

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

**Dissertação de Mestrado**

**DESENVOLVIMENTO DE CÓRNEAS BIOSSINTÉTICAS DERIVADAS DO  
ESTROMA DE CÓRNEAS SUÍNAS DESCELULARIZADAS CONTENDO  
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

**Autor: Matheus Soares Siman**

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice**

**Novembro/2023**

Matheus Soares Siman

**DESENVOLVIMENTO DE CÓRNEAS BIOSSINTÉTICAS DERIVADAS DO  
ESTROMA DE CÓRNEAS SUÍNAS DESCELULARIZADAS CONTENDO  
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfica

Belo Horizonte

Novembro/ 2023

S588d

Siman, Matheus Soares.

Desenvolvimento de córneas bio sintéticas derivadas do estroma de córneas suínas descelularizadas contendo nanopartículas de ouro [recurso eletrônico] / Matheus Soares Siman. - 2023.

1 recurso online (104 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Rodrigo Lambert Oréfice.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 98-104.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Córnea - Transplante - Teses. 4. Hidrogéis - Teses. 5. Oftalmologia - Teses. 6. Transplante de córnea - Teses. 7. Nanopartículas - Teses. 8. Neovascularização - Teses. I. Oréfice, Rodrigo Lambert, 1968-. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 620(043)

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ângela Cristina Silva CRB/6 2361

Biblioteca Prof. Mário Werneck, Escola de Engenharia da UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE ENGENHARIA**  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Metalúrgica, Materiais e de Minas



A dissertação intitulada "**Desenvolvimento de Córneas Biossintéticas Derivadas do Estroma de Córneas Suínas Descelularizadas Contendo Nanopartículas de Ouro**", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pelo candidato **Matheus Soares Siman**, para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, foi aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

Dr. Rodrigo Lambert Oréfica  
Orientador (UFMG)

Dr. Sidney Nicodemos da Silva  
(CEFET-MG)

Dr. Armando da Silva Cunha Júnior  
(UFMG)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas/UFMG

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2023

*A cada ser que se faz presente.*

## **AGRADECIMENTOS**

Com imensa gratidão que me dirijo a todos que aqui estão citados, pois minha jornada acadêmica jamais teria sido possível sem o apoio, a sabedoria e o amor que recebi de cada um de vocês.

Primeiro, ao Professor e meu Orientador - Rodrigo Lambert Oréfice, agradeço profundamente pela parceria e pela orientação humana, sábia, paciente e pelo apoio inabalável ao longo de todo o trabalho. Seu exemplo de profissionalismo e de humanidade foram inspiradores para mim.

Ao Dr. Paulo Ferrara, cujo apoio incondicional, visão e idealismo na ciência foram fundamentais para a realização deste projeto. Além disso, gostaria de estender meus agradecimentos especiais a toda sua equipe, em particular à Juliana, que desempenhou um papel fundamental ao disponibilizar as córneas para o estudo e se mostrar sempre disponível. Suas contribuições não apenas tornaram este projeto uma realidade, mas também destacaram o espírito de colaboração e comprometimento que um bom trabalho científico necessita.

A minha mãe – Raquel Soares Leite – ao meu pai – Robson Perpétuo Siman – ao meu irmão – Marcelo Soares Siman - e aos demais parentes, minha gratidão é eterna. Vocês sempre estiveram ao meu lado, apoiando e encorajando, mesmo nos momentos mais desafiadores. A presença e amor de vocês são a força motriz que impulsiona a minha vida.

Aos colegas de laboratório - Catarina, Philipe, Ricardo, Andréia, Ana e aos demais, agradeço por compartilharem todo esse tempo comigo. Nossas trocas e amizades tornaram o processo mais leve e enriquecedor.

Aos professores e funcionários do PPGEM, em especial ao professor Eduardo Henrique Martins Nunes, que também sempre se mostrou apto a ajudar e colaborar com o projeto.

Aos professores parceiros de outros departamentos e instituições, sobretudo ao professor Armando da Silva Cunha Júnior – que disponibilizou a sua força de trabalho e estrutura laboratorial para o projeto – sendo imprescindível para os

resultados alcançados – e ao professor Sidney Nicodemos da Silva – por todas os apoios e parcerias. Também ao professor Dawidson Assis Gomes por permitir e realizar o ensaio de viabilidade celular em seu laboratório.

Àqueles que muito contribuíram, de modo particular à Lays Fernanda Nunes Dourado, Fernanda Aparecida Silva Vieira e Thomas Toshio Inoue – que possibilitaram a realização do ensaio de angiogênese. Também à María José González Armijos pelo ensaio de viabilidade e a professora Maria Aparecida Gomes do ICB que me abriu as primeiras portas em um momento de dificuldade. O apoio de vocês foi engrandecedor e inestimável.

Aos amigos-irmãos: Níkolos Assiz, Miguel Oliveira, Fábio Francisco, Lucas Gabriel, Plínio Lucas, Matheus Guimarães e Amanda Maria - agradeço por estarem ao meu lado, celebrando as vitórias e apoiando nos momentos difíceis. É uma honra e prazer partilhar essa existência com vocês.

À Gabriela Vilhena, sob a égide dos ventos da gratidão e dos espíritos protetores, expresso minha gratidão por poder conhecer e compartilhar minha existência com o seu ser. Você é uma verdadeira pérola que apareceu em minha jornada. Juntos, compartilhamos sonhos, desafios, risos e lágrimas, e a cada passo, crescemos espiritualmente.

Às Terras de Anahí, à Xamã Ayala e a todas as pessoas e egrégora dessa casa. Agradeço por me ensinarem lições profundas sobre espiritualidade e conexão com o divino.

Finalmente, a CAPES, agradeço por conceder o apoio financeiro que foi vital para a execução deste trabalho. Essa gratidão se estende a cada cidadão brasileiro, que muitas vezes, mesmo sem pleno conhecimento, contribuiu para essa bolsa por meio de seus impostos.

Que a energia da abundância e prosperidade se multiplique e retorne a todos vocês. Juntos, construímos um caminho de crescimento espiritual e acadêmico, e por isso sou eternamente grato.

## RESUMO

A demanda crescente por transplantes de córneas em todo o mundo não está sendo suprida devido à escassez de doadores humanos. Nesse contexto, torna-se imperativo desenvolver novos materiais. A síntese de córneas bio sintéticas, modeladas como hidrogéis, surge como uma alternativa promissora. Isso se deve ao fato de que, além de possibilitar a preservação dos componentes da matriz extracelular da córnea, a matéria-prima é facilmente acessível, tem baixo custo e apresenta poucos dilemas éticos relacionados à sua obtenção. Embora apresente todas essas vantagens, estudos apontam a necessidade de aprimorar as propriedades mecânicas e estabilidade estrutural desses materiais. Dessarte, o presente trabalho teve como objetivo investigar a influência da adição de nanopartículas de ouro (AuNPs) nas propriedades mecânicas e biológicas desses hidrogéis baseados em córneas suínas descelularizadas. As AuNPs, com aproximadamente 30nm de diâmetro, foram sintetizadas a partir do método *Turkevich* modificado e incorporadas na matriz dos hidrogéis em três diferentes proporções: 25, 50 e 75ppm. A análise dinâmico-mecânica revelou uma correlação entre o aumento na concentração de AuNPs e um aumento no módulo de elasticidade. A adição de 75ppm de AuNPs resultou em um aumento de aproximadamente 75% no módulo de elasticidade dos hidrogéis sob uma carga oscilante de compressão a 10Hz. O teste de viabilidade celular por resazurina revelou que a adição dessas concentrações de AuNPs não resultaram em efeito citotóxico. Além disso, o ensaio de membrana cório-alantoide (CAM) para angiogênese revelou um efeito de inibição na formação de vasos sanguíneos à medida que a concentração de AuNPs aumentava, reduzindo a área vascular e o número de junções vasculares. Apesar de uma redução na transmitância de luz na faixa de absorção das AuNPs, as córneas bio sintéticas mantiveram propriedades óticas e biomecânicas adequadas para aplicações no campo da oftalmologia.

Palavras-chave: córneas suínas descelularizadas, hidrogel, transplante de córnea, nanopartículas de ouro, angiogênese.



## ABSTRACT

The growing demand for corneal transplants worldwide has not been supplied due to the shortage of human donors. In this context, it becomes imperative to develop new materials. The synthesis of biosynthetic corneas, modeled as hydrogels, emerges as a highly promising alternative. This is because, in addition to preserving a significant portion of the extracellular matrix of the cornea, the raw material is easily accessible, cost-effective, and presents few ethical dilemmas related to its source. Despite all these advantages, previous studies indicate the need to enhance the mechanical properties and structural stability of these materials. Therefore, the present study aimed to investigate the influence of adding different concentrations of gold nanoparticles (AuNPs) on the mechanical and biological properties of these hydrogels derived from decellularized porcine cornea. The AuNPs, approximately 30nm in diameter, were synthesized using a modified Turkevich method and incorporated into the hydrogel matrix in three different proportions: 25, 50, and 75ppm. Dynamic-mechanical analysis revealed a correlation between an increase in AuNPs concentration and an increase in the elastic modulus. The addition of 75ppm of AuNPs resulted in an approximately 75% increase in the elastic modulus of the hydrogels under a compressive oscillating load at 10Hz. The resazurin cell viability test showed that the addition of these concentrations of AuNPs did not result in cytotoxic effects. Additionally, the Chorioallantoic membrane (CAM) angiogenesis assay revealed an inhibitory effect on blood vessel formation as the concentration of AuNPs increased, reducing the vascular area and the number of vascular junctions. Despite a reduction in light transmission in the AuNPs absorption range, the biosynthetic corneas maintained suitable optical and biomechanical properties for applications in the field of ophthalmology.

Key words: Decellularized porcine cornea, hydrogel, corneal transplant, gold nanoparticles, angiogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - Modelo esquemático da anatomia da córnea humana..... 23
- Figura 3.2** - Representação esquemática da córnea humana com enfoque na estrutura do estroma. .... 25
- Figura 3.3** - Representação esquemática de uma nanopartícula de ouro com moléculas de citrato adsorvidas em sua superfície..... 48
- Figura 4.1** - Fluxo das principais etapas do desenvolvimento das córneas bio sintéticas..... 50
- Figura 4.2** - Fluxograma descritivo das etapas e dos reagentes necessários para a preparação das AuNPs. .... 53
- Figura 4.3** - Fluxograma descritivo das etapas e dos reagentes necessários para a preparação dos HEDS. .... 55
- Figura 5.1** – Resultados do processo de descelularização onde: (A) apresenta uma imagem representativa de cada grupo após desidratação com glicerol, (B) imagens representativas de seções histológicas que foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), Tricrômico de Masson (T. Masson), *Alcian Blue*, *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Hoechst 33258, (C) gráfico com a quantificação da porcentagem de colágeno e (D) gráfico com a quantificação do número de núcleos..... 63
- Figura 5.2** - Espectros de absorção UV-Vis das nanopartículas de ouro com a representação do seu pico de absorção no comprimento de luz visível. .... 65
- Figura 5.3** – (A) Imagem das AuNPs no substrato dos hidrogéis e (B) cálculo do diâmetro das partículas após tratamento da imagem utilizando o software ImageJ®..... 69
- Figura 5.4** – Imagens das córneas bio sintéticas, na sequência da esquerda para direita: HEDS, HEDS25, HEDS50 e HEDS75..... 70
- Figura 5.5** – Transmitância em diferentes comprimentos de onda das córneas

biossintéticas: HEDS, HEDS25, HEDS50 e HEDS75. ....	70
<b>Figura 5.6</b> – Imagens obtidas por MET das córneas biossintéticas, em diferentes escalas, na seguinte sequência: (A) e (A') HEDS, (B) e (B') HEDS25, (C) e (C') HEDS50 e (D) e (D') HEDS75.....	73
<b>Figura 5.7</b> – Duas imagens, em diferentes escalas, de uma amostra de uma córnea suína nativa, revelando a ordenação das fibras de colágeno em diferentes direções. ....	74
<b>Figura 5.8</b> – Espectro de FTIR da córnea suína nativa, córnea suína descelularizada com SDS 0,1% e dos hidrogéis sem AuNPs (HEDS) e com AuNPs (HEDS-Au). ....	76
<b>Figura 5.9</b> – Imagem da amostra HEDS logo antes de ser submetida ao ensaio de compressão.....	79
<b>Figura 5.10</b> – Módulo de Elasticidade (KPa) para diferentes frequências obtidas por DMA. ....	80
<b>Figura 5.11</b> – Módulo de Perda (KPa) para diferentes frequências obtidas por DMA. ....	82
<b>Figura 5.12</b> - Módulo de Elasticidade (KPa) para diferentes frequências obtidas por DMA. ....	83
<b>Figura 5.13</b> – Viabilidade de HDF após 24 horas de contato com as amostras. *Indica diferença estatística em relação ao grupo Controle. ....	86
<b>Figura 5.14</b> - Imagens dos vasos sanguíneos e rede de conexão nas imagens retiradas do embrião (A), do processamento gráfico (B) e da identificação das junções e pontos de conexão vascular (C). ....	87
<b>Figura 5.15</b> - Análise estatística que foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey (n = 10). Os dados são representados pela média ± DP. A área dos vasos do grupo PBS foi definida como 100%....	88
<b>Figura 5.16</b> - (A) comparativo com HEDS e (B) comparativo com HEDS25. ...	89
<b>Figura 5.17</b> - Imagens da resposta vascular no sétimo dia de desenvolvimento do embrião dos grupos: controle negativo – PBS (A), HEDS (B) e controle	

positivo - Bevacizumabe (C). ..... 90

**Figura 5.18** - Comparativo do número de junções do PBS com os demais grupos (A), do HEDS com os demais grupos (B) e comparativo do HEDS25 com os demais.. ..... 91

**Figura 5.19** - Comparativo da lacunaridade PBS com os demais grupos (A), do HEDS com os demais grupos (B) e comparativo do HEDS25 com os demais. 92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Lista de espera em países comparada com o número de transplantes de córneas realizados por ano. Fonte: Adaptado de Yoon; Choi; Kim, (2021).....	34
<b>Tabela 5.1</b> - Diâmetro e índice de Polidispersibilidade (DPI) obtidos pela análise de DLS em 10 leituras distintas.....	67
<b>Tabela 5.2</b> – Diâmetro médio das AuNPs da figura 5.3B calculadas pelo software ImageJ®.....	68
<b>Tabela 5.3</b> – Grau de Hidratação (%H) das córneas suínas, córneas suínas descelularizadas e das córneas biossintéticas (HEDS, HEDS25, HEDS50 e HEDS75), valores expressos em média e desvio padrão (n=5).....	72
<b>Tabela 5.4</b> – Relação das amostras com a atribuição dos principais picos de absorção obtidos por FTIR e suas respectivas posições. ....	77
<b>Tabela 5.5</b> - Módulo de Elasticidade E' (KPa) com seu respectivo desvio padrão amostral obtidos por DMA em diferentes frequências (Hz). ....	80

## LISTA DE NOTAÇÕES

AuNPs	Nanopartículas de Ouro
CAM	Ensaio da membrana cório-alantoide do ovo de galinha
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CMC carbodiimida	Meto-p-toluenossulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)
DLS	do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FTIR	do inglês <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
HDF	do inglês <i>Human Dermal Fibroblast</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
HEDS Córneas Suínas	Hidrogéis provindos de Estromas Descelularizados de
H&E:	Hematoxilina e Eosina
IP	Índice de Polidispersão
LEPCOM	Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos
LSPR	do inglês, <i>localized surface plasmon resonance</i>
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NaCl	Cloreto de Sódio
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PAS	Ácido Periódico de Schiff
pH	Potencial Hidrogeniônico

PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PAS	do inglês <i>Periodic Acid Schiff</i>
OOKP	Osteo-Odonto-Queratopróteses
SDS	do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TM	Tricrômico de Masson
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
µg	Micrograma
µl	Microlitro
VEGF	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Geral .....	21
2.2 Específicos .....	21
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>22</b>
3.1 Anatomia e Fisiologia da Córnea .....	<b>22</b>
3.1.1 Epitélio.....	<b>23</b>
3.1.2 Membrana de Bowman .....	<b>24</b>
3.1.3 Estroma .....	<b>24</b>
3.1.4 Membrana de Descemet .....	<b>25</b>
3.1.5 Endotélio .....	<b>26</b>
3.2 Propriedades Biomecânicas da Córnea .....	<b>26</b>
3.3 Disfunções da Córnea.....	<b>29</b>
3.4 Transplante de Córneas.....	<b>32</b>
3.5 Engenharia de Tecidos da Córnea Como Alternativa Médica.....	<b>35</b>
3.5.1 Córneas Artificias .....	<b>36</b>
3.5.2 Matrizes Corneanas providas de Xenoenxertos Descelularizados.....	<b>39</b>
3.5.3 Hidrogéis Derivados de Matrizes Extracelulares Descelularizadas.....	<b>43</b>
3.6 Nanopartículas de ouro (AuNPs) em aplicações oftalmológicas.....	<b>45</b>
<b>4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>50</b>
4.1 Etapas do Procedimento Experimental .....	<b>50</b>
4.2 Materiais.....	<b>51</b>
4.3 Métodos.....	<b>52</b>



4.3.1 Obtenção do Estroma de Córneas Suínas .....	52
4.3.2 Descelularização do estroma de córneas suínas .....	52
4.3.3 Síntese das Nanopartículas de Ouro (AuNPs) .....	53
4.3.4 Síntese dos Hidrogéis Estromais Provindos de Estromas de Córneas Suínas Descelularizadas (HEDS) .....	54
4.4 Análise dos processos de descelularização .....	55
4.5 Caracterizações das aunps .....	56
4.5.1 Espectroscopia no UV/Vis .....	56
4.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) .....	56
4.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	57
4.6 Caracterizações das córneas bio sintéticas.....	57
4.6.1 Avaliação da Transparência macroscópica e de transmitância de luz ....	57
4.6.2 Avaliação do grau de hidratação .....	58
4.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	58
4.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	59
4.6.5 Análise dinâmico-mecânico (DMA) .....	59
4.6.6 Análise de viabilidade celular por resazurina .....	60
4.6.7 Ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM).....	60
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>62</b>
5.1 Descelularização das Córneas Suínas.....	62
5.2 Síntese das Nanopartículas de Ouro .....	64
5.2.1 Espectroscopia no UV-Vis.....	64
5.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) .....	66
5.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	68
5.3 Desenvolvimento das Córneas Bio sintéticas.....	69

5.3.1 Avaliação da Transparência .....	69
5.3.2 Avaliação do grau de hidratação .....	71
5.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	73
5.3.4 Análise da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	75
5.3.5 Análise Dinâmico Mecânica (DMA) .....	78
5.3.6 Ensaio de Viabilidade Celular por resazurina.....	86
5.3.7Ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM) .....	87
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>97</b>
<b>Referências.....</b>	<b>98</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A córnea é um tecido avascular e transparente localizado na interface do olho com o meio externo. Ela atua como barreira física, protegendo o globo ocular de danos e infecções. É responsável também por suportar a pressão intraocular. Outra de suas funções é de lente primária do sistema visual, refratando e focalizando grande parte da luz incidente para garantir a transmissão adequada até a pupila (DELMONTE; KIM, 2011; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020; NUBILE et al., 2021). As funcionalidades e transparência da córnea possuem relação intrincada com sua estrutura. Injúrias, disfunções e enfermidades podem afetar o equilíbrio desse sistema, provocando danos biopsicossociais graves aos pacientes. Ceratocone, distrofia de Fuchs, ceratopatia bolhosa, ceratites infecciosas, além de traumas e acidentes, como queimaduras, são alguns dos exemplos que podem levar a perda da acuidade visual e até a cegueira (ALMEIDA et al., 2018; FLAXMAN et al., 2017).

A Ceratoplastia, ou transplante de córnea, é o tratamento de maior aceitação e comumente empregado para restaurar a acuidade visual de pacientes com disfunções corneanas graves. Um dos fatores relacionados a elevada taxa de sucesso desse procedimento é a condição imunológica diferenciada da córnea, decorrente do relativo isolamento do sistema imune e por não possuir vasos sanguíneos e linfáticos em sua estrutura (ALMEIDA et al., 2018; HORI et al., 2019). Aproximadamente 80% a 90% dos pacientes não apresentam complicações pós-cirúrgicas em até um ano após o transplante (HORI et al., 2019; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020). Porém, apesar de ser um dos procedimentos mais realizado em todo o mundo, estudos e indicadores apontam que a demanda por córneas está em tendência de aumento e não está sendo suprida devido, principalmente, à escassez de doadores humanos (BRUNETTE et al., 2017).

Uma metanálise conduzida por Flaxman *et al.* (2017) constatou que em 2015 havia, aproximadamente, 216 milhões de pessoas consideradas deficientes visuais no mundo todo, sendo que dessas, 4,5 milhões possuíam comprometimento visual moderado ou grave decorrente de disfunções da

córnea, sendo que essas disfunções são a quarta maior causa de cegueira. Apesar da centena de milhares de transplantes anuais, tem-se que ao menos 12 milhões de pacientes em todo o mundo aguardam pelo procedimento. Comparando-se com o número de transplantes realizados, chega-se a alarmante estatística que apenas um a cada setenta indivíduos necessitados recebem uma nova córnea (ALMEIDA; KARA-JUNIOR, 2018; GAIN et al., 2016; WANG et al., 2020a). Ademais, um número significativo de pacientes, principalmente entre aqueles que apresentam inflamação e vascularização pós-cirurgia, necessitam de um novo transplante em até cinco anos (HORI *et al.*, 2019).

Devido à urgência do tema atrelada a falta da oferta de córneas viáveis para transplante, novas abordagens terapêuticas têm recebido considerável atenção experimental e clínica. Scaffolds provindos de córneas suínas descelularizadas têm sido utilizados com sucesso em modelos animais e ensaios clínicos. É uma opção promissora pelo fato dos tecidos suínos serem facilmente adquiridos a um baixo custo, além de enfrentarem menos problemas éticos para sua obtenção (LYNCH; AHEARNE, 2013; YOON; CHOI; KIM, 2021). Além disso, a córnea suína, em especial, possui estrutura e morfologia similares a córnea humana. Porém, para tornar esse tecido viável para transplante é necessário eliminar o conteúdo biológico para mitigar as possibilidades de rejeição. Os processos de descelularização são comumente empregados nesse intuito, objetivando também, a preservação dos componentes da matriz extracelular (BRUNETTE et al., 2017; WILSON et al., 2013).

Não obstante, estudos clínicos *in vivo* apontam a necessidade de mais pesquisas para aprimoramento das matrizes provindas de córneas suínas descelularizadas, muito pelo fato de que esses tecidos apresentam perda das propriedades óticas e mecânicas a longo prazo, podendo levar a opacidade da córnea (LI et al., 2020a, 2020b; TAN et al., 2015; WANG et al., 2020b). Outra limitação do uso das córneas suínas descelularizadas para transplante está relacionada aos próprios dispêndios e riscos das práticas clínicas. Ressalta-se a natureza invasiva do procedimento cirúrgico.

Para contornar essas restrições, hidrogéis injetáveis provindos de córneas

suínas descelularizadas foram desenvolvidos e avaliados por Wang *et al.* (2020) e por Zhou *et al.* (2021), obtendo resultados satisfatórios na recuperação do tecido corneano de animais. Outros estudos demonstraram a eficácia na promoção da reparação de tecidos, não apenas durante a cultura de células *in vitro*, mas também quando injetadas em defeitos corneanos *in vivo* (WANG *et al.*, 2020a; WU *et al.*, 2009; YAZDANPANAHI *et al.*, 2021). Apesar dos bons resultados iniciais, os hidrogéis também apresentaram limitações referentes as propriedades mecânicas inferiores ao tecido natural e rápida degradação (WANG *et al.*, 2020a; ZHOU *et al.*, 2021).

Uma estratégia para melhorar as propriedades mecânicas desses hidrogéis e inibir a neovascularização após o transplante é o uso de nanopartículas de ouro (AuNPs) incorporadas à sua estrutura (DRUFFEL *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2017; MASSE *et al.*, 2019). Recentemente, estudos envolvendo a citotoxicidade e o efeito antiangiogênico de nanopartículas metálicas e poliméricas foram realizadas (LIU *et al.*, 2017; MASSE *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2011). Um estudo conduzido por Cho *et al.* (2015) mostrou que nanopartículas de ouro com diâmetro menor que 20nm podem ser usadas para inibir a neovascularização da córnea. As AuNPs podem atuar inibindo a ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é um importante mediador da neovascularização. Além disso, elas podem também interagir com as fibras de colágeno da córnea, aumentando a resistência mecânica desse sistema (KIRDAITE *et al.*, 2019; SCHUETZ *et al.*, 2013).

Diante das propriedades citadas, o presente trabalho visou o desenvolvimento de córneas bio sintéticas estruturadas como hidrogéis injetáveis, com arcabouço estrutural e componentes extracelulares necessários para a reparação natural do tecido corneano defeituoso. Destaca-se a incorporação de AuNPs em sua estrutura para aprimorar as propriedades mecânicas e mitigar a neovascularização após transplante.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Desenvolver córneas bio sintéticas na forma de hidrogéis, a partir de estromas de córneas suínas descelularizadas, investigando o efeito da incorporação de nanopartículas de ouro nas propriedades mecânicas e biológicas desses materiais, com o propósito final de criar um biomaterial injetável viável para a regeneração de defeitos teciduais da córnea.

### **2.2 Específicos**

- Avaliação da eficácia do dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% para descelularização dos estromas de córneas suínas.
- Síntese de nanopartículas de ouro esféricas e caracterização dessas partículas por Espalhamento de luz dinâmico (DLS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia na região do UV-Visível (UV-Vis).
- Desenvolvimento de hidrogéis injetáveis a partir da cominuição, liofilização, solubilização, hidrólise e posterior reticulação do estroma de córneas suínas descelularizadas.
- Aprimoramento desses hidrogéis injetáveis a partir da inserção de nanopartículas de ouro (AuNPs), em 3 diferentes concentrações mássicas (25, 50 e 75ppm) e avaliação da inibição da angiogênese - por meio do ensaio de Membrana Cório-Alantoide (CAM) - e da citotoxicidade - por meio de ensaio de viabilidade celular utilizando o método fluorimétrico com resazurina.
- Caracterização das córneas bio sintéticas (hidrogéis nanocompósitos com AuNPs) e do estroma suíno nativo descelularizado, avaliando e comparando suas propriedades mecânicas pela Análise Dinâmico Mecânica (DMA) - e suas propriedades óticas por meio de medidas da transmitância da luz no espectro visível.

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Anatomia e Fisiologia da Córnea**

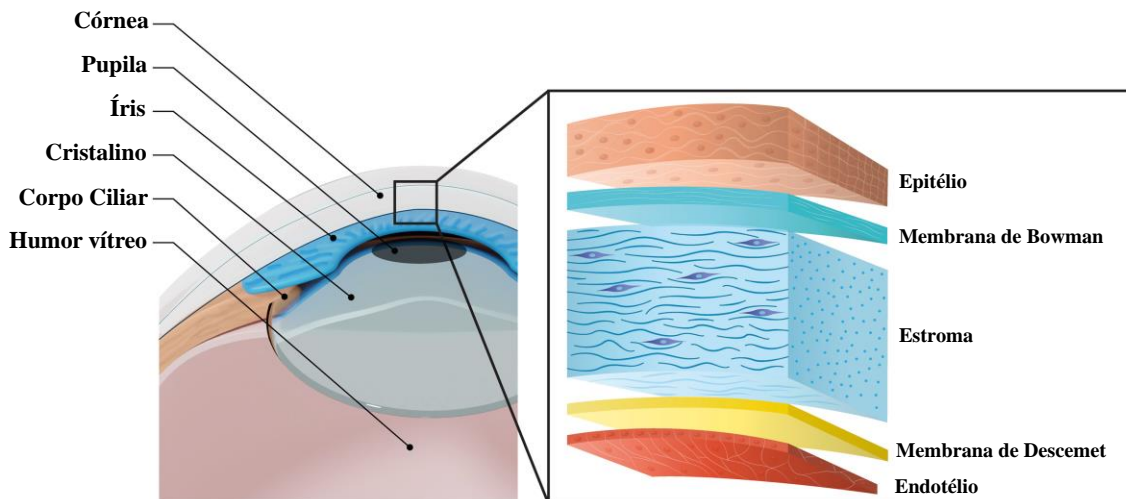
A córnea é um tecido avascular e transparente presente na parte frontal do globo ocular. É um tecido de interface do organismo com o ambiente, desempenhando a importante função de barreira estrutural primária do olho contra agentes externos e impactos mecânicos. A espessura central de uma córnea humana é de aproximadamente 500µm e a espessura periférica de 700µm. Ela atua também como lente primária do sistema visual, refratando de dois terços a 75% da luz incidente e dispersando menos do que 1% dela (DELMONTE; KIM, 2011; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020; WU et al., 2009).

Além de transmitir e focar os raios luminosos, a córnea também auxilia na manutenção da integridade estrutural do sistema visual, ao mesmo tempo que suporta a pressão intraocular provinda de forças externas do globo pressurizado cheio de fluido. Em uma perspectiva macroscópica, a córnea nativa é composta por centenas de camadas de fibrilas de colágeno, cada uma tendo uma direção angular distinta (BRUNETTE et al., 2017).

A transparência da córnea está intrinsecamente relacionada a sua estrutura e seus componentes extracelulares. A ausência de vasos sanguíneos e linfáticos também é essencial para a manutenção das propriedades óticas desse tecido (DELMONTE; KIM, 2011). Além disso, tem-se que o espaçamento e o diâmetro das fibrilas de colágeno tipo I, maior constituinte em peso da córnea, permite uma interação não destrutiva com os comprimentos de luz visível justamente em direção à pupila e a retina, onde ocorre a formação da imagem (WU et al., 2009).

A córnea humana é usualmente dividida em cinco regiões distintas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio, sendo que o estroma corresponde a região de maior espessura e, por consequência, maior relevância para as propriedades mecânicas e óticas do tecido. A membrana de Bowman separa o endotélio do estroma enquanto a membrana de Descemet separa o estroma do endotélio (HOLLAND et al., 2021; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020). A figura 3.1 revela um modelo esquemático da estrutura de

uma córnea humana e suas cinco subcamadas.



**Figura 3.1** - Modelo esquemático da anatomia da córnea humana. Fonte: adaptado de Holland *et al.* (2021).

### 3.1.1 Epitélio

O epitélio da córnea humana é constituído de cinco a sete camadas de células coesas, representando cerca de 10% da espessura total do tecido, variando usualmente de 50µm a 60µm, possuindo maior espessura em sua periferia. Estratificado, pavimentoso e não-queratinizado, a superfície do epitélio é a principal proteção contra corpos estranhos, além de reter o conteúdo líquido interno do sistema visual (DELMONTE; KIM, 2011; MARTINS, 2017).

Considerando a camada celular mais externa para a mais interna do epitélio, tem-se duas ou três camadas de células superficiais pavimentosas e alongadas, duas ou três camadas de células aladas poligonais e uma camada de células basais prismáticas, que apresentam maior taxa de reprodução celular. Conforme essas células vão se reproduzindo por meio de mitose, elas passam a ocupar o espaço das células mais antigas, ou seja, mais superficiais, que por sua vez, passam a descamar. Possui elevada capacidade de regeneração e cicatrização, sendo totalmente renovado em aproximadamente sete dias (MARTINS, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2018).



### 3.1.2 Membrana de Bowman

A camada de Bowman situa-se logo abaixo da membrana basal. Contrariamente ao epitélio, é uma estrutura acelular densa com espessura de 6µm a 15µm, composta por um agregado desorganizado e compacto de fibrilas colágenas dos tipos I, III e IV, principalmente. Esses componentes são essenciais para a manutenção das funções estruturais e fisiológicas da córnea. A membrana de Bowman não se regenera no caso de lesão, podendo formar cicatrizes (MATTHYSSEN et al., 2018; SILVA, 2013).

### 3.1.3 Estroma

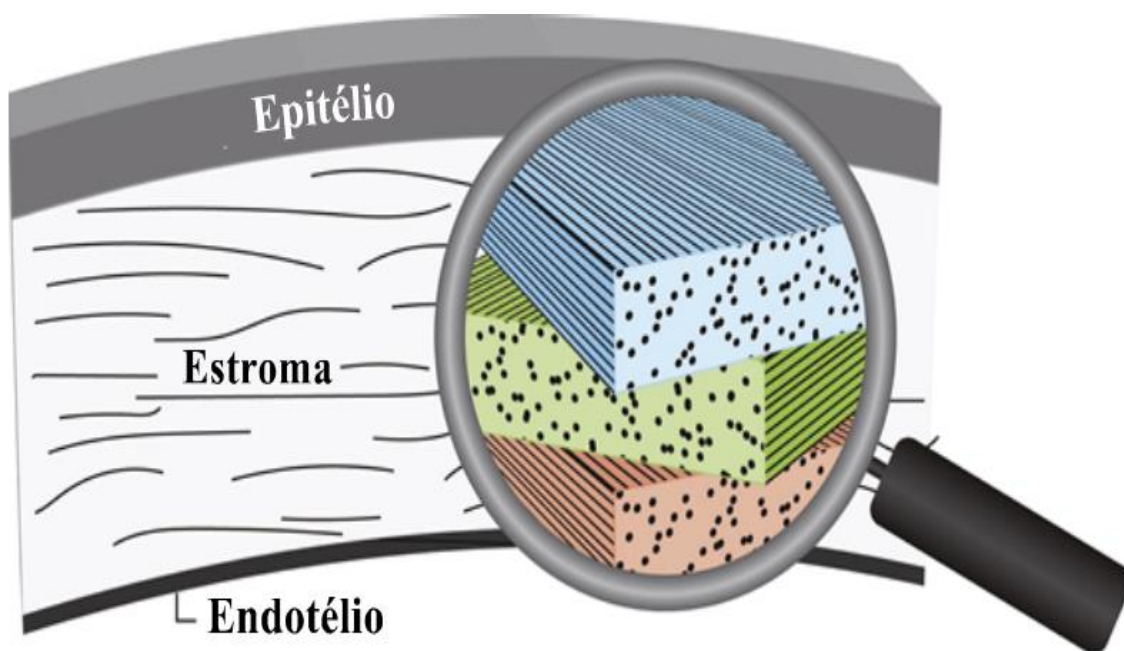
O estroma é uma estrutura com alto grau de organização, representando em torno de 80% da espessura total da córnea e é a principal região responsável pela transparência e a resistência mecânica desse tecido. Sua composição principal abrange uma matriz extracelular com fibrilas de colágeno altamente organizadas. Observa-se, majoritariamente, a presença do colágeno tipo I, sendo também observados outros tipos de colágenos, como os do tipo V e tipo VI. Além de metaloproteinases e glicosaminoglicanos (GAGs), dos quais o sulfato de queratano é o GAG mais abundante, cerca de 65% da quantidade total (MATTHYSSEN et al., 2018; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020).

O estroma, em contraponto a outras estruturas de colágeno, é transparente. Isso decorre do fato de uma organização sensível das fibras de colágeno e dos componentes da matriz extracelular. Essas fibras estão dispostas em feixes paralelos denominados fibrilas, e essas fibrilas são empacotadas em camadas ou lamelas. O estroma de uma córnea humana contém tipicamente de 200 a 250 dessas lamelas (DELMONTE; KIM, 2011; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020).

O diâmetro médio das fibras varia comumente de 22,5nm a 35nm, dependendo do tipo de colágeno, e o espaçamento entre elas é de cerca de 41,5nm. Nesse entremeio estão presentes células, denominadas ceratócitos, sendo as responsáveis pela produção dos componentes da matriz extracelular. Os ceratócitos são células diferenciadas de origem mesenquimal e apesar de

estarem dispersas no estroma, ainda são capazes de fazer contato umas com as outras. Essas células naturalmente não se proliferam e constituem apenas de 3% a 5% do volume do estroma (MATTHYSSEN et al., 2018).

Todavia, após alguma injúria, os ceratócitos podem aumentar sua atividade metabólica e secretar componentes da matriz extracelular, como moléculas de colágeno e glicosaminoglicanos, a fim de promover a restauração do tecido (MATTHYSSEN et al., 2018; MEEK; KNUPP, 2015). A figura 3.2 expõe uma representação esquemática da estrutura de uma córnea humana com enfoque na região do estroma.



**Figura 3.2** - Representação esquemática da córnea humana com enfoque na estrutura do estroma. Fonte: adaptado de Matthyssen *et al.* (2018).

#### 3.1.4 Membrana de Descemet

A quarta camada, membrana de Descemet, é uma estrutura acelular amorfa composta por fibrilas colágenas, principalmente do tipo IV, e glicoproteínas que são continuamente sintetizadas e excretadas pelas células do endotélio; essa camada aumenta de espessura lentamente com o passar da idade. Corresponde a uma das membranas basais mais espessas do corpo humano,

podendo alcançar até 10 $\mu$ m de espessura (DELMONTE; KIM, 2011). Além das fibras colágenas tipo IV, essa membrana é formada também por filamentos de fibras do tipo III. As fibras de colágeno do tipo III também conferem porosidade a essa estrutura, exercendo, desse modo, um papel importante na resistência e hidratação do tecido (SILVA, 2013).

### 3.1.5 Endotélio

O endotélio é constituído por apenas uma camada de células planas e hexagonais, com espessura próxima de 4 $\mu$ m, as quais apresentam pouca capacidade de replicação. Por isso, essa espessura tende a diminuir com o avanço da idade do indivíduo. O endotélio permite a passagem de elementos nutritivos e a manutenção da hidratação do tecido (FLAXMAN et al., 2017; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020).

Ao nascer, um indivíduo possui densidade celular endotelial média de 3.500 células/mm<sup>2</sup>. A taxa de decréscimo é de aproximadamente 0,6% ao ano. Traumas, ferimentos e outros processos patológicos podem acelerar esse processo. Não obstante, as células restantes têm a capacidade de se adaptar, modificando sua morfologia a fim de ocupar o espaço das células endoteliais degeneradas (DELMONTE; KIM, 2011; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020).

## 3.2 Propriedades Biomecânicas da Córnea

As propriedades biomecânicas da córnea desempenham um papel crucial em sua funcionalidade, com o arranjo das fibrilas de colágeno no estroma sendo um fator determinante. Esse arranjo é influenciado pela concentração, diâmetro e orientação das fibrilas de colágeno. Essas fibrilas são organizadas de modo a conferir rigidez e resistência à córnea. Os processos fisiológicos buscam garantir a manutenção da ultraestrutura e propriedades desse tecido, sendo que uma córnea muito rígida ou muito flexível pode causar problemas graves de visão (HATAMI-MARBINI; ETEBU, 2013a; LEANDRO, 2010; PARKER; VAN DIJK; MELLES, 2015; WEEBER et al., 2005).

A rigidez da córnea também é importante para sua função mecânica, pois protege o olho de danos. Um importante parâmetro para mensurar essa rigidez é o módulo de elasticidade, que para as tensões de tração e compressão é denominado como módulo de Young, podendo ser definido como a relação entre a tensão aplicada ao material e a deformação resultante. No geral, o módulo de elasticidade é maior na região central da córnea, onde o estroma é mais espesso, e tende a diminuir com a idade devido à degradação das fibrilas de colágeno (HARA; COOPER, 2011; HATAMI-MARBINI; ETEBU, 2013a; JAYASURIYA et al., 2003; LEANDRO, 2010).

É notório que, uma vez fora do seu ambiente biológico natural, a córnea apresenta um módulo de Young amplamente variável. Esta complexidade enfatiza a necessidade de uma avaliação rigorosa das condições experimentais e da metodologia utilizada ao investigar as propriedades biomecânicas. Isso é essencial para garantir a obtenção de resultados confiáveis e aplicáveis às áreas clínicas e à engenharia de tecidos. Nesse contexto, o estroma emerge como a camada de maior relevância para a caracterização dessas propriedades. As camadas mais finas, como o epitélio e as membranas de Descemet e de Bowman, mostraram-se irrelevantes na avaliação biomecânica desse tecido (HATAMI-MARBINI; RAHIMI, 2015; HOLLAND et al., 2021; JAYASURIYA et al., 2003; LEANDRO, 2010; LYNCH; AHEARNE, 2013; ULAG et al., 2020).

Ademais, as córneas exibem uma notável anisotropia mecânica devido, principalmente, as diferentes orientações das fibrilas de colágeno em direções específicas dentro da córnea. Essa não uniformidade também é um dos fatores que justifica as discrepâncias dos valores encontrados para o módulo de elasticidade, que pode variar de 0,05 a 27,5 MPa dependendo da metodologia empregada (HATAMI-MARBINI; ETEBU; RAHIMI, 2013; JAYASURIYA et al., 2003; LEANDRO, 2010; WORTHINGTON et al., 2014). A direção correspondente ao módulo de Young mais elevado se deve ao fato de conter um maior número de fibrilas de colágeno orientadas nessa direção particular. Por outro lado, a direção associada ao módulo de Young mais baixo possui

menos fibrilas de colágeno orientadas nessa mesma direção. Outros parâmetros como o grau de compactação das fibrilas e do entumescimento da córnea também alteram as propriedades mecânicas desse tecido (DELMONTE; KIM, 2011; HATAMI-MARBINI; ETEBU, 2013b; JAYASURIYA et al., 2003).

Os métodos comumente empregados para avaliar as propriedades biomecânicas da córnea abrangem: extensometria uniaxial, análise por tração e compressão, microscopia de força atômica, análise dinâmico-mecânica (DMA) e a reometria oscilatória. Essas técnicas analíticas oferecem informações sobre a capacidade do material para resistir a deformações, podendo ser quantificadas em termos de viscosidade e elasticidade (DINESCU et al., 2019; HATAMI-MARBINI; ETEBU, 2013b; HATAMI-MARBINI; RAHIMI, 2015; LEANDRO, 2010; MEYVIS et al., 2002).

A análise dinâmico mecânica (DMA) se destaca por permitir determinar as propriedades viscoelásticas de um material. Neste método de ensaio, as propriedades são investigadas aplicando-se uma deformação cíclica (tensão) e medindo-se a resultante (deformação). Um dos principais parâmetros que podem ser obtidos por meio dessa técnica é o módulo complexo ( $E^*$ ) que representa a resposta geral à deformação sob carga dinâmica (HATAMI-MARBINI; RAHIMI, 2015; JAYASURIYA et al., 2003; WORTHINGTON et al., 2014). Ele é composto pelo módulo de armazenamento (componente elástico) e pelo módulo de perda (componente viscoso) usando a teoria linear da viscoelasticidade. O módulo complexo  $E^*$  é definido como apresentando na equação 3.1.

$$E^* = E' + iE'' \quad (3.1)$$

Onde  $E'$  é o módulo de armazenamento e  $E''$  o módulo de perda. Há também outro importante parâmetro,  $\tan(\delta)$ , representado pela equação 3.2, que indica a capacidade do material de dissipar energia sob carga cíclica.

$$\tan(\delta) = E''/E' \quad (3.2)$$

A partir da análise desses parâmetros é possível obter uma visão detalhada das propriedades mecânicas de materiais biológicos, incluindo informações sobre sua rigidez, elasticidade, comportamento viscoelástico e outros parâmetros relevantes. Essa técnica de análise dinâmico mecânica tem sido amplamente empregada na caracterização das propriedades de uma variedade de tecidos, não apenas da córnea, mas incluindo também ligamentos, tecido cerebral, vasos sanguíneos, tendões, retina e esclera (HATAMI-MARBINI; RAHIMI, 2015; JAYASURIYA et al., 2003; MEYVIS et al., 2002; WEEBER et al., 2005).

No que diz respeito ao tecido corneano, o DMA assume uma relevância ainda maior. Isso se deve ao fato de que, entre a variedade de estímulos aos quais um tecido biológico pode ser submetido, a córnea pode estar sujeita a vibrações na faixa de frequência de 0,1 a 100 Hz, que correspondem a cargas fisiológicas dinâmicas em condições *in vivo*. Além disso, fatores como vibrações originadas de objetos externos, flutuações súbitas na pressão intraocular, piscar, atrito nos olhos e a rápida contração e relaxamento das fibras musculares podem contribuir para essas variações nas cargas dinâmicas. O DMA, ao possibilitar a reprodução dessas condições, emerge como uma poderosa técnica para a medição e avaliação do comportamento e das propriedades biomecânicas da córnea (HATAMI-MARBINI; RAHIMI, 2015; JAYASURIYA et al., 2003; MEYVIS et al., 2002; WEEBER et al., 2005).

### **3.3 Disfunções da Córnea**

Toda alteração no tecido corneano, que acarrete prejuízo para o sistema visual, pode ser considerada como uma disfunção da córnea. Doenças como a ceratopatia bolhosa, leucoma, tracoma, distrofia de Fuchs e ceratites infecciosas, são alguns exemplos que podem danificar a estrutura desse tecido e levar a perda da acuidade visual, seja parcial ou até total. Estima-se que as doenças da córnea são a quarta causa de cegueira no mundo, precedidas apenas pela catarata, glaucoma e degeneração macular (ALMEIDA, 2018;

FLAXMAN et al., 2017; MARTINS, 2017; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020).

Uma metanálise, conduzida por Flaxman *et al.* (2017), constatou que em 2015 havia aproximadamente 216,6 milhões de pessoas consideradas deficientes visuais em todo o mundo, dentro desse grupo, 4,5 milhões apresentavam comprometimento visual devido a doenças da córnea. Além das manifestações patológicas, é importante salientar que diversas lesões físicas, como ulcerações, queimaduras e perfurações oculares, têm o potencial de desencadear um processo de vascularização no tecido ocular, o que, por sua vez, pode resultar em prejuízos na acuidade visual. De maneira semelhante, vale ressaltar que condições de ectasia corneana severa, como o ceratocone e a miopia, também estão associadas a esse cenário (ALMEIDA, 2018; MARTINS, 2017).

A vascularização do tecido corneano é uma patologia comumente observada em doenças da superfície ocular e em procedimentos malsucedidos, sendo a principal causa de falha no transplante de córnea (LIU et al., 2017). Por ser um tecido transparente e que não possui vasos sanguíneos, é de suma importância que a estrutura corneana não se vascularize pela possibilidade de intensificação das conexões entre o sistema imunológico e os antígenos de transplante, desencadeando uma resposta imunológica intensa que pode levar até à perda da visão (DARWEESH; AYOUB; NAZZAL, 2019; HARA; COOPER, 2011; HORI et al., 2019; YOON; CHOI; KIM, 2021).

A angiogênese é um subconjunto específico da vascularização e consiste na formação de novos capilares sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos interagem na ultraestrutura da córnea em um processo altamente regulado que pode ser dividido nas seguintes fases: ativação, progressão, migração, diferenciação e maturação celular.

Apesar de diversos fatores mitigarem a angiogênese na córnea, em situações de hipóxia, inflamação ou lesão vascular, os sinais angiogênicos estimulam as células endoteliais quiescentes a entrarem em estado ativado. Isso melhora a permeabilidade vascular por meio da ação de vários mediadores, sendo um dos principais o VEGF - Fator de Crescimento Endotélio Vascular (DARWEESH; AYOUB; NAZZAL, 2019; NICHOLAS; MYSORE, 2021; ROMA-RODRIGUES et

al., 2016; ZHU et al., 2013).

Os estudos que elucidaram os mecanismos e etapas da vascularização corneana propiciaram o desenvolvimento de medicamentos para suprimir a formação de novos vasos sanguíneos. Nesse contexto, destaca-se o bevacizumabe (AVASTIN® atividade anti-VEGF), um anticorpo monoclonal que inibe a permeabilidade local induzida pelo VEGF (CHO et al., 2015; HORI et al., 2019; LIU et al., 2017). Pesquisas recentes vêm demonstrando que as nanopartículas de ouro (AuNPs) também podem desencadear efeitos antiangiogênicos ao interagirem com o VEGF, reduzindo sua atividade ou inibindo sua ligação aos receptores, impedindo assim a sinalização que desencadeia a formação de novos vasos sanguíneos (CHO et al., 2015; DARWEESH; AYOUB; NAZZAL, 2019; LIU et al., 2017; MASSE et al., 2019; PAN et al., 2014). Esse fator de crescimento endotelial vascular é reconhecido como o principal estimulador do crescimento de novos vasos sanguíneos na ultraestrutura corneana. Desativar essa proteína sinalizadora via adição de elementos moleculares tem potencial efetivo de inibir a geração de novos vasos sanguíneos (CHO et al., 2015; MASSE et al., 2019; SPERLING et al., 2008).

Nesse contexto, o ensaio utilizando a membrana corioalantoica (CAM) tem sido amplamente empregado como uma ferramenta ou protocolo valioso para investigar as propriedades pró-angiogênicas ou antiangiogênicas de diversas moléculas. A CAM é uma membrana extraembrionária surge a partir da mesoderme do córion e da alantoide durante o quarto dia de desenvolvimento embrionário. Dentro dessa estrutura de camada dupla, ocorre o desenvolvimento de uma rede vascular extremamente densa, a qual se conecta com a circulação embrionária através das artérias e veias alantóicas. Os vasos sanguíneos primitivos se expandem rapidamente até o oitavo dia, momento em que dão origem a um complexo capilar que facilita as trocas gasosas com o ambiente externo. (DOURADO, 2021; OLIVEIRA et al., 2012; ROMA-RODRIGUES et al., 2016). Ao introduzir um composto com efeito pró-angiogênico, é possível observar um aumento na densidade vascular aproximadamente 72 horas após a estimulação. Em contrapartida, quando um agente inibidor de angiogênese é testado, ocorre uma redução gradual na densidade vascular, eventualmente



levando à regressão dos vasos sanguíneos (DARWEESH; AYOUB; NAZZAL, 2019; DOURADO, 2021; OLIVEIRA et al., 2012).

Os estudos sobre as disfunções da córnea têm desempenhado um papel fundamental na elaboração de medicamentos e métodos destinados a preservar a integridade e a função desse tecido, mesmo quando acometido por traumas e/ou doenças. Em situações em que ocorrem ectasias devido a fatores genéticos, tratamentos como o uso de óculos, lentes de contato e até a inserção de anéis poliméricos intraestromais ainda se apresentam como opções simples e eficazes. No entanto, quando o dano à córnea atinge um estágio mais avançado, muitas vezes é necessário substituir total ou parcialmente o tecido danificado por tecido saudável. Nesse contexto, a Ceratoplastia, ou seja, o transplante de córnea, emerge como o tratamento mais amplamente aceito e frequentemente utilizado para restaurar a acuidade visual dos pacientes (ALMEIDA, 2018; HOLLAND et al., 2021; LEITE, 2015; LIU et al., 2017; MARTINS, 2017; PARKER; VAN DIJK; MELLES, 2015).

### **3.4 Transplante de Córneas**

O transplante de córnea é um procedimento cirúrgico em que o tecido corneano degenerado é removido e substituído por uma córnea sadia. Com o avanço tecnológico, notadamente embarcando o campo da oftalmologia e o emprego de novas técnicas e equipamentos, como o laser femtosegundo, é possível substituir a córnea na totalidade, processo conhecido como Ceratoplastia Penetrante, ou apenas regiões específicas dela, descrita como Ceratoplastia Lamelar (ALMEIDA, 2018; HE et al., 2016; NUBILE et al., 2021).

O transplante de córnea é considerado como o tratamento de maior aceitação a nível mundial e comumente empregado para restaurar a acuidade visual dos pacientes com disfunções corneanas graves. Um dos fatores relacionados a elevada taxa de sucesso desse procedimento é a condição imunológica especial da córnea. Essa característica é resultado do relativo isolamento da córnea ao sistema imune e pela ausência de vasos sanguíneos e linfáticos em seu estado normal (ALMEIDA et al., 2018; HORI et al., 2019; LUO et al., 2013;

MARTINS, 2017; YOON; CHOI; KIM, 2021).

De fato, estima-se que aproximadamente 80% a 90% dos pacientes não apresentam complicações pós-cirúrgicas em até um ano após o transplante (HORI et al., 2019; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020). Das possíveis complicações, a rejeição ao transplante é descrita como a causa mais comum de falência do tecido, sendo que cerca de 20% desses casos são enquadrados como irreversíveis. O fator de risco de maior relevância é a neovascularização da córnea transplantada. Sinequias anteriores, inflamação intraocular, glaucoma e herpes também podem levar ao processo de rejeição (KAMIJI, 2020; MARTINS, 2017).

A neovascularização decorre de uma resposta imunológica contra o “corpo estranho”. Esse mecanismo tem o intuito de melhorar a conexão dos antígenos do enxerto com o sistema de defesa do corpo receptor. Por mais que seja um mecanismo natural, esse processo pode levar a opacidade da córnea e a perda da visão do paciente. Portanto, se faz necessário suprimi-lo ao máximo (LIU et al., 2017).

Inibir a neovascularização não é a única preocupação para aumentar o sucesso dos transplantes de córnea. Ao analisar o comportamento do material transplantado a longo prazo, as estatísticas revelam um quadro que exige ainda maior atenção. Após dez anos do procedimento cirúrgico, a taxa de sobrevivência do enxerto pode variar de 35% a 89%. Nos casos de retransplante, a taxa de sucesso é ainda menor, em torno de 53% aos cinco anos e cai para 41% aos dez anos da cirurgia (ALMEIDA, 2018; MARTINS, 2017; MATTHYSSEN et al., 2018). Ou seja, um número significativo de pacientes, principalmente entre aqueles que apresentam inflamação e vascularização da córnea, necessitam de um novo transplante em até cinco anos (HORI et al., 2019).

Não bastassem essas limitações, estudos e indicadores apontam que a demanda por córneas está em tendência de aumento e não está sendo suprida devido, principalmente, à escassez de doadores humanos (BRUNETTE et al., 2017). Uma pesquisa feita por Gain et al. (2016), expos que cerca de 12,7

milhões de pessoas no mundo estão esperando por um transplante de córnea. Comparando com o número de transplantes realizados, chega-se a alarmante estatística que apenas um a cada setenta indivíduos necessitados recebem o transplante. A tabela 3.1 apresenta dados que comparam o número de transplantes de córneas realizados por ano com a lista de espera em diversos países, incluindo o Brasil.

**Tabela 3.1** – Lista de espera em países comparada com o número de transplantes de córneas realizados por ano.

<b>Países</b>	<b>Pacientes na lista de espera</b>	<b>Transplantes realizados</b>	<b>Data e Referência da pesquisa</b>
Austrália	0	1096	2008 (HARA; COOPER, 2011)
Brasil	10.923	14.534	2018 (ALMEIDA et al., 2018)
China	2.000.000	<8000	2017 (WONG et al., 2017)
Índia	7.000.000	25.000	2017 (WONG et al., 2017)
Japão	2769	1634	2008 (HARA; COOPER, 2011)
Reino Unido	500	2711	2008 (HARA; COOPER, 2011)
Estados Unidos	0	41.652	2008 (HARA; COOPER, 2011)

Fonte: Adaptado de Yoon; Choi; Kim, (2021).

Nesse contexto, está se tornando cada vez mais difícil para os bancos de olhos atender à crescente demanda por tecido transplantável. Ademais, o procedimento de transplante da córnea a partir de doadores humanos, apesar de sua elevada taxa de sucesso, também apresenta outras limitações que devem ser elencadas. Pode-se citar, por exemplo, a dificuldade no controle de

qualidade; os dispêndios e custos envolvidos na prática cirúrgica, e possíveis atrasos para a disposição do tecido para o transplante, sendo de suma importância rastrear o histórico do doador e verificar se esse possui alguma doença potencialmente transmissível (ALMEIDA, 2018; BRUNETTE et al., 2017; GAIN et al., 2016).

Além disso, a qualidade do tecido pode ser afetada pela idade do doador, saúde, causa da morte e outros parâmetros específicos para a preparação, triagem e preservação do enxerto (BRUNETTE et al., 2017). Portanto, alternativas às córneas de doadores humanos se fazem necessárias para suprir a demanda mundial. Estratégias no âmbito da Engenharia de Tecidos têm sido amplamente adotadas, como por exemplo, a produção de córneas artificiais e o uso de xenoenxertos para síntese de matrizes descelularizadas (BRUNETTE et al., 2017; MARTINS, 2017; MATTHYSSEN et al., 2018; ULAG et al., 2020).

### **3.5 Engenharia de Tecidos da Córnea Como Alternativa Médica**

O desafio de regenerar, reparar e até aperfeiçoar a função de órgãos e tecidos é tal que se faz necessária a junção de várias áreas do conhecimento. Na Engenharia de Tecidos, o escopo interdisciplinar integra as ciências da natureza e as Engenharias (LYNCH; AHEARNE, 2013; MARTINS, 2017). Sendo que, reproduzir e mimetizar estruturas biológicas, ao ponto de mitigar os efeitos de rejeição no corpo receptor, é ponto crucial para o sucesso de materiais desenvolvidos dentro desse campo tecnológico (LEITE, 2015; LYNCH; AHEARNE, 2013; MARTINS, 2017).

A escassez de córneas viáveis e a crescente demanda por elas têm sido uma força motriz na Engenharia de Tecidos para o desenvolvimento de novos materiais e sistemas. Ao se pensar neles, espera-se que as alternativas engendradas alcancem equivalência ou superioridade de aplicação ao se comparar com os tecidos nativos. Para isso, muitas demandas devem ser cumpridas. No caso da córnea, o novo material precisa ser biocompatível, possuir geometria e estrutura similar, notadamente, preservando a transparência do tecido, além de ter a resistência mecânica adequada para

suportar os esforços aos quais ele estará submetido (ALIÓ DEL BARRIO et al., 2021; BRUNETTE et al., 2017; HOLLAND et al., 2021; WILSON et al., 2013).

Do mesmo modo, as funções biológicas para ancoramento celular e permeabilidade de solutos e solventes para transferência de oxigênio e nutrientes ao interior da estrutura, por exemplo, devem ser mimetizados. Todas essas características devem estar atreladas a um processo de fabricação que tenha reprodutividade e qualidade, idealmente com alta velocidade de produção e custo acessível (BRUNETTE et al., 2017; MEEK; KNUPP, 2015; WILSON et al., 2013).

### 3.5.1 Córneas Artificias

Não obstante, córneas artificiais, como as ceratopróteses, têm sido desenvolvidas e aplicadas clinicamente. Elas podem ser compreendidas como estruturas feitas em laboratório, com ou sem a ajuda de material biológico, projetadas principalmente para substituir a função da córnea humana nativa. Embora esses materiais possuam níveis adequados de resistência mecânica, transparência e biocompatibilidade, elas não se concretizaram como uma alternativa factível para atender à crescente demanda pelo tecido corneano, principalmente nos países subdesenvolvidos. De fato, seu uso foi direcionado aos pacientes que são identificados por possuírem alto risco de rejeição ao tecido cadavérico humano (BRUNETTE et al., 2017; HOLLAND et al., 2021; MATTHYSSEN et al., 2018).

Segundo Matthyssen *et al.* (2018) e Wong *et al.* (2017), apenas dois tipos de córneas artificiais, até o momento dos estudos, provaram ser bem-sucedidas nas aplicações clínicas. A primeira é conhecida como Boston KPro, fabricada em matriz de poli(metacrilato de metila) (PMMA) com placa traseira de titânio. A segunda, denominada Osteo-Odonto-Queratopróteses (OOKP), é fabricada a partir de um pedaço de dente que é usado para suportar uma matriz de PMMA.

A principal limitação da implementação da Boston KPro, em escalas maiores, é que ela ainda necessita de uma córnea doadora. Ademais, ela é indicada para

pacientes que possuam superfície ocular intacta. Por sua vez, a OOKP é indicada em caso de cegueira corneana bilateral, tracoma, lesões químicas e térmicas, por exemplo. Sua aplicação requer a extração do dente do paciente para acomodação de um cilindro ótico de PMMA na dentina. Então, esse material é embutido na bochecha do paciente por vários meses, para posterior implantação no olho. É evidente que os dispêndios envolvendo as práticas clínicas cirúrgicas é uma das grandes restrições para o uso extensivo da OOKP. Ademais, os materiais utilizados para essas córneas artificiais, notadamente o PMMA, não são propícios para adesão e proliferação dos ceratócitos, em decorrência disso, foi se percebendo a necessidade de aprimorar esses sistemas (HOLLAND et al., 2021; LI et al., 2019; MATTHYSSEN et al., 2018).

Novas versões das ceratopróteses têm sido desenvolvidas para aperfeiçoar suas funcionalidades, como a substituição do PMMA por polímeros de menor rigidez e com caráter hidrofílico, se aproximando das características do tecido corneano nativo. Todavia, elas ainda têm apresentado alto risco relacionado a complicações graves nos pacientes, como calcificação, glaucoma, formação de membrana retroprotética, descolamento de retina, fusão da córnea e extrusão da própria prótese (HOLLAND et al., 2021; MATTHYSSEN et al., 2018).

A partir desse cenário, novas abordagens começaram a ser analisadas. O uso da impressão 3D propiciou a construção de córneas biossintéticas, buscando replicar as funções, geometria e biomecânica do tecido nativo para aplicações *in vivo* (HOLLAND et al., 2021; ULAG et al., 2020). Essas córneas foram engenhadas a partir de diversos biomateriais poliméricos para fabricação de *scaffolds*, sejam eles sintéticos como o poli(etileno glicol) (PEG) e o poli(álcool vinílico) (PVA), ou de incidência natural (biopolímeros) como o colágeno, quitosana, gelatina, alginato e fibroína de seda (HOLLAND et al., 2021; MATTHYSSEN et al., 2018; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020; ULAG et al., 2020).

Todos esses materiais podem induzir a secreção de proteínas da matriz extracelular pelos ceratócitos, permitindo a formação de complexos de adesão que podem recriar membranas basais. Ou seja, com capacidade de regenerar

subcamadas como o epitélio, estroma e o endotélio da córnea (HOLLAND et al., 2021; MATTHYSSEN et al., 2018; MIROTSOU; ABE; LANZA, 2020; TIDU; SCHANNE-KLEIN; BORDERIE, 2020; ULAG et al., 2020).

O uso dos biopolímeros, contudo, vêm demonstrando resultados melhores para adesão, migração e proliferação de fibroblastos, ceratócitos e de células-tronco epiteliais límbicas ao serem comparadas com os polímeros sintéticos. O uso de scaffolds corneanos que possuem colágeno como constituintes, por exemplo, é especialmente indicado por possuir uma sequência de aminoácidos conhecidos como RGD. Esse tripeptídeo está diretamente relacionado ao processo de adesão e ancoramento celular (GUAN et al., 2013; TIDU; SCHANNE-KLEIN; BORDERIE, 2020; YOERUEK et al., 2012).

Por sua vez, Wu *et al.* (2014) utilizando a fibroína de seda com o tripeptídeo RGD conjugado em sua superfície, em conjunto com fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ 3, conseguiram mimetizar um microambiente *in vivo*, induzindo a secreção de componentes da matriz extracelular por células-tronco estromais da córnea humana, que se diferenciaram em ceratócitos. Ademais, a fibroína de seda demonstrou apoiar o crescimento de células epiteliais e endoteliais da córnea, além de aprimorar a fixação e a diferenciação de células-tronco mesenquimais (WU et al., 2014).

Os estudos supracitados revelaram que a técnica de impressão 3D se mostrou, em parte, capaz de reproduzir a complexa geometria da córnea, permitindo a manipulação dos espaçamentos das fibrilas de colágeno e do tamanho dos poros para estimular a adesão e proliferação celular. Essa técnica está permitindo a fabricação de *scaffolds* de acordo com as características da córnea do paciente e tem como ponto-forte a abrangência para outros grupos, com baixo a médio risco para transplante de córnea, em contraste as ceratopróteses (HOLLAND et al., 2021; ULAG et al., 2020; WILSON et al., 2013).

Todavia, aplicações e estudos clínicos, em especial os que verificam o comportamento desses materiais a longo prazo *in vivo*, identificaram que a adesão dos ceratócitos ainda é limitada. A densidade celular normal de um tecido sadio não foi alcançada. Por mais que as técnicas por impressão 3D e cultura

celular *in vitro* conseguissem mimetizar boa parte da estrutura de uma córnea, a sua ultraestrutura com a presença de diferentes tipos de colágeno, de proteoglicanos, glicoproteínas e demais componentes da matriz extracelular, torna o processo de replicação da córnea, na íntegra, inexecutável para atender a atual demanda (BRUNETTE et al., 2017; HOLLAND et al., 2021; TIDU; SCHANNE-KLEIN; BORDERIE, 2020).

### 3.5.2 Matrizes Corneanas provindas de Xenoenxertos Descelularizados

Em comparação as alternativas supracitadas, uma nova possibilidade vem se sobressaindo: o uso de xenoenxertos para produção de matrizes corneanas. Quando comparadas com as ceratopróteses e as córneas bio sintéticas, os xenoenxertos fornecem um microambiente mais propício para o crescimento, migração e diferenciação celular, em decorrência da presença de fatores de crescimento e demais componentes da matriz extracelular, como os GAGs (HARA; COOPER, 2011; LI et al., 2017; LYNCH; AHEARNE, 2013).

O fato da córnea ser considerada um tecido imunologicamente privilegiado, com relativa distância dos vasos sanguíneos e linfáticos, é fator chave para o emprego de xenoenxertos. Outro ponto que suscita o seu uso é a elevada disponibilidade material, em conjunto com sua fácil obtenção e estrutura histológica semelhante à humana, especialmente quando se trata de tecidos oriundos de córneas suínas (HARA; COOPER, 2011; LI et al., 2017; LYNCH; AHEARNE, 2013).

Contudo, ainda se faz necessário mitigar ao máximo a possibilidade de rejeição do material no corpo hospedeiro. Para tal, se faz uso de uma técnica para retirar o material biológico nativo do animal, preservando, ao mesmo tempo, os demais componentes extracelulares, processo esse conhecido como descelularização (HOLLAND et al., 2021; LI et al., 2017; LYNCH; AHEARNE, 2013; YOON; CHOI; KIM, 2021).

A descelularização é um processo pelo qual as células de órgãos e/ou tecidos são removidas para formar uma estrutura acelular e com arcabouço estrutural preservado (HOLLAND et al., 2021). Segundo Gonzalez-Andrades *et al.* (2011),



a utilização de técnicas de descclularização engendra caminhos vantajosos para o desenvolvimento de córneas viáveis para transplantes, sendo que diversos estudos foram realizados a fim de determinar os melhores protocolos para retirada das células desses tecidos. Todavia, ainda não há um consenso de qual técnica empregada possui maior eficácia.

Os procedimentos de descclularização podem ser categorizados dentro de três abordagens distintas ou de junções delas, sendo estas: química, física e biológica. A descclularização química envolve, por exemplo, o uso de agentes detergentes, incluindo o Dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100, ácido fórmico, hidróxido de amônio, cloreto de sódio. Por outro lado, a descclularização física compreende técnicas como agitação, ciclos de congelamento e descongelamento, eletroforese, aplicação de alta pressão hidrostática, pressão osmótica, CO<sub>2</sub> supercrítico, ultrassom, glicerol e liofilização. Por fim, os métodos biológicos abrangem o uso de enzimas, como pepsina, tripsina, dispases, fosfolipase A2, soro humano e nucleases (GONZALEZ-ANDRADES et al., 2011; HOLLAND et al., 2021; ISIDAN et al., 2019; YOON; CHOI; KIM, 2021).

O SDS é um detergente iônico potente e, devido à sua notável eficácia na remoção de células e solubilização de membranas celulares, é amplamente empregado na descclularização de córneas, seja utilizado isoladamente ou em combinação com outros agentes. No entanto, é importante observar que a eficácia do SDS pode variar de acordo com a metodologia e a concentração utilizada, uma vez que altas concentrações e tempos de exposição podem levar à desnaturação de proteínas, o que, por sua vez, afeta a estrutura da matriz extracelular (MEC). A maioria dos protocolos inclui uma etapa subsequente de lavagem para remover qualquer resíduo remanescente. (GAETANI et al., 2018; ISIDAN et al., 2019; LYNCH; AHEARNE, 2013; NARA et al., 2016; YOERUEK et al., 2012; ZHOU et al., 2011).

A concentração ideal de SDS para a descclularização da córnea geralmente varia entre 0,1% e 1% (p/v), pois esse intervalo permite a remoção eficaz das células sem comprometer a ultraestrutura corneana ou reduzir os níveis de GAG e colágeno. No entanto, é importante mencionar que alguns estudos

contraditórios relatam uma redução no teor total de GAG, danos à membrana basal e afrouxamento das fibras de colágeno, mesmo em concentrações mais baixas. Essas discrepâncias podem ser atribuídas a variações entre espécies, o tempo de contato com o detergente ou à presença de inibidores de proteases, que podem proteger a estrutura e os componentes da matriz extracelular. Portanto, fica evidente a necessidade de padronização de procedimentos e técnicas de caracterização para assegurar a eficácia do processo de descclularização utilizando o SDS (GAETANI et al., 2018; LYNCH; AHEARNE, 2013; NARA et al., 2016; YOERUEK et al., 2012; ZHOU et al., 2011).

Além disso, é importante destacar que algumas metodologias têm alcançado bons resultados na descclularização da córnea sem a necessidade de detergentes. Em um estudo conduzido por Gonzalez-Andrades *et al.* (2011) foi demonstrado que o uso de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 1,5M para a descclularização de córneas suínas resultou em uma estrutura com propriedades histológicas e ópticas adequadas. Essa abordagem proporcionou um microambiente favorável para a penetração de ceratócitos humanos e a manutenção de sua diferenciação dentro do suporte.

Por sua vez, Wu *et al.* (2009) demonstrou que o uso da fosfolipase A2 para remoção do material biológico de estromas de córneas suínas preservou as fibras de colágeno e uma quantidade suficiente de proteoglicanos e GAGs, mantendo a ultraestrutura da região. O material desenvolvido apresentou biocompatibilidade e biomecânica adequadas, imunogenicidade indetectável e alta transparência e estabilidade.

É evidente que os processos de descclularização, mesmos os mais eficientes, acarretam, em algum grau, danos a matriz extracelular. A escolha da metodologia para descclularização das córneas deve se basear na melhor relação de manutenção da integridade estrutural pela eliminação de células nativas (ALIÓ DEL BARRIO et al., 2021; LUO et al., 2013; YOON; CHOI; KIM, 2021; ZARIF et al., 2020). Vale ressaltar, contudo, que os avanços contínuos no estudo das técnicas de descclularização estão viabilizando o uso de xenoenxertos para fornecer matrizes de substituição e reconstrução de tecidos

corneanos. Desde que o material desenvolvido seja armazenado adequadamente, é possível oferecer maior flexibilidade no planejamento dos pacientes e das intervenções cirúrgicas. Essa vantagem pode otimizar significativamente os procedimentos, potencialmente aumentando o número de transplantes realizados (ALMEIDA, 2018; LEITE, 2015; MARTINS, 2017).

Ao se tratar da escolha de qual espécie animal pode fornecer a melhor matriz para produção de scaffolds corneanos descelularizados, algumas considerações merecem destaque. Os primatas apesar de possuírem a filogenética mais próxima dos seres humanos, o que *a priori* levaria a um menor índice de rejeição ao transplante, detêm uma estrutura ocular menor do que a do ser humano e possuem maior chance de transmissão zoonótica (HARA; COOPER, 2011; YOON; CHOI; KIM, 2021).

Outro fator importante é que há uma maior preocupação no campo da ética para obtenção de órgãos e tecidos dos primatas. Os suínos, por sua vez, são abatidos anualmente em número maior do que a demanda por córneas. Dispõem também de tamanho e morfologia do sistema visual próxima a do ser humano e os custos envolvendo os cuidados e a alimentação são relativamente baixos (HARA; COOPER, 2011; ISIDAN et al., 2019; YOON; CHOI; KIM, 2021).

Além disso, experimentos envolvendo a modificação genética de suínos estão permitindo que seus tecidos se tornem resistentes a lesões provocadas por resposta imune de primatas, abrangendo, notadamente, os seres humanos. A engenharia genética pode tornar a córnea dos suínos comparável, ou mesmo superior, a uma córnea humana no que diz respeito à sua capacidade de resistir à rejeição, desse modo, essas matrizes poderão ser produzidas em condições livres de patógenos (HARA; COOPER, 2011; LYNCH; AHEARNE, 2013; YOON; CHOI; KIM, 2021).

Não obstante, estudos clínicos *in vivo* apontam a necessidade de mais pesquisas para aprimoramento das matrizes provindas de córneas suínas descelularizadas, muito pelo fato de que esses tecidos apresentam perdas das propriedades óticas e mecânicas a longo prazo, levando a opacidade da córnea (LI et al., 2020a, 2020b; TAN et al., 2015; WANG et al., 2020). Outra limitação

do uso dessas matrizes para transplante está relacionada aos próprios dispêndios e riscos das práticas clínicas, ressaltando a natureza invasiva do procedimento cirúrgico. O uso de um material injetável que fornecesse os componentes e estruturas necessárias para restauração dos defeitos da córnea poderia ser uma alternativa para contornar essas restrições. Nesse âmbito, surge a possibilidade de formação de hidrogéis a partir de matrizes corneanas descelularizadas (WANG et al., 2020a; ZHOU et al., 2021).

### 3.5.3 Hidrogéis Derivados de Matrizes Extracelulares Descelularizadas

Os hidrogéis podem ser compreendidos como materiais poliméricos com redes tridimensionais interconectadas, e com capacidade de reter grandes quantidades de água ou fluidos biológicos em sua estrutura, permitindo ainda a difusão de oxigênio, água e glicose através de suas redes (WANG et al., 2020a; ZHOU et al., 2021). A capacidade de absorver e reter fluídos, como a água, está relacionada com a presença de grupos funcionais hidrofílicos em sua estrutura. Alguns exemplos comumente observados são os grupos amino, carboxila e hidroxila (MATTHYSSEN et al., 2018; PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009; WANG et al., 2020a). Nesse contexto, o tecido corneano pode ser conceituado como hidrogéis colágenos constituídos por fibrilas de colágeno que mantêm sua transparência aos comprimentos de luz visível (HOLLAND et al., 2021; JAYASURIYA et al., 2003).

A produção de um hidrogel pode se dar a partir de polímeros sintéticos ou naturais, designados como biopolímeros. Elenca-se, no âmbito da oftalmologia, a quitosana, colágeno, ácido hialurônico, alginato e fibroína de seda, como biopolímeros comumente utilizados. É possível observar também o emprego de polímeros sintéticos para a fabricação de hidrogéis, alguns exemplos são a utilização do poli(etileno glicol) e de cianoacrilatos (ALIÓ DEL BARRIO et al., 2021; WANG et al., 2020a). Todavia, as matrizes extracelulares descelularizadas vêm se concretizando como a melhor opção para produção de hidrogéis injetáveis aplicados a restauração tecidual da córnea, pois também podem ser usadas para preencher e restaurar regiões regulares e irregulares dela

(HOLLAND *et al.*, 2021; MATTHYSSEN *et al.*, 2018; MEEK; KNUPP, 2015; WANG *et al.*, 202a).

A estabilização da estrutura de hidrogéis provindos de matrizes extracelulares tende a ser realizada pelo processo de reticulação, após hidrólise das fibras de colágeno, no qual os peptídeos das cadeias poliméricas estabelecem interações químicas umas com as outras. A reticulação dessas cadeias pode levar a um processo denominado transição sol-gel, em que uma solução coloidal, sistema *sol*, adquire aspectos de um sistema *gel*, ou seja, adquirindo uma estrutura com maior rigidez e viscosidade. As condições físico-químicas do meio, como a temperatura e o pH, influenciam diretamente nos aspectos dessa transição (PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009; YAZDANPANA et al., 2021).

Diversos agentes podem ser empregados para promover a reticulação dos hidrogéis provindos de córneas descelularizadas, e em diferentes graus, seja usando reticuladores químicos, como a riboflavina, genipina e a proantocianidina, ou físicos, como a radiação ultravioleta (LI et al., 2020a; PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009; WANG et al., 2020a).

Ao se pensar na aplicação de um hidrogel injetável para a restauração tecidual da córnea, cuja transição sol-gel ocorre dentro do olho, ou seja, em ambiente *in vivo*, é de suma importância regular os parâmetros físico-químicos dessa reação a fim de não danificar a estrutura biológica ocular do paciente. Por isso, é necessário escolher com critério os agentes reticulantes. Dessarte disso, Wang *et al.* (2020) analisaram a combinação de dois desses agentes, o Meto-p-toluenossulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida (CMC) com a N-Hidroxisuccinimida (NHS). A escolha dessas moléculas está intrinsecamente relacionada ao fato de a reação de reticulação do colágeno ocorrer em temperatura ambiente e em pH neutro, preservando os componentes da matriz extracelular, os GAGs e o próprio colágeno, o que também contribui para a gelificação do hidrogel. Esse comportamento é clinicamente importante, pois o biomaterial ainda em solução pode ser usado em procedimentos cirúrgicos e atingir rapidamente um estado de gel, protegendo a integridade do tecido e permitindo que as células nativas do paciente ancorem e proliferem (WANG et

al., 2020a).

Os resultados dos experimentos de Wang *et al.* (2020) com células *in vitro* indicaram que o hidrogel reticulado com o CMC e o NHS não apresentou citotoxicidade relevante, promovendo ainda a síntese de componentes da matriz extracelular a partir da adesão dos ceratócitos. Além do que o hidrogel acelerou a cicatrização de feridas epiteliais e estromais da córnea que foram induzidas em animais. Outro fator de suma relevância constatado foi de que não houve a liberação de subprodutos tóxicos ao tecido, durante ou após a reação de reticulação.

Nessa conjuntura, outros estudos também foram realizados a partir de hidrogéis injetáveis provindos de córneas suínas descelularizadas, como o feito por Zhou *et al.* (2021), também obtendo resultados satisfatórios na recuperação do tecido corneano de animais, revelando a eficácia na promoção da reparação de tecidos, não apenas durante a cultura de células *in vitro*, mas também quando injetadas em defeitos da córnea *in vivo* (WANG *et al.*, 2020a; WU *et al.*, 2009; YAZDANPANAHI *et al.*, 2021). Ressalta-se, contudo, que em ambos os estudos ainda foram observadas algumas limitações em relação as propriedades mecânicas dos hidrogéis, que foram inferiores ao tecido nativo. Portanto, ainda se faz necessário aperfeiçoar essas matrizes descelularizadas. A adição de nanocomponentes se engendra com uma possível alternativa para esse fim. Um dos exemplos se dá pela aplicação de nanopartículas funcionalizadas como agentes indutores de reticulação do colágeno.

### **3.6 Nanopartículas de ouro (AuNPs) em aplicações oftalmológicas**

A nanotecnologia entrou no campo da medicina nas últimas décadas e vem revolucionando as práticas terapêuticas, fornecendo novos materiais e métodos para prevenção de doenças e de realização de diagnósticos (AZHARUDDIN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017; MASSE *et al.*, 2019). Notadamente, o campo oftalmológico abarcou o uso dessas novas tecnologias, empregando, inclusive, nanopartículas cujo tamanho deve ser de até 100nm. Um estudo de revisão empreendido por Masse *et al.* (2019) revelou as principais utilizações de

nanopartículas de ouro (AuNPs) no campo da oftalmologia. De maneira geral, as AuNPs já foram empregadas como biossensores, em sistemas de liberação controlada de drogas, terapia gênica, como agente antiangiogênico, dentre outros.

Aprofundando nas análises da citotoxicidade das AuNPs nos tecidos presentes no globo ocular, Masse *et al.* (2019) concluíram que a maioria dos estudos relatou baixa ou nenhuma toxicidade devido à natureza inerte do ouro e à biocompatibilidade dos ligantes escolhidos. Ressalta-se, contudo, que essas características também estão associadas as dimensões e formatos das nanopartículas, assim como a quantidade aplicada. Como exemplo, Azharuddin *et al.* (2014) introduziram AuNPs de 20nm a 30nm estabilizadas com citrato de sódio, administradas topicamente, em olhos de camundongos, esse material ficou presente em diferentes regiões da córnea por trinta dias sem induzir qualquer alteração morfológica no tecido (MASSE *et al.*, 2019).

Na conclusão de sua revisão, Masse *et al.* (2019) demonstraram o potencial inegável das AuNPs no campo das terapêuticas oftalmológicas. Muito pelo fato da grande capacidade de ajuste das propriedades dessas partículas a partir de modificações em seus aspectos morfológicos, como tamanho e formato. A aplicação das AuNPs estudadas foi realizada por diversas vias, como uso tópico, administração intravenosa, perfusão e até incubação. Ademais, a não citotoxicidade atrelada aos efeitos antiangiogênico e anti-inflamatório das AuNPs, as tornam excelentes candidatas para auxiliar no tratamento de doenças e disfunções oculares, incluindo as da córnea (CHO *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017; MASSE *et al.*, 2019; SPERLING *et al.*, 2008).

De fato, durante a busca por materiais para impedir a neovascularização corneana, Cho *et al.* (2015) comprovaram que a administração tópica de AuNPs, com diâmetro médio de 20nm, mitigou significativamente esse processo em camundongos. O uso desse material levou a uma diminuição de 39,8% da vascularização sem acarretar efeitos colaterais relevantes. Uma das razões aventadas para tal efeito é que as AuNPs inibiram a expressão do VEGF.

Dessarte, modelos *in vivo* e *ex vivo*, como o da membrana corioalantoica de

embrião de galinha (CAM), têm corroborado com o exposto ao demonstrar a atividade antiangiogênica das AuNPs. Pesquisa conduzida por Darweesh (2019) destacou que as nanopartículas de ouro demonstraram a capacidade de diminuir a densidade e a permeabilidade vascular, ao mesmo tempo em que preservaram a integridade dos vasos sanguíneos. Como resultado, a maioria das aplicações biomédicas investigadas revelou que as AuNPs são eficazes como inibidores angiogênicos, uma vez que conseguiram reduzir de forma significativa a complexidade total dos túbulos vasculares, o comprimento global dos vasos e o número de junções vasculares.

Os estudos decorrentes do ensaio CAM também contribuíram e ainda contribuem substancialmente para a validação do potencial das nanopartículas de ouro como agentes de natureza antiangiogênica. Essa validação reforça a viabilidade da aplicação dessas partículas como abordagem terapêutica em contextos patológicos que são caracterizados por processos de angiogênese exacerbados, como os transplantes de tecido. Além disso, a abordagem de empregar modelos *ex vivo* proporciona uma maior proximidade com as condições fisiológicas, conferindo maior pertinência e confiabilidade aos resultados obtidos (DARWEESH; AYOUB; NAZZAL, 2019; DOURADO, 2021; OLIVEIRA et al., 2012).

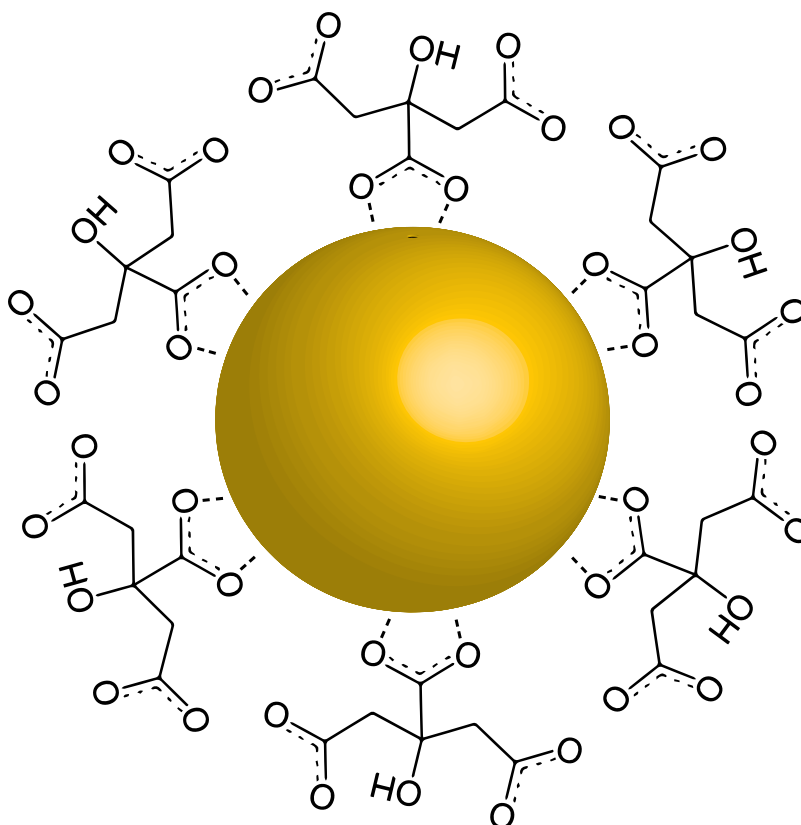
Em relação a síntese de AuNPs, diversas rotas podem ser empregadas para sua produção. Porém, ao se pensar em aplicações biomédicas, convém a utilização de reagentes atóxicos ou, caso contrário, que sejam consumidos completamente. A partir desse pressuposto, o método *Turkevish*, que utiliza o citrato de sódio como agente redutor de íons de ouro, e algumas de suas variantes, que usam o ácido cítrico, se destacam (KHAN et al., 2014; MASSE et al., 2019).

Em sínteses típicas de AuNPs para aplicações biomédicas a partir do método *Turkevish*, o ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) é usado como precursor de íons de ouro ( $\text{Au}^{+3}$ ) e a molécula de citrato de sódio como agente redutor, desencadeando a nucleação e posteriormente estabilizando as nanopartículas de ouro pelo processo de adsorção (FAVI et al., 2015; KHAN et al., 2014; SPERLING et al.,



2008). O aumento da quantidade de citrato de sódio utilizado tende a estabilizar as AuNPs em tamanhos menores (COURA et al., 2018; GUO et al., 2015).

Uma maior área superficial atribuída às AuNPs, com moléculas polares adsorvidas em sua superfície, possibilita maior grau de interação com as fibras de colágeno. Desse modo, o uso de nanopartículas tende a uma melhor estabilização dessas fibras do que o uso de reticulantes convencionais (ISIDAN et al., 2019; LI et al., 2020a; VEDHANAYAGAM; NAIR; SREERAM, 2019). Além do mais, esses reticulantes comumente utilizados, como o glutaraldeído, apresentam incompatibilidade em aplicações biológicas, podendo levar a efeitos adversos a longo prazo (THANGAVEL et al., 2019). A figura 3.3 apresenta um modelo esquemático de uma nanopartícula de ouro com moléculas de citrato de sódio adsorvidas em sua superfície.



**Figura 3.3** - Representação esquemática de uma nanopartícula de ouro com moléculas de citrato de sódio adsorvidas em sua superfície. Fonte: adaptado de Guo *et al.* (2015).

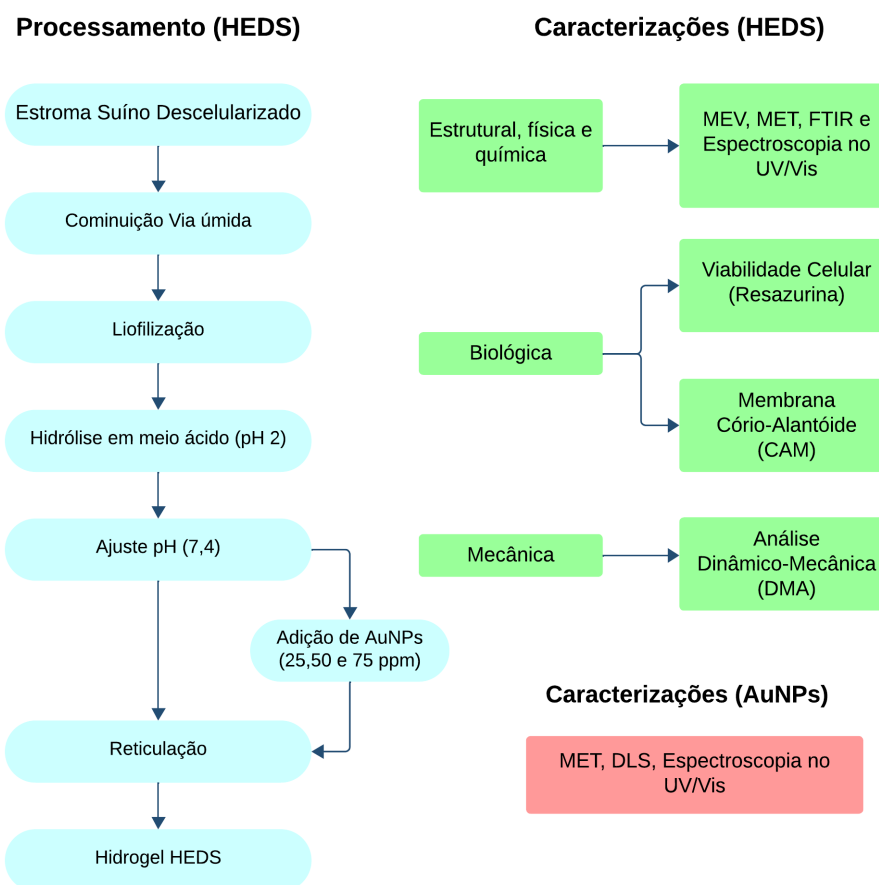
Uma vez que todo o processo de descelularização degrada, em algum grau, a estrutura das fibras de colágeno da córnea, o emprego de AuNPs se delinea com uma excelente alternativa para aprimorar as propriedades biomecânicas de scaffolds provindos desse tecido. Além do mais, as características supracitadas de baixa citotoxicidade e efeito antiangiogênico corroboram com o seu emprego nesse campo, notadamente, abarcando a síntese de hidrogéis derivados do estroma de córneas suínas (HOLLAND et al., 2021; LI et al., 2020a; SCHUETZ et al., 2013; VEDHANAYAGAM; NAIR; SREERAM, 2019; WANG et al., 2020a; WU et al., 2009; ZHOU et al., 2021).

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Etapas do Procedimento Experimental

A metodologia do presente trabalho foi subdividida nas seguintes etapas: descclularização de córneas suínas; síntese e caracterização das nanopartículas de ouro (AuNPs) e síntese e caracterização das córneas bio-sintéticas, denominadas como hidrogéis provindos de estromas descclularizados de córneas suínas (HEDS). A síntese dos hidrogéis será adaptada da metodologia empregada por Wang *et al.* (2020), visando a obtenção de uma matriz injetável para restauração de partes do tecido defeituosos da córnea. A figura 4.1 apresenta o fluxo das principais etapas do desenvolvimento do presente projeto de mestrado

#### FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DAS CÓRNEAS BISSINTÉTICAS



**Figura 4.1** - Fluxo das principais etapas do desenvolvimento das córneas bio-sintéticas.

## 4.2 Materiais

Todos os sais e reagentes foram utilizados em grau analítico (P.A) e para possíveis composições das soluções foi utilizada Água Deionizada (H<sub>2</sub>O/milli-Q, com resistividade mínima de 18,0M.cm a 25°C). Segue listas dos materiais empregados subdividas de acordo com as etapas do projeto e respectivas fontes:

### Descelularização

- Dodecil sulfato de sódio (SDS) – 99% de pureza - Sigma - Aldrich, Saint Louis, (EUA),
- Estromas de Córneas Suínas - Centro de Saúde Ocular Dr. Paulo Ferrara,

### Síntese de AuNPs

- Citrato de Sódio tribásico, reagente ACS, com grau de pureza de 99,0%, Sigma - Aldrich, Saint Louis, (EUA),
- Cloreto de ouro (III) tri-hidratado (HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O), Sigma - Aldrich, Saint Louis, (EUA),

### Síntese de Hidrogéis (HEDS)

- Ácido clorídrico (HCl, 37%, Synth),
- Cloreto de sódio (NaCl 99-100%, Synth),
- Cloreto de potássio (KCl 99-100%, Synth),
- Fosfato de Potássio Monobásico Anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 99%, Synth).
- Hidróxido de sódio (NaOH 99% microperolada, Synth),
- Hidrogenofosfato Dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 99-100%, Synth),
- Meto-p-toluenossulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida (CMC) – 95% Sigma - Aldrich, Saint Louis, (EUA),
- N-Hidroxisuccinimida (NHS) – 98% de pureza, Sigma - Aldrich, Saint Louis, (EUA),
- Pepsina, provinda da mucosa gástrica de suínos, bovinos ou ovinos, Sigma - Aldrich, Saint Louis, (EUA),

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Obtenção do Estroma de Córneas Suínas

A equipe do Centro de Saúde Ocular Dr. Paulo Ferrara foi responsável pelo fornecimento das matrizes estromais ao Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCOM) da UFMG, em condições viáveis para a realização do projeto, seguindo o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob número de protocolo 206/2022. Desse modo, a equipe do Centro de Saúde Ocular obteve olhos suínos frescos, oriundos de porcos de abatedouros comerciais, e os processou na seguinte condição: esterilização do material em iodopovidona 10%, extração da córnea e remoção das camadas epitelial e endotelial para obtenção das matrizes e conservação material em solução salina balanceada (BSS – do inglês, *balanced salt solution*).

### 4.3.2 Descelularização do estroma de córneas suínas

Seguindo o mesmo protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética supracitado (sob número de protocolo 206/2022) - estudos prévios foram realizados na Faculdade de Farmácia da UFMG para avaliar a eficácia de quatro metodologias distintas para descelularização, sendo estas:

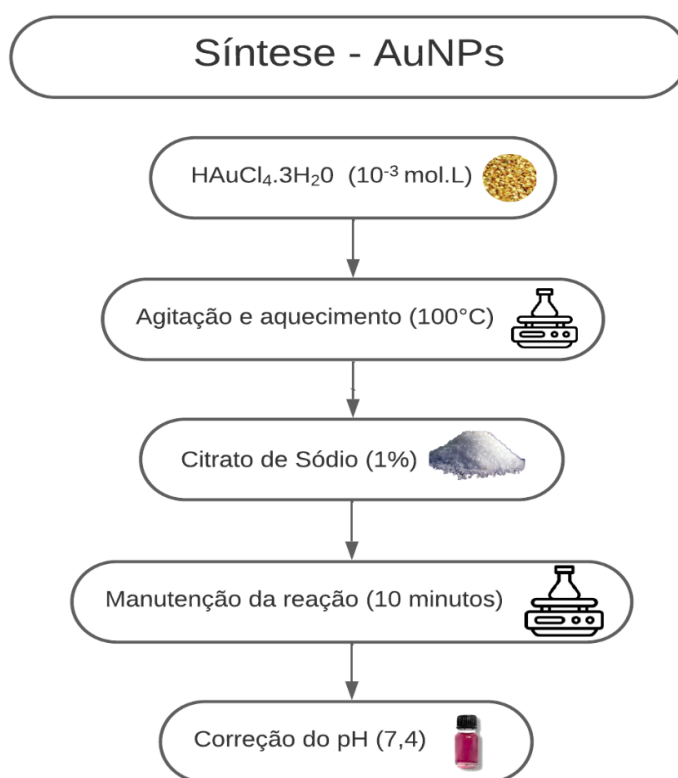
- SDS 1% (m/v)
- SDS 0,1% (m/v)
- Triton-X 1% (v/v)
- NaCl (1,5M)

Os estromas obtidos foram incubados nas soluções descelularizantes e mantidos sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, os estromas foram submetidos a um enxágue com solução PBS, que durou 120 minutos, com agitação constante, a uma temperatura de 4°C. Durante o processo de enxágue, o PBS foi substituído a cada 30 minutos. Após a conclusão dos ciclos de lavagem, os estromas foram deixados em solução de

PBS sob agitação mecânica por um período de 72 horas, com trocas de PBS a cada 24 horas.

#### 4.3.3 Síntese das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

A síntese das nanopartículas de ouro foi realizada a partir da metodologia *Turkevich*, ligeiramente modificada. No presente trabalho, foi utilizada uma solução de citrato de sódio a 1%. Com o auxílio de uma pipeta graduada, foi colocado 60,0mL de uma solução de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ ) em um Erlenmeyer de 125mL. O sistema foi agitado e aquecido até uma temperatura de  $100^\circ\text{C}$ , por 5 minutos. Após esse tempo, ainda sobre agitação, foi adicionado 5 mL de solução de citrato de sódio 1%, mantendo a reação por aproximadamente 10 minutos. Finalmente, o pH da solução foi ajustado para o valor de 7,4 utilizando uma solução de NaOH. A figura 4.2 ilustra, a partir de um fluxograma, as etapas e os reagentes necessários para a preparação das AuNPs.



**Figura 4.2** - Fluxograma descritivo das etapas e dos reagentes necessários para a preparação das AuNPs.

#### 4.3.4 Síntese dos Hidrogéis Estromais Provindos de Estromas de Córneas Suínas Descelularizadas (HEDS)

Após a obtenção das matrizes extracelulares descelularizadas de córneas suínas, procedeu-se à sua dispersão e cominuição em água utilizando o dispositivo T25 digital ULTRA-TURRAX®, com o intuito de fragmentar as estruturas das lamelas, fibras e fibrilas de colágeno. Essa etapa foi seguida pela liofilização das amostras, que foi conduzida por um período de 48 horas.

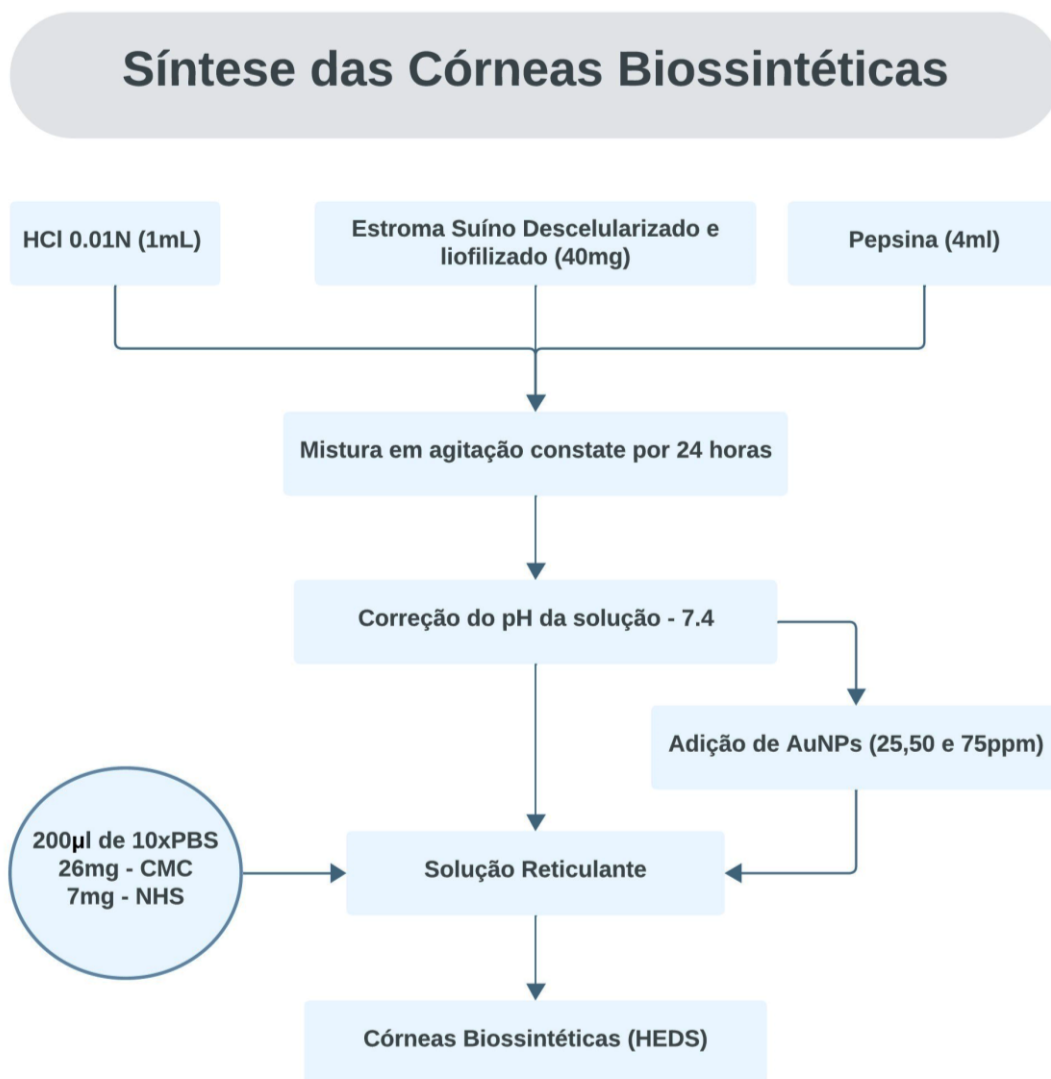
Para a síntese das córneas bio sintéticas, foram utilizadas as seguintes matérias-primas e proporções:

- 40mg de estromas suínos descelularizados, cominuídos e liofilizados,
- 4mg de pepsina,
- 1ml de HCl 0.01M

Essa combinação permaneceu em agitação constante por 24 horas à temperatura ambiente, promovendo a hidrólise das cadeias de colágeno e a homogeneização do sistema. Posteriormente, a pepsina foi desativada por meio da adição de NaOH 1M até que o pH da solução atingisse 7,4.

Para concluir o processo, foram dissolvidos 26mg de CMC e 7mg de NHS em 200 $\mu$ L de uma solução 10xPBS. Essa solução foi, então, incorporada ao sistema para a reticulação dos peptídeos de colágeno. No caso das córneas bio sintéticas com adição de nanopartículas de ouro, antes desta etapa, a solução contendo (AuNPs) foi introduzida em diferentes volumes até atingir proporções de (25, 50 e 75ppm). Nesse cálculo, foi considerado apenas a fração mássica correspondente ao ouro em solução em relação a quantidade de estromas suínos descelularizados e liofilizados.

Todas as formulações foram homogeneizadas antes da reticulação. Os sistemas resultantes foram transferidos para tubos Eppendorf e incubados por 20 minutos, permitindo que a reação de reticulação fosse concluída. A Figura 4.3 apresenta um fluxograma ilustrando as etapas seguidas e os reagentes utilizados no processo de preparação dos HEDS, ou córneas bio sintéticas.



**Figura 4.3** - Fluxograma descritivo das etapas e dos reagentes necessários para a preparação dos HEDS.

#### 4.4 Análise dos processos de descelularização

A eficácia das descelularizações foi avaliada na Faculdade de Farmácia da UFMG - por meio da quantificação da remoção dos componentes celulares das matrizes estromais, da verificação da presença de material genético nos grupos controle e nas matrizes descelularizadas, e pela quantidade de colágeno, seguindo as metodologias explanadas por Vieira (2022). Em resumo, para determinar a ausência de componentes celulares nos estromas descelularizados, foram realizadas análises histológicas que incluíram



colorações com H&E (Hematoxilina e Eosina), *Periodic Acid Schiff* (PAS), Tricrômico de Masson e *Alcian Blue*. Além disso, foi avaliado por meio da MET e marcação de núcleo com sonda de Hoechst a presença de resíduo celular. A partir das micrografias de T. Masson, utilizando o software ImageJ® (versão 1.50i, *National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA*), foi quantificado o percentual de colágeno em cada amostra (n=6 por grupo).

A transparência macroscópica dos estromas descelularizados foi analisada após desidratá-los com glicerol 100% (v/v) durante 1 hora. Posteriormente, foram fotografados sobre um fundo que apresentava a letra "A" em papel branco, a fim de avaliar a capacidade de transmitância de luz. Essa mesma avaliação foi conduzida com os estromas em seu estado natural.

## **4.5 Caracterizações das AuNPs**

### **4.5.1 Espectroscopia no UV/Vis**

A partir da obtenção das AuNPs em solução, essas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção no UV-Vis, por meio de medidas de absorbância abrangendo uma faixa de comprimentos de onda de 200nm a 900nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-2600.

### **4.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

Para avaliar o raio hidrodinâmico das nanopartículas de ouro, procedeu-se à realização da análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS). O equipamento empregado para essa finalidade foi o Zetasizer 3000 HS 1256. Esse sistema é equipado com um laser de hélio/neon com potência de 4 mW e um comprimento de onda de 633nm. O tamanho do raio hidrodinâmico das partículas foi determinado utilizando a tecnologia de retroespalhamento não invasiva, com um ângulo de detecção de 173°. As medições foram conduzidas a uma temperatura constante de 25 ±1°C. O ângulo de 90° foi utilizado para as medições hidrodinâmicas. A análise dos dados seguiu o método cumulativo para obter o diâmetro médio aparente e o índice de polidispersibilidade (PDI). O valor final

representou a média aritmética de 10 medições consecutivas.

#### 4.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os aspectos morfológicos das AuNPs, já incorporadas aos hidrogéis, foram analisados por meio do Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV – do Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky modificada (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5%) por 12 horas. Em sequência, as amostras foram encaminhadas ao Centro de Microscopia da UFMG, onde prosseguiu-se com as demais etapas de preparação que envolvem a desidratação em etanol e a imersão em Epon 812. O cálculo do diâmetro das AuNPs foi realizado utilizando o software ImageJ® (versão 1.50i, *National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA*).

### 4.6 Caracterizações das córneas bio sintéticas

Quatro grupos amostrais foram estabelecidos, caracterizados e comparados a partir da síntese das córneas bio sintéticas, sendo estes:

- HEDS – Hidrogel provindo do estroma suíno descelularizado;
- HEDS25 - Hidrogel provindo do estroma suíno descelularizado com adição de 25ppm de AuNPs;
- HEDS50 - Hidrogel provindo do estroma suíno descelularizado com adição de 50ppm de AuNPs;
- HEDS75 - Hidrogel provindo do estroma suíno descelularizado com adição de 75ppm de AuNPs.

#### 4.6.1 Avaliação da Transparência macroscópica e de transmitância de luz

Para avaliar as diferenças visuais, os quatro grupos amostrais foram sobrepostos em uma letra "A" preta em papel branco e fotografados. A transmitância de luz das córneas e dos hidrogéis preparados foi medida

utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-2600 em comprimentos de onda na faixa de 300 a 800nm. A transmitância de luz foi calculada de acordo com a equação 4.1, onde:

$$\text{Tramitância (\%)} = \left( \frac{1}{10^A} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

“A” é o valor de absorbância do material em cada comprimento de luz.

#### 4.6.2 Avaliação do grau de hidratação

Seguindo a abordagem metodológica de Wang *et al.* (2020), as córneas bio sintéticas (HEDS) (n=5) foram imersas em uma solução de PBS (pH = 7,4) à temperatura ambiente por um período de 72 horas. Após esse tempo, as amostras intumescidas foram cuidadosamente retiradas da solução, submetidas a uma leve secagem com papel filtro e então pesadas ( $P_f$ ). As amostras pesadas foram subsequentemente submetidas a um processo de liofilização de 24 horas e, em seguida, pesadas novamente ( $P_i$ ). O cálculo do teor de água absorvido de cada amostra foi realizado conforme a equação 4.2, descrita na sequência:

$$\%H = \frac{P_f - P_i}{P_f} \times 100 \quad (4.2)$$

As córneas, nativas e descelularizadas (n=5), por já estarem imersas em solução e intumescidas, tiveram ajustes pontuais na metodologia para determinar o grau de hidratação (%H). Inicialmente, essas amostras passaram por um processo de liofilização com duração de 24 horas. Após a liofilização, as amostras foram pesadas ( $P_i$ ) e então imersas em PBS (pH = 7,4) à temperatura ambiente por 72 horas, seguidas de uma nova pesagem ( $P_f$ ). O cálculo do grau de hidratação foi realizado de acordo com a mesma equação 4.1 supracitada.

#### 4.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os aspectos morfológicos da córnea nativa e das córneas bio sintéticas, assim

como a presença e morfologia de nanopartículas de ouro, foram analisados pelo Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecna G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV – do Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky modificada (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5%) por 12 horas. Em sequência, as amostras foram encaminhadas ao Centro de Microscopia da UFMG, onde prosseguiu-se com as demais etapas de preparação que envolveram a desidratação em etanol e a imersão em Epon 812.

#### 4.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise da formação do hidrogel, a reticulação das fibras de colágeno pelo composto CMC/NHS e a detecção das AuNPs nas córneas bio sintéticas foram realizadas utilizando a técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) no espectrômetro NICOLET, modelo 6700. A faixa de análise compreendeu o intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos após 64 varreduras, com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.6.5 Análise dinâmico-mecânico (DMA)

A análise dinâmico-mecânica (DMA) dos seis grupos amostrais foi realizada usando um equipamento DMS 6100 SII Exstar em módulo de compressão com as amostras imersas em PBS e à temperatura constante de 37°C. Antes do início da análise, as amostras foram liofilizadas por 24 horas e posteriormente imersas em tampão fosfato-salino (PBS) por mais 24 horas.

Previamente a aplicação das cargas mecânicas compressivas, as amostras foram submetidas a uma preparação composta por três ciclos de carga/descarga e três etapas de relaxamento de estresse. Isso foi feito com o objetivo de obter amostras com históricos de tensões semelhantes e eliminar qualquer possível influência do histórico de carga nas propriedades mensuradas. Foi aplicado então uma carga inicial de 100mN para remover qualquer folga e determinar os parâmetros geométricos das amostras para início do ensaio. A amplitude de oscilação foi fixada em 10 $\mu\text{m}$ . Os testes foram conduzidos em uma série de

frequências, a saber: 0,05Hz, 0,1Hz, 0,2Hz, 0,5Hz, 1Hz, 2Hz, 5Hz, 10Hz, 20Hz e 100Hz.

#### 4.6.6 Análise de viabilidade celular por resazurina

Os grupos amostrais das córneas biossintéticas – HEDS, HEDS25, HEDS50 e HEDS75 - foram reticulados em uma placa de 96 poços (n=5) com volume de 140-150µl por poço. A placa foi então esterilizada por irradiação gama no CDTN – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - utilizando uma fonte de irradiação Co-60 (15kGy).

Foi utilizada uma linhagem de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), semeadas com uma densidade de 20.000 células por poço para avaliação da citotoxicidade. Na mesma placa em que foram sintetizados os hidrogéis, foi feito também o controle negativo e positivo (n=3). Então, deixou-se a placa em uma estufa com atmosfera controlada, *overnight* à 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%.

No dia seguinte, após cerca de 18 horas, foram colocados 100µl de resazurina em cada poço. A solução de resazurina foi preparada a partir de uma solução padrão (5mg/ml), sendo que dessa solução, dissolve-se 1ml em 9ml de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Após 24 horas do cultivo celular, a absorbância de cada um dos poços foi mensurada no espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices), utilizando um comprimento de onda de 570nm.

#### 4.6.7 Ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM)

A atividade antiangiogênica das AuNPs e dos hidrogéis foram avaliadas por meio do ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM). Para realização do teste, ovos de galinha fertilizados (*Gallus gallus domesticus*) foram incubados a 37 ± 2°C e 60 ± 5% da umidade relativa do ar. No 3º dia de desenvolvimento embrionário, um pequeno orifício (1cm<sup>2</sup>) foi feito na casca do ovo e a membrana interna da casca foi removida para expor a membrana corioalantóica. O orifício foi selado com fita transparente e, em seguida, os ovos retornaram à incubadora por mais 48 horas.

No 5° dia foram adicionados a superfície da membrana corioalantóica 50µg de quatro grupos amostrais das córneas biossintéticas – HEDS, HEDS25, HEDS50, HEDS75 - O tampão PBS foi definido como o controle negativo e o bevacizumabe (250 µg/mL) como o controle positivo. Ademais, foi avaliado a atividade antiangiogênica da solução contendo apenas as AuNPs (400 µg/mL) para cada grupo foi utilizado um total de 10 ovos.

No 7° dia, as membranas foram fotografadas e as imagens obtidas foram processadas utilizando-se o software ImageJ®. Posteriormente, realizou-se uma análise quantitativa da rede vascular por meio do software *Angiotool*® (*National Cancer Institute*, EUA). Com o auxílio deste programa, pode-se investigar as diferenças em relação à área vascularizada, à lacunaridade e ao número total de junções.

Para o cálculo da área vascularizada, o grupo que recebeu tampão PBS foi definido como 100% e os resultados foram expressos como a média da porcentagem  $\pm$  DP em relação a este grupo. Em relação à lacunaridade e ao número de junções a análise estatística foi realizada comparando a média  $\pm$  DP do grupo salina aos demais.

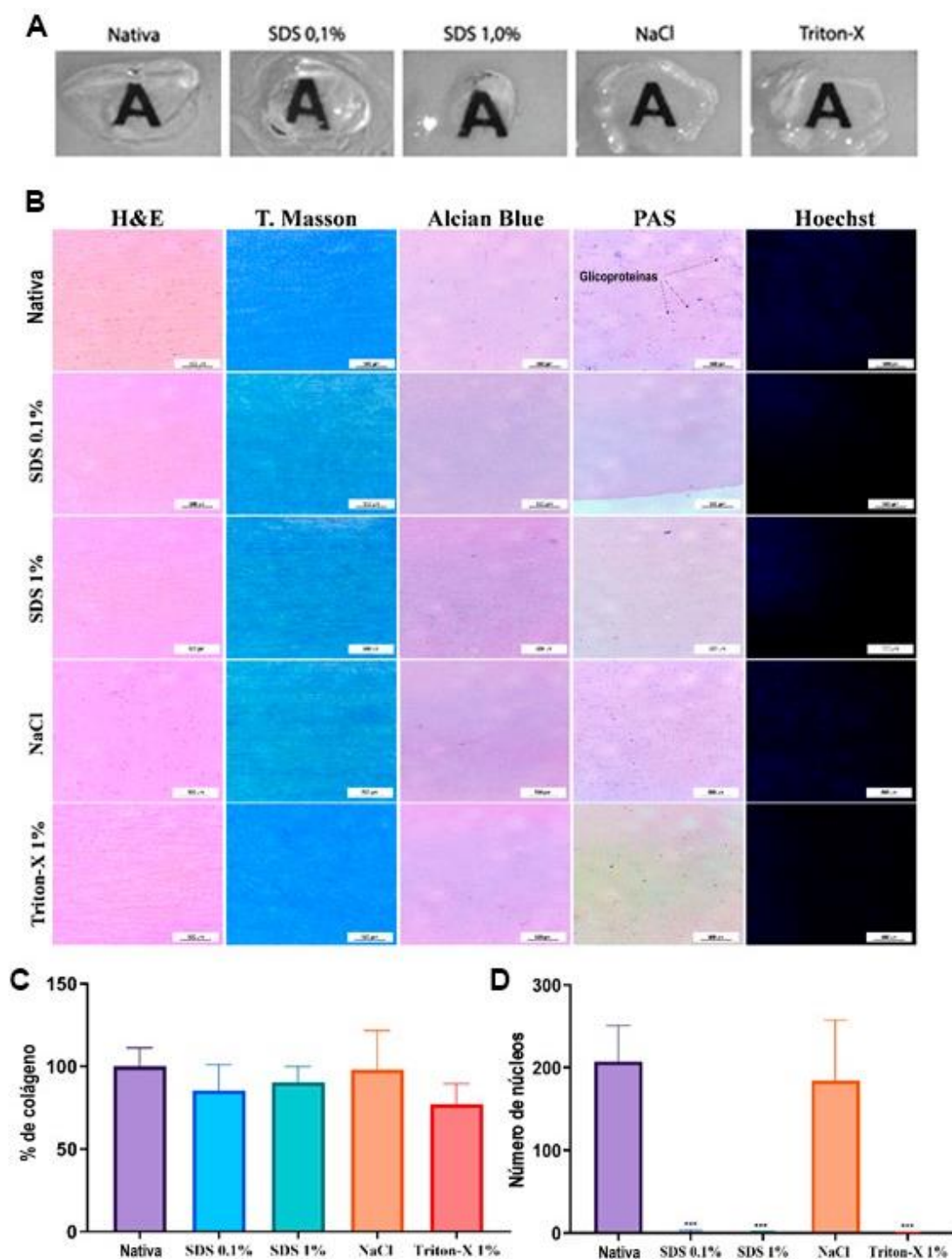
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Descelularização das Córneas Suínas

Os resultados dos ensaios para qualificar os processos de descelularização, previamente obtidos e reportados resumidamente na figura 5.1, sugerem que as matrizes descelularizadas com a solução detergente SDS nas concentrações testadas (0,1% e 1%) superaram aquelas tratadas com as soluções de Triton-X a 1% e NaCl a 1,5M. As matrizes estromais descelularizadas com SDS mantiveram a estrutura da matriz extracelular e removeram mais eficazmente os componentes imunogênicos.

A coloração de Tricrômico de Masson mostrou que todos os tratamentos de descelularização afetaram ligeiramente a estrutura das fibrilas de colágeno. O grupo Triton-X 1% apresentou a maior redução no colágeno (22,71%), em comparação com os estromas do grupo nativo. Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de colágeno entre os outros grupos. A coloração com *Alcian Blue* revelou uma coloração relativamente fraca nos estromas de todos os grupos, embora a coloração PAS tenha identificado glicoproteínas no estroma nativo.

A coloração com Hoechst 33258 revelou uma significativa redução no número de núcleos nos estromas corneanos submetidos à descelularização com SDS a 0,1%, SDS a 1% e Triton-X a 1%, em comparação com os estromas do grupo nativo ( $p < 0,001$ ). Esses tratamentos eliminaram, respectivamente,  $99,35\% \pm 0,85\%$ ,  $99,67\% \pm 0,42\%$  e  $99,83\% \pm 0,21\%$  dos núcleos originalmente presentes nos estromas. No entanto, no grupo tratado com NaCl, embora tenha havido uma redução na quantidade de núcleos detectados, a média permaneceu semelhante à do grupo nativo. Ao término dos processos de descelularização, os grupos exibiram transparência, com a preservação da arquitetura das fibrilas de colágeno e a ausência de componentes celulares, especialmente o SDS 0,1%. Tais afirmações são corroboradas com o exposto na figura 5.1, que revela: (A) as amostras corneanas antes e após a descelularização, (B) os cortes e colorações histológicas, (C) a quantificação de colágeno e (D) a quantificação do número de núcleos celulares.



**Figura 5.1** – Resultados do processo de descélularização onde: (A) apresenta uma imagem representativa de cada grupo após desidratação com glicerol, (B) imagens representativas de seções histológicas que foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), Tricrômico de Masson (T. Masson), *Alcian Blue*, *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Hoechst 33258, (C) gráfico com a quantificação da



porcentagem de colágeno e (D) gráfico com a quantificação do número de núcleos. Escala: 50 $\mu$ m. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 6).

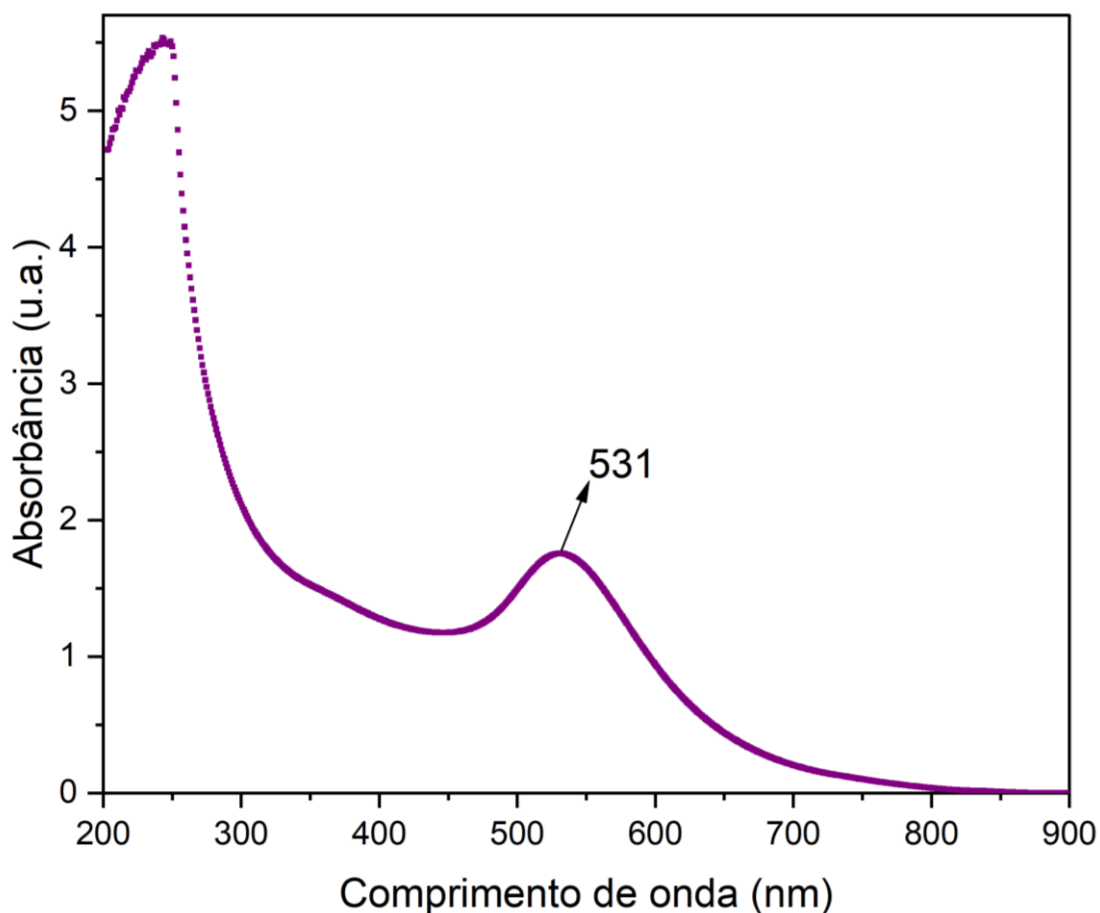
Embasado nos resultados prévios supracitados, a descelularização com o detergente iônico SDS mostrou-se a mais eficaz. Para a síntese das córneas bio sintéticas (HEDS), que envolve o processo de desmantelamento e hidrólise das lamelas e fibras de colágeno, convém-se priorizar a retirada de material celular frente a manutenção da ultraestrutura do tecido. Todavia, sem desnaturar o colágeno e as demais proteínas da MEC. Essa premissa encontra respaldo nos estudos conduzidos por Fernández-Pérez e Ahearne (2019), que avaliaram o impacto dos métodos de descelularização em hidrogéis derivados da matriz extracelular de córneas suínas. Nesse estudo, verificou-se que a síntese de tais hidrogéis não foi viável quando o tecido foi descelularizado com SDS a 1%, devido à perda da conformação do colágeno, mesma conclusão obtida por Gaetani *et al.* (2018). No presente trabalho, também foram realizadas tentativas malsucedidas de formação de hidrogéis ao se utilizar SDS a 1%, ao passo que o SDS a 0,1% possibilitou a formação dos hidrogéis. Por conseguinte, o método com SDS a 0,1% foi selecionado como o mais adequado, entre os avaliados, para o desenvolvimento das córneas bio sintéticas.

## 5.2 Síntese das Nanopartículas de Ouro

### 5.2.1 Espectroscopia no UV-Vis

A figura 5.2 revela o espectro de absorção no UV-Vis das nanopartículas de ouro sintetizadas como o citrato de sódio como agente redutor e estabilizante. A banda de absorção situada entre 500nm e 560nm é um sinal da formação das AuNPs, resultante da excitação das vibrações do plasma de superfície, característica típica de nanopartículas de ouro monodispersas. Esse fenômeno é conhecido como *localized surface plasmon resonance* (LSPR) e pode ser definido como a oscilação ressonante de elétrons livres na superfície de uma nanopartícula

metálica em resposta ao campo elétrico oscilante da radiação eletromagnética. Esses “*plasmons*” são ondas eletromagnéticas que surgem da oscilação coletiva de elétrons. Quando uma nanopartícula de ouro é irradiada por luz, os elétrons livres na superfície são excitados e começam a oscilar em fase. Essa oscilação coletiva produz um campo elétrico que interage com a luz incidente, aumentando a absorção da luz pela nanopartícula (JOANITTI, 2022; COURA et al., 2018).



**Figura 5.2** - Espectros de absorção UV-Vis das nanopartículas de ouro com a representação do seu pico de absorção no comprimento de luz visível. Fonte: autor.

O pico de absorção no espectro UV-Vis - decorrente do fenômeno LSPR - de soluções coloidais está diretamente relacionado ao tamanho médio das partículas, enquanto a largura da banda de absorção relaciona-se à dispersão

das partículas. Na figura 5.2 é possível observar um pico de absorção de luz em torno de 531nm. Esse valor é consistente com o esperado para nanopartículas de ouro esféricas com diâmetros entre 20nm e 30nm (JOANITTI, 2022; COURA et al., 2018; DOYEN; BARTIK; BRUYLANTS, 2013; TYAGI et al., 2016).

Apenas considerando o tamanho das nanopartículas, observa-se que à medida que seu tamanho diminui, há um deslocamento do pico de absorbância para comprimentos de onda mais curtos. Da mesma forma, quando as partículas aumentam de tamanho, o pico de absorbância se move em direção a comprimentos de onda mais longos. É relevante destacar que, em casos de partículas com tamanhos idênticos, mas formas diversas da esférica, o espectro de absorbância sofre um deslocamento em direção à região do vermelho (JOANITTI, 2022; NGUYEN et al., 2010; TYAGI et al., 2016).

Vale ressaltar que o valor do pico e da largura da banda de absorção não é influenciado apenas pelo tamanho e forma das partículas, mas também pelo agente estabilizante utilizado e pelo grau de agregação. Portanto, é aconselhável empregar outras técnicas de caracterização para determinar de forma abrangente as características das nanopartículas de ouro (JOANITTI, 2022; COURA et al., 2018; DOYEN; BARTIK; BRUYLANTS, 2013; TYAGI et al., 2016).

### 5.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O valor médio do diâmetro hidrodinâmico das AuNPs encontrados pelo DLS foi de  $30,26 \pm 0,86$ nm, que vai ao encontro do resultado da espectroscopia UV-Vis, indicando a presença de nanopartículas de ouro com aproximadamente 30nm. Ressalta-se, contudo, que esse valor se refere a dimensão da partícula juntamente com as moléculas adsorvidas em sua superfície.

O DLS também desempenhou um papel crucial ao possibilitar a avaliação da polidispersibilidade (PDI) em amostras de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato de sódio. O PDI é um parâmetro que fornece informações sobre a uniformidade das suspensões coloidais e varia em uma escala de 0 a 1. Quando o PDI se aproxima de 0, isso indica que a suspensão é monodispersa, ou seja, que as partículas são notavelmente uniformes em tamanho. Por outro lado,

valores próximos a 1 sugerem uma polidispersão, indicando que a amostra é heterogênea em termos de tamanhos das partículas (JOANITTI, 2022; HUSSAIN et al., 2020). A tabela 5.1 mostra os valores obtidos do diâmetro das AuNPs e o índice de polidispersibilidade (PDI), em 10 leituras distintas, apresentando a média e o desvio padrão amostral.

**Tabela 5.1** - Diâmetro e índice de Polidispersibilidade (PDI) obtidos pela análise de DLS em 10 leituras distintas.

<b>Análise</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersibilidade (PDI)</b>
<b>1</b>	29,3	0,287
<b>2</b>	29,5	0,264
<b>3</b>	30,8	0,263
<b>4</b>	30,3	0,252
<b>5</b>	29,6	0,283
<b>6</b>	30,1	0,288
<b>7</b>	30,4	0,246
<b>8</b>	31,1	0,282
<b>9</b>	32,2	0,295
<b>10</b>	30,3	0,269
<b>Média</b>	<b>30,26</b>	<b>0,27</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,86</b>	<b>0,02</b>

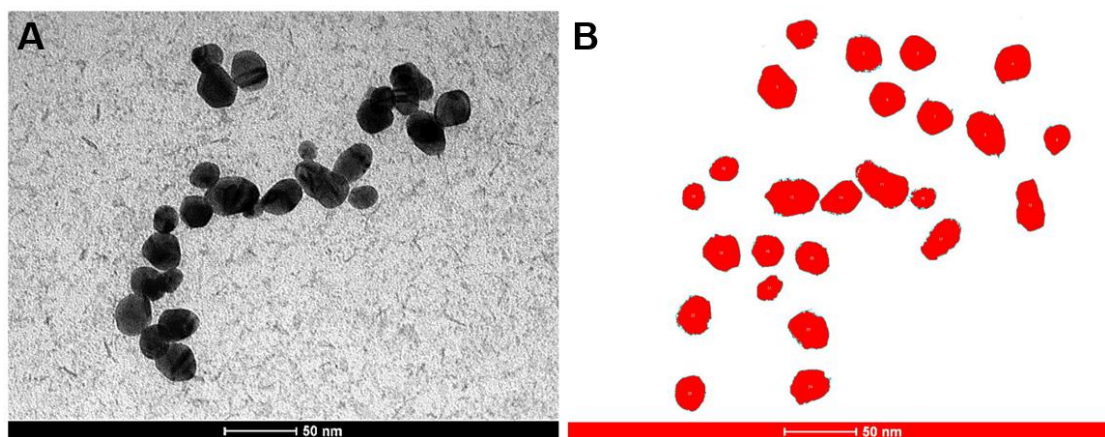
Para amostras de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato de sódio, considera-se que um PDI próximo de 0,2 ou seja, é aparentemente satisfatório, indicando uma notável homogeneidade em relação ao tamanho das partículas (JOANITTI, 2022; HUSSAIN et al., 2020). Portanto, o PDI mensurado de  $0,27 \pm 0,02$  sugere que a distribuição das nanopartículas de ouro foi relativamente homogênea, embora tenha apresentado alguma variação significativa nos tamanhos das AuNPs. Para averiguar essa distribuição indicada pelo PDI, assim como o tamanho real das AuNPs sintetizadas, foi realizada também a análise por microscopia de transmissão (MET).

### 5.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A figura 5.3 revela as AuNPs no substrato dos hidrogéis sintetizados na imagem a esquerda (A) e o cálculo e reposicionamento das AuNPs, que estavam sobrepostas, na imagem a direita (B). Foram analisadas 25 partículas ao todo e o valor do diâmetro médio encontrado foi de  $30,46 \pm 6,21\text{nm}$ . Percebe-se também uma morfologia predominantemente esférica e a presença de algumas partículas de diferentes tamanhos, o que pode justificar o valor de PDI encontrado. A tabela 5.2 expõe os valores encontrados pelo processamento da imagem exposta na figura 5.3B.

**Tabela 5.2** – Diâmetro médio das AuNPs da figura 5.3B calculadas pelo software ImajeJ®.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>
<b>1</b>	24,51	<b>14</b>	31,25
<b>2</b>	37,52	<b>15</b>	21,40
<b>3</b>	27,47	<b>16</b>	25,27
<b>4</b>	29,65	<b>17</b>	35,54
<b>5</b>	31,85	<b>18</b>	30,91
<b>6</b>	27,74	<b>19</b>	26,42
<b>7</b>	29,31	<b>20</b>	28,49
<b>8</b>	35,88	<b>21</b>	20,85
<b>9</b>	22,71	<b>22</b>	39,12
<b>10</b>	22,58	<b>23</b>	36,96
<b>11</b>	41,99	<b>24</b>	32,08
<b>12</b>	42,46	<b>25</b>	26,36
<b>13</b>	33,31		
<b>Média 30,46nm</b>			
<b>Desvio Padrão 6,21nm</b>			



**Figura 5.3** – (A) Imagem das AuNPs no substrato dos hidrogéis e (B) cálculo do diâmetro das partículas após tratamento da imagem utilizando o software ImageJ®.

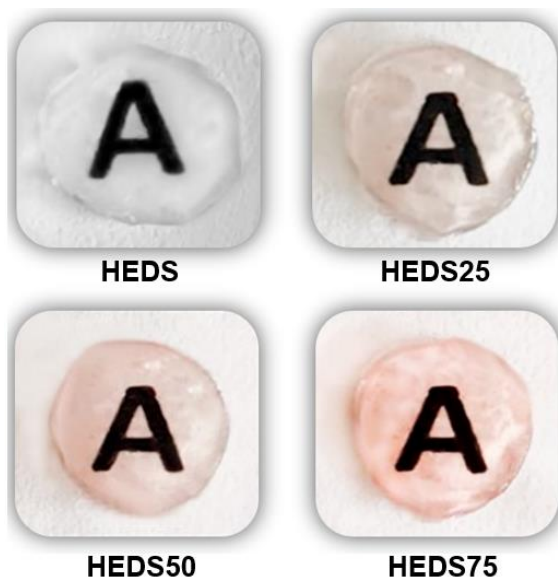
A pequena discrepância de tamanho observada entre as análises realizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) está, provavelmente, relacionada ao fato de que o DLS quantifica o diâmetro hidrodinâmico com base em muitas partículas, enquanto a MET se baseia na medição de um número limitado de partículas individuais. Essa disparidade também resulta da influência da camada de solvatação que envolve as nanopartículas. No caso, com moléculas de citrato de sódio, o raio hidrodinâmico obtido pela DLS tende a ser ligeiramente maior que o tamanho real, uma vez que incorpora a contribuição dessa camada de solvente (JOANITTI, 2022; COURA et al., 2018; HUSSAIN et al., 2020). Ao comparar e relacionar os resultados obtidos por meio das três técnicas (UV-Vis, DLS e MET), pode-se concluir que as AuNPs sintetizadas apresentam uma morfologia quase esférica e um diâmetro médio de cerca de 30nm, conforme proposto.

### 5.3 Desenvolvimento das Córneas Biossintéticas

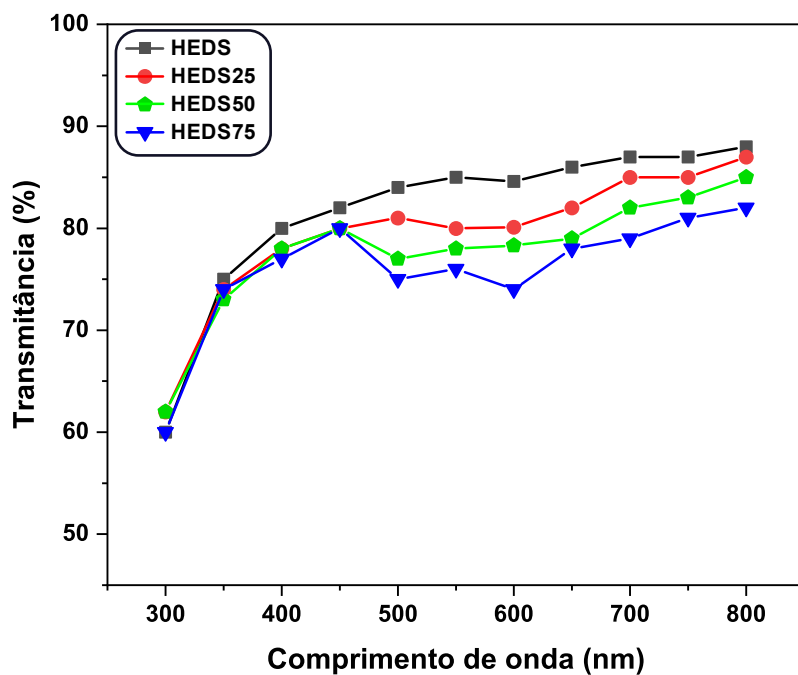
#### 5.3.1 Avaliação da Transparência

A figura 5.4 apresenta uma foto das córneas biossintéticas sobre uma letra “A” em papel branco para aferição da transparência a nível macroscópico. A

transmitância dos respectivos hidrogéis também foi mensurada em diferentes comprimentos de onda, conforme apresentando na figura 5.5.



**Figura 5.4** – Imagens das córneas bio-sintéticas, na sequência da esquerda para direita: HEDS, HEDS25, HEDS50 e HEDS75.



**Figura 5.5** – Transmitância em diferentes comprimentos de onda das córneas bio-sintéticas: HEDS, HEDS25, HEDS50 e HEDS75.

Observa-se que as córneas bio sintéticas desenvolvidas exibiram uma notável transmitância de luz. A amostra (HEDS), sem adição de nanopartículas, apresentou um espectro similar ao encontrado por Wang *et al.* (2020), com transmitância superior a 80% para os comprimentos de onda maiores que 400nm. Resultado superior aos tipicamente encontrados para córneas suínas e humanas (LI *et al.*, 2020a; NARA *et al.*, 2016; ULAG *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2021, 2011). Era de se esperar uma redução na transmitância dos hidrogéis com a incorporação de nanopartículas de ouro na faixa de maior absorção dessas partículas, próximo a 530nm. O que pode ser constatado na figura 5.5, que demonstra uma clara diminuição nos valores de transmitância à medida que a concentração de AuNPs aumenta. No entanto, é notável que, mesmo com essa queda, todos os valores de transmitância permanecem acima de 70% na faixa correspondente à luz visível. Isso indica que os materiais mantêm propriedades óticas que se alinham com as aplicações oftalmológicas exigidas (ULAG *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2021, 2011).

### 5.3.2 Avaliação do grau de hidratação

A córnea suína nativa apresentou um nível de hidratação dentro da faixa esperada, chegando perto do teor de água encontrado no estroma da córnea humana, que é aproximadamente 78% (BRUNETTE *et al.*, 2017; GOODARZI *et al.*, 2019; MARTINS, 2017; WANG *et al.*, 2020a). Por outro lado, a córnea descelularizada mostrou um valor ligeiramente superior, sugerindo uma possível alteração na estrutura organizada das lamelas e fibras de colágeno. No entanto, é importante observar que essa diferença não atinge significância estatística relevante. Isso também é válido para as córneas bio sintéticas cuja amostra (HEDS75) apresentou o menor valor aparente de hidratação  $78 \pm 7\%$ . A tabela 5.3 expõe o grau de hidratação (%H) dos seis grupos amostrais (n=5), incluindo as córneas nativas e descelularizadas por SDS 0,1%, além das córneas bio sintéticas, após estarem imersas em solução tampão por 72 horas, seguindo a metodologia de Wang *et al.* (2020). Observa-se valores muito próximos entre os grupos analisados.



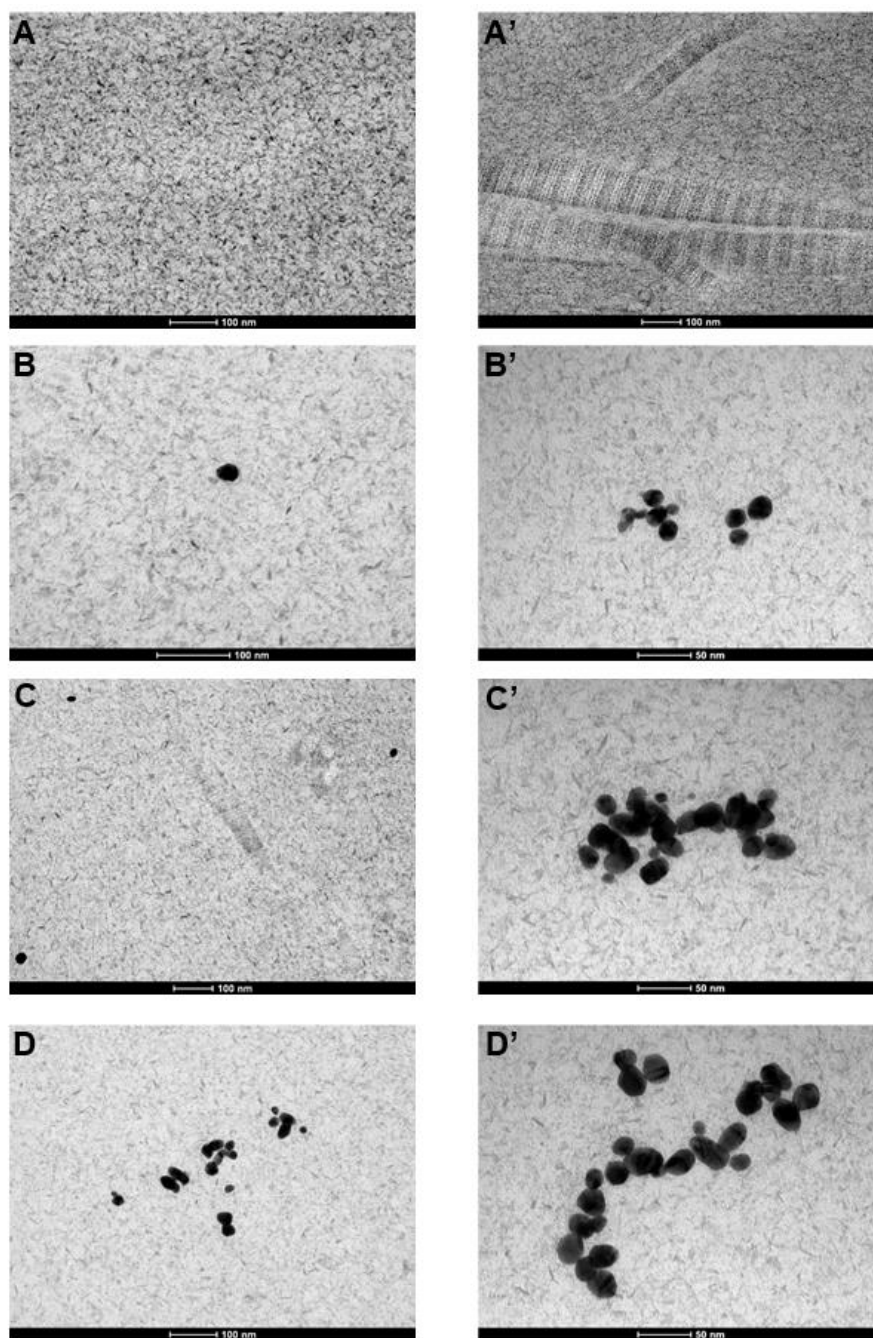
**Tabela 5.3** – Grau de Hidratação (%H) das córneas suínas, córneas suínas descelularizadas e das córneas biossintéticas (HEDS, HEDS25, HEDS50 e HEDS75), valores expressos em média e desvio padrão (n=5).

<b>Grau de Hidratação (%H)</b>		
<b>Amostra</b>	<b>Média (%)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Córneas Nativas</b>	80	2
<b>Córneas Descelularizadas</b>	85	5
<b>HEDS</b>	82	2
<b>HEDS25</b>	80	4
<b>HEDS50</b>	80	6
<b>HEDS75</b>	78	7

O grau de hidratação de um hidrogel é um indicador da hidrofiliabilidade da rede, bem como da densidade relativa de reticulação. Redes mais rígidas, conforme observado por Bhattacharjee e Ahearne (2021) e Li *et al.* (2020), tendem a absorver menos água. Para evitar a formação de um aspecto turvo na córnea, é fundamental que um material potencialmente substituto possua uma taxa de intumescimento semelhante ao tecido nativo. Isso permitirá a difusão eficaz de nutrientes através do tecido, melhorando a sobrevivência das células e replicando as características viscoelásticas necessárias para manter a fisiologia corneana. Qualquer diferença significativa no grau de intumescimento pode resultar em disparidades nessas propriedades, o que, por sua vez, poderia comprometer o sucesso de um eventual transplante (BHATTACHARJEE; AHEARNE, 2021; BRUNETTE *et al.*, 2017; GOODARZI *et al.*, 2019; ISIDAN *et al.*, 2019; ISLAM *et al.*, 2018). Nesse contexto, todas as córneas biossintéticas desenvolvidas demonstraram níveis de hidratação estatisticamente semelhantes entre si, e comparáveis aos do tecido natural, solidificando-se como candidatos promissores para eficaz substituição do tecido corneano.

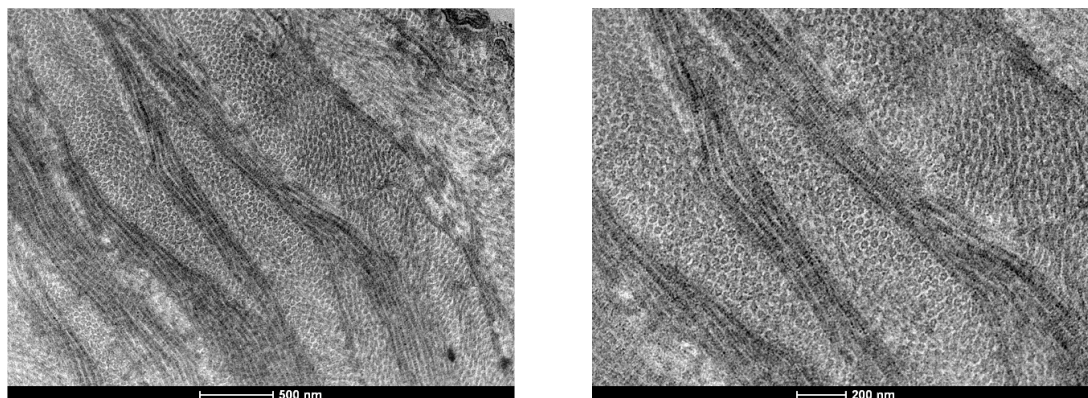
### 5.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A figura 5.6, revela imagens do substrato das córneas biossintéticas desenvolvidas, assim com a presença das AuNPs em suas estruturas.



**Figura 5.6** – Imagens obtidas por MET das córneas biossintéticas, em diferentes escalas, na seguinte sequência: (A) e (A') HEDS, (B) e (B') HEDS25, (C) e (C') HEDS50 e (D) e (D') HEDS75.

A figura 5.7, por sua vez, revela duas imagens da córnea nativa suína, obtidas por MET, em diferentes escalas, revelando a ordenação da ultraestrutura do estroma.



**Figura 5.7** – Duas imagens, em diferentes escalas, de uma amostra de uma córnea suína nativa, revelando a ordenação das fibras de colágeno em diferentes direções.

As imagens na figura 5.6 revelam uma matriz de colágeno predominantemente desordenada, em contraste com a córnea nativa mostrada na figura 5.7. É notável a presença de AuNPs nas amostras HEDS25, HEDS50 e HEDS75, e é possível observar um aumento na quantidade de partículas no substrato à medida que a concentração incorporada aumenta. Em outras palavras, a amostra HEDS75 apresentou uma quantidade significativamente maior de AuNPs. Há também uma distribuição heterogênea evidente dessas partículas no substrato, com a presença de AuNPs isoladas e dispersas, assim como pequenas aglomerações. Isso indica que o método de dispersão pode ser aprimorado para melhorar a homogeneização do sistema e conseqüentemente as propriedades das córneas bio sintéticas.

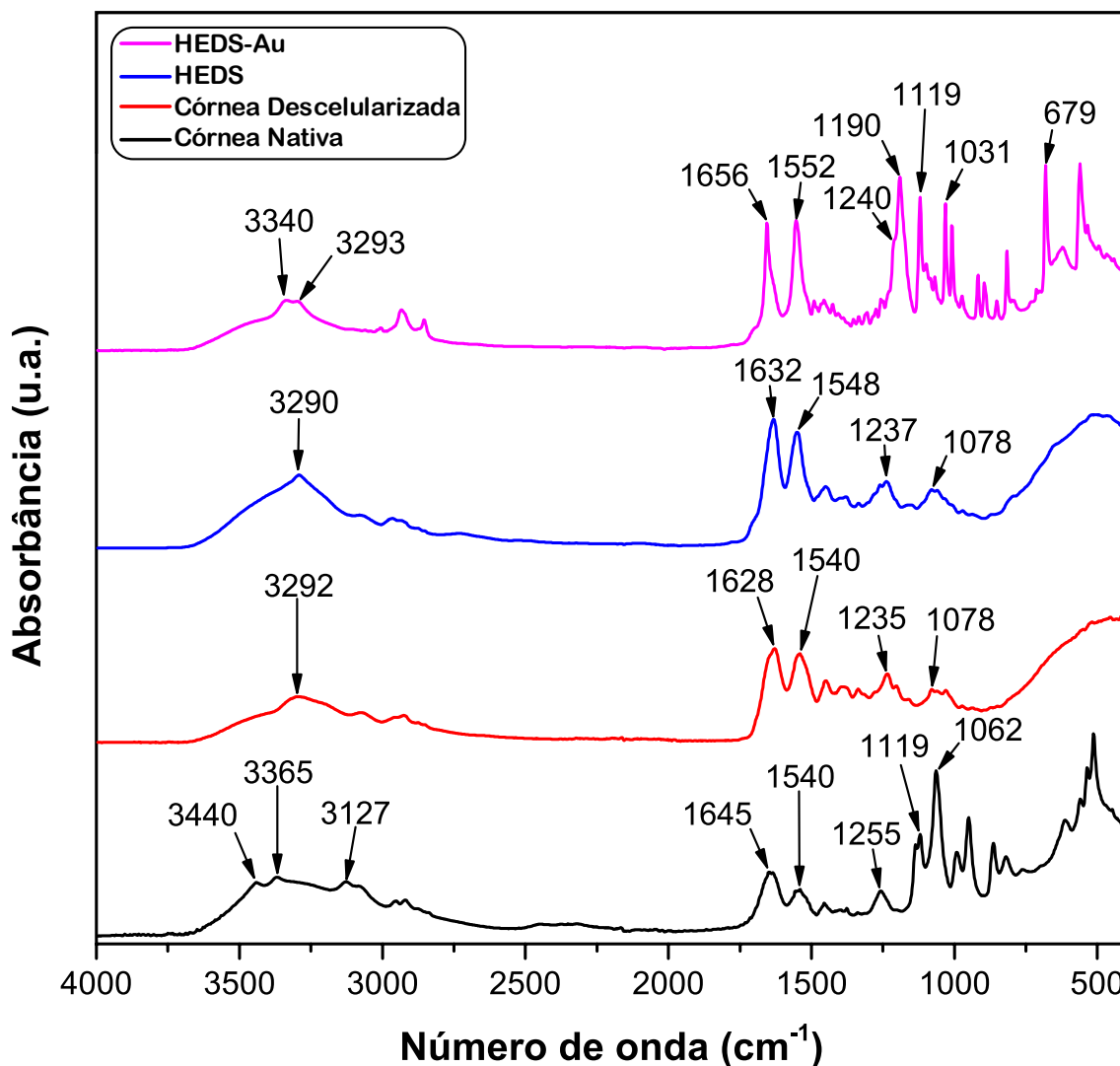
Na imagem (A'), da figura 5.6, é possível observar um suposto princípio de organização das fibrilas de colágeno na matriz do HEDS, o que não foi observado nas outras amostras. Não obstante, é esperado uma matriz desordenada para os hidrogéis uma vez que as córneas são submetidas ao

processo de descelularização, cominuição e hidrólise enzimática para formação de peptídeos de colágeno, que são posteriormente reticulados. Essas etapas se fazem necessárias, pois as carbodiimidas, para atuarem como agentes reticulantes, necessitam que as cadeias de colágeno estejam próximas umas das outras, em até 1nm, para promover a ligação covalente entre grupos carboxílicos (-COOH) e de aminhas (-NH<sub>2</sub>) de resíduos de aminoácidos do colágeno (AHN et al., 2013; CAMMARATA; HUGHES; OFNER, 2015; SCHUETZ et al., 2013; WANG et al., 2020a).

A ausência de uma estrutura ordenada, em fibras e lamelas e em multidireções como observado nas córneas nativas, é uma das razões fundamentais que contribuem para a menor resistência mecânica e mais rápida degradação dos hidrogéis desenvolvidos a partir de córneas suínas descelularizadas, como documentado nos estudos de Wang *et al.* (2020) e Yazdanpanah *et al.* (2021). Essa falta de organização estrutural compromete de maneira substancial o desempenho desses hidrogéis, exigindo a busca de abordagens alternativas para superar esse problema (WANG et al., 2020a).

#### 5.3.4 Análise da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro do colágeno exibe bandas de absorção típicas em 1600–1700 cm<sup>-1</sup>, 1500–1550 cm<sup>-1</sup> e 1200–1300 cm<sup>-1</sup>, que representam, respectivamente, as bandas de amida I (estiramento C=O), amida II (dobramento N–H e estiramento C–N) e amida III (estiramento C–N e deformação N–H) do colágeno (GOODARZI et al., 2019). A espectroscopia FTIR foi empregada com intuito de avaliar essas e outras bandas das córneas suínas nativas, córneas suínas descelularizadas utilizando SDS a 0,1%, bem como para as córneas biossintéticas, com e sem a presença de nanopartículas de AuNPs. Esses espectros, com as principais bandas de absorção indicadas, estão representados na figura 5.8.



**Figura 5.8** – Espectros de FTIR da córnea suína nativa, córnea suína descelularizada com SDS 0,1% e dos hidrogéis sem AuNPs (HEDS) e com AuNPs (HEDS-Au).

As bandas de absorção na faixa de  $2900$  a  $3300\text{cm}^{-1}$  correspondem à contribuição de estiramento dos grupos O-H do colágeno. Já as bandas entre  $3300$  e  $3500\text{cm}^{-1}$  resultam das vibrações de estiramento do grupo amina N-H, que se sobrepõem às bandas de estiramento do grupo hidroxila O-H (AKTURK et al., 2016). As bandas de absorção entre  $970$  e  $1200\text{cm}^{-1}$  também são representativas da proteína colágeno. Sendo comumente relacionadas ao estiramento da ligação C-O de álcoois, os quais podem ser originados tanto da hidroxiprolina, aminoácido que compõe o colágeno, quanto da cadeia lateral

glicosídica (AKTURK et al., 2016).

A formação e reticulação das córneas biossintéticas pode ser observada justamente por meio da formação de grupos amida ( $-\text{CONH}-$ ), resultantes da ligação entre os grupos funcionais  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{COOH}$ , presentes no colágeno, com a carbodiimida (CMC). Uma maior intensidade relativa das bandas da amida, conforme apresentado pela amostra HEDS e HEDS-Au, sugere o sucesso na reticulação dos peptídeos de colágeno. Ademais, para os hidrogéis, a ausência da banda associada ao estiramento das carbodiimidias (Estiramento  $\text{N}=\text{C}=\text{N}$ ) presente entre  $2145\text{-}2120\text{cm}^{-1}$ , indica que não há resíduos dessa substância, possivelmente pelo fato dela ter sido completamente consumida para reticulação do material (AHN et al., 2013; WANG et al., 2020a, 2020b).

Por sua vez, a banda em  $679\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento M-O (onde M representa o metal e O representa oxigênio), confirmando assim o encapsulamento de nanopartículas de ouro por íons citrato, através da coordenação  $\text{RCOO}^- \rightarrow \text{Au}$ . A presença de citrato de sódio também pode ser indicada pelas bandas correspondentes ao estiramento de C-O em  $1540$  e  $1236\text{cm}^{-1}$ . Portanto, a presença dessas bandas no espectro da amostra HEDS-Au, indica que ocorreu o encapsulamento de nanopartículas de ouro por íons citrato e que eles se encontram presentes na amostra (TYAGI et al., 2016). As demais bandas reveladas pelo FTIR, para as quatro amostras indicadas, estão expostas na tabela 5.4 com suas respectivas atribuições.

**Tabela 5.4** – Relação das amostras com a atribuição das principais bandas de absorção obtidos por FTIR e suas respectivas posições.

Amostra	Posição ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
Córnea Nativa	3440	Estiramento da ligação N-H sobreposto pelo estiramento do grupo O-H
	3365	
	3127	
	1645	Amida I, estiramento C=O
	1540	Amida II, dobramento N-H e estiramento C-N
	1255	Amida III, estiramento C-N e deformação N-H

	1119	Estiramento da ligação C-O
	1062	
Córnea Descelularizada	3292	Estiramento da ligação N-H sobreposto pelo estiramento do grupo O-H
	1628	Amida I, estiramento C=O
	1540	Amida II, dobramento N-H e estiramento C-N
	1235	Estiramento da ligação C-O
	1078	
HEDS	3290	Estiramento da ligação N-H sobreposto pelo estiramento do grupo O-H
	1632	Amida I, estiramento C=O
	1548	Amida II, dobramento N-H e estiramento C-N
	1237	Estiramento da ligação C-O
	1078	
HEDS-Au	3340	Estiramento da ligação N-H sobreposto pelo estiramento do grupo O-H
	3293	
	1656	Amida I, estiramento C=O
	1552	Amida II, dobramento N-H e estiramento C-N
	1190	Estiramento da ligação C-O
	1119	
	1031	
	679	Estiramento Au-O

Fonte: Adaptado de (AKTURK et al., 2016; GOODARZI et al., 2019; HASDA et al., 2020; NARA et al., 2016; TYAGI et al., 2016; WU et al., 2009).

### 5.3.5 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)

No ensaio dinâmico de compressão com as amostras imersas em PBS à 37°C (n=5), o hidrogel (HEDS) apresentou módulo de Young de  $(78,6 \pm 5,4\text{KPa})$  na frequência de 0,01Hz e de  $(120,6 \pm 6,4\text{KPa})$  para frequências de 100Hz (como mostrado na Tabela 5.5 e figura 5.10). Valor inferior aos encontrados, na mesma metodologia, para a córnea nativa e córnea descelularizada com SDS 0,1%. A figura 5.9 revela uma imagem da amostra HEDS no equipamento DMS logo antes de ser submersa em PBS e submetida as cargas mecânicas oscilatórias.



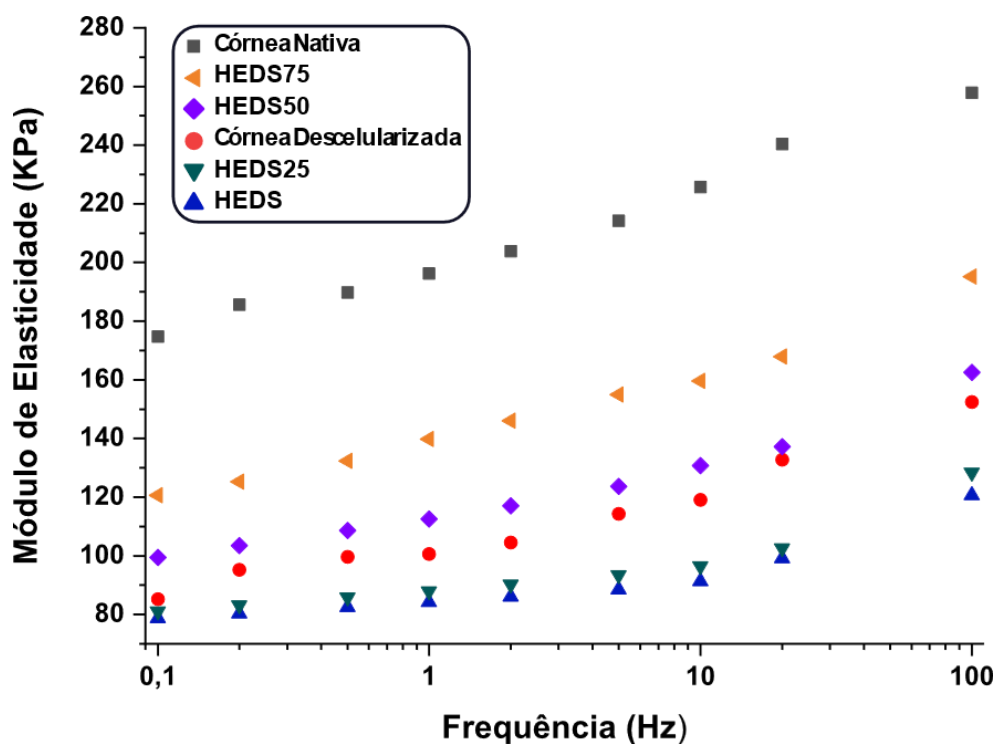
**Figura 5.9** – Imagem da amostra HEDS logo antes de ser submetida ao ensaio dinâmico de compressão em PBS.

A partir dos resultados reportados na Tabela 5.5, percebe-se, no entanto, um incremento nítido no módulo de elasticidade ao se adicionar AuNPs. A maior proporção dessas partículas – na amostra HEDS75 – engendrou os maiores módulos em relação as córneas bio sintéticas desenvolvidas, em todas as frequências aplicadas. Além do mais, em todos os experimentos, o módulo de elasticidade aumentou com o aumento da frequência de 0,1 até 100Hz, o que é típico do comportamento de materiais viscoelásticos. A tabela 5.5, que apresenta os valores do módulo de elasticidade dos seis grupos amostrais, em conjunto com a representação gráfica desses valores, exposta na figura 5.10, revelam os resultados obtidos referentes a rigidez das amostras analisadas.



**Tabela 5.5** - Módulo de Elasticidade E' (KPa) com seu respectivo desvio padrão amostral obtidos por DMA em diferentes frequências (Hz).

Frequência (Hz)	Córnea Nativa	Córnea Descelularizada	HEDS	HEDS25	HEDS50	HEDS75
0,1	174,7 ± 8,9	85,3 ± 7,2	78,7 ± 4,5	81,1 ± 4,9	99,5 ± 5,1	120,6 ± 5,9
0,2	185,6 ± 10,1	95,3 ± 8,7	80,3 ± 6,0	83,1 ± 5,4	103,4 ± 7,8	125,2 ± 6,2
0,5	189,9 ± 12,9	99,7 ± 9,5	82,5 ± 6,5	85,9 ± 6,0	108,9 ± 6,7	132,4 ± 6,5
1	196,3 ± 13,2	100,6 ± 9,2	84,1 ± 7,4	87,8 ± 8,0	112,6 ± 8,0	139,7 ± 8,6
2	203,8 ± 16,6	104,7 ± 9,4	86,1 ± 9,5	90,3 ± 7,6	117,0 ± 9,8	146,0 ± 7,2
5	215,2 ± 17,1	114,4 ± 10,9	88,5 ± 7,6	93,5 ± 9,8	123,7 ± 11,1	154,9 ± 8,6
10	225,7 ± 18,7	119,1 ± 11,2	91,2 ± 8,7	96,5 ± 5,6	130,8 ± 10,0	159,6 ± 9,2
20	240,4 ± 17,5	132,9 ± 11,9	99,0 ± 8,2	102,6 ± 6,5	132 ± 12,1	167,9 ± 10,1
100	257,8 ± 18,4	152,5 ± 13,9	120,6 ± 9,3	128,4 ± 10,0	162,5 ± 12,8	195,2 ± 16,1



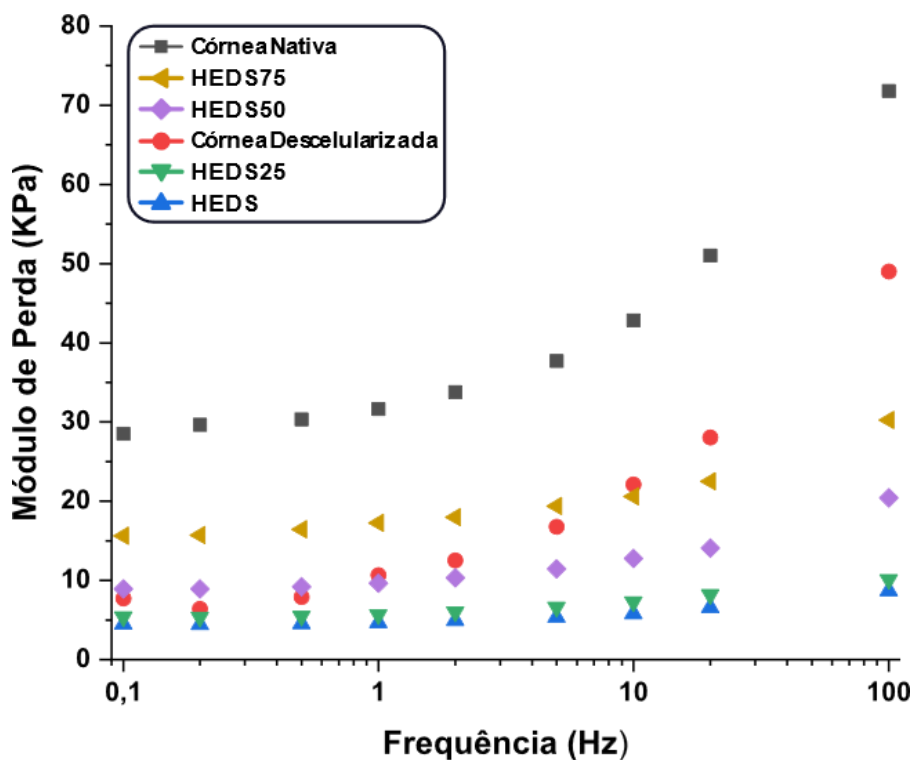
**Figura 5.10** – Módulo de Elasticidade (KPa) para diferentes frequências obtido por DMA.

As córneas biossintéticas são produzidas a partir da reticulação química das proteínas hidrolisadas do estroma corneano. São compostas majoritariamente de colágeno tipo I, o que as torna altamente apropriadas para ser usadas na formação de uma estrutura de suporte para a córnea. No entanto, a natureza intrínseca desses géis, altamente hidratados, significa que as fibras de colágeno estão dispersas e desorganizadas, resultando em materiais que são inerentemente mais macios do que as córneas nativas e descelularizadas, que possuem uma ultraestrutura de organização lamelar. Isso pode explicar os valores inferiores do módulo de elasticidade para as córneas biossintéticas (ANTOINE; VLACHOS; RYLANDER, 2014; CRAPO; GILBERT; BADYLAS, 2012; GOODARZI et al., 2019; ISIDAN et al., 2019; PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009; WANG et al., 2020a; ZHOU et al., 2011). As imagens de MET apresentadas na figura 5.6 – para as córneas nativas – e na figura 5.7 – para os HEDS - corroboram com o exposto. Por sua vez, há um aumento expressivo do módulo de elasticidade com a adição de AuNPs, nas proporções de 25, 50 e 75ppm. Sendo que o HEDS50 e HEDS75 apresentaram um módulo de Young superior ao da córnea descelularizada. Ainda assim, inferior ao da córnea nativa. Na frequência de oscilação de 10Hz houve um acréscimo de 75% no módulo de elasticidade do HEDS75 em comparação com o HEDS.

A maior rigidez dos hidrogéis contendo nanopartículas de ouro (AuNPs) pode ser atribuída, possivelmente, à interação dos grupos citratos adsorvidos na superfície das nanopartículas com os peptídeos do colágeno hidrolisado e com a matriz proteoglicana dos hidrogéis. Essa interação ocorre por meio de forças de ligação intermoleculares, como interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, entre os grupos funcionais das proteínas, como carboxilas e aminas, e o citrato. Essa interação provavelmente limita ou dificulta o deslizamento relativo das camadas reticuladas das proteínas da matriz extracelular quando submetidas a uma tensão de compressão, resultando em um aumento do atrito entre essas estruturas. As nanopartículas de ouro estariam, assim, atuando como ligações cruzadas físicas. Além disso, o impedimento estérico das AuNPs na estrutura reticulada também pode contribuir para esse efeito (AKTURK et al., 2016; ARYAL et al., 2006; GRANT et al., 2013;

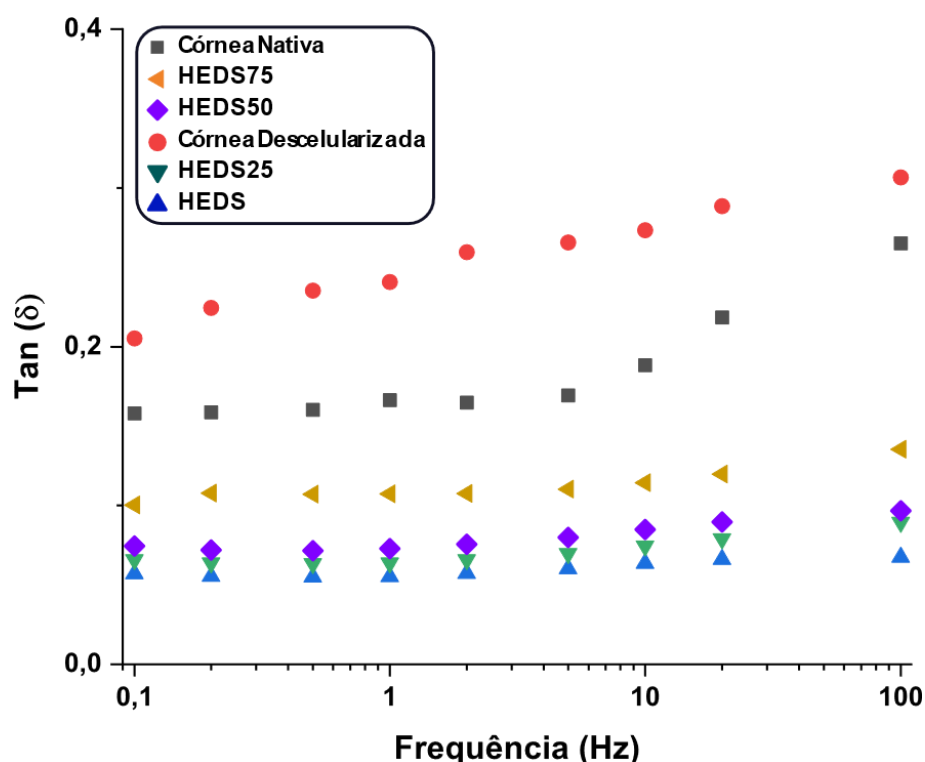
KIRDAITE et al., 2019; VEDHANAYAGAM; NAIR; SREERAM, 2019).

Além do módulo de elasticidade, que mede a energia armazenada em um ciclo de deformação, a análise de DMA também permitiu avaliar o módulo de perda, que mede a energia dissipada após os ciclos de aplicação de cargas mecânicas. Essa energia dissipada pode ser oriunda, por exemplo, da fricção das AuNPs com a matriz do hidrogel ou da relaxação das cadeias poliméricas do colágeno. A razão entre o módulo de perda ( $E''$ ) e o módulo de elasticidade ( $E'$ ) é denotada por  $\tan(\delta)$ . Esse parâmetro é uma medida da eficiência com que um material converte energia elástica em energia dissipada. Valores próximos a 0 indicam um comportamento predominantemente elástico, enquanto valores maiores indicam um comportamento de caráter viscoso (HATAMI-MARBINI; ETEBU, 2013b, 2013a; HATAMI-MARBINI; ETEBU; RAHIMI, 2013; HATAMI-MARBINI; RAHIMI, 2015). A figura 5.11 apresenta o Módulo de Perda (KPa), em diferentes frequências de oscilação, obtidas por DMA.



**Figura 5.11** – Módulo de Perda (KPa) para diferentes frequências obtidas por DMA.

O comportamento do módulo de perda segue um padrão semelhante ao módulo de elasticidade, com a córnea nativa exibindo os valores mais elevados em todas as frequências, enquanto o  $E''$  aumenta com a adição de AuNPs para as córneas biossintéticas. No caso do tecido corneano, espera-se que ele se comporte como uma mola. Ou seja, que grande parte da energia aplicada seja recuperada quando a carga é removida (HATAMI-MARBINI; ETEBU, 2013b; HATAMI-MARBINI; RAHIMI, 2015; WEEBER et al., 2005; WORTHINGTON et al., 2014). O parâmetro  $\tan(\delta)$ , conforme explicado, é útil para avaliar esse comportamento, à medida que relaciona  $E''$  e  $E'$ . A figura 5.12 exibe os valores de  $\tan(\delta)$  para as diferentes amostras analisadas.



**Figura 5.12** -  $\tan(\delta)$  para diferentes frequências obtidas por DMA.

Uma observação notável na Figura 5.12 é que a córnea descelularizada apresentou o mais alto valor de  $\tan(\delta)$ . Em outras palavras, ela demonstrou um maior caráter viscoso em comparação à córnea nativa e às córneas biossintéticas desenvolvidas. Essa diferença pode ser atribuída, em certa

medida, ao fato de que o SDS causou relaxamento e/ou desnaturação das fibras e lamelas de colágeno, tornando as moléculas com maior capacidade de escoamento. Todavia, sem impedir a formação dos hidrogéis (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019; GAETANI et al., 2018; NARA et al., 2016). Por outro lado, valores inferiores de  $\tan(\delta)$  para os hidrogéis são indícios da bem-sucedida reticulação dos peptídeos da matriz extracelular corneana. Em termos comparativos, no estudo publicado por Liu (2013), o valor de  $\tan(\delta)$  encontrado para córneas humanas em um ensaio de DMA foi de  $0,16 \pm 0,01$ . Valor análogo ao exposto na figura 5.11 para a córnea nativa, indicando o comportamento elástico da córnea e a coerência dos valores obtidos.

Quanto à ordem de grandeza dos valores do módulo de elasticidade obtidos para as seis amostras analisadas, é importante destacar que ela é diretamente influenciada pela técnica e metodologia utilizadas, que são amplas no estado da arte. Essa diversidade de abordagens resultou em uma gama de valores, tanto para córneas suínas quanto para córneas humanas. Assim, é comum encontrar intervalos de Módulo de Elasticidade que variam de 10KPa à 10MPa (HATAMI-MARBINI; ETEBU, 2013a; JAYASURIYA et al., 2003; LEANDRO, 2010; LI et al., 2020a; WEEBER et al., 2005; WORTHINGTON et al., 2014).

Como exemplo temos o estudo conduzido por Li *et al.* (2020), que avaliou o módulo de Young de córneas suínas nativas, descelularizadas e reticuladas com diferentes agentes químicos. Nessa pesquisa, foram utilizadas duas técnicas distintas: o ensaio de tração estático e a microscopia de força Atômica. Os valores encontrados foram em média de 1,7MPa e 20KPa, respectivamente, para córneas suínas descelularizadas.

A utilização da técnica de análise dinâmico mecânica (DMA) para avaliação das propriedades viscoelásticas da córnea ainda é incipiente. Dentre os trabalhos que utilizaram essa técnica, destaca-se o de Worthington *et al.* (2014), que avaliou os módulos compressivos dos tecidos oculares suínos em submersão e em temperatura constante. A córnea exibiu um módulo de Young de  $(25,0 \pm 0,9\text{kPa})$ . Ademais, segundo Goodarzi *et al.* (2019), o módulo de Young da córnea, em estudos *in vitro*, pode variar de 0,1 a 57MPa. Percebe-se que

comparar os valores obtidos referentes as propriedades mecânicas da córnea é uma tarefa complexa. Além das diferentes técnicas possíveis que podem ser adotadas, com diferentes tipos e direções de tensões aplicadas, a metodologia empregada e as características intrínsecas da variabilidade histológica entre indivíduos da mesma espécie, podem alterar significativamente os resultados.

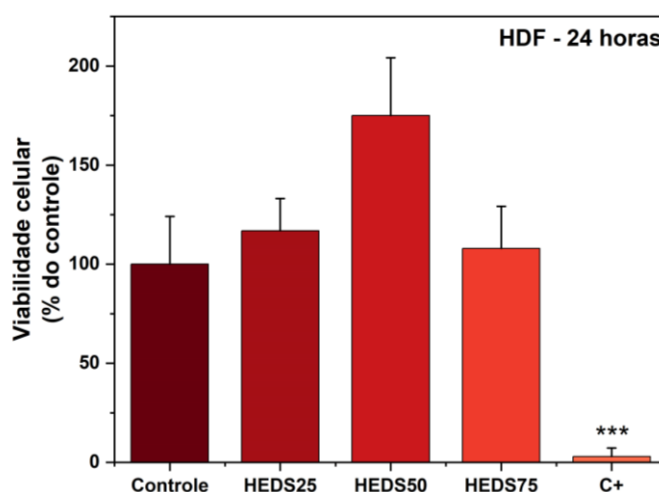
Nesse ínterim, a metodologia empregada no presente estudo se aproximou da utilizada por Worthington *et al.* (2014). No entanto, vale destacar que o referido pesquisador não realizou a avaliação do módulo de elasticidade em diferentes frequências de oscilação, o que constitui uma distinção fundamental ao aqui apresentado. Hatami-Marbini e Rahimi (2015), por sua vez, avaliaram o módulo de elasticidade da córnea em diferentes frequências pelo DMA. Todavia, utilizou esforços de tração, ao invés de compressão, chegando a valores de 18,9MPa na frequência de 0,01 Hz e 53,7MPa para frequências de 10Hz.

Toda essa disparidade de valores encontrados também está intrinsecamente relacionada a estrutura do tecido corneano que apresenta características anisotrópicas. Ou seja, possui propriedades distintas de acordo com a orientação em que é avaliada. Isso decorre em muito pelas diferentes orientações e densidades de lamelas de colágeno, de diferentes tipos. Além da presença de proteoglicanos, GAGs e dos próprios ceratócitos. Nesse contexto, segundo Hatami-Marbini e Etebu (2013b), a técnica de DMA por compressão, a partir da aplicação de diferentes frequências de oscilação, pode melhor estimar o módulo efetivo (ou seja, a média em todas as direções anatômicas). Até porque a córnea pode estar sujeita a vibrações na faixa de frequência de 0,1 a 100 Hz.

Com base em todas as informações apresentadas e na premissa de que resultados mais condizentes serão obtidos à medida que a metodologia melhor mimetizar as condições *in vivo*, é notável que a abordagem empregada, utilizando o ensaio de análise dinâmico-mecânica por compressão com amostras imersas e mantidas a uma temperatura fisiológica de 37°C, mostrou-se uma ferramenta eficaz para avaliar as propriedades mecânicas da córnea e o impacto da adição das nanopartículas de ouro na matriz dos hidrogéis sintetizados.

### 5.3.6 Ensaio de Viabilidade Celular por resazurina

A viabilidade celular das córneas biossintéticas foi avaliada por meio do ensaio com resazurina. Um dos principais objetivos desta análise foi verificar se as nanopartículas de ouro, nas concentrações utilizadas, apresentariam alguma toxicidade celular, o que não foi observado. A análise relativa foi realizada considerando o grupo HEDS (sem as nanopartículas de ouro) como o controle. Os grupos foram comparados estatisticamente utilizando o teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados da viabilidade celular de uma linhagem de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), após 24 horas de exposição às amostras, estão representados na Figura 5.13.

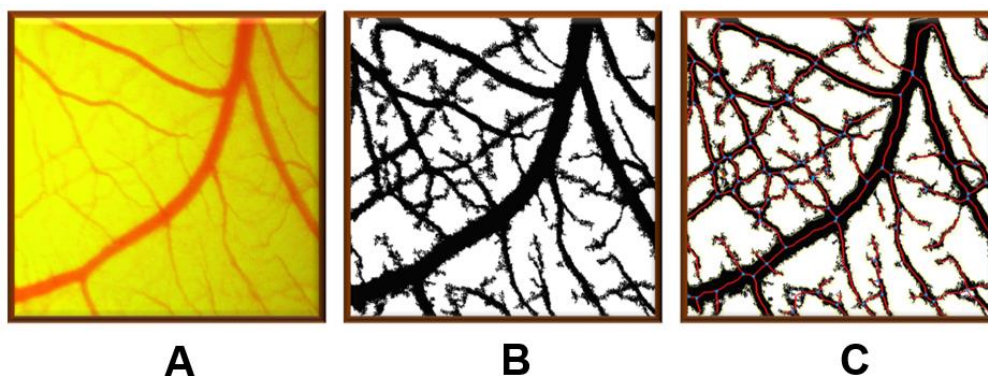


**Figura 5.13** – Viabilidade de HDF após 24 horas de contato com as amostras. \*Indica diferença estatística em relação ao grupo Controle (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

Embora o grupo HEDS50 tenha exibido uma viabilidade celular muito superior a 100%, apenas o grupo de controle positivo demonstrou resultados estatisticamente distintos em relação aos outros grupos. Isso sugere que as concentrações de AuNPs utilizadas não tiveram efeito citotóxico significativo. Essa premissa foi endossada pela análise prévia do aspecto visual dos poços com hidrogéis, que exibiram uma tonalidade roseada, denotando a conversão do indicador resazurina para sua forma ativa, resorufina, o que constitui um sinal de atividade metabólica e viabilidade celular.

### 5.3.7 Ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM)

O ensaio CAM é amplamente reconhecido como um modelo confiável para investigar os processos de angiogênese (DOURADO, 2021; OLIVEIRA et al., 2012; ROMA-RODRIGUES et al., 2016). A partir de três parâmetros geométricos analisados: porcentagem de área vascular (área ocupada por vasos sanguíneos/área total da imagem); número de junções vasculares (interseções ou ramificações nos vasos sanguíneos) e lacunaridade (grau de agrupamento ou espaçamento entre vasos sanguíneos) - evidenciou-se uma ação antiangiogênica presente nas córneas biossintéticas. A figura 5.14 apresenta três imagens indicando a sequência do processamento das imagens para o cálculo dos parâmetros supracitados, sendo que a figura 5.14A refere-se aos vasos sanguíneos no embrião, a figura 5.14B ao processamento da imagem para exposição única dos vasos sanguíneos e figura 5.14C as junções e pontos de conexão identificadas pelo software Angiotool®.



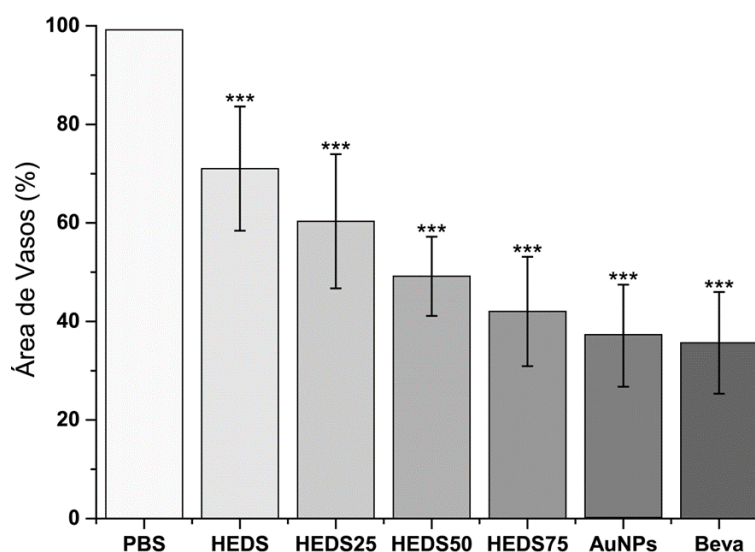
**Figura 5.14** - Imagens dos vasos sanguíneos e rede de conexão nas imagens retiradas do embrião (A), do processamento gráfico (B) e da identificação das junções e pontos de conexão vascular (C);

A partir do processamento das imagens, levantou-se o conjunto de dados referente a cada amostra. Em primeiro ponto, tem-se que a administração de bevacizumabe resultou em uma diminuição da área ocupada pelos vasos em cerca de  $(65,44 \pm 10,31\%)$ , um aumento na lacunaridade  $(0,99 \pm 0,05\lambda)$  e uma



redução no número de junções ( $16,70 \pm 4,84$ ) em comparação com o grupo de controle negativo – PBS – que apresentou os seguintes valores: (área de vasos = 100%; lacunaridade =  $[0,28 \pm 0,03\Lambda]$  e número de junções ( $46,77 \pm 6,87$ ).

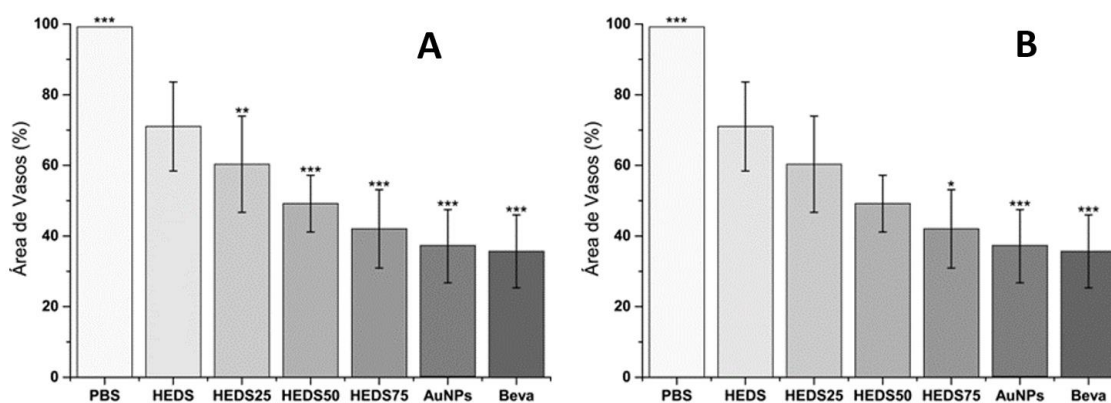
O hidrogel (HEDS), por sua vez, teve uma redução significativa dos parâmetros supracitados: (área de vasos =  $29,98 \pm 10,31\%$ ) e número de junções ( $30,11 \pm 8,27$ ), e um aumento na lacunaridade ( $0,47 \pm 0,08\Lambda$ ) ao ser comparado com o controle negativo. Percebe-se também um padrão de intensificação da antiangiogênese à medida que a quantidade de AuNPs foi acrescida. A figura 5.15 revela o gráfico com os valores comparativos entre os parâmetros geométricos dos sete grupos estudados (Controle negativo – PBS; HEDS; HEDS25, HEDS50, HEDS75, além dos grupos só com as AuNPs e o controle positivo – Beva).



**Figura 5.15** - Análise estatística que foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey ( $n = 10$ ). Os dados são representados pela média  $\pm$  DP. A área dos vasos do grupo PBS foi definida como 100%. \*Indica diferença estatística em relação ao grupo PBS (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Beva: bevacizumabe.

Ao comparar o grupo HEDS com os demais, a partir do mesmo teste ANOVA, é evidenciado que as proporções de 50ppm e 75ppm também apresentam diferenças significativas no aumento do efeito antiangiogênico. Todavia, esse

mesmo efeito não pode ser comprovado ao comparar o grupo HEDS com o HEDS25. Ou seja, constatou-se, em termos estatísticos, que as AuNPs apresentaram efeito antiangiogênico ao serem adicionadas nos HEDS apenas em concentrações maiores que 50ppm. A fim de reforçar esse argumento, evidencia-se que o grupo HEDS75 apresentou também diferenças significativas na redução da angiogênese ( $*p < 0,95$ ) ao ser comparado com o grupo HEDS25, conforme apresentando na figura 5.16 que revela as diferenças estatísticas do grupo HEDS com os demais (A) e HEDS25 com os demais (B).



**Figura 5.16** - (A) comparativo com HEDS e (B) comparativo com HEDS25  
\*Indica diferença estatística em relação ao grupo PBS ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ).

No artigo de revisão elaborado por LIU *et al.* (2017), verificou-se, em estudos clínicos humanos, que o uso do bevacizumabe pode reduzir em até 70% da área de neovascularizações corneana, especialmente se aplicada/injetada nos estágios iniciais da vascularização. Resultado esse que vai ao encontro a redução percentual encontrada no presente trabalho para o Beva ( $35,66\% \pm 10,31\%$ ). Ou seja, uma redução percentual de aproximadamente 65%. Ressalta-se aqui que as AuNPs apresentaram atividade antiangiogênica estatisticamente igual ao do Bevacizumabe ( $37,11\% \pm 10,36\%$ ). Ademais, os hidrogéis aplicados sobre a membrana corioalantóica não demonstraram sinais significativos de toxicidade, uma vez que preservaram a integridade da estrutura dos vasos

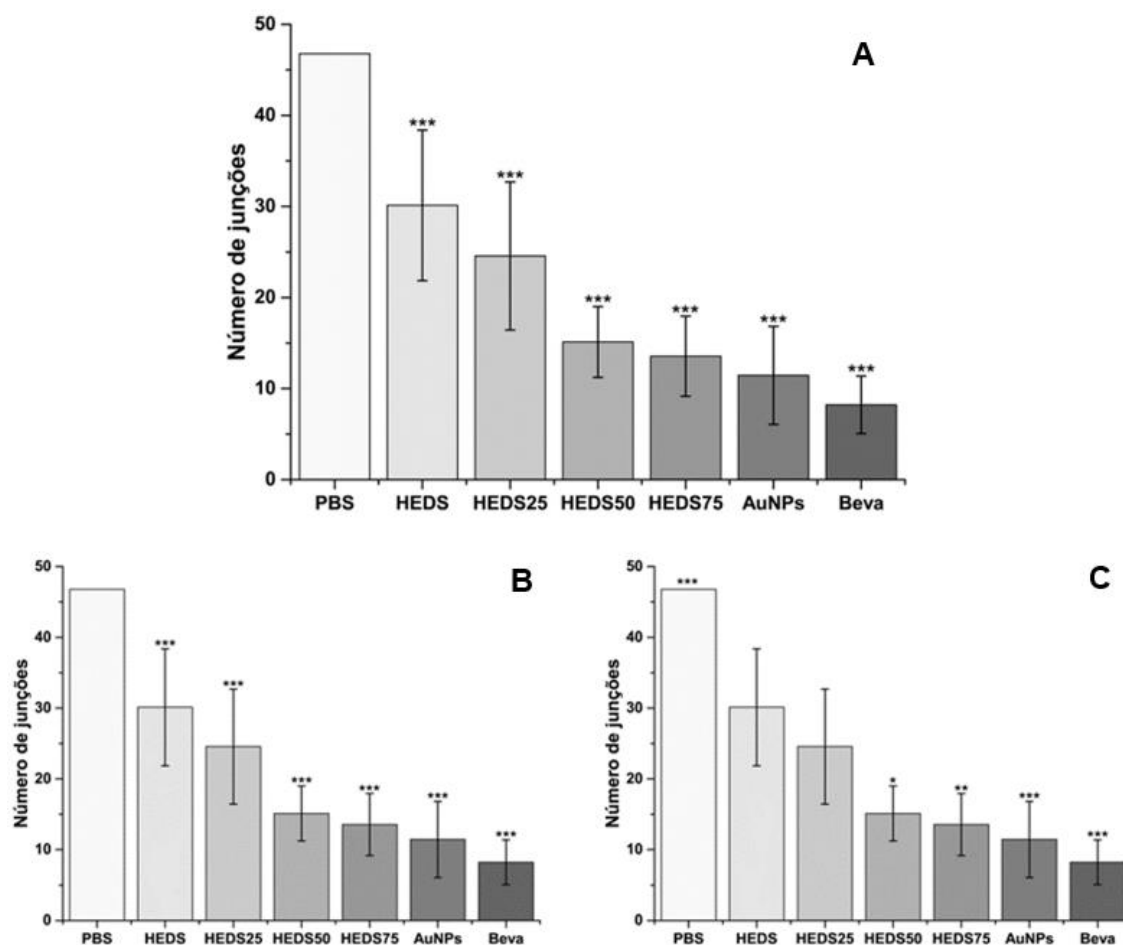
sanguíneos. A figura 5.17 apresenta três imagens da rede vascular dos embriões, sendo que a figura 5.17A refere-se ao controle negativo – PBS, a figura 5.17B ao grupo HEDS, com o hidrogel sobre a membrana corioalantoica, e figura 5.17C ao controle positivo – Bevacizumabe.



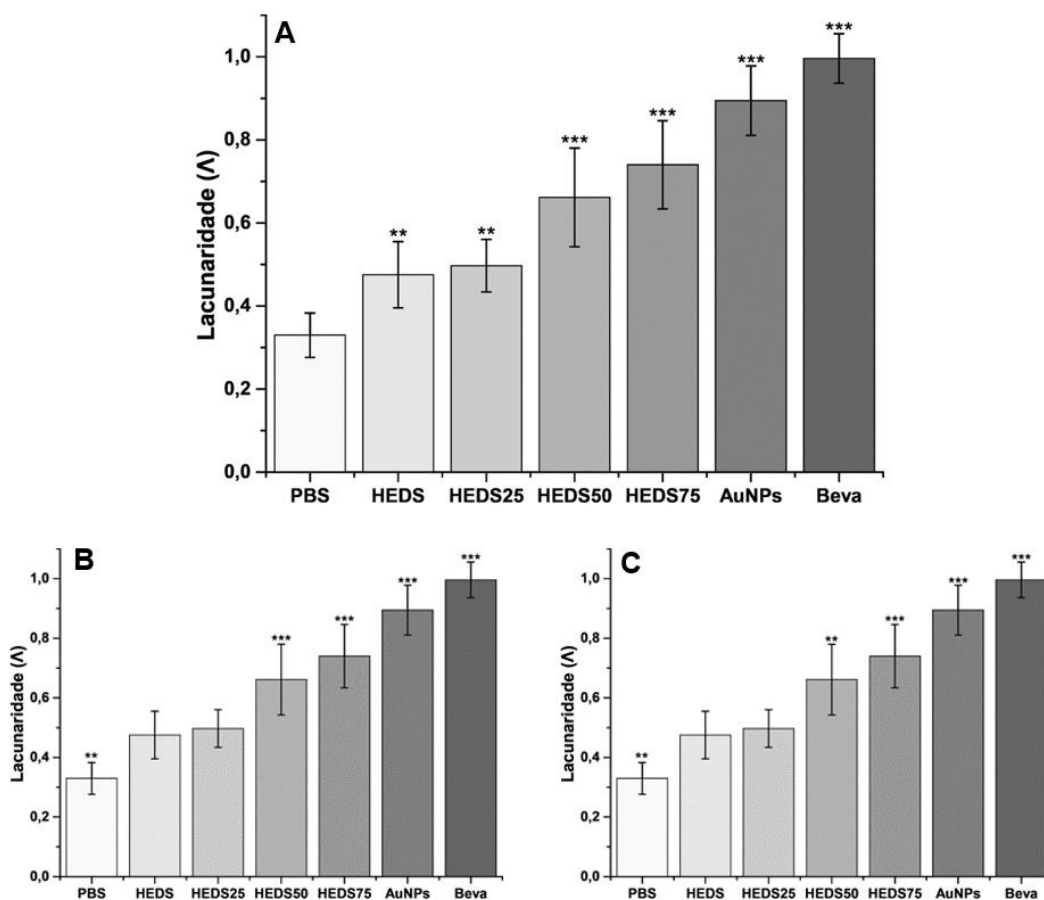
**Figura 5.17** - Imagens da resposta vascular no sétimo dia de desenvolvimento do embrião dos grupos: controle negativo – PBS (A), HEDS (B) e controle positivo - Bevacizumabe (C).

Como dito, os efeitos antiangiogênicos das nanopartículas de ouro (AuNPs) foram comprovados em diversos estudos (AZHARUDDIN et al., 2014; DARWEESH; AYOUB; NAZZAL, 2019; MASSE et al., 2019; MEEK; KNUPP, 2015; PAN et al., 2014; SPERLING et al., 2008). Nas pesquisas conduzidas por Pan *et al.* (2014), utilizando modelos *in ovo*, especificamente o modelo cório-alantoide do embrião de galinha (CAM), verificou-se que as AuNPs inibiram a formação de novos vasos sanguíneos, reduziram a complexidade total dos túbulos vasculares, o comprimento total dos vasos e o número de junções vasculares ao limitar a migração e a formação de tubos de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) induzidas pelo VEGF165, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Todavia, não foi especificada a quantidade de nanopartículas utilizada em cada teste. Outros parâmetros, além da redução do valor percentual da área ocupada por vasos sanguíneos, também foram analisados no presente trabalho e ratificam os efeitos antiangiogênicos das AuNPs. A figura 5.18 apresenta o comparativo amostral do número total de junções entre os vasos sanguíneos e

a figura 5.19 a lacunaridade amostral. Ou seja, como os vasos sanguíneos estão distribuídos e organizados em termos de espaços vazios entre eles. Uma lacunaridade alta indica que a rede vascular é mais irregular, com espaços vazios maiores e uma organização menos uniforme, enquanto uma lacunaridade baixa indica uma rede vascular mais densa e organizada.



**Figura 5.18** - Comparativo do número de junções do PBS com os demais grupos (A), do HEDS com os demais grupos (B) e comparativo do HEDS25 com os demais. \*Indica diferença estatística em relação ao grupo PBS (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Figura 5.19** - Comparativo da lacunaridade PBS com os demais grupos (A), do HEDS com os demais grupos (B) e comparativo do HEDS25 com os demais. \*Indica diferença estatística em relação ao grupo PBS (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Fonte: autor.

Todos os parâmetros avaliados demonstraram que o aumento da concentração de nanopartículas de ouro (AuNPs) está associado ao fortalecimento da atividade antiangiogênica. Isso se reflete no contexto em que a administração de 50 $\mu$ l de AuNPs a uma concentração de 400 $\mu$ g/mL, quando examinadas de maneira independente, exibiu resultados comparáveis, em termos de inibição da angiogênese, ao Bevacizumabe a uma concentração de 250 $\mu$ g/mL, com o mesmo volume aplicado. Contudo, vale ressaltar que com base no presente estudo, não é possível deduzir conclusivamente que exista uma relação estritamente proporcional entre a quantidade de AuNPs e o efeito antiangiogênico que elas manifestaram.

Nesse contexto, o artigo de revisão produzido por Masse *et al.* (2019), que examinou a aplicação de nanopartículas de ouro em contextos biomédicos oftalmológicos, chegou à conclusão de que a dosagem de AuNPs empregadas em diversos trabalhos é o parâmetro experimental de maior incongruência. De fato, na maioria das pesquisas analisadas, não se especifica a quantidade exata de AuNPs empregadas. Muitas vezes, apenas as concentrações ou a massa são mencionadas, sem mencionar o volume utilizado, o que torna impossível determinar o número de nanopartículas presentes. Além disso, nem sempre fica claro se a concentração se refere ao número de átomos de ouro (Au) ou às próprias nanopartículas de ouro (AuNPs) como um todo. Em algumas situações, os autores dos estudos também definem volumes de forma arbitrária, referindo-se a eles como "gotas da solução". Portanto, de acordo com o autor, não foi possível chegar a conclusões definitivas sobre a toxicidade e os efeitos antiangiogênicos das AuNPs em relação às diferentes dosagens utilizadas.

Por sua vez, Darweesh *et al.* (2019) ao divulgar um estudo de revisão sobre as aplicações biomédicas das AuNPs, constatou que a toxicidade dessas nanopartículas dependem intrinsecamente das propriedades físico-químicas, como tamanho, carga e química da superfície. Tamanhos inferiores a 5nm tendem a apresentar maior toxicidade ao serem mais facilmente internalizadas pelas células e desencadearem atividades catalíticas.

Nanopartículas de ouro, quando em exposição a células, podem ser incorporadas em compartimentos perinucleares, que são estruturas vesiculares localizadas em proximidade ao núcleo celular. A internalização das partículas resulta na exposição prolongada de células ou tecidos às nanopartículas de ouro. Em ensaios de cultura celular, tais nanopartículas têm sido classificadas como biocompatíveis e até o momento não se observou a ocorrência de citotoxicidade aguda. Importante destacar também que não foram identificadas ocorrências de liberação de íons tóxicos, especialmente em comparação com outras nanopartículas (CHO *et al.*, 2015; GRANT *et al.*, 2013; SPERLING *et al.*, 2008; VEDHANAYAGAM; NAIR; SREERAM, 2019).

Na mesma revisão feita por Masse *et al.* (2019), averiguou-se que AuNPs esféricas com diâmetro entre 50nm e 100nm mostraram ser biocompatíveis *in vitro* até uma dose de 750µg. No entanto, partículas com tamanho entre 5nm e 30nm apresentam maior toxicidade. A eficiência de internalização também foi influenciada pelo diâmetro das AuNPs, sendo que apenas as com diâmetro inferior a 30nm foram altamente internalizadas. Ou seja, partículas com diâmetro igual ou maior que 30nm tendem a ser menos citotóxicas pois há uma maior dificuldade de sua internalização. Ademais, outra conclusão desse estudo é que AuNPs com diâmetro de 20nm a 30nm, estabilizadas com citrato de sódio, penetraram em diferentes camadas de células da córnea sem causar alterações morfológicas no endotélio, podendo permanecer nessa região por tempos superiores a três meses.

Os resultados do estado da técnica, em consonância com os aqui apresentados, indicam que AuNPs esféricas com tamanho próximo a de 30nm e estabilizadas com citrato de sódio podem ter o maior potencial para aplicações biomédicas oftalmológicas, por apresentarem menor probabilidade de toxicidade, menor chance de internalização pelas células e grande potencial antiangiogênico. Esses achados destacam a importância de considerar o tamanho, forma e carga superficial das nanopartículas de ouro para sua incorporação em matrizes biossintéticas.

## 6. CONCLUSÕES

A pesquisa empreendida neste estudo constituiu um esforço importante e desafiador, com um objetivo central de desenvolver córneas biossintéticas na forma de hidrogéis, fazendo uso de estromas de córneas suínas descelularizadas. O processo foi dividido em etapas cruciais, cada uma desempenhando um papel fundamental para o êxito do projeto.

A primeira etapa foi avaliar a eficácia da descelularização das córneas suínas. A utilização da solução de SDS a 0,1% (m/v), dentre os métodos analisados, apresentou a melhor relação da preservação da matriz extracelular pela retirada do material biológico nativo. Relação essa confirmada pelas análises histológicas, quantificação de colágeno e contagem de núcleos celulares.

Na segunda etapa, procedeu-se à síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) estabilizadas com citrato de sódio, com a expectativa de obter partículas esféricas e um diâmetro médio de 30nm. Os resultados obtidos por meio de espectroscopia UV-Vis, DLS e MET confirmaram a presença de nanopartículas com morfologia e tamanho muito próximos ao que era esperado. O ensaio de DLS indicou um diâmetro hidrodinâmico médio de  $30,26 \pm 0,86$ nm para as AuNPs, enquanto a quantificação das partículas realizada por MET revelou um valor de diâmetro de  $30,46 \pm 6,21$ nm.

A etapa subsequente, que abordou o desenvolvimento de hidrogéis injetáveis a partir da matriz de estromas de córneas suínas, demonstrou ser factível a obtenção de tais hidrogéis a partir da transição sol-gel do colágeno solubilizado. O processo de descelularização, cominuição, liofilização, solubilização e hidrólise enzimática da matriz extracelular da córnea foi conduzido com sucesso, preservando a estrutura de tal forma que permitiu a formação de uma rede polimérica reticulada após a adição de uma solução contendo CMC + NHS. A transmitância dos hidrogéis, sem adição de AuNPs, ao ser comparado com o estado da arte, mostrou-se superior aos de córneas nativas.

A parte central de investigação foi focada no desenvolvimento e caracterização de hidrogéis injetáveis compósitos, com diferentes concentrações de nanopartículas de ouro (25ppm, 50ppm e 75ppm em razão mássica), avaliando



as características mecânicas, a citotoxicidade e a inibição da angiogênese. Estes parâmetros revestem-se de importância fundamental na avaliação da segurança e do potencial de eficácia desses materiais para futuras aplicações na regeneração de córneas.

A avaliação das propriedades mecânicas, conduzida por meio do ensaio de DMA, revelou uma correlação clara entre o aumento da concentração de AuNPs com o aumento do módulo de elasticidade, para as amostras submetidas a uma tensão oscilante de compressão em PBS à 37°C, até atingir a proporção de 75ppm. Esses resultados sugerem que a incorporação dessas nanopartículas tem o potencial de aprimorar a resistência dos hidrogéis derivados dos estromas de córneas suínas. Especificamente, a adição de 75ppm de AuNPs resultou em um aumento de aproximadamente 75% no módulo de elasticidade dos hidrogéis, quando esses foram submetidos a uma frequência de oscilação de carga de 10Hz.

O ensaio de viabilidade celular, conduzido por meio do método de resazurina, não revelou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e as diversas amostras, o que indica que as matrizes desenvolvidas não são citotóxicas para a linhagem celular utilizada (Fibroblastos dérmicos humanos). O ensaio de CAM demonstrou de maneira evidente um efeito de inibição na angiogênese, refletido na redução da porcentagem de área vascular e na diminuição do número de junções vasculares, ao mesmo tempo que houve um aumento na lacunaridade, à medida que se incrementou a concentração de AuNPs, chegando à proporção máxima de 75ppm.

Por fim, as córneas biossintéticas, embora tenham demonstrado uma redução na transmitância de luz na faixa associada à maior banda de absorção das AuNPs, ainda exibiram propriedades óticas e mecânicas que as tornam adequadas para serem consideradas em aplicações oftalmológicas. No entanto, para validar plenamente o seu potencial como substitutos viáveis para tecidos corneanos humanos, é crucial realizar estudos mais aprofundados sobre o comportamento desses materiais em ambientes *in vivo*.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudos mais aprofundados para determinar a proporção ideal de nanopartículas de ouro que podem ser incorporadas na matriz do hidrogel sem afetar sua biocompatibilidade e propriedades óticas. Isso envolverá a análise detalhada da relação entre a concentração de nanopartículas de ouro e as características do material.
- Realizar testes *in vivo* para avaliar o comportamento e a biofuncionalidade das córneas bio sintéticas. Além disso, investigar o tempo de degradação do material em condições fisiológicas para determinar a sua durabilidade.
- Pesquisar técnicas de dispersão das nanopartículas de ouro na matriz do hidrogel para garantir uma distribuição homogênea. Avaliar como essa melhoria na dispersão influencia as propriedades biomecânicas do material, como elasticidade e resistência.
- Investigar o efeito da utilização de nanopartículas de ouro com formatos alternativos, como estrelas ou bastões, nas propriedades biomecânicas e óticas das córneas bio sintéticas.
- Realizar testes de degradação térmica para avaliar como as córneas bio sintéticas com nanopartículas de ouro respondem a condições de temperatura, o que é particularmente importante para o armazenamento e uso clínico.
- Expandir a pesquisa para desenvolver córneas bio sintéticas usando outras fontes de tecido ricas em colágeno, como a pele. Isso pode aumentar as opções disponíveis para o desenvolvimento de órgãos e tecidos bio sintéticos.

## Referências Bibliográficas

AHN, J. IL et al. Crosslinked collagen hydrogels as corneal implants: Effects of sterically bulky vs. non-bulky carbodiimides as crosslinkers. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7796–7805, 2013.

AKTURK, O. et al. Collagen / gold nanoparticle nanocomposites : A potential skin wound healing biomaterial. **Biomaterials applications**, v. 31, n. 2, p. 283–301, 2016.

ALIÓ DEL BARRIO, J. L. et al. Corneal stroma regeneration: Preclinical studies. **Experimental Eye Research**, v. 202, p. 108314, 2021.

ALMEIDA, H. G. et al. A 15-Year Review of Corneal Transplant in Brazil. **Eye & contact lens**, v. 44, p. S376–S381, 2018.

ALMEIDA, H. G. **Transplante de córnea no Brasil: progresso e dificuldades em 16 anos**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2018. 83p. (Tese, Doutorado em Ciências).

ALMEIDA, H. G.; KARA-JUNIOR, N. Critical analysis of the different data sources on corneal transplantation in Brazil. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 77, n. 3, p. 142–145, 2018.

JOANITTI, Graziella Anselmo; MORAIS, Paulo César de; AZEVEDO, Ricardo Bentes de (org.). **Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2022. 517 p.

ANTOINE, E. E.; VLACHOS, P. P.; RYLANDER, M. N. Review of collagen i hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: Characterization of mechanics, structure, and transport. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 20, n. 6, p. 683–696, 2014.

ARYAL, S. et al. Immobilization of collagen on gold nanoparticles : preparation , characterization , and hydroxyapatite growth. p. 4642–4648, 2006.

AZHARUDDIN, M. et al. Corneal penetration of gold nanoparticles - Therapeutic implications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 8, p. 5669–5675, 2014.

BHATTACHARJEE, P.; AHEARNE, M. Significance of crosslinking approaches in the development of next generation hydrogels for corneal tissue engineering. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 1–24, 2021.

BRUNETTE, I. et al. Alternatives to eye bank native tissue for corneal stromal replacement. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 59, p. 97–130, 2017.

CAMMARATA, C. R.; HUGHES, M. E.; OFNER, C. M. Carbodiimide induced cross-linking, ligand addition, and degradation in gelatin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 783–793, 2015.

CHO, W. K. et al. Topically administered gold nanoparticles inhibit experimental corneal neovascularization in mice. **Cornea**, v. 34, n. 4, p. 456–459, 2015.

COURA, M. et al. Como Obter Nanopartículas De Ouro Usando Suco De Limão?

**Química Nova**, v. 41, n. 5, p. 533–539, 2018.

CRAPO, P.; GILBERT, T.; BADYLAS, S. an Overview of Tissue and Whole. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2012.

DARWEESH, R. S.; AYOUB, N. M.; NAZZAL, S. Gold nanoparticles and angiogenesis: Molecular mechanisms and biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 7643–7663, 2019.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 37, n. 3, p. 588–598, 2011.

DINESCU, S. et al. Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. p. 1643–1664, 2019.

DOURADO, L. F. N. **EFEITO NEUROPROTETOR DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA ARANHA ARMADEIRA (*Phoneutria nigriventer*) EM DOENÇAS DA RETINA**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2021. 199p. (Tese, Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

DOYEN, M.; BARTIK, K.; BRUYLANTS, G. UV-Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold-citrate aggregates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 399, p. 1–5, 2013.

DRUFFEL, T. et al. The role of nanoparticles in visible transparent nanocomposites. **Nanophotonic Materials V**, v. 7030, n. 70300, p. 70300F, 2008.

FAVI, P. M. et al. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 11, p. 3449–3462, 2015.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; AHEARNE, M. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

FLAXMAN, S. R. et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 12, p. e1221–e1234, 2017.

GAETANI, R. et al. Evaluation of different decellularization protocols on the generation of pancreas-derived hydrogels. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 24, n. 12, p. 697–708, 2018.

GAIN, P. et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. **JAMA Ophthalmology**, v. 134, n. 2, p. 167–173, 2016.

GONZALEZ-ANDRADES, M. et al. Generation of Bioengineered Corneas with Decellularized Xenografts and Human Keratocytes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2011.

GOODARZI, H. et al. Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 620–632, 2019.

- GRANT, S. A. et al. Assessment of the biocompatibility and stability of a gold nanoparticle collagen bioscaffold. p. 1–8, 2013.
- GUAN, L. et al. Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture. **Journal of molecular histology**, v. 44, n. 5, p. 609–618, 2013.
- GUO, C. et al. Gold nanoparticle-doped silk film as biocompatible SERS substrate. **RSC Advances**, v. 5, n. 3, p. 1937–1942, 2015.
- HARA, H.; COOPER, D. K. C. Xenotransplantation-the future of corneal transplantation? **Cornea**, v. 30, n. 4, p. 371–378, 2011.
- HASDA, A. M. et al. Graphene oxide reinforced nanocomposite oleogels improves corneal permeation of drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, n. August, p. 102024, 2020.
- HATAMI-MARBINI, H.; ETEBU, E. Hydration dependent biomechanical properties of the corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 116, p. 47–54, 2013a.
- HATAMI-MARBINI, H.; ETEBU, E. An experimental and theoretical analysis of unconfined compression of corneal stroma. **Journal of Biomechanics**, v. 46, n. 10, p. 1752–1758, 2013b.
- HATAMI-MARBINI, H.; ETEBU, E.; RAHIMI, A. Swelling pressure and hydration behavior of porcine corneal stroma. **Current Eye Research**, v. 38, n. 11, p. 1124–1132, 2013.
- HATAMI-MARBINI, H.; RAHIMI, A. Collagen cross-linking treatment effects on corneal dynamic biomechanical properties. **Experimental Eye Research**, v. 135, p. 88–92, 2015.
- HE, Z. et al. Cutting and decellularization of multiple corneal stromal lamellae for the bioengineering of endothelial grafts. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 57, n. 15, p. 6639–6651, 2016.
- HOLLAND, G. et al. Artificial Cornea: Past, Current, and Future Directions. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. November, p. 1–19, 2021.
- HORI, J. et al. Immune privilege in corneal transplantation. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 72, n. January, p. 100758, 2019.
- HUSSAIN, M. H. et al. Synthesis of Various Size Gold Nanoparticles by Chemical Reduction Method with Different Solvent Polarity. **Nanoscale Research Letters**, v. 15, p. 140–150, 2020.
- ISIDAN, A. et al. Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives. **Xenotransplantation**, v. 26, n. 6, p. 1–8, 2019.
- ISLAM, M. M. et al. Biomaterials-enabled cornea regeneration in patients at high risk for rejection of donor tissue transplantation. **Regenerative Medicine**, v. 3, n. 1, 2018.
- JAYASURIYA, A. C. et al. A study of piezoelectric and mechanical anisotropies of the human cornea. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 4, p. 381–387, 2003.

KAMIJI, D. **O USO DE TACROLIMUS 0,02% TÓPICO NA PREVENÇÃO DE REJEIÇÃO DE TRANSPLANTE PENETRANTE DE CÓRNEA DE BAIXO RISCO**. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 2020. 42p. (Dissertação, Mestrado em Ciências).

KHAN, A. K. et al. Gold nanoparticles: Synthesis and applications in drug delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, p. 1169–1177, 2014.

KIRDAITE, G. et al. Antioxidant effects of gold nanoparticles on early stage of collagen-induced arthritis in rats. **Research in Veterinary Science**, v. 124, n. February 2018, p. 32–37, 2019.

LEANDRO, D. DE C. **Avaliação biomecânica de córneas de suínos por meio da microscopia de força atômica**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de Campinas, 2020. 42p. (Dissertação, Mestrado em Ciências).

LEITE, A. G. B. **UTILIZAÇÃO DE MATRIZ CORNEAL SUÍNA DESCELULARIZADA EM CERATOPLASTIAS**. Recife: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015. 36p. (Dissertação, Mestrado em Biociência Animal).

LI, H. et al. Natural cross-linker-stabilized acellular porcine corneal stroma for lamellar keratoplasty. **Acta Biomaterialia**, v. 114, p. 270–284, 2020a.

LI, Q. et al. Preparation and Biomechanical Properties of an Acellular Porcine Corneal Stroma. **Cornea**, v. 36, n. 11, p. 1343–1351, 2017.

LI, S. et al. Healing characteristics of acellular porcine corneal stroma following therapeutic keratoplasty. **Xenotransplantation**, v. 27, n. 2, p. 1–8, 2020b.

LI, Z. et al. A sintered graphene/titania material as a synthetic keratoprosthesis skirt for end-stage corneal disorders. **Acta Biomaterialia**, v. 94, p. 585–596, 2019.

LIU, M. **Effects of Eye-Rubbing on Corneal Biomechanical Properties THESIS**. Ohio: Ohio State University, 2013. 33p. (Tese, Doutorado em Engenharia Biomédica).

LIU, X. et al. Recent drug therapies for corneal neovascularization. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 90, n. 5, p. 653–664, 2017.

LUO, H. et al. Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6748–6759, 2013.

LYNCH, A. P.; AHEARNE, M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. **Experimental Eye Research**, v. 108, p. 42–47, 2013.

MARTINS, T. M. D. M. **Desenvolvimento E Caracterização De Córneas Humanas Descelularizadas E Recelularização Com Células-Tronco Visando Regeneração Do Epitélio Corneano Anterior**. Belo Horizonte: Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2017. 136p. (Tese, Doutorado em Ciências).

- MASSE, F. et al. Gold nanoparticles in ophthalmology. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 1, p. 302–327, 2019.
- MATTHYSSEN, S. et al. Corneal regeneration: A review of stromal replacements. **Acta Biomaterialia**, v. 69, p. 31–41, 2018.
- MEDEIROS, C. S. et al. The corneal basement membranes and stromal fibrosis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 59, n. 10, p. 4044–4053, 2018.
- MEEK, K. M.; KNUPP, C. Corneal replacement tissue. **Progress in Retinal and Eye Research**, 2015.
- MEYVIS, T. K. L. et al. A comparison between the use of dynamic mechanical analysis and oscillatory shear. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 163–168, 2002.
- MIROTSOU, M.; ABE, M.; LANZA, R. Corneal replacement tissue. In: MIROTSOU, M. **Principles of Tissue Engineering**. 5.ed. Westborough: Academic Press, 2020. cap. 61, p. 1135–1143.
- NARA, S. et al. Preservation of biomacromolecular composition and ultrastructure of a decellularized cornea using a perfusion bioreactor. **RSC Advances**, v. 6, n. 3, p. 2225–2240, 2016.
- NGUYEN, D. T. et al. Experimental measurements of gold nanoparticle nucleation and growth by citrate reduction of HAuCl<sub>4</sub>. **Advanced Powder Technology**, v. 21, n. 2, p. 111–118, 2010.
- NICHOLAS, M. P.; MYSORE, N. Corneal neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 202, n. June 2020, p. 108363, 2021.
- NUBILE, M. et al. Epithelial and stromal remodelling following femtosecond laser-assisted stromal lenticule addition keratoplasty (SLAK) for keratoconus. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021.
- OLIVEIRA, A. G. DE L. et al. Chorioallantoic membrane assays ( HET-CAM and CAM-TBS ): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 153–159, 2012.
- PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications. **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, n. 3, p. 197–220, 2009.
- PAN, Y. et al. Gold Nanoparticles Inhibit VEGF 165 -Induced Migration and Tube Formation of Endothelial Cells via the Akt Pathway. v. 2014, 2014.
- PARKER, J. S.; VAN DIJK, K.; MELLES, G. R. J. Treatment options for advanced keratoconus: A review. **Survey of Ophthalmology**, v. 60, n. 5, p. 459–480, 2015.
- ROMA-RODRIGUES, C. et al. Peptide-coated gold nanoparticles for modulation of angiogenesis in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2633–2639, 2016.
- SCHUETZ, T. et al. The microstructure of collagen type I gel cross-linked with gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 118–

125, 2013.

SHARMA, A. et al. Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 4, p. 505–513, 2011.

SILVA, A. V. D. S. **ESTUDO DAS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E MECÂNICAS DE CÓRNEAS HUMANAS VIA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2013. 59p. (Monografia, Bacharelado em Física).

SPERLING, R. A. et al. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1896–1908, 2008.

TAN, X. W. et al. Application of graphene as candidate biomaterial for synthetic keratoprosthesis skirt. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, n. 11, p. 6605–6611, 2015.

THANGAVEL, N. et al. Photocrosslinking of collagen using Ru(II)-polypyridyl complex functionalized gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 215, p. 196–202, 2019.

TIDU, A.; SCHANNE-KLEIN, M. C.; BORDERIE, V. M. Development, structure, and bioengineering of the human corneal stroma: A review of collagen-based implants. **Experimental Eye Research**, v. 200, 2020.

TYAGI, H. et al. A Facile pH Controlled Citrate-Based Reduction Method for Gold Nanoparticle Synthesis at Room Temperature. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, 2016.

ULAG, S. et al. 3D printed artificial cornea for corneal stromal transplantation. **European Polymer Journal**, v. 133, n. January, p. 109744, 2020.

VEDHANAYAGAM, M.; NAIR, B. U.; SREERAM, K. J. Effect of functionalized gold nanoparticle on collagen stabilization for tissue engineering application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1211–1220, 2019.

VIEIRA, F. **ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE PROCESSOS DE DESCELULARIZAÇÃO DE CÓRNEAS PORCINAS VISANDO A APLICAÇÃO EM TRANSPLANTES HETERÓLOGOS**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2022. 53p. (Monografia, Bacharelado em Farmácia).

WANG, F. et al. Decellularized porcine cornea-derived hydrogels for the regeneration of epithelium and stroma in focal corneal defects. **Ocular Surface**, v. 18, n. 4, p. 748–760, 2020a.

WANG, Q. et al. Modified acellular porcine corneal matrix in deep lamellar transplantation of rabbit cornea. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 34, n. 8, p. 1092–1104, 2020b.

WEEBER, H. A. et al. Dynamic mechanical properties of human lenses. **Experimental Eye Research**, v. 80, n. 3, p. 425–434, 2005.

WILSON, S. 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.

WONG, K. H. et al. Corneal blindness and current major treatment concern graft scarcity. **International Journal of Ophthalmology**, v. 10, n. 7, p. 1154–1162, 2017.

WORTHINGTON, K. S. et al. Mechanical properties of murine and porcine ocular tissues in compression. **Experimental Eye Research**, v. 121, p. 194–199, 2014.

WU, J. et al. Corneal stromal bioequivalents secreted on patterned silk substrates. **Biomaterials**, v. 35, n. 12, p. 3744–3755, 2014.

WU, Z. et al. The use of phospholipase A2 to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold. **Biomaterials**, v. 30, n. 21, p. 3513–3522, 2009.

YAZDANPANA, G. et al. In-situ porcine corneal matrix hydrogel as ocular surface bandage. **Ocular Surface**, v. 21, n. March, p. 27–36, 2021.

YOERUEK, E. et al. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. **Acta Ophthalmologica**, v. 90, n. 2, p. 125–131, 2012.

YOON, C. H.; CHOI, H. J.; KIM, M. K. Corneal xenotransplantation: Where are we standing? **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 80, p. 100876, 2021.

ZARIF, M. EL et al. Corneal Stroma Regeneration: New Approach for the Treatment of Cornea Disease. **Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)**, v. 9, n. 6, p. 571–579, 2020.

ZHOU, Q. et al. Hydrogels derived from acellular porcine corneal stroma enhance corneal wound healing. **Acta Biomaterialia**, v. 134, p. 177–189, 2021.

ZHOU, Y. et al. Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate. **Cornea**, v. 30, n. 1, p. 73–82, 2011.

ZHU, J. et al. Reconstruction of functional ocular surface by acellular porcine cornea matrix scaffold and limbal stem cells derived from human embryonic stem cells. **Tissue Engineering - Part A**, v. 19, n. 21–22, p. 2412–2425, 2013.