, and HLA-DR). Therefore, the phenotypic analysis confirms previous publications that indicate the absence of distinguishing markers in MSCs and fibroblasts [25, 29, 32, 33, 69].

However, despite the morphological, growth pattern, and phenotypic similarity, OFSCs and fibroblasts are not identical.

Our analysis showed that fibroblasts at passage 4 did not exhibit AP activity, while OFSCs exhibited high levels of this enzyme activity. RT-PCR analysis confirmed that fibroblasts, in contrast to OFSCs, did not express the AP gene. The APs form a large family of dimeric enzymes common to all organisms. They catalyze the hydrolysis of phosphomonoesters resulting in the release of inorganic phosphate from biomolecules [70]. In humans, there are four isoforms of the enzyme: intestinal, germ cell, placental, and tissue nonspecific AP [71]. Tissue nonspecific AP is commonly accepted as a marker of osteoblasts and embryonic stem cells [71, 72]. One group demonstrated that the mesenchymal stem cell antigen-1, which is identical to tissue nonspecific AP, plays an important role as an MSC selection marker in human bone marrow and in endometrium [73, 74]. Further studies have shown that AP is also expressed in adipose tissue and dermis MSCs [75], myogenic progenitor cells [76], and neuronal progenitor cells [77]. Therefore, AP is an enzyme expressed in undifferentiated cells, and the absence of gene expression and enzyme activity in fibroblasts is justified because they are commonly considered to be terminally differentiated cells that are primarily responsible for the synthesis and remodeling of extracellular matrix in tissues and do not convert into other types of cells [23, 25, 26, 29]. Therefore, fibroblasts are routinely used as a negative control for the evaluation of cell multipotency in many studies [2, 27, 28].

Our results also demonstrated that fibroblasts isolated from eyelid skin are different from MSCs because they did not differentiate towards the adipogenic or osteogenic lineage, and they show less pronounced signs of chondrogenic differentiation, as assessed by cytochemical staining and RT-PCR analysis. These results are in contrast with other studies that demonstrated that fibroblasts and MSCs display similar differentiation capacity [30, 32–34] but support the findings of many reports that showed fibroblasts, in contrast to MSCs, did not possess a multilineage differentiation potential [23, 25–29, 78, 79]. Other studies indicate that fibroblasts are more differentiated cells with more restricted differentiation potential compared to MSCs [31, 80]. These contradictory results in literature regarding fibroblasts multipotency can be attributed to the fact that the majority of studies comparing MSCs and fibroblasts have been carried out using cells derived from different donors, body locations and developmental stage [35]. In this study, we compared OFSCs and fibroblasts in donor-matched samples to avoid variation in cellular functions that is not directly related to the differences between these cell types.

In conclusion, we were able to successfully isolate OFSCs and fibroblasts without mixing both cell populations, namely contaminating OFSCs with fibroblasts, and vice versa. Our observations suggest that AP expression/activity and multilineage differentiation assays can be used reliably to discriminate MSCs from fibroblasts. In addition, we showed that HS enhanced OFSC proliferation without compromising their differentiation capacity or immunophenotype and reducing costs and the time needed for cells expansion. Thus, our findings also support the feasibility of pooled allogeneic HS as a safer and more effective alternative to FBS for clinical applications.

Acknowledgments The authors thank Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais and Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, especially Dr. João Agostini Netto and Dra. Ana Paula. The authors also thank Dra. Maira Souza de Oliveira for advice on statistical analysis. This work was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil), Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG-PRPq, and by grants from NIH 1R03TW008709.

Conflict of Interest The authors indicate no potential conflicts of interest.

References

- Dominici, M., Le Blanc, K., & Mueller, I. (2006). Minimal criteria for defining multi potent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147.
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., et al. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106(2), 756–763.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10711–10716.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393–403.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228.
- Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N. M., et al. (2008). Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*, 26(1), 146–150.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630.
- De Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M. M., et al. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 25(1), 100–106.
- Korn, B. S., Ph, D., Kikkawa, D. O., & Hicok, K. C. (2009). Identification and characterization of adult stem cells from human orbital adipose tissue. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 25(1), 27–32.
- Ho, J. H., Ma, W., Tseng, T., Chen, Y., Chen, M., & Lee, O. K. (2011). Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. *Tissue Engineering-Part A*, 17(1–2), 255–266.
- Lin, K. J., Loi, M. X., Lien, G. S., et al. (2013). Topical administration of orbital fat-derived stem cells promotes corneal tissue regeneration. *Stem cell research & therapy*, 4(3), 72.
- Chien, M.-H., Bien, M.-Y., Ku, C.-C., et al. (2012). Systemic human orbital fat-derived stem/stromal cell transplantation ameliorates acute inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Critical Care Medicine*, 40(4), 1245–1253.
- Lee, J. Y., Lee, K. H., Shin, H. M., Chung, K. H., Kim, G. I., & Lew, H. (2013). Orbital volume augmentation after injection of human orbital adipose-derived stem cells in rabbits. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(4), 2410–2416.
- Dry, H., Jorgenson, K., Ando, W., Hart, D. a., Frank, C. B., & Sen, A. (2013). Effect of calcium on the proliferation kinetics of synovium-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 15(7), 805–819.
- Chen, X., Zhang, S., Liu, T., Liu, Y., & Wang, Y. (2012). Maintenance of rat hepatocytes under inflammation by coculture with human orbital fat-derived stem cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 17(2), 182–195.
- Kang, H. M., Kim, J., Park, S., et al. (2009). Insulin-secreting cells from human eyelid-derived stem cells alleviate type I diabetes in immunocompetent mice. *Stem Cells*, 27(8), 1999–2008.
- Ong, W., Chen, H., Tsai, C., et al. (2013). The activation of directional stem cell motility by green light-emitting diode irradiation. *Biomaterials*, 34(8), 1911–1920.
- Mannello, F., & Tonti, G. A. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement non conditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*, 25(7), 1603–1609.

20. Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F., & Varki, A. (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine*, *11*(2), 228–232.
21. Sundin, M., Ringdén, O., Sundberg, B., Nava, S., Götherström, C., & Le Blanc, K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*, *92*(9), 1208–1215.
22. Aldahmash, A., Haack-Sorensen, M., Al-Nbaheen, M., Harkness, L., Abdallah, B. M., & Kassem, M. (2011). Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multi potent stromal (mesenchymal) stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cell Reviews and Reports*, *7*(4), 860–868.
23. Pereira, M. C. L., Secco, M., Suzuki, D. E., & Janjoppi, L. (2011). Contamination of mesenchymal stem-cells with fibroblasts accelerates neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, *7*(4), 1006–1017.
24. Haniffa, M. A., Wang, X., Holtick, U., et al. (2007). Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *Journal of Immunology*, *179*(3), 1595–1604.
25. Bae, S., Ahn, J. H., Park, C. W., et al. (2009). Gene and microRNA expression signatures of human mesenchymal stromal cells in comparison to fibroblasts. *Cell and Tissue Research*, *335*(3), 565–573.
26. Cappellesso-Fleury, S., Puissant-Lubrano, B., Apoil, P. A., et al. (2010). Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Immunology*, *30*(4), 607–619.
27. Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., et al. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, *33*(11), 1402–1416.
28. Brendel, C., Kucklick, L., Hartmann, O., et al. (2005). Distinct gene expression profile of human mesenchymal stem cells in comparison to skin fibroblasts employing cDNA microarray analysis of 9600 genes. *Gene Expression*, *12*(4–6), 245–257.
29. Alt, E., Yan, Y., Gehmert, S., et al. (2011). Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the Cell*, *103*(4), 197–208.
30. Chen, F. G., Zhang, W. J., Bi, D., et al. (2007). Clonal analysis of nestin (–) vimentin (+) multi potent fibroblasts isolated from human dermis. *Journal of Cell Science*, *120*(16), 2875–2883.
31. Covas, D. T., Panepucci, R. A., Fontes, A. M., et al. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*, *36*(5), 642–654.
32. Lorenz, K., Sicker, M., Schmelzer, E., et al. (2008). Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Experimental Dermatology*, *17*(11), 925–932.
33. Blasi, A., Martino, C., Balducci, L., et al. (2011). Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular Cell*, *3*(1), 5.
34. Brohem, C. A., de Carvalho, C. M., Radoski, C. L., et al. (2013). Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. *International Journal of Cosmetic Science*, *35*(5), 448–457.
35. Jääger, K., Islam, S., Zajac, P., Linnarsson, S., & Neuman, T. (2012). RNA-seq analysis reveals different dynamics of differentiation of human dermis- and adipose-derived stromal stem cells. *PLoS One*, *7*(6), e38833.
36. Jääger, K., & Neuman, T. (2011). Human dermal fibroblasts exhibit delayed adipogenic differentiation compared with mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *20*(8), 1327–1336.
37. Baker, T. J., Gordon, H. L., & Stuzin, J. M. (1996). *Surgical Rejuvenation of the Face*. St Louis, Mosby.
38. Barker, D. E. (1977). Dye injection studies of intraorbital fat compartments. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *59*(1), 82–85.
39. Cristofalo, V. J., Allen, R. G., Pignolo, R. J., Martin, B. G., & Beck, J. C. (1998). Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(18), 10614–10619.
40. Bieback, K., Hecker, A., Kocaoemer, A., et al. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, *27*(9), 2331–2341.
41. de Paula, A. C. C., Zonari, A. A. C., Martins, T. M. M., et al. (2013). Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. *Tissue Engineering-Part A*, *19*(1–2), 277–289.
42. Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H., & Bieback, K. (2007). Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*, *25*(5), 1270–1278.
43. Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., et al. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in Vitro*, *24*(4), 1053–1063.
44. Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., et al. (2012). Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, *7*(11), e50542.
45. Spees, J. L., Gregory, C. A., Singh, H., et al. (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypo immunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, *9*(5), 747–756.
46. Heiskanen, A., Satomaa, T., Tiitinen, S., et al. (2007). N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*, *25*(1), 197–202.
47. Gregory, C. A., Reyes, E., Whitney, M. J., & Spees, J. L. (2006). Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells*, *24*(10), 2232–2243.
48. Gottipamula, S., Muttigi, M. S., Chaansa, S., et al. (2013). Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, doi:10.1002/term.1713. [Epub ahead of print].
49. Hudson, J. E., Mills, R. J., Frith, J. E., et al. (2011). A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem Cells and Development*, *20*(1), 77–87.
50. Felka, T., Schäfer, R., De Zwart, P., & Aicher, W. K. (2010). Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *12*(2), 143–153.
51. Bieback, K., Ha, V. A.-T., Hecker, A., et al. (2010). Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue Engineering-Part A*, *16*(11), 3467–3484.
52. Lin, H.-T., Tarnag, Y.-W., Chen, Y.-C., et al. (2005). Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multilineage potential. *Transplantation Proceedings*, *37*(10), 4504–4505.
53. Fekete, N., Rojewski, M. T., Fürst, D., et al. (2012). GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLoS One*, *7*(8), e43255.
54. Mietsch, A., Neidlinger-Wilke, C., Schrezenmeier, H., et al. (2013). Evaluation of platelet-rich plasma and hydrostatic pressure regarding

- cell differentiation in nucleus pulposus tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(3), 244–252.
55. Goedecke, A., Wobus, M., Krech, M., et al. (2011). Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded *in vitro*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(8), 648–654.
 56. Kishimoto, S., Ishihara, M., Mori, Y., et al. (2012). Effective expansion of human adipose-derived stromal cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured on a fragmin/protamine nanoparticles-coated substratum with human platelet-rich plasma. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(12), 955–964.
 57. Gottipamula, S., Sharma, A., Krishnamurthy, S., Majumdar, A. S., & Seetharam, R. N. (2012). Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnology Letters*, 34(7), 1367–1374.
 58. Kilian, O., Flesch, I., Wenisch, S., et al. (2004). Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells *in vitro*. *European Journal of Medical Research*, 9(7), 337–344.
 59. Horn, P., Bokermann, G., Cholewa, D., et al. (2010). Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(7), 888–898.
 60. Lindroos, B., Aho, K. L., Kuokkanen, H., et al. (2010). Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Engineering-Part A*, 16(7), 2281–2294.
 61. Bieback, K., Hecker, A., Schlechter, T., et al. (2012). Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy*, 14(5), 570–583.
 62. Naaijkens, B. A., Niessen, H. W. M., Prins, H.-J., et al. (2012). Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. *Cell and Tissue Research*, 348(1), 119–130.
 63. Tateishi, K., Ando, W., Higuchi, C., et al. (2008). Comparison of human serum with fetal bovine serum for expansion and differentiation of human synovial MSC: potential feasibility for clinical applications. *Cell Transplantation*, 17(5), 549–557.
 64. Poloni, A., Maurizi, G., Serrani, F., et al. (2012). Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi : comparison with other source and other media including platelet lysate. *Cell Proliferation*, 45(1), 66–75.
 65. Schäfer, R., Schnaidt, M., Klaffschinkel, R. A., et al. (2011). Expression of blood group genes by mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 153(4), 520–528.
 66. Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K. K., et al. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8932–8937.
 67. Le Blanc, K., Samuelsson, H., Lönnies, L., Sundin, M., & Ringdén, O. (2007). Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. *Transplantation*, 84(8), 1055–1059.
 68. Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., et al. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the international federation for adipose therapeutics and science (IFATS) and the international society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641–648.
 69. Lysy, P. A., Smets, F., Sibille, C., Najimi, M., & Sokal, E. M. (2007). Human skin fibroblasts: from meso dermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology*, 46(5), 1574–1585.
 70. Mornet, E., Stura, E., Stigbrand, T., & Ménez, A. (2001). Protein structure and folding : structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31171–31178.
 71. Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the international stem cell initiative. *Nature Biotechnology*, 25(7), 803–816.
 72. Kim, Y. H., Yoon, D. S., Kim, H. O., & Lee, J. W. (2012). Characterization of different subpopulations from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by alkaline phosphatase expression. *Stem Cells and Development*, 21(16), 2958–2968.
 73. Battula, V. L., Treml, S., Bareiss, P. M., et al. (2009). Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, 94(2), 173–184.
 74. Sobiesiak, M., Sivasubramanian, K., Hermann, C., et al. (2010). The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *Stem Cells and Development*, 19(5), 669–677.
 75. Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., et al. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(4), 378–386.
 76. Dellavalle, A., Sampaoli, M., Tonlorenzi, R., et al. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature Cell Biology*, 9(3), 255–267.
 77. Langer, D., Ikehara, Y., Takebayashi, H., Hawkes, R., & Zimmermann, H. (2007). The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, post-natal and adult neurogenic zones. *Neuroscience*, 150(4), 863–879.
 78. Suzdal'tseva, Y. G., Burunova, V. V., Petrakova, N. V., Vakhruhev, I. V., Yarygin, K. N., & Yarygin, V. N. (2007). Comparative analysis of cytophenotypes of cells of mesenchymal lineage isolated from human tissues. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143(1), 147–154.
 79. Bouffi, C., Bony, C., Jorgensen, C., & Noël, D. (2011). Skin fibroblasts are potent suppressors of inflammation in experimental arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(9), 1671–1676.
 80. Hong, S. J., Jia, S., Xie, P., et al. (2013). Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *PLoS One*, 8(1), e55640.