

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade De Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Fernanda Aparecida Silva Vieira

**TRANSPLANTE XENOGÊNICO DE CÓRNEAS SEGUIDO DE TRATAMENTO
COM RIBOFLAVINA E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA: uma alternativa promissora
para doenças da córnea**

Belo Horizonte

2025

Fernanda Aparecida Silva Vieira

**TRANSPLANTE XENOGÊNICO DE CÓRNEAS SEGUIDO DE TRATAMENTO
COM RIBOFLAVINA E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA: uma alternativa promissora
para doenças da córnea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha
Júnior

Coorientadora: Dra. Lays Fernanda Nunes
Dourado

Belo Horizonte

2025

V658t Vieira, Fernanda Aparecida Silva.
Transplante xenogênico de córneas seguido de tratamento com riboflavina e radiação ultravioleta [recurso eletrônico] : uma alternativa promissora para doenças da córnea / Fernanda Aparecida Silva Vieira. – 2025.
1 recurso eletrônico (96 f. : il.) : pdf

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.
Coorientadora: Lays Fernanda Nunes Dourado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Córnea – Teses. 2. Crosslinking corneano – Teses. 3. Riboflavina – Teses. 4. Raios ultravioleta – Teses. 5. Transplante heterólogo – Teses. 6. Ceratocone – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Dourado, Lays Fernanda Nunes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:617.719



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Realizou-se, no dia 24 de fevereiro de 2025, às 09:00 horas, na Faculdade de Farmácia da UFMG, a 416ª defesa de dissertação, intitulada TRANSPLANTE XENOGÊNICO DE CÔRNEAS SEGUIDO DE TRATAMENTO COM RIBOFLAVINA E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA PARA DOENÇAS DA CÔRNEA, apresentada por FERNANDA APARECIDA SILVA VIEIRA, número de registro 2023664890, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Dr. Armando da Silva Cunha Junior - Orientador (FAFAR/UFMG), Dra. Lays Fernanda Nunes Dourado - Coorientadora (UFMG), Prof(a). Dra. Adriana Oliveira Costa (FAFAR/UFMG), Prof(a). Dra. Caryne Margotto Bertollo (FAFAR/UFMG).

A Comissão considerou a Dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Lays Fernanda Nunes Dourado, Usuário Externo**, em 24/02/2025, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior, Membro**, em 25/02/2025, às 12:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caryne Margotto Bertollo, Professora do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3986558 e o código CRC 14D43E35.

À Lowry.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua sábia orientação. Agradeço pelas contribuições em minha formação, ensinando-me que a ciência, quando acompanhada da sabedoria, da humildade e da colaboração, frutifica.

À minha coorientadora, Dra. Lays Fernanda Nunes Dourado, pela paciência, pelo cuidado, ética, profissionalismo e disponibilidade. Pessoa que suportou todas as minhas “por quês” e sempre os respondeu.

Ao Thomas Inoue, colega de laboratório e de experimento, muito obrigada por todo apoio, principalmente nos dias de experimento, e por sempre se mostrar solícito às minhas dúvidas.

À Dra. Sílvia Fialho pelo auxílio e contribuição especial neste trabalho.

Ao Dr. Paulo Ferrara, do Centro de Saúde Ocular, que contribuiu para que este trabalho fosse desenvolvido.

À Dra. Lutiana pela contribuição e disponibilidade em ajudar.

Aos mestres e demais colegas do LTF, pelo apoio e por transmitirem o conhecimento

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.

Ao Centro de Microscopia, Célula Vet, e todos os profissionais desses laboratórios, pela prontidão e eficiência com as quais me ajudaram na realização das análises.

À Adelaide e ao Batista, pelo auxílio no trabalho com os animais e pelos momentos de descontração. Obrigada pelo carinho e pela disponibilidade.

À Luiz, meu parceiro de vida. Exemplo de resiliência e superação. Quando eu digo que não tenho mais um porquê para continuar, é você quem me ajuda a olhar para o horizonte e não desistir.

Aos meus pais, Antônio e Maria das Graças.

À Lowry, meu amor incondicional, minha alegria, minha saudade eterna. Você me ensinou sobre vida, lealdade e amor. Obrigada por tudo e por tanto. “*In memoriam*”

RESUMO

O ceratocone é uma doença que compromete a córnea humana, e em casos graves, o transplante de córnea é a única solução para restaurar a visão. Contudo, a escassez de córneas disponíveis limita esse tipo de tratamento. A córnea de porco tem se destacado como uma alternativa devido à sua fácil disponibilidade e baixa taxa de rejeição. Após o transplante xenogênico, abordagens para promover o *cross-linking* (reticulação das fibras de colágeno) do colágeno no tecido implantado têm sido testadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação de riboflavina e radiação UV em lenticulos descelularizados implantados em coelhos por ceratoplastia. Os resultados mostraram que a implantação intraestromal foi bem-sucedida, com a aplicação de riboflavina e radiação UV resultando em resultados superiores em relação à implantação sem esses tratamentos. As análises microscópicas indicaram que o tecido estava bem aderido, com fibrilas de colágeno organizadas na periferia e sem sinais de edema no grupo tratado com riboflavina e radiação UV. Conclui-se, portanto, que o uso de riboflavina e radiação UV imediatamente após o transplante é uma alternativa promissora para promover o cross-linking corneal.

Palavras-chave: cornea; lenticulo; cross-linking; riboflavina; ultravioleta; xenotransplante.

ABSTRACT

Keratoconus is a disease that affects the human cornea, and in severe cases, corneal transplantation is the only solution to restore vision. However, the scarcity of available corneas limits this type of treatment. Porcine cornea has emerged as an alternative due to its easy availability and low rejection rate. Following xenograft transplantation, approaches to promote collagen cross-linking in the implanted tissue have been tested. The aim of this study was to evaluate the application of riboflavin and UV radiation on decellularized lenticules implanted in rabbits through keratoplasty. The results showed that intrastromal implantation was successful, with riboflavin and UV radiation treatment yielding superior outcomes compared to implantation without these treatments. Microscopic analyses indicated that the tissue was well-adhered to, with collagen fibrils organized at the periphery and no signs of edema in the riboflavin and UV radiation-treated group. Therefore, it is concluded that the use of riboflavin and UV radiation immediately after transplantation is a promising alternative to promote corneal cross-linking.

Keywords: cornea; lenticule; cross-linking; riboflavin; ultraviolet; xenotransplant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Número de Pacientes em Lista de Espera De Córneas no Brasil 2014-2023	17
Figura 2: Desenho esquemático do bulbo ocular	19
Figura 3: Histologia da córnea humana	20
Figura 4 - Imagem ilustrativa do Anel de Ferrara	25
Figura 5: Imagem do olho de um coelho com lenticulo implantado	29
Figura 6: Prováveis mecanismos da excitação da riboflavina pela UVA.....	40
Figura 7: Imagem ilustrativa do Estroma Corneano pós descelularização.....	44
Figura 8: Avaliação macroscópica, histológica e por microscopia de transmissão de Estromas	47
Figura 9: Imagem do procedimento de ceratoplastia para implante de lenticulo.....	53
Figura 10: Marcação Dos Grupos.....	55
Figura 11: Imagem De Um Globo Ocular Enucleado No 60º Dia Pós Implante Do Lenticulo	57
Figura 12: Exame de Lâmpada de Fenda	59
Figura 13:Imagens AS-OCT.....	61
Figura 14: Topografia da Córnea	63
Figura 15: Imagens Histológicas Com Coloração Por H&E.....	65
Figura 16: Imagens de Microscopia eletrônica De Transmissão.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos principais métodos de descelularização.....	33
Tabela 2 - Parâmetros avaliados nas medições de topografia corneana.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, LISTAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
ABTO	Associação Brasileira de Transplantes
ARVO	Associação Para Pesquisa Oftálmica e Visual
BSS	do inglês <i>Balanced Salt Solution</i>
CB	Conselho Brasileiro de Oftalmologia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CS	do inglês <i>Corneal Stroma</i>
CK	do inglês <i>Keratoconus</i>
CLX	do inglês <i>Cross-linking</i>
DALK	Ceratoplastia Lamelar Anterior Profunda
DM	do inglês <i>Descemet's membrane</i>
DF	Distrofia de Fuchs
DP	Desvio padrão
EC	Estroma corneano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
HS	Horas
H&E	Hematoxilina e eosina
HSV-1	Herpes simples tipo 1
HSV-2	Herpes simples tipo 2
ILCs	Células linfoides inatas
IRF	Índice de irregularidade da superfície
L	Lenticulo
LC's	Células de Langherans
M	Molar
MAS	Módulo de segmento anterior
MC's	Mastócitos
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MIN	Minutos
MM	Milímetros
NK	do inglês <i>Natural killer</i>
NaCl	Cloreto de sódio

LISTA DE ABREVIATURAS, LISTAS E SIMBOLOS

O ₂	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/v	Peso/Volume
PBS	Solução tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Ceratoplastia penetrante
RB	Riboflavina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SUS	Sistema único de saúde
UV	Ultravioleta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
v/v	Volume/Volume
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISAO BIBLIOGRAFICA	18
2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA DO OLHO	18
2.2	A CÓRNEA.....	19
2.3	PRINCIPAIS DOENÇAS QUE ACOMETEM A CÓRNEA	22
2.4	CERATOCONE.....	23
2.5	MANEJO CIRÚRGICO DO CERATOCONE	24
2.6	BIOENGENHARIA DE TECIDOS E O TRANSPLANTE HETERÓLOGO DE CÓRNEAS.....	26
2.7	TRANSPLANTE XENOGÊNICO DE CÓRNEAS.....	27
2.8	DESCELULARIZAÇÃO DE ESTROMAS CORNEANOS PORCINOS.....	29
2.9	TÉCNICAS DE DESCELULARIZAÇÃO DA CÓRNEA.....	30
2.10	MÉTODOS QUÍMICOS DE DESCELULARIZAÇÃO	31
2.10.1	DETERGENTES.....	31
2.10.2	ÁCIDOS E BASES	31
2.10.3	AGENTE QUELANTE	32
2.11	MÉTODOS FÍSICOS DE DESCELULARIZAÇÃO.....	32
2.12	MÉTODOS BIOLÓGICOS DE DESCELULARIZAÇÃO	33
2.13	SÉRUM.....	33
2.14	PRINCIPAIS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA AVALIAR A DESCELULARIZAÇÃO E A ADESÃO DO TECIDO NO HOSPEDEIRO.....	36
2.14.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	36
2.14.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	37
2.14.3	TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA ANTERIOR (AS-OCT)	37
2.14.4	TOPOGRAFIA DA CÓRNEA	38
2.15	CROSS-LINKING DA CÓRNEA E RADIAÇÃO-UV	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41

3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3.2.1	PARTE I: DESCELULARIZAÇÃO DOS ESTROMAS PORCINOS	41
3.2.2	PARTE II: TRANSPLANTE XENOGÊNICO DE LENTÍCULOS PORCINOS DESCELULARIZADOS	41
PARTE I: DESCELULARIZAÇÃO DOS ESTROMAS PORCINOS.....		42
4	INTRODUÇÃO	43
5	MÉTODOS.....	43
5.1.1	DESCELULARIZAÇÃO DE ESTROMAS PORCINOS	43
5.1.2	AVALIAÇÃO DA TRANSPARÊNCIA DOS ESTROMAS DESCELULARIZADOS.....	44
5.1.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS ESTROMAS DESCELULARIZADOS	44
5.1.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	45
6	RESULTADOS	46
6.1.1	AVALIAÇÃO DA TRANSPARÊNCIA E ESTRUTURA MICROSCÓPICA.....	46
6.1.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	46
7	DISCUSSÃO	48
PARTE II: TRANSPLANTE XENOGÊNICO DE CÓRNEAS SEGUIDO DE TRATAMENTO COM RIBOFLAVINA E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....		49
8	INTRODUÇÃO	50
9	MÉTODOS.....	51
9.1	PREPARO DOS LENTÍCULOS CORNEANOS PORCINOS	51
9.2	IMPLANTAÇÃO DOS LENTÍCULOS POR CERATOPLASTIA INTERLAMELAR	51
9.2.1	ANIMAIS.....	51
9.2.2	TRANSPLANTE DOS LENTÍCULOS POR CERATOPLASTIA INTERLAMELAR.....	52
9.2.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	53
9.2.4	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	55
9.2.5	TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA DO SEGMENTE ANTERIOR (AS-OCT)	56

9.2.6	TOPOGRAFIA DA CÓRNEA	56
9.2.7	HISTOLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	57
9.2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
10	RESULTADOS.....	58
10.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	58
10.1.1	TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA DO SEGMENTO ANTERIOR (AS-OCT)	60
10.1.2	TOPOGRAFIA DA CÓRNEAS PÓS TRANSPLANTE HETERÓLOGO	62
10.1.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	64
10.1.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	66
11	DISCUSSÃO	68
12	CONCLUSÃO.....	71
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

A córnea é a barreira inicial do olho para o meio ambiente, protegendo seus tecidos internos de traumas, microrganismos, produtos químicos, radiação, entre outros (DI GIROLAMO, 2024). Diversas doenças, como o Ceratocone, podem lesar a córnea e acarretar a redução ou perda total da acuidade visual, acarretando a alta demanda pelo transplante de córneas, uma vez que o tratamento farmacológico, somente, não é capaz de reverter ou minimizar o agravamento do quadro clínico. O fornecimento deste tecido pelo Banco de Olhos dos Estados Unidos, no ano de 2022, teve uma redução de 3,3% comparado com o ano de 2021, o que pode ter ocorrido devido à falta de solução conservadora a longo prazo (MATHEWS et al., 2023).

No Brasil (**Figura 1**), segundo o Conselho Brasileiro de Oftalmologia (CBO), o número de pacientes na fila de transplante de córneas passou de 10.734, em 2014, para 26.905, em 2023, sendo que a pandemia do Covid-19 contribuiu significativamente para este aumento no número de pessoas que esperam por um transplante (Conselho Brasileiro De Oftalmologia, 2024).

Figura 1: Número de Pacientes em Lista de Espera De Córneas no Brasil 2014-2023

Número de Pacientes em Lista de Espera de Córnea no Brasil - Cadastro Técnico*										
<i>(estratificado por estado) 2014-2023</i>										
Estados	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
AC	0	21	8	17	25	49	35	77	101	142
AL	121	153	191	188	219	252	286	386	432	476
AM	269	180	62	33	59	4	52	23	37	61
AP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BA	1.100	1.250	1.179	950	801	626	797	997	1.217	1.384
CE	640	726	191	39	72	61	87	159	143	211
DF	181	102	119	211	317	299	389	398	466	643
ES	125	140	83	93	147	284	402	502	787	1.092
GO	832	786	659	116	142	469	834	1.166	1.513	1.591
MA	745	765	807	649	475	573	672	745	851	796
MG	760	964	1.280	1.999	1.344	1.448	1.844	2.580	3.162	3.633
MS	24	34	70	51	143	163	226	276	351	337
MT	152	198	247	152	198	302	338	221	265	337
PA	894	1.050	1.118	1.022	880	961	1.020	1.178	1.179	946
PB	234	308	386	401	370	409	495	328	263	350
PE	86	259	281	62	125	173	431	776	1.059	1.272
PI	356	381	406	376	351	394	408	428	372	425
PR	369	357	144	72	132	311	567	818	1.109	1.281
RJ	1.346	1.424	1.310	1.980	1.249	1.496	2.027	2.898	3.759	4.274
RN	55	66	149	180	201	296	378	479	541	584
RO	46	48	132	137	164	208	259	301	312	326
RR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RS	52	45	59	67	119	187	502	855	1.158	1.299
SC	353	127	70	70	163	137	390	463	479	354
SE	76	150	199	190	168	211	305	334	304	311
SP	1.918	3.152	3.715	3.215	2.753	2.835	3.515	3.631	3.961	4.587
TO	0	0	0	24	59	64	78	115	125	193
Brasil	10.734	12.686	12.865	12.294	10.676	12.212	16.337	20.134	23.946	26.905

Fonte: Reproduzido de CBO (2024)

A alta demanda associada a escassez do número de córneas para transplantes no mundo tem levado a medicina regenerativa a se dedicar ao estudo de possíveis substitutos para o transplante

alogeno de córneas (Isidan et al., 2021; Wilson et al., 2016). Dentre as estratégias testadas para suprir esta demanda, está o uso de tecidos xenogênicos previamente descelularizados para se evitar reações de rejeição primaria, incompatibilidade e biotoxicidade (GRIFFITH et al., 1999; MIMURA et al., 2008; WILSHAW et al., 2006). Pesquisas realizadas têm demonstrado que córneas porcinas descelularizadas possuem grande potencial para serem utilizadas como substitutas da cornea humana pois elas apresentam biocompatibilidade adequada e fornecem um arcabouço para o repovoamento celular com células do receptor deste tecido (Yoeruek et al., 2012)

Com o intuito de melhorar a regeneração e a reorganização das fibras de colágeno da córnea após o transplante, a solução t pica de riboflavina combinada com radiação ultravioleta (UV) tem-se mostrado bastante promissora. Esta abordagem é eficaz devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SANTHIAGO; RANDLEMAN, 2021). Quando a riboflavina é exposta à luz ultravioleta (UV), liberta ROS, que agem facilitando a ligação cruzada das fibrilas de colágeno no tecido transplantado (WU et al., 2021).

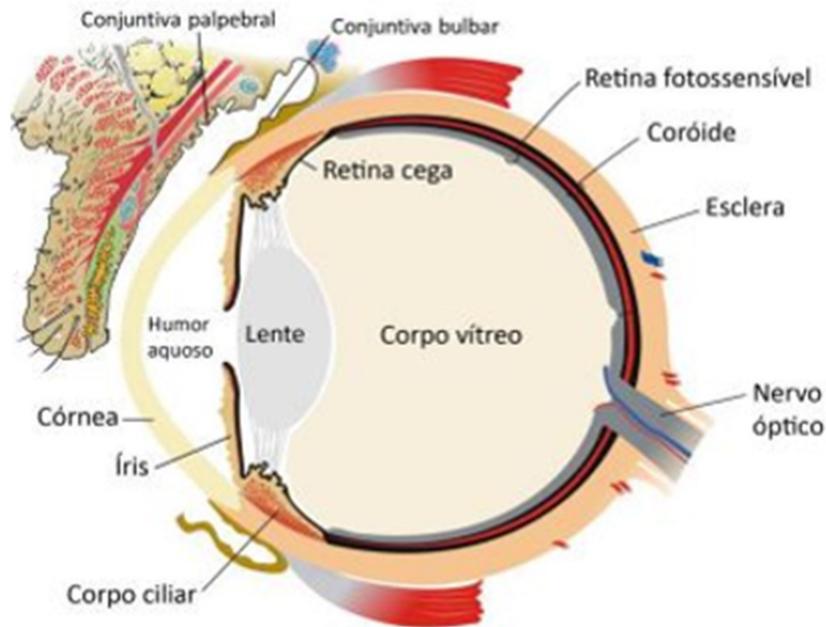
Com base nestes fatos, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do transplante heterólogo de l ntculas porcinas descelularizadas para o estroma corneano de coelhos, seguido da aplicação t pica de solução de riboflavina e radiação UV.

2 REVISAO BIBLIOGRAFICA

2.1 Anatomia e fisiologia do olho

O olho humano é um dos órgãos mais complexos e especializados do corpo humano, desempenhando um papel fundamental na captação das informações trazidas pela luz e transformando-as em impulsos que serão decodificados pelo sistema nervoso central (RAMOS, 2006). Este  rg o é composto por três camadas, a camada externa composta pela córnea e a esclera, camada média onde se localizam a íris, o corpo ciliar e a camada interna composta pela retina (**Figura 2**) (WILLOUGHBY et al., 2010).

Figura 2: Desenho esquemático do bulbo ocular



Fonte: Adaptado e autorizada reprodução de Nogueira (2015).

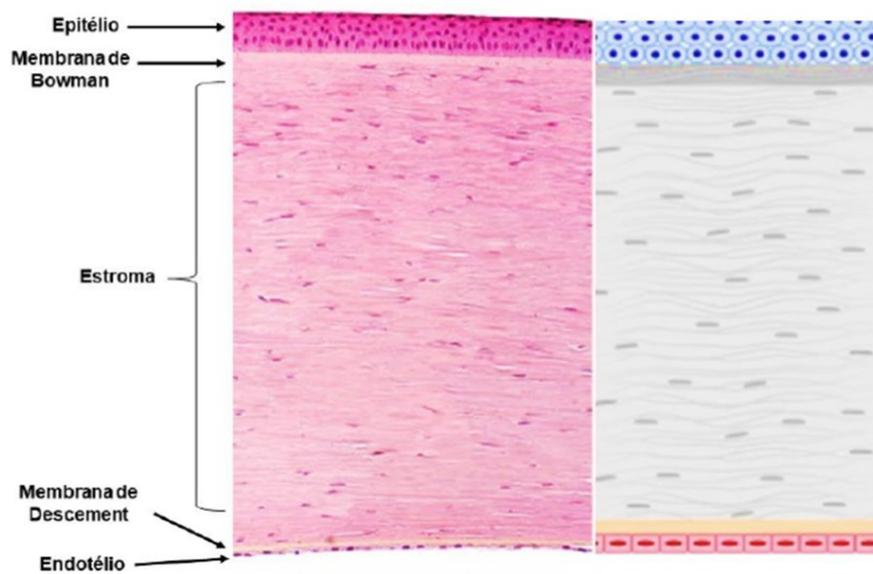
2.2 A córnea

A córnea constitui a barreira inicial do olho para o meio externo, protegendo-o de traumas, exposição à radiação, micróbios, produtos químicos e poluentes (DI GIROLAMO, 2024). Por se tratar de um tecido transparente e possuir uma curvatura natural, a córnea além de ser uma das estruturas que a luz percorre para chegar até a retina, também possui grande resistência às deformações e forças de tração. Essa transparência se deve à ausência de vasos linfáticos e sanguíneos e sua resistência ocorre devido à sua constituição rica em fibras colágenas (KAZAILI; GERAGHTY; AKHTAR, 2019; NOGUEIRA, 2015).

A superfície anterior da córnea é convexa e esférica uma vez que a curvatura deste tecido não é uniforme e possui um aumento gradual da espessura da região central para periferia devido a um aumento nas fibras de colágeno que compõem o estroma (KRACHMER; MANNIS; HOLLAND, 2011). A espessura da córnea central, em olhos com ausência de anomalias, varia de 551 a 565 μm , enquanto a cornea periférica possui uma curvatura entre 612 e 640 μm . Estes dados são de extrema importância para avaliar o desenvolvimento de algumas patologias, como o Ceratocone, e possíveis intervenções cirúrgicas (FEIZI et al., 2014).

A composição da córnea se dá por componentes celulares e acelulares. Os componentes celulares são os ceratócitos, as células epiteliais e as endoteliais. Já as fibras de colágeno e os glicosaminoglicanos constituem os componentes acelulares. Com relação à composição estrutural deste tecido (**Figura 3**), ele é composto por cinco camadas: o epitélio anterior ou corneano, a membrana limitante anterior ou camada de Bowman, o Estroma ou substância própria, a membrana Descemet e o endotélio ou epitélio posterior (DELMONTE; KIM, 2011).

Figura 3: Histologia da córnea humana



Legenda: É possível observar as cinco camadas da córnea: Epitélio; Membrana de Bowman; Estroma; Membrana Descemet e Endotélio (DOURADO, 2021)

O epitélio anterior ou corneano é escamoso, estratificado, não queratinizado e é constituído por uma camada multicelular regeneradora. Essa regeneração ocorre ao longo da vida por meio de suas células tronco, que se desenvolvem e tornam esta camada mais espessa na periferia onde ocorre a transição corneconjuntiva (DI GIROLAMO, 2024). Com relação às características morfológicas deste epitélio, elas devem ser adaptadas tanto para a transparência quanto para a correta difração da luz que incide sobre toda a córnea. Ademais, ele possui uma abundante inervação sensitiva o que explica a grande sensibilidade da córnea (DELMONTE; KIM, 2011). Logo abaixo do epitélio está localizada a camada de bowman ou membrana limitante anterior do epitélio da córnea. Trata-se de uma membrana transparente com espessura entre 6 e 15 μm , formada por microfibrilas de colágeno principalmente dos tipos I e II, aleatoriamente dispostas (PARKER; DOCKERY; MELLES, 2020). Esta membrana não possui capacidade de

regeneração, o que faz com que quando lesada, haja a formação de uma cicatriz fibrosa opaca que pode comprometer a visão (NOGUEIRA, 2015).

Logo abaixo e promovendo suporte estrutural ao epitélio corneano, está localizado o Estroma Corneano (EC). Essa camada compreende entre 80 e 85% da espessura da córnea e abriga os queratócitos residentes que sintetizam e depositam colágeno (DI GIROLAMO, 2024). O EC é formado por múltiplas camadas de fibras de colágeno sendo as do tipo I as mais abundantes. No entanto também estão presentes outros tipos de colágeno como o V e o VI (MA et al., 2018). A substância fundamental do estroma é formada por proteoglicanos, que são proteínas que desempenham um importante papel na organização e espaçamento entre as fibras de colágeno (AHEARNE, 2020). Nesta camada também se encontram linfócitos, que são responsáveis pela resposta imunológica e neurônios responsáveis pela resposta sensorial. (DI GIROLAMO, 2024; DOWNIE et al., 2023).

Já a membrana Descemet é constituída por uma camada acelular, hialina e espessa. Contém fibras de colágeno e glicoproteínas e localiza-se entre o estroma e o endotélio (DELMONTE; KIM, 2011). Por fim, a cornea possui a camada endotelial que é responsável por manter sua hidratação e transparência. A hidratação é mantida através de bombas de Na⁺ e K⁺ ATPase que transportam água para o interior da córnea (DI GIROLAMO, 2024). Ademais, esta camada também é responsável por suprir o EC com nutrientes que passam pelo endotélio a partir do humor aquoso (FISCHBARG, 2005).

Por ser uma estrutura complexa e de extrema importância para a visão, a córnea tem diversas células imunes residentes que lhe conferem uma complexa resposta imune. Essa imunogenicidade é conferida por macrófagos, células de Langherans (LCs), mastócitos (MCs), linfócitos e células linfoides inatas (ILCs) que juntas permitem que a córnea responda às agressões ambientais (LIU; LI, 2021). As LCs residem no epitélio límbico e conjuntival da córnea sendo a primeira linha de defesa imunológica da superfície ocular. Estas células transportam o antígeno de histocompatibilidade de Classe II responsável pela rejeição de aloenxertos (GILLETTE; CHANDLER; GREINER, 1982). Já os MCs estão envolvidos em reações inflamatórias induzidas por lesões corneanas, enquanto os linfócitos participam da defesa imunológica pois participam da homeostase da superfície ocular e atuam no reparo de feridas da córnea (LIU & LI, 2021; NOGUEIRA, 2015; RAMIREZ ET AL., 2015).

Já as ILCs residem na cornea e formam um subconjunto de células Natural Killer (NK) clássicas, evitando o recrutamento excessivo de neutrófilos e consequentemente dano irreparável ao tecido corneano (LIU & LI, 2021).

2.3 Principais doenças que acometem a córnea

Doenças que acometem a córnea estão entre as principais causas de cegueira e entre as principais alternativas terapêuticas está o transplante homólogo de córneas. No entanto o número de córneas disponíveis para transplantes, provenientes de indivíduos falecidos recentemente, não são suficientes para suprir a alta demanda por este tecido em todo o mundo (BONFADINI et al., 2014). Dentre as principais doenças que acometem a córnea estão as ceratites, Herpes Ocular, Distrofia de Fuchs, Distrofia em Trelença e o Ceratocone.

A ceratite é uma doença que acomete a cornea de natureza infecciosa, na maioria dos casos, sendo causada por bactérias, fungos, protozoários e vírus. Essa patologia decorre de um defeito epitelial da córnea com conseqüente infiltrado corneano, acompanhado de dor intensa e progressiva que pode resultar em perda parcial ou total da visão resultando, assim, em uma necessidade de transplante (STAPLETON, 2023). Já a ceratite não infecciosa pode estar relacionada a uma grande variedade de causas sistêmicas ou decorrentes de desordens no próprio globo ocular, mas a maior predominância está relacionada a origem autoimune (SHARMA, 2001).

O herpes simples ocular, causada pelo vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) e pelo tipo 2 (HSV-2) também pode ocasionar a ceratite corneana epitelial na qual ocorre inflamação da camada superficial da córnea e a ceratite estromal em que a inflamação ocorre no EC (BARKER, 2008). Assim como a ceratite não inflamatória, a distrofia corneana abrange um grupo heterogêneo de processos não inflamatórios da córnea, geneticamente determinadas e restritas a este tecido. Elas podem ser classificadas em distrofias da córnea anterior (afetam o epitélio da córnea e sua membrana basal ou camada de Bowman), distrofias da córnea estromal (acomete o estroma corneano) e distrofias da córnea posterior (atingem a membrana Descemet e o endotélio da cornea) (KLINTWORTH, 2009).

A Distrofia de Fuchs (DF) decorre da deterioração gradual da camada mais interna do epitélio corneano e seus sintomas se desenvolvem com o envelhecimento. Alguns pesquisadores descrevem a DF como uma patogenia com predileção feminina e padrão de herança autossômico recessivo (HAROLD CROSS ET AL., 1971; LIPMAN et al., 1990). Já a Distrofia de Trelença ou Lattice trata-se de uma doença hereditária do olho caracterizada por deposição amiloide na córnea central, principalmente, resultando em perda progressiva da visão (MOSHIRFAR et al., 2022).

2.4 Ceratocone

O ceratocone (do inglês *Keratoconus*, sigla CK) consiste em uma ectasia que acomete a córnea dando a esta o formato de cone. É uma doença bilateral e assimétrica que resulta em adelgaçamento e aumento progressivo da córnea tendo como consequência o astigmatismo irregular e a diminuição da acuidade visual (SANTODOMINGO-RUBIDO et al., 2022). Essa condição afeta 1 em cada 2.000 pessoas no mundo é uma das principais causas de transplante de córnea (BRADFORD et al., 2023). Uma vez que esta desordem é diagnosticada, em sua grande parte, na população jovem, os efeitos adversos têm grande impacto sobre a sua qualidade de vida, a falta de perspectivas para o futuro visto que uma das opções terapêuticas é o transplante de córnea e, como já foi citado, não há córneas que supram a alta demanda deste tecido, seja para o Ceratocone ou outra ectasia que acometa a córnea (RAFATI et al., 2019).

A sua condição não inflamatória tem sido questionada nos últimos anos. Em 2022, Santodomingo et al. e colaboradores descreveram o CK como uma doença inflamatória, degenerativa sendo proveniente de uma inflamação ocular.

Como em muitas doenças complexas, distinguir entre associação, causa e efeito no CK é extremamente desafiador e problemático. Sabe-se que as influências ambientais incluem o desgaste da superfície ocular provocado pelas lentes de contato, a fricção mecânica dos olhos e doença ocular alérgica. No entanto, é de extrema importância ressaltar que o desenvolvimento dessa ectasia envolve interações complexas entre fatores genéticos e ambientais (DAVIDSON et al., 2014).

Diversos estudos comprovam que no CK a quantidade e a organização das fibras de colágeno no EC se reduzem (CRITCHFIELD et al., 1988). Essa alteração nas fibras de colágeno é condizente com a menor rigidez do tecido corneano. O afinamento do EC é causado por uma redução no número de lamelas dentro da região afetada (HAYES et al., 2007).

Diversas teorias sobre o desenvolvimento do CK têm sido propostas a partir de estudos científicos, bem conduzidos, para um diagnóstico mais preciso. Associado à avaliação clínica, a Topografia Corneana de Plácido, um exame de imagem da córnea, tem sido uma ferramenta valiosa para diagnosticar e rastrear a progressão do CK. O exame por lâmpada de fenda também tem sido muito utilizado para o acompanhamento da progressão da doença apesar de não ser capaz de detectar a doença em seu estágio inicial uma vez que as imagens podem parecer normais. Ademais, alguns pesquisadores utilizam a Tomografia de Coerência Ótica (AS - OCT)

como uma ferramenta para avaliar a geometria da superfície anterior da córnea (ESPANDAR; MEYER, 2010; PIÑERO; NIETO; LOPEZ-MIGUEL, 2012).

Com relação ao tratamento, as estratégias utilizadas são adaptadas à gravidade e progressão da doença, sendo que nos estágios iniciais a correção da visão através do uso de óculos ou lentes de contato gelatinosas pode ser suficiente. Com a evolução da doença, lentes de contato rígidas permeáveis à gases ou lentes esclerais (lentes de contato personalizadas que se apoiam na esclera e permitem o uso por até 12 horas) tornam-se uma opção. Pacientes com CK mais avançado, que não toleram o uso de lentes de contato, e que ao exame topográfico e clínico são possíveis visualizar cicatrizes corneanas, as intervenções cirúrgicas são as mais indicadas (SINGH et al., 2024). E entre as intervenções cirúrgicas está o transplante de córnea através da Ceratoplastia Interlamelar e o implante do anel de Ferrara®

2.5 Manejo Cirúrgico do Ceratocone

Através do manejo cirúrgico do CK em estágios avançados da doença busca-se a estabilização desta ectasia. As cirurgias refrativas com transplante total ou parcial da cornea, o transplante da lâmina limitante anterior e o transplante intraestromal de células tronco são as opções mais utilizadas até o momento, sendo que tanto a utilização de células tronco quanto o transplante da lâmina limitante anterior xenogênicos ainda estão sendo exploradas por pesquisadores.

O Anel de Ferrara® (FIGURA 4) constitui uma importante estratégia não cirúrgica para o tratamento do CK (Moreira et al., 2002). Por meio da sua inserção no estroma corneano é possível reduzir a inclinação da córnea, reduzir o astigmatismo irregular e melhorar a acuidade visual. Ademais, o anel tem sido uma alternativa cirúrgica para eliminar ou pelo menos retardar a necessidade da ceratoplastia lamelar ou penetrante (MOREIRA et al., 2002; TORQUETTI et al., 2009).

Figura 4 - Imagem ilustrativa do Anel de Ferrara

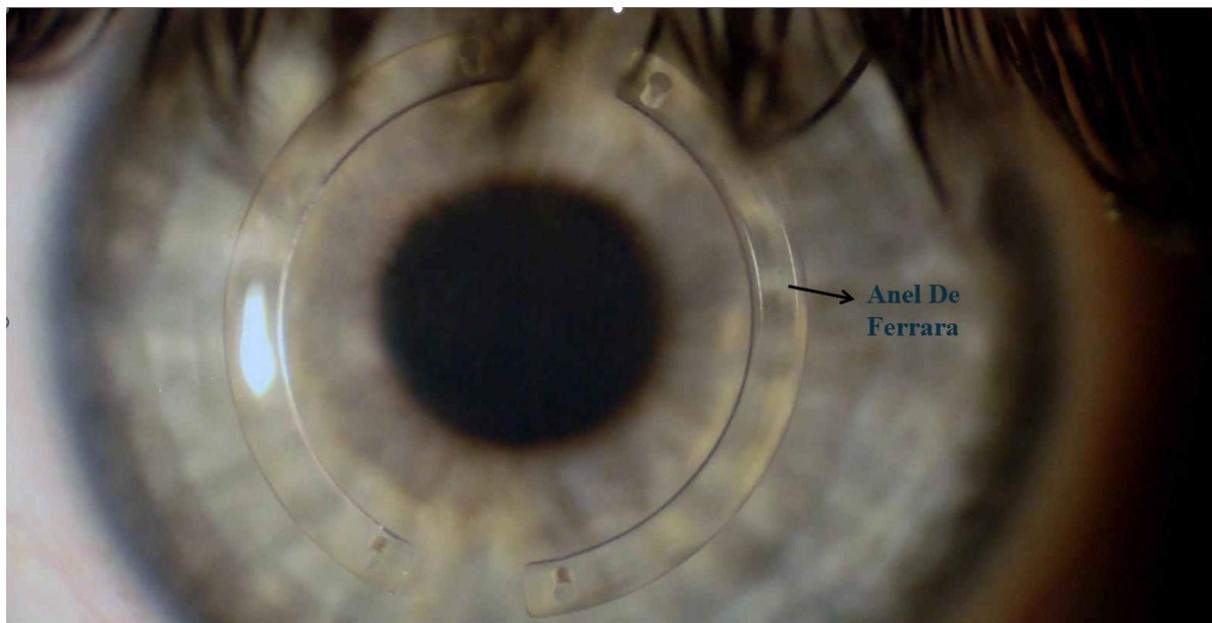


Imagem representativa de um olho humano com o Anel de Ferrara® implantado e após completa adesão do globo ocular. Fonte: Adaptado de Dr. Marcio Rodrigues (Rodrigues, 2018)

A ceratoplastia penetrante, PK (do inglês *Penetrating Keratoplasty*) envolve a remoção de toda a córnea do hospedeiro e a sua substituição por um tecido doador. A taxa de sucesso desta cirurgia chega a ser superior a 90%, porém como efeito adverso grave tem-se a rejeição do enxerto que ocorre entre 20% e 35% dos casos no primeiro ano devido à rejeição endotelial mediada pela perda de células endoteliais e complicações incluindo a hemorragia expulsiva. Pacientes que passam por este tratamento também podem desenvolver o astigmatismo no pós-operatório, porém este pode ser resolvido através do uso de lentes de contato, cirurgia refrativa entre outros (GURNANI; KAUR, 2025; NANAVATY; VIJIAN; YVON, 2018). Como desvantagem da PK está a necessidade de um doador homólogo, ou seja, da mesma espécie e como já foi citado anteriormente o número de doadores de cornea está muito abaixo da alta demanda por este tecido.

A ceratoplastia lamelar anterior profunda, DALK, (do inglês *Deep Anterior Lamellar Keratoplasty*) tem sido realizada há anos para o tratamento do CK. A DALK consiste na remoção da maior parte do tecido da córnea, porém a membrana Descemet (DM) e o endotélio corneano do hospedeiro são preservados e o novo enxerto transplantado é desprovido de DM. Apesar de ser uma cirurgia mais delicada e longa, ela possui muitos adeptos por alegações de menor número de episódios de rejeição (NANAVATY; VIJIAN; YVON, 2018).

Transplante de lâmina limitante anterior ou Ceratoplastia Interlamelar consiste no transplante de uma camada da parte frontal da cornea do doador dentro ou sobre a córnea do hospedeiro. Este procedimento pode estabilizar as alterações corneanas progressivas em olhos com ceratocone (JHANJI et al., 2022). Diferentemente das técnicas citadas anteriormente, o transplante intraestromal de células tronco visa rejuvenescer ou substituir as camadas da córnea em pacientes com ceratocone através da injeção destas células diretamente na córnea ou sua incorporação em estruturas de suporte (JHANJI et al., 2022).

Diante da alta demanda e da baixa disponibilidade de córneas para transplante homólogo, e associado ao transplante intraestromal de células tronco, pesquisadores em todo o mundo tem se dedicado a desenvolver uma opção às córneas humanas. Neste sentido, a bioengenharia de tecidos através da descclularização de córneas porcinas tem sido testada como uma proposta para o transplante heterólogo de córneas (GHEZZI; RNJAK-KOVACINA; KAPLAN, 2015).

2.6 Bioengenharia De Tecidos E O Transplante Heterólogo De Córneas

A engenharia de tecidos se desenvolveu através de pesquisas realizadas por médicos, engenheiros e cientistas para pesquisar e desenvolver substitutos biológicos que imitassem tecidos e pudessem substituir ou regenerar tecidos e órgãos doentes (MHANNA; HASAN, 2017). A proposta de substituir uma parte do corpo danificada usando materiais de origem natural foi proposta e aplicada há mais de 4000 anos. Embora atualmente, esta seja uma prática comum utilizada nos transplantes devido, por exemplo, à falência de um órgão, o número de pessoas que necessitam de órgãos supera o número de doadores de órgãos (VACANTI; VACANTI, 2014).

Enquanto a engenharia de tecidos envolve a construção de tecido *in vitro*, a medicina regenerativa se refere às ferramentas que ajudarão o corpo a regenerar um tecido *in vivo* no paciente. Sendo assim, pode-se dizer que a engenharia de tecidos é um fator limitante para a atuação da medicina regenerativa. Isso permite distinguir esses dois termos e não os classificar como sendo um só, mas sim, cooperativos entre si (MHANNA; HASAN, 2017; VACANTI; VACANTI, 2014).

A aplicação da engenharia de tecidos envolve três combinações típicas: células, mediadores e arcabouços, sendo reconhecida como Tríade da Engenharia de Tecidos. E para incorporar esses três elementos faz-se necessário que o arcabouço seja capaz de sustentar os demais (MORO et al., 2018).

Com o intuito de atender à crescente demanda por córneas viáveis para transplantes no mundo, duas abordagens têm sido adotadas: cultivo de células de tecido halogênicos de doadores humanos e transplante de homólogos sintéticos (MARTINS, 2017). Princípios da engenharia de tecidos tem sido aplicado na tentativa de desenvolvimento de equivalentes viáveis de córnea humana em diferentes níveis de complexidade desde o desenvolvimento de camadas do epitélio, de estroma e endotélio, até abordagens para recriar a inervação nativa deste tecido. Essas abordagens culminaram em equivalentes de tecido de córnea humana com espessura total exata, implementados em ambientes clínicos controlados, usando diversos tipos de biomateriais (GHEZZI; RNJAK-KOVACINA; KAPLAN, 2015). Logo é neste contexto que o uso de córneas xenogênicas descelularizadas tem se tornado uma das propostas como substitutos do transplante homólogo humano.

2.7 Transplante Xenogênico De Córneas

O conceito de xenotransplantes surgiu por volta do século XVIII com a primeira tentativa de transfusão de sangue de uma ovelha para um ser humano. Após essa tentativa, diversas tentativas de doação de órgãos e tecidos provenientes de doadores xenogênicos como coelhos, porcos, chimpanzé, babuínos entre outros animais foram realizados. Algumas tentativas resultaram em maior tempo de vida (o receptor de sangue de ovelha sobreviveu até sua morte natural) ou menor tempo de vida do paciente receptor (a doação de um coração de um chimpanzé resultou em uma sobrevivência de apenas 2 horas do receptor) foram relatadas (EKSER; LI; COOPER, 2017).

Franz Reisinger, 1824, recebeu os créditos pela formulação do conceito de ceratoplastia onde propunha a troca da cornea humana opacificada por uma córnea de animal transparente. Entretanto, somente no ano de 1838, Richard Kissam realizou o primeiro enxerto xenogênico utilizando cornea suína, para um ser humano (YOON et al., 2021).

Primatas não humanos são filogeneticamente os animais que mais se assemelham aos humanos, porém, desde questões éticas até a fácil transmissão de infecções zoonóticas, tornam essa opção desvantajosa (Ekser; Li; Cooper, 2017). Já o uso de córneas, provenientes de suínos para xenotransplante, apresentam vantagens uma vez que essa espécie possui fácil criação, múltiplas ninhadas, podem ser geneticamente modificados para superar barreiras imunológicas e podem ser criados em ambientes controlados, livres de patógenos. Ademais, a utilização de órgãos ou tecidos suínos para xenotransplante é de considerável interesse (Yoon; Choi; Kim, 2021)

Diante dos poucos entraves ao uso de córneas porcinas, o transplante xenogênico com o uso do tecido dessa espécie, tem se tornado alvo de diversos pesquisadores no intuito de desenvolver novas terapias para substituir o alotransplante de uma córnea doente. Para isso córneas acelulares provenientes de protocolos de descélularização aplicados às córneas porcinas podem representar uma alternativa às córneas de cadáveres humanos para transplantes heterólogos (GONZÁLEZ-ANDRADES et al., 2015).

Coelhos, por se tratarem, do ponto de vista filogenético, os animais mais próximos dos primatas não humanos, constituem o modelo animal mais comumente empregado para pesquisas envolvendo doenças, tratamentos e transplantes para doenças que acometem a córnea (GRAUR; DURET; GOUY, 1996). Os coelhos, animais pertencentes à ordem dos lagomorfos, são considerados animais de laboratório de médio porte e por isso a sua utilização como modelo de experimento animal requer a aprovação por um comitê de ética de uso de animais em experimentação (Y. ZERNII et al., 2016)

No estudo de doenças oftálmicas, os coelhos são os animais de escolha por compartilharem muitas características anatômicas semelhantes aos humanos, incluindo o tamanho do olho, estrutura interna, sistema óptico e volume da cavidade conjuntival (**Figura 5**). Porém, dentre estes fatores, o de maior relevância para a escolha de coelhos como modelo animal de oftalmologia, é o fato de o tamanho dos olhos destes animais facilitarem os exames na superfície ocular e assim favorecer o estudo de procedimentos médicos e cirúrgicos ou para administração de insumos farmacológicos (LOISEAU et al., 2023).

Figura 5: Imagem do olho de um coelho com lenticulo implantado



Imagem representativa de um olho de coelho com o lenticulo porcino descelularizado implantado e aderido ao seu globo ocular. Fonte: Da autora

2.8 Descelularização De Estromas Corneanos Porcinos

O EC constitui a camada mais espessa da cornea responsável por manter a transparência e a acuidade visual. Ele é composto por fibras de colágeno produzido pelos ceratócitos, sendo que estas células também são responsáveis por produzir proteoglicanos e glicoproteínas da MEC (BARRIENTEZ et al., 2019). Os ceratócitos são células inativas que flutuam entre as lamelas de colágeno, desempenhando um papel central no reparo, regeneração e manutenção do EC e, conseqüentemente, de todo o tecido corneano. Após uma lesão, os ceratócitos podem ser ativados e se diferenciar em miofibroblastos, mediando uma cascata de reações imunes (BARRIENTEZ et al., 2019; YAM et al., 2016a).

Protocolos de descelularização de EC realizam a remoção, completa ou parcialmente completa, de células e de antígenos o que resulta na diminuição da resposta imune desses tecidos quando

implantados, além de permitir o repovoamento celular com células do receptor (YOERUEK et al., 2012).

2.9 Técnicas De Descelularização Da Córnea

O tecido corneano heterólogo descelularizado tem sido alvo de diversos estudos com o intuito de ser utilizado como alternativa ao transplante de cornea homólogo (PROCHÁZKOVÁ et al., 2024). A descelularização consiste na remoção completa de componentes celulares, preservando, porém, a estrutura da matriz extracelular (MEC) e a integridade mecânica da córnea nativa (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). A remoção de células tem como objetivo reduzir a rejeição do enxerto pelo sistema imune do hospedeiro (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2020). Estudos demonstram que a remoção parcial de células de um tecido ou órgão a ser transplantado pode levar à ligação de imunoglobulinas e proteínas aos componentes celulares, o que resulta na ativação de macrófagos e linfócitos B (Nagata; Hanayama; Kawane, 2010).

Os protocolos de descelularização atualmente descritos se iniciam com a lise da membrana celular através de métodos físicos ou soluções iônicas seguida pela separação de componentes celulares da MEC através de tratamentos enzimáticos. Em um outro protocolo proposto, a lise da membrana celular com consequente solubilização e remoção de componentes celulares citoplasmáticos ocorre através do uso de soluções detergentes acopladas à agitação mecânica para aumentar a eficácia do processo (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Os métodos de descelularização podem ser químicos e físicos. Na descelularização química utiliza-se surfactantes (detergentes químicos), como citado anteriormente, ácidos, bases e agentes quelantes. Já a descelularização física inclui ciclos de congelamento e descongelamento, soluções hipertônicas e hipotônicas, alta pressão hidrostática, pressão hidrostática ultra alta e dióxido de carbono supercrítico. Associada a um método de descelularização, a agitação mecânica utilizada simultaneamente ao uso de uma solução descelularizante auxilia na lise celular e remoção dos detritos celulares (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2020; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; MENDIBIL et al., 2020). No entanto, independentemente do método utilizado, este deve ser capaz de promover a adequada remoção das células, porém mantendo as propriedades estruturais do tecido (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

A descelularização através do uso de tratamentos ácidos e alcalinos tendem a remover os componentes citoplasmáticos das células, além dos ácidos nucleicos. Já os detergentes não iônicos possuem leve ação sobre o tecido, interrompendo as interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína da MEC, porém deixam as interações proteína-proteína intactas, de modo que as proteínas não percam sua conformação funcional (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2020). Os principais métodos de descelularização estão resumidos na Tabela 1.

2.10 Métodos Químicos de Descelularização

2.10.1 Detergentes

Detergentes ou tensoativos atuam na lise das células rompendo suas membranas celulares. Podem ser iônicos, não iônicos e zwitterionicos:

- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS): detergente iônico muito utilizado devido á eficaz descelularização com uma taxa de remoção de estruturas celulares e material genético. Estudos demonstram sua utilização em concentrações variando de 0,1% a 2% com bons resultados na preservação da resistência mecânica e remoção de estruturas celulares (BAYYOUNG et al., 2012);
- Desoxicolato de Sódio (DS): detergente iônico menos eficaz na descelularização quando comparado ao SDS, pois destrói a histoarquitetura do tecido, neste caso as fibras de colágeno da membrana de Bowman(Du et al., 2011);
- Triton X-100: estudos relatam que esse detergente é menos eficaz na remoção de estruturas celulares quando comparados a detergentes iônicos, no entanto, é menos prejudicial. As concentrações mais comumente utilizadas são 0,01%, 0,05% e 0,1% (Yam et al., 2016);
- 3-[(3-Colamidopropil) dimetil amônio] -1-propano sulfato (CHAPS): detergente zwitteriônico descrito por pesquisadores como ineficiente para a descelularização da córnea por não remover significativamente as estruturas celulares (Du et al., 2011).

2.10.2 Ácidos e bases

- Ácidos: De acordo com a literatura os mais utilizados são o ácido fórmico, acético e o cítrico. Todos são ácidos orgânicos e entre eles o que apresentou melhores resultados

foi o ácido fórmico por preservar a MEC. Os demais ácidos testados não obtiveram bons resultados na remoção das células (Ponce Márquez et al., 2009);

- Bases: pesquisadores testaram o Hidróxido de Amônio (NH_4OH) para a descelularização da córnea, porém, sempre associado a uma solução detergente (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2020).

2.10.3 Agente Quelante

Para descelularização com um agente quelante tem-se utilizado o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), que se liga a íons metálicos interrompendo a adesão da MEC, a associado a outro método de descelularização pois quando usado sozinho é ineficaz (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

2.11 Métodos Físicos de Descelularização

- Ciclos de congelamento e descongelamento: Por meio do uso de temperaturas capazes de congelar (-80°C) e descongelar (37°) ocorre o processo de descelularização que se dá por meio da lises das células sem, no entanto, comprometer a estrutura da MEC. Como desvantagem, pesquisadores afirmam que esse método não é eficaz na remoção de células e conteúdo genético sem ser associado a outros métodos, como por exemplo, uso de detergentes (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011);
- Solução hipertônica de Cloreto de Sódio (NaCl): Soluções capazes de lisar células e enxaguar os restos celulares, porém não o suficiente para o uso da córnea em transplante. Geralmente são associadas a nucleases para aumentar sua efetividade (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011);
- Dióxido de Carbono Supercrítico: Esta técnica se dá pelo rompimento das células com a alta pressão exercida pelo fluido, para então serem removidas do tecido por meio da rápida despressurização. Sua limitação encontra-se no complexo sistema de reator necessário para o dióxido de carbono supercrítico (HUANG et al., 2017);
- Pressão hidrostática alta e ultra alta: relatos na literatura afirmam que essas técnicas realizam uma descelularização eficiente com mudanças mínimas na MEC. Em contrapartida, o equipamento para realização da descelularização possui alto custo (García-Gareta et al., 2020; Lynch; Ahearne, 2013).

2.12 Métodos Biológicos de Descelularização

Os métodos de descelularização biológica incluem enzimas ou soro. As enzimas ajudam a remover nucleotídeos após a lise celular, mas, em estudos realizados, elas não se mostraram capazes de remover restos celulares ao serem utilizadas sozinhas. Dentre as enzimas testadas pode-se citar as nucleases (DNAse e RNAse), fosfolipase A2 e a tripsina. (PROCHÁZKOVÁ et al., 2024)

2.13 Sêrum

Neste método tem sido testado o uso de soro, principalmente o bovino e o humano. O soro bovino resultou em descelularização eficiente sem comprometer as fibras de colágeno ou a transparência da córnea. O soro humano associado com a eletroforese para descelularização mostrou-se eficiente para a obtenção de um tecido corneano descelularizado que mostrou semelhanças ópticas, biomecânicas e ultraestruturais com as das córneas humanas. Porém, estudos “in vivo” com este tecido resultou na perda do transplante. (PROCHÁZKOVÁ et al., 2024).

Os principais métodos de descelularização estão citados na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1: Resumo dos principais métodos de descelularização

Método	Nome	Vantagens/ desvantagens:	Importância em futuras pesquisas	Eficiência
Químico	Surfactantes (SDS)	Muito eficiente na remoção de estruturas celulares e material genético, mas pode induzir reação imunológica se não for completamente lavado. Pode alterar a estrutura da ECM e reduzir a transparência em concentrações mais altas.	Alto	+++++

	Surfactantes (SD)	Método eficaz de descelularização, porém menos eficiente que o SDS e geralmente utilizado com outros métodos. Pode causar menor disrupção nas fibrilas de colágeno.	Médio	++++
	Surfactantes (Triton X-100)	Nem todos os estudos indicam descelularização suficiente; sua eficácia aumenta em combinação com outros métodos. Menos eficaz que detergentes iônicos, mas menos disruptivo para a MEC.	Médio/alto	++++/+++++
	Surfactantes (CHAPS)	Ineficaz sozinho para descelularização da córnea, mas eficaz em combinação com outros métodos. Pode destruir a histoarquitetura do tecido em longos tempos de incubação.	Baixo/médio	+++ /++++
	Ácidos	Estudos indicam insuficiência na descelularização corneana, com pequenas alterações na ECM.	Baixo/médio	+++
	Bases	Apenas hidróxido de amônio foi documentado para descelularização corneana, necessitando de combinação com outro método eficaz.	Baixo	++
	EDTA	Remoção incompleta de células quando usados isoladamente, mas eficiente em combinação com outros métodos, como SDS e tripsina.	Médio	+++
Físico	Ciclos de congelamento e descongelamento	Bom efeito de descelularização, mas requer combinação com outras técnicas para remoção completa de	Médio	+++ /++++

		células, podendo perturbar a estrutura da ECM. Possui melhores propriedades ópticas do que detergentes químicos.		
	Soluções hipertônicas e hipotônicas (principalmente NaCl)	Eficiente quando combinado com outros métodos, causando mínima perturbação na ECM e com boas propriedades ópticas, porém menos eficaz que detergentes químicos.	Médio	+++ /++++
	Alta ou ultra alta pressão hidrostática (HHP, UHHP)	Método eficiente com alterações mínimas na ECM, mas requer equipamento caro para aplicação solitária.	Médio	++++
	ScCO ₂	Descelularização eficaz, reduz o tempo de processamento e pode causar alterações na ECM. Usado para esterilização simultânea e é mais econômico que o HHP, mas exige um sistema complexo de reator scCO ₂ .	Médio/alto	++++
Biológico	Enzimas	Frequentemente usado para remoção de material genético, porém precisa ser combinado com outros métodos e pode reduzir a transparência do tecido corneano.	Alto	++++
	Sérum	Método eficiente, mantendo a ultraestrutura do tecido e boas propriedades ópticas sem necessidade de outros métodos complementares.	Alto	++++/+++++

Fonte: Reproduzido e Adaptado de PROCHÁZKOVÁ et al., (2024)

2.14 Principais Técnicas Utilizadas Para Avaliar A Descelularização E A Adesão Do Tecido No Hospedeiro

Após o processo de descelularização e/ou implante do tecido no hospedeiro deve-se avaliar o sucesso da descelularização (se esta foi satisfatória ou não), determinado, assim, qual melhor método para a descelularização, se não houve rejeição imunológica ao tecido implantado, se houve boa adesão deste ao local do implante e se há sinais de repovoamento celular do tecido corneano implantado. Para essa análise algumas técnicas são utilizadas após a descelularização e/ou implante.

2.14.1 Análise Histológica

A histologia consiste no estudo das células e tecidos, realizado por meio de técnicas de coloração de cortes de tecido para posterior avaliação em microscópio. A coloração histológica envolve uma série de procedimentos técnicos aplicados a pigmentação do tecido utilizando corantes específicos. Tais corantes facilitam a análise microscópica e proporcionam uma melhor visualização das células, fibras de colágeno e constituição geral do tecido analisado (ALTURKISTANI; TASHKANDI; MOHAMMEDSALEH, 2015).

A coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) é a técnica histoquímica mais amplamente empregada em laboratórios clínicos e de pesquisa (ORTIZ-HIDALGO; PINA-OVIEDO, 2019). Utilizada há mais de um século, a H&E permite diferenciar as estruturas dos componentes citoplasmáticos e nucleares de células e tecidos, sendo que, a hematoxilina cora predominantemente as estruturas nucleares, enquanto a eosina marca as estruturas citoplasmáticas (CHAN, 2014). A coloração H&E proporciona uma vasta gama de informações o que explica seu uso em diversas áreas (CHAN, 2014; ORTIZ-HIDALGO; PINA-OVIEDO, 2019).

Inicialmente os cortes são submetidos a coloração com hematoxilina e posteriormente com eosina (Abrahamsohn; Freitas, 2017; Anderson; Rolls, 2011). Enquanto a solução de hematoxilina cora em um tom de azul-arroxeadado os componentes celulares, a eosina cora em rosa as fibras de colágeno (ABRAHAMSOHN; FREITAS, 2017).

2.14.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) tem sido amplamente utilizada para caracterizar a morfologia, a estrutura cristalina e a composição dos elementos constituintes de tecidos (TANG; YANG, 2017). Através de imagens de secções finas de tecidos previamente corados, onde um feixe de elétrons passa através da amostra de forma que ele seja absorvido e espalhado, produzindo contraste e a imagem (WINEY et al., 2014).

2.14.3 Tomografia de Coerência Óptica Anterior (AS-OCT)

A Tomografia de Coerência Óptica do Segmento Anterior (AS-OCT) é uma tecnologia de imagem óptica não invasiva e de alta resolução, que se baseia na interferência entre o sinal proveniente de um objeto em estudo e um sinal de referência local. A AS-OCT permite a obtenção, em tempo real, de imagens transversais dinâmicas, ou seja, imagens bidimensionais no espaço com coordenadas laterais e axiais, de alta e ultra alta resolução (PODOLEANU, 2012).

Inicialmente, a OCT, foi desenvolvida para obter imagens do seguimento posterior, no entanto, esta tecnologia também se mostrou promissora na obtenção de imagens sistemáticas da superfície ocular e do seguimento anterior, da frente para trás: filme lacrimal, conjuntiva, camadas individuais da córnea, esclera, ângulo e estruturas lenticulares (VENKATESWARAN et al., 2018a).

Atualmente, devido aos avanços nas imagens do segmento anterior, o diagnóstico do CK tem sido mais precoce o que permite caracterizar, melhor, as alterações anteriores e posteriores da córnea que podem ocorrer ao longo da progressão da doença (GOKUL; VELLARA; PATEL, 2018).

2.14.4 Topografia da Córnea

A topografia da córnea trata-se de uma técnica de imagem sem contato que mapeia a forma e as características da superfície da córnea. Topógrafos da cornea, como um disco de Plácido, analisam o padrão dos raios de luz refletidos na córnea e na interface filme lacrimal e reconstruem a forma da córnea (FAN et al., 2018a). O disco plácido consiste em um alvo circular de anéis concêntricos alternados de luz e escuridão e uma abertura central para observar os reflexos corneanos dessas faixas claras e escuras sobre a córnea. O exame dos anéis refletidos fornece informações sobre o formato da córnea (COURVILLE; SMOLEK; KLYCE, 2004; FAN et al., 2018a).

2.15 Cross-Linking Da Córnea E Radiação-UV

O termo Cross-linking (CLX) é utilizado para descrever a formação de pontes químicas por meio de reações entre proteínas ou outras moléculas. Essas ligações cruzadas podem ser formadas a partir de reações químicas iniciadas por calor, pressão ou radiação e como resultado tem-se a alteração nas propriedades físicas do material reticulado. Reações enzimáticas e não enzimáticas de CLX ocorrem em diversas partes do organismo durante o envelhecimento natural do corpo humano (RAISKUP; SPOERL, 2013). Uma das observações que desencadeou no uso do CLX no tratamento de doenças corneanas foi que pacientes portadores de Diabetes mellitus costumam não apresentar progressão de ectasias corneanas devido à ocorrência natural de CLX não enzimático (SADY; KHOSROF; NAGARAJ, 1995). Seguindo este princípio, o CLX corneano utilizando riboflavina e irradiação ultravioleta (UVA) passou a representar uma alternativa para o tratamento de doenças que acometem a córnea (RAISKUP; SPOERL, 2013). O CLX corneano constitui a reticulação do colágeno corneano através da aplicação na córnea de solução de Riboflavina e UVA. Essa técnica, desenvolvida por Spoerl et al. e Wollensak e colaboradores (WOLLENSAK; SPOERL; SEILER, 2003), tem como princípio a fotoativação da riboflavina para induzir a reticulação das ligações covalentes das fibras de colágeno do estroma corneano (BRADFORD et al., 2023).

No CK ocorre redução da rigidez da córnea o que sugere que há uma interrupção do CLX nas estruturas terciárias e quaternárias das fibras de colágeno, sendo assim, pode-se inferir que a diminuição do CLX corneano seja um dos causadores do CK (ANDREASSEN; HJORTH SIMONSEN; OXLUND, 1980).

A foto-oxidação, do tecido implantado, com riboflavina e UVA é uma opção para o enrijecimento da córnea devido ao seu efeito localizado e à necessidade de um curto período de terapia. Ademais, a riboflavina, também conhecida como Vitamina B2, não é tóxica ao organismo, possui boa biodisponibilidade, sendo muito utilizada em intervenções terapêuticas. Durante o processo fotoquímico de CLX, ocorre a geração de radicais livres através da interação UVA com a riboflavina. A riboflavina atua neste processo como uma molécula responsável pela transferência de energia. Quando a riboflavina absorve energia da radiação UVA, ela é excitada para um estado de alta energia, denominado singlete excitado, o que pode ser visto na figura 6. Nesse estado, ocorre uma troca energética e a riboflavina transiciona para um estado tripletado. Essa excitação dá origem a duas possíveis reações fotoquímicas conhecidas como tipo I e tipo II. Na reação do tipo II, o oxigênio molecular é necessário para originar um oxigênio singlete (forma fisicamente excitada da molécula de oxigênio). Embora o número de elétrons não se altere, a direção do giro dos elétrons sofre uma mudança. Por meio da interação com o oxigênio tripletado, o oxigênio singlete altamente reativo é gerado, formando espécies reativas de oxigênio (ROS) que interagem com os grupos carbonila presentes no colágeno, promovendo assim a sua modificação estrutural. Entretanto, caso o oxigênio disponível seja consumido durante a exposição à UVA, ocorre o predomínio de reações do tipo I. No CLX, ambos os tipos de reações podem ocorrer simultaneamente, contribuindo para o fortalecimento da estrutura corneana e a estabilização do CK (HUANG; CHOE; MIN, 2004; RAISKUP; SPOERL, 2013).

Figura 6: Prováveis mecanismos da excitação da riboflavina pela UVA.

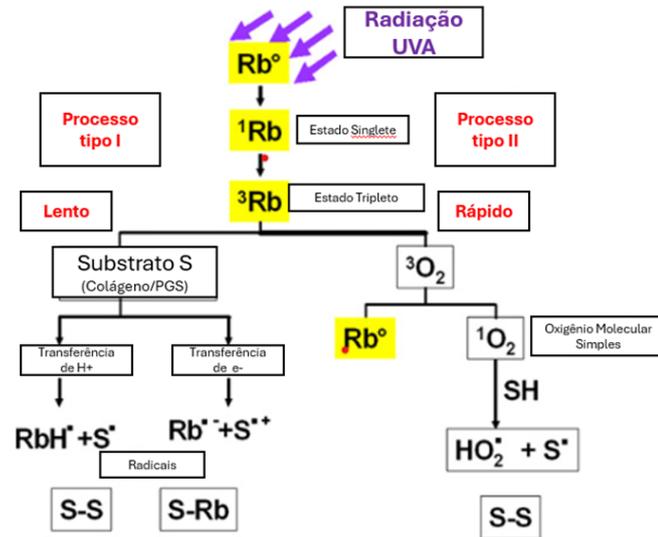


Imagem representativa da excitação da riboflavina após aplicação da radiação UVA. Fonte: Adaptado de Raiskup F et al. (2013)

No processo fotoquímico citado acima, locais ativos reagem entre si, seja de forma intermolecular ou intramolecular, resultado na formação de ligações covalentes entre aminoácidos específicos, como histidina, hidroxiprolina, hidroxilisina, tirosina e treonina. São essas reações que promovem a formação de ligações cruzadas ou CLX (BALASUBRAMANIAN; KANWAR, 2002; KATO; UCHIDA; KAWAKISHI, 1994; MARCOVICH et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia do transplante heterólogo de lenticulos porcinos descelularizados para o estroma corneano de coelhos, seguida pela aplicação tópica de solução de Riboflavina e radiação UV.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Parte I: Descelularização Dos Estromas Porcinos

1. Avaliar a remoção dos componentes celulares dos estromas porcinos submetidos à descelularização com as soluções SDS 0.1%; SDS 1%; NaCl 1.5M e Triton-X 1%, através de:
 - ✓ Transparência dos estromas porcinos após o processo de descelularização;
 - ✓ Eficácia das soluções descelularizantes na remoção de componentes celulares;
 - ✓ Disposição e conservação das fibras de colágeno dos estromas porcinos, através da MET, nos grupos descelularizados em comparação com o grupo controle;
 - ✓ Concluir sobre a melhor solução descelularizante a ser utilizada na descelularização de lenticulos para transplante heterólogo.

3.2.2 Parte II: Transplante Xenogênico De Lenticulos Porcinos Descelularizados

1. Realizar o transplante de lenticulos porcinos descelularizados para o estroma corneano de coelhos;
2. Avaliar a eficácia do tratamento com Riboflavina-UV após o transplante heterólogo de lenticulos porcinos;
3. Comparar “*in vivo*” os grupos somente lenticulo e grupo tratado lenticulo-riboflavina-UV com o grupo controle;
4. Avaliar, por meio da MET, a disposição das fibras colágeno no tecido corneano dos grupos somente lenticulo e no grupo tratado lenticulo-riboflavina-UV.

PARTE I: DESCELULARIZAÇÃO DOS ESTROMAS PORCINOS

4 INTRODUÇÃO

Nesta primeira parte do trabalho, foi realizada a caracterização de um protocolo de descelularização de EC visando a aplicação, posterior, em lenticulos porcinos para transplantes heterólogos, uma vez que não existe um protocolo padronizado e descrito na literatura para descelularização de córneas xenogênicas que resulte na remoção de células e antígenos e preservação da MEC. Para essa caracterização foram utilizados os seguintes métodos.

5 MÉTODOS

5.1.1 Descelularização de Estromas Porcinos

Olhos suínos frescos foram obtidos de um abatedouro local (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). A partir desses olhos foram extraídos os estromas em parceria com o Centro de Saúde Ocular de Belo Horizonte.

Seguindo o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (Sob número de protocolo 206/2022), os estromas foram fotografados e em seguida divididos em 4 grupos (n=20/grupo) de acordo com a solução descelularizante: SDS 0,1% p/v; SDS 1% p/v; NaCl 1.5M e Triton-X. Ademais, um quinto grupo, denominado controle foi incluído.

O protocolo de descelularização consistiu em incubar os EC (**Figura 7**) nas respectivas soluções descelularizantes por 24 horas (h) em temperatura ambiente e sob agitação constante, conforme descrito em vasta literatura científica previamente consultada. Decorridas as 24 h, os EC foram lavados com Solução Tampão Fosfato (PBS), 0.15M, pH=7,2 (PBS) por 90 minutos (min), a 4°C sob agitação constante, para retirar o excesso de solução descelularizante. A cada ciclo de lavagem (30 min), o PBS foi substituído. Por fim, os EC foram mantidos por 72 h em solução PBS, a 4°C e sob agitação constante. O PBS foi substituído a cada 24 horas. O grupo controle passou pelo mesmo protocolo, porém sempre em solução PBS.

Figura 7: Imagem ilustrativa do Estroma Corneano pós descelularização.

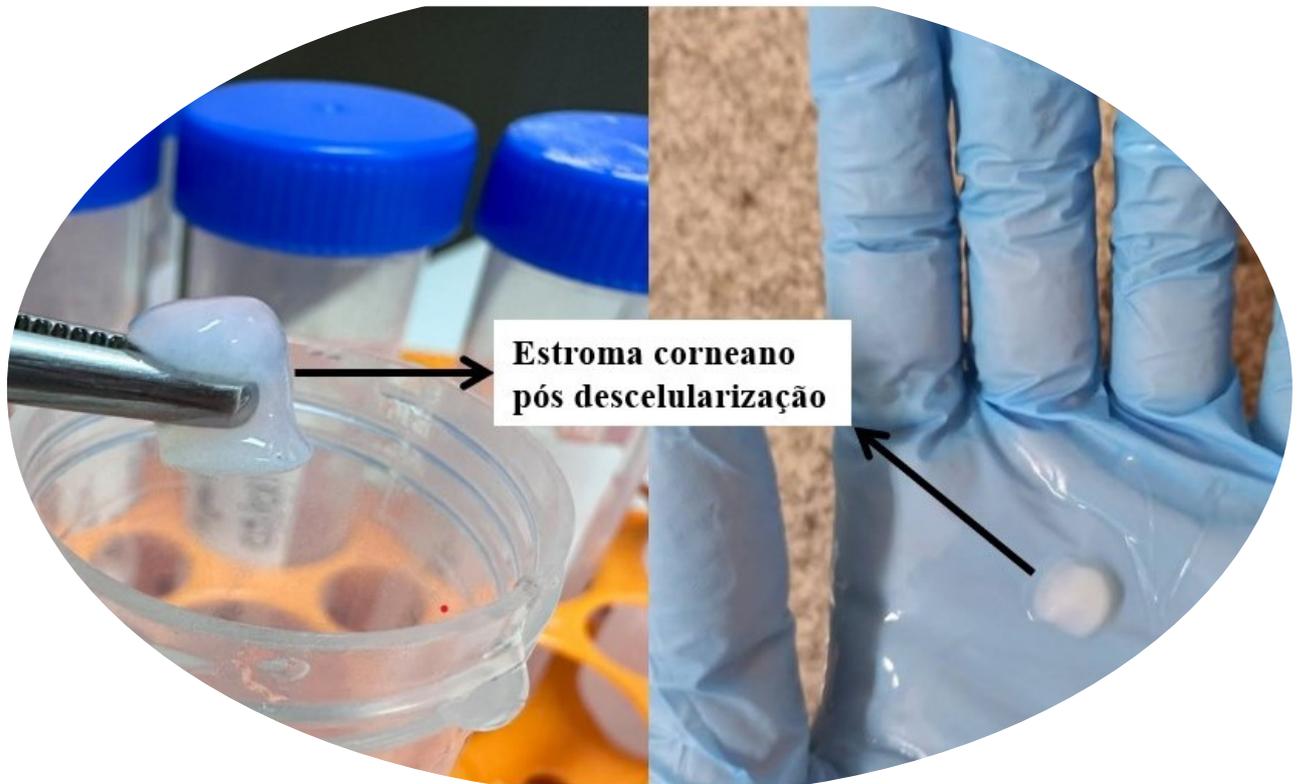


Imagem representativa do estroma corneano decorrido o processo de descelularização.

Fonte: Da autora

5.1.2 Avaliação Da Transparência Dos Estromas Descelularizados

Para avaliar a transparência macroscópica e a transmitância da luz, os EC, após a descelularização, foram fotografados. Em sequência, eles foram desidratados utilizando glicerol 100% v/v (Sigma Aldrich St. Louis, MO. USA) por 1 h. Após a desidratação, os estromas foram novamente fotografados e registrados sobre uma letra preta “A”. Esse processo também foi realizado com os EC do grupo controle (n=5).

5.1.3 Análise Histológica Dos Estromas Descelularizados

Para avaliar a ausência de componentes celulares dos EC descelularizados foram realizadas análises histológicas através da coloração com H&E.

Para o processamento da análise histológica, os EC foram cuidadosamente seccionados com uma lâmina de bisturi e fixados em solução de Davidson (solução contendo álcool etílico 95% (v/v) / formaldeído / ácido acético glacial / água destilada) por 24hs. Após este período, foram transferidos para uma solução de álcool 70% v/v, onde permaneceram por mais 24 hs, e então foram desidratados em concentrações decrescentes de etanol (70-100%) por 48 hs em cada banho. Em sequência, foram submetidos a uma clarificação em xilol por 24hs. Posteriormente, o material foi incluído em parafina para obtenção de blocos.

Para montagem das lâminas, realizou-se cortes com espessura máxima de 5 micrometros (μm) aos blocos de parafina com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram adicionados à lâmina e submetidos ao método de coloração com H&E. Esses procedimentos foram realizados pela empresa CelulaVet® (n=5).

5.1.4 Microscopia Eletrônica De Transmissão (MET)

Para avaliar a disposição e integridade das fibras de colágeno utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Para isso as amostras dos estromas descelularizados foram fixadas por imersão, por 2 h, em temperatura ambiente, em Karnovsky Modificado (2.5% de glutaraldeído e 1% de formaldeído em PBS, pH 7,2). Em seguida foram mantidos em tampão cacodilato de sódio 0.1M, Ph 7,2 (Sigma Aldrich, St Louis, MA) por 12 hs. Sequencialmente, utilizou-se acetato de uranila (acetato de uranila a 2% em água deionizada) para contra coloração seguida de desidratação com concentrações aumentadas de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), imerso por 15 min em cada concentração. As amostras foram incluídas em resina Epon 812 (Sigma Aldrich, St Louis, MA) e cortes ultrafinos com espessura de 70 nanômetros (nm) foram obtidos através de um ultra micrótomo (Leica Microsystems) e colocados sobre uma tela de cobre de 200 malhas. Os cortes foram contracorados com solução de citrato de chumbo de Reynold por 10 min e examinados com microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12-SpiritBiotwin FEI Company) localizado no Centro de Microscopia da UFMG.

6 RESULTADOS

Com a análise das diferentes soluções descelularizantes utilizadas na descelularização dos EC visou-se determinar qual delas teria melhor desempenho na remoção completa ou quase completa dos ceratócitos e, ainda, manteria a integridade da MEC. A solução descelularizante com melhor desempenho seria utilizada na segunda parte deste estudo.

6.1.1 Avaliação Da Transparência E Estrutura Microscópica

As fotografias dos EC pós descelularização revelaram que todos os grupos descelularizados mantiveram a estrutura macroscópica e estavam opacos após o tratamento com as diferentes soluções descelularizantes (Figura 8A). Essa característica também foi observada no grupo controle não tratado.

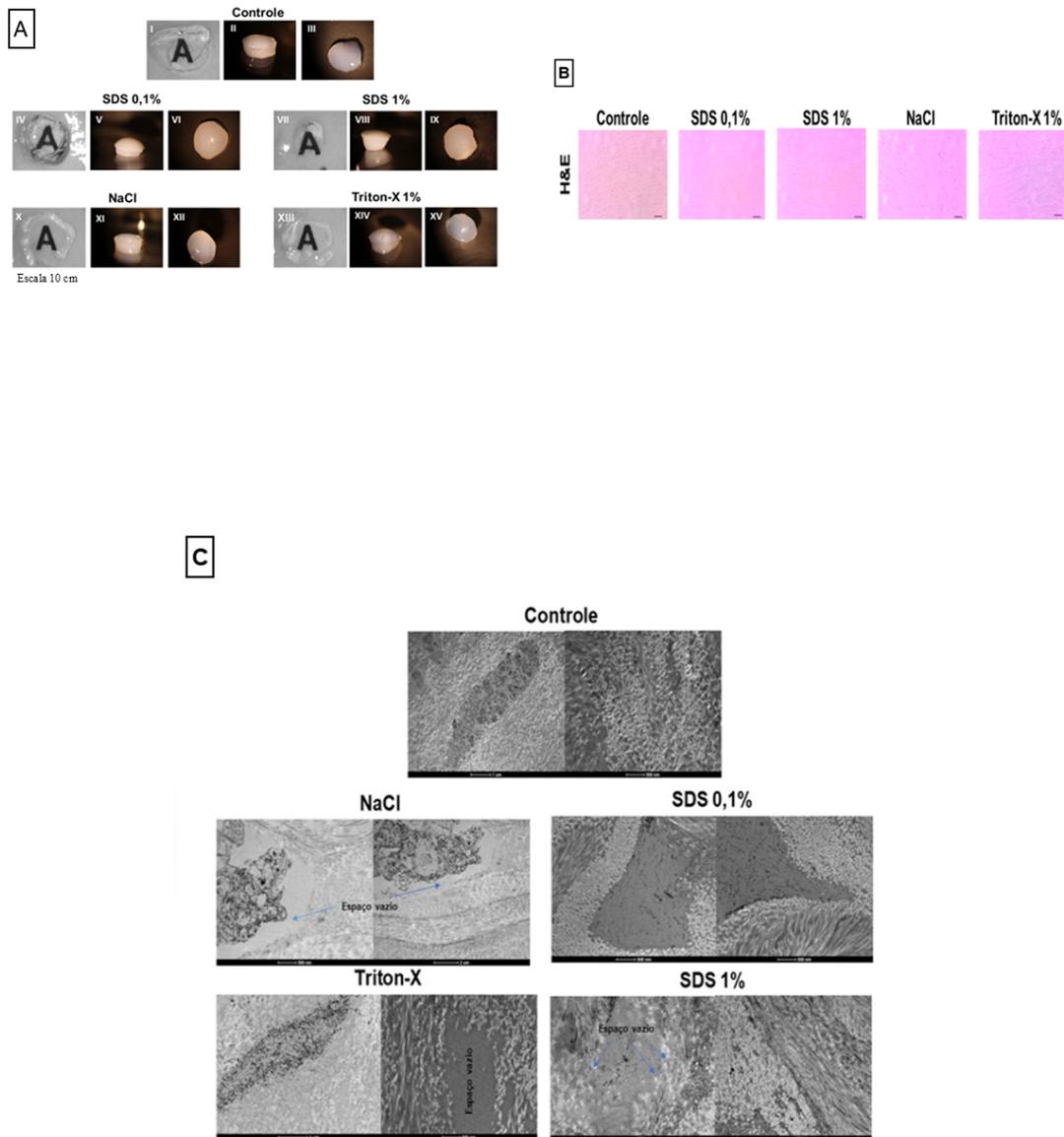
Em contrapartida, todos os grupos tiveram aumento da transparência após a desidratação com glicerol 100 % v/v, sendo possível observar a transmitância da luz através da fotografia sobre a letra A (Figura 8A).

6.1.2 Análise Histológica E Microscopia Eletrônica De Transmissão (Met)

As imagens de H&E mostraram que quase todas as células foram eliminadas nos estromas das córneas tratados com SDS 0,1%, SDS 1% e Triton-X 1% (Figura 8 B), no entanto, no grupo tratado com NaCl, foi possível visualizar muitos ceratócitos

A Figura 8 C contém as imagens obtidas através da MET. Quando comparados, os grupos descelularizados e o grupo controle, observamos que os grupos descelularizados apresentam espaçamentos entre as fibras de colágeno. Já com relação à organização das fibras de colágeno, o grupo descelularizado com solução detergente SDS manteve as fibras de colágeno mais uniformes e organizadas comparadas ao grupo controle e aos grupos tratados com NaCl e Triton-X.

Figura 8: Avaliação macroscópica, histológica e por microscopia de transmissão de Estromas



Legenda: Estromas Porcinos Descelularizados. A: Imagem representativa de cada grupo após desidratação com glicerol (estroma sobre a letra “A”) seguido de imagens de EC logo após a descelularização para avaliação macroscópica e de transmitância da luz. B: Imagens representativas da histologia com coloração por H&E nos grupos controle, SDS 0,1%; 1%;

Triton-X e NaCl 1,5M (Barra: 500 μ m) C: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de todos os grupos. Escalas: 500 nm. Fonte: Da autora.

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam que os EC porcinos descelularizados com a solução detergente SDS, nas concentrações de 0,1% e 1%, apresentaram desempenho superior em comparação com as soluções de Triton-X 1% e NaCl 1,5M. As matrizes estromais geradas pela descelularização com SDS mantiveram a estrutura da MEC e demonstraram uma remoção mais eficaz dos componentes celulares, o que é crucial para reduzir o risco de reações imunogênicas caso esses estromas sejam utilizados em transplantes.

O desenvolvimento de córneas artificiais por meio de métodos de descelularização para transplantes xenogênicos deve atender a requisitos semelhantes aos das córneas humanas nativas, como biocompatibilidade, aceitação imunológica, integridade mecânica e transparência óptica (NISHIDA et al., 2004; OH et al., 2009).

Córneas descelularizadas devem possuir um microambiente específico para que as células estromais e epiteliais do hospedeiro possam migrar e repovoar o enxerto descelularizado (González-Andrades et al., 2015) As córneas porcinas descelularizadas são promissoras para a substituição das córneas humanas em transplantes visto que possuem refração, propriedades e tamanho semelhantes com a córnea humana (Oh et al., 2009) . Entretanto, até o momento, não há nenhum protocolo documentado que tenha atingido 100% de descelularização e tenha sido capaz de manter a integridade da MEC (Isidan et al., 2021).

Apesar de ter demonstrado eficácia na descelularização dos EC, o SDS é relatado na literatura como um detergente capaz de causar efeitos indesejáveis como o edema da MEC, ruptura das fibras de colágeno e redução da transparência do tecido (ISIDAN et al., 2021).

Nesta primeira parte do estudo visamos testar métodos de descelularização que são relatados na literatura como mais eficazes na remoção de componentes celulares. A solução detergente SDS foi a que apresentou os melhores resultados. Sendo assim, a solução escolhida para a descelularização para o teste “in vivo” do transplante de tecido corneano heterólogo foi a SDS 1%.

**PARTE II: TRANSPLANTE XENOGÊNICO DE CÓRNEAS SEGUIDO DE
TRATAMENTO COM RIBOFLAVINA E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

8 INTRODUÇÃO

Diversos pesquisadores no mundo têm se dedicado a propor e testar técnicas capazes de estabilizar as ectasias que acometem a córnea com o intuito de evitar e reduzir o número de transplantes deste tecido uma vez que este possui uma alta demanda e uma baixa disponibilidade (ALMODIN et al., 2009). No Brasil, diversos são os entraves para o transplante homólogo de córneas, dentre eles pode-se citar a recusa familiar, a falta de informação e a falta de informações detalhadas e compreensíveis para todos sobre a lista de espera por transplantes, além da retirada deste tecido, em tempo hábil, pela Central de Transplantes, para ser transplantado (IPEA, 2023).

O transplante de córneas é uma das principais opções de tratamento para doenças que acometem a córnea. O CK é uma ectasia corneana em que a córnea adquire o formato de cone e em estado avançado, o transplante de córnea é a única opção para os pacientes com estágio avançado desta doença (SANTODOMINGO-RUBIDO et al., 2022).

Diante da alta demanda por córneas e baixa disponibilidade, não somente deste tecido, mas de diversos órgãos, o transplante xenogênico ou heterólogo tem se tornado uma alternativa viável (EKSER; LI; COOPER, 2017; SINGH et al., 2022).

No caso de transplante xenogênico de córneas, os protocolos já estudados propõem que seja realizada a descclularização previa do tecido para remoção de material genético e células que poderiam culminar na rejeição do tecido pelo hospedeiro devido a reações imunogênicas (Cascalho; Platt, 2008).

Associado ao transplante xenogênico de tecido corneano proveniente de olhos suínos, a técnica de Cross-linking utilizando riboflavina e luz UV tem sido utilizada por alguns pesquisadores (RANDLEMAN; KHANDELWAL; HAFEZI, 2015; WOLLENSAK; SPOERL; SEILER, 2003).

Fundamentado nos dados acima referidos e nos resultados obtidos com as diferentes soluções descclularizantes na primeira parte dos métodos descritos nessa dissertação, a segunda parte disserta sobre o transplante xenogênico de lenticulos porcinos seguido do tratamento com riboflavina e UV através de testes de implante do lenticulo in vivo .

9 MÉTODOS

9.1 Preparo Dos Lentículos Corneanos Porcinos

Estromas corneanos foram obtidos a partir de olhos suínos frescos provenientes de um abatedouro local. Para obtenção do estroma, o Centro de Saúde Ocular, utilizou um laser Femtossegundo (Ziemer FEMTO LDV Z6, Ziemer Ophthalmic Systems, Suíça). A partir desse estroma obteve-se os lentículos com aproximadamente 6.5 mm de diâmetro e 106 µm de espessura. Após a obtenção dos lentículos, armazenou-se os tecidos em BSS, a -10°C, por 30 minutos.

Decorridos os 30 minutos, para posterior implante dos lentículos porcinos, esses foram descclularizados com solução SDS a 1% (p/v) seguindo o mesmo protocolo utilizado para descclularizar os EC com essa solução. A solução detergente SDS a 1% foi a que apresentou os melhores resultados com a descclularização dos EC, o que justifica a escolha desta para descclularizar os lentículos. Após a descclularização os tecidos foram transferidos para solução salina balanceada (BSS) e armazenados sob refrigeração.

9.2 Implantação dos Lentículos por Ceratoplastia Interlamelar

9.2.1 Animais

Coelhas brancas da Nova Zelândia, fêmeas, com 6 semanas de idade e aproximadamente 2 kg de peso, n=12, foram obtidas da Fazenda Experimental da UFMG. Os animais foram alojados em condições padrão de acordo com as diretrizes da Associação para Pesquisa Oftálmica e Visual (ARVO) e o protocolo do estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais Experimentais da UFMG (Protocolo nº 206/2022).

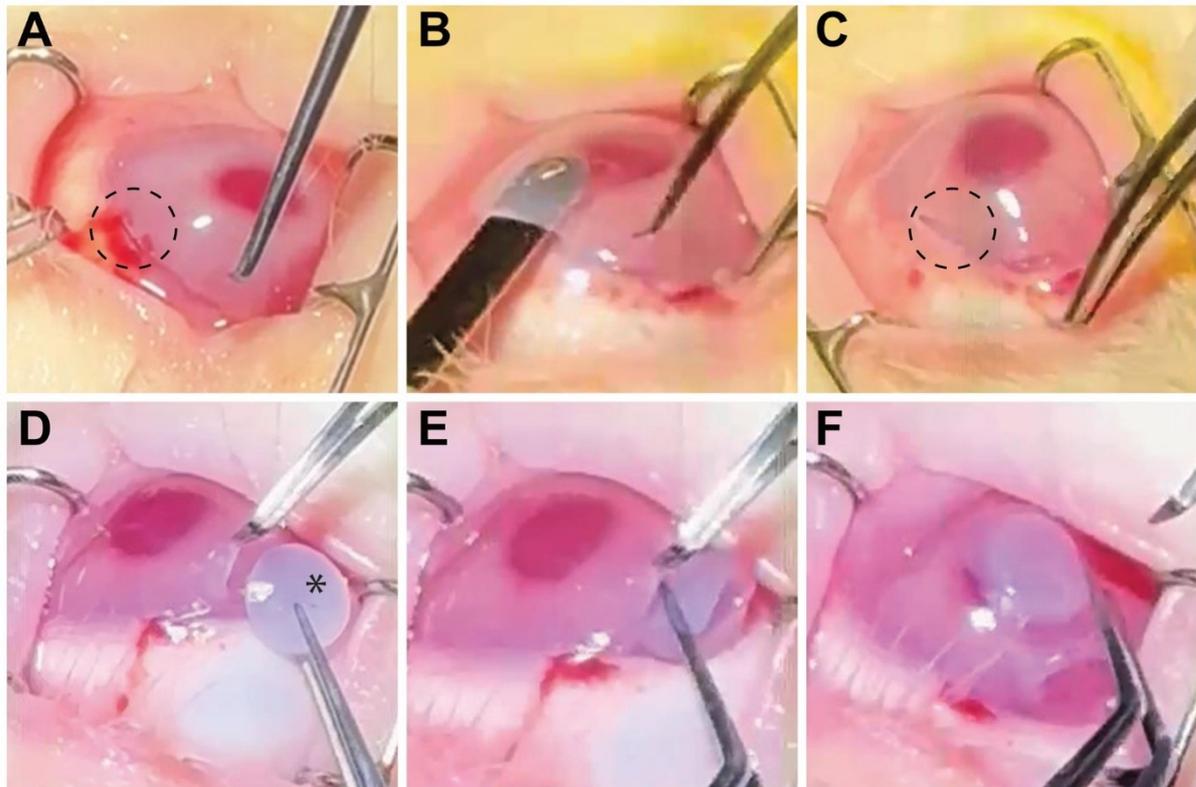
9.2.2 Transplante Dos Lentículos Por Ceratoplastia Interlamelar

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais e um grupo controle (n=4/cada grupos). Para realizar a inserção do lentículo e para todos os demais exames realizados com coelhos, esses foram primeiramente anestesiados com injeção intramuscular de 5 mg/Kg de cloridrato de xilazina e 30 mg/Kg de cloridrato de cetamina. Como anestesia local do globo ocular, aplicou-se uma gota de cloreto de prometacaína a 0.5%.

Para o implante do lentículo descelularizado foi realizado o procedimento descrito a seguir (**Figura 9**): Primeiramente realizou-se um retalho estromal com um microceratomo no olho esquerdo de cada animal. Para evitar a perfuração do globo ocular, a lâmina do microceratomo foi ajustada para realizar uma incisão controlada de 100 µm de espessura, 7.5 mm de comprimento e 18 mm de diâmetro para permitir a inserção precisa do lentículo. O comprimento da incisão se refere à extensão linear desta ao longo do eixo horizontal da córnea e o diâmetro indica o tamanho total do retalho estromal semicircular. As bordas foram cuidadosamente separadas para formar a bolsa estromal através de uma incisão de 4 mm.

Após a criação da bolsa estromal, o lentículo foi cuidadosamente inserido. No pós-operatório, os olhos foram tratados com pomada de trobamicina® e dexametasona® três vezes ao dia durante uma semana.

Figura 9: Imagem do procedimento de ceratoplastia para implante de lenticulo.



Legenda: Letra A: Incisão cirúrgica (indicada pela área tracejada); B: confecção do retalho estromal; C: bolsa estromal (destacada pela área tracejada; D-E: inserção da lenticula (marcada por um asterisco) na bolsa estromal; F: córnea com a lenticula no lugar. Fonte: Autora

9.2.3 Grupos experimentais

O primeiro grupo experimental foi denominado como grupo lenticulo-riboflavina-UV. Imediatamente após a cirurgia, instilou-se o olho com solução de Riboflavina a 1% (MERK®) a cada 5 minutos (min) com auxílio de uma pipeta, graduada com ponteiros previamente esterilizados, por 30 minutos até completa saturação do estroma corneano, o que pode ser verificado visualmente com a coloração completa de cor laranja de todo o globo ocular.

O protocolo utilizado para aplicação da cross-linking corneano para tratamento do Ceratocone foi o aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil e será anexado a este estudo (SAÚDE, 2017). Para produção da solução de Riboflavina isotônica a 0,1%, pesou-se o pó da Riboflavina e foi feita uma solução de Riboflavina a 1% (MERK®), para isso a solubilizamos em água purificada, previamente esterilizada. Para completa dissolução utilizamos um agitador mecânico, sempre mantendo a solução protegida da luz, visto que se trata de um insumo

fotossensível. Após completa dissolução armazenamos em frasco de vidro âmbar, envolto em papel alumínio, e então fizemos a instilação nos olhos com enxerto.

Para radiação UV, foi utilizada uma lanterna com emissão de radiação UVA, previamente testado pelo Departamento de Física da UFMG, quanto ao comprimento de onda emitido e potência.

Imediatamente após a saturação, foi aplicada radiação UV com 365nm por 30 minutos com a lanterna, precisamente colocada, a 5 cm da córnea. Decorrido o período de aplicação da Riboflavina e UV, os olhos destes animais foram enxaguados com solução salina estéril e então foi aplicado o colírio anti-inflamatório e antibiótico por uma semana para evitar futuras complicações decorrentes do processo cirúrgico.

Para evitar a troca de animais entre os grupos, estes foram identificados no lado interno da orelha (Figura 10) com números de 1 a 12, sendo os animais 1 a 4 pertencentes ao Grupo lenticulo-riboflavina-UV; 5 a 8 animais do grupo somente lenticulo e 9 a 12, animais do grupo controle. Ademais eles também foram separados em gaiolas, previamente identificadas, higienizadas diariamente, em salas com controle cronológico para claro/escuro (12/12hs), e temperatura controlada, conforme recomendação do CEUA-UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG), a água e ração foram mantidas “*ad libitum*”.

Figura 10: Marcação Dos Grupos



Legenda: Parte interna da orelha do animal 7 demonstrando a marcação dos Grupos. O animal 7 pertencia ao grupo Somente Lenticulo. Fonte: Da Autora

O segundo grupo experimental que continha somente o lenticulo, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico em que foi implantado o lenticulo via confecção prévia de retalho estromal, porém após a cirurgia este grupo recebeu o tratamento convencional constituído por aplicação de colírio antibiótico e anti-inflamatório para evitar intercorrências futuras decorrentes do procedimento cirúrgico.

9.2.4 Avaliação Clínica

Todos os animais foram observados clinicamente duas vezes ao dia, durante as 4 primeiras semanas, para avaliar o local da incisão do lenticulo, presença ou ausência de secreção e dor.

Ademais os animais também eram observados quanto a alimentação, ingestão regular de água, comportamento e pelagem íntegra.

Para avaliar a opacidade do lenticulo transplantado, os olhos dos animais foram fotografados diariamente com o uso de uma câmera do Iphone® 14 Pro, e em condições padronizadas com auxílio da lâmpada de fenda, aos 5, 30 e 60 dias após o implante. As imagens foram capturadas por dois observadores independentes através de um Biomicroscópio (Apramed HS5, São Carlos, Brasil) equipado com uma câmera digital Canon EOS Rebel T5 (Canon, Inc., Tóquio, Japão) para aquisição de imagens.

9.2.5 Tomografia De Coerência Óptica Do Segmento Anterior (AS-OCT)

Por meio de colaboração entre a Fundação Ezequiel Dias de Minas Gerais (FUNED) e a Faculdade de Farmácia da UFMG, realizou-se o exame de Tomografia de coerência óptica do segmento anterior (AS-OCT), após 60 dias de Ceratoplastia Interlamelar para avaliar a aderência do lenticulo e a espessura da córnea transplantada. Para isso, os animais foram transportados em condições adequadas para a FUNED e as imagens foram realizadas por meio do dispositivo Spectralis HRA® + OCT (Heidleberg Engineering, Alemanha) equipado com um módulo de segmento anterior (MAS). Imagens de alta resolução da córnea e da área do lenticulo foram capturadas em modo volumétrico vertical através de uma lente de 30°. Utilizou-se a função automática em tempo real do dispositivo além da potência infravermelha total e uma profundidade de varredura de 16,6 mm. A espessura da córnea foi medida da camada do epitélio ao endotélio em intervalos de 900 µm à esquerda e à direita do centro da córnea. Os resultados são apresentados como espessura média ± DP (n=4).

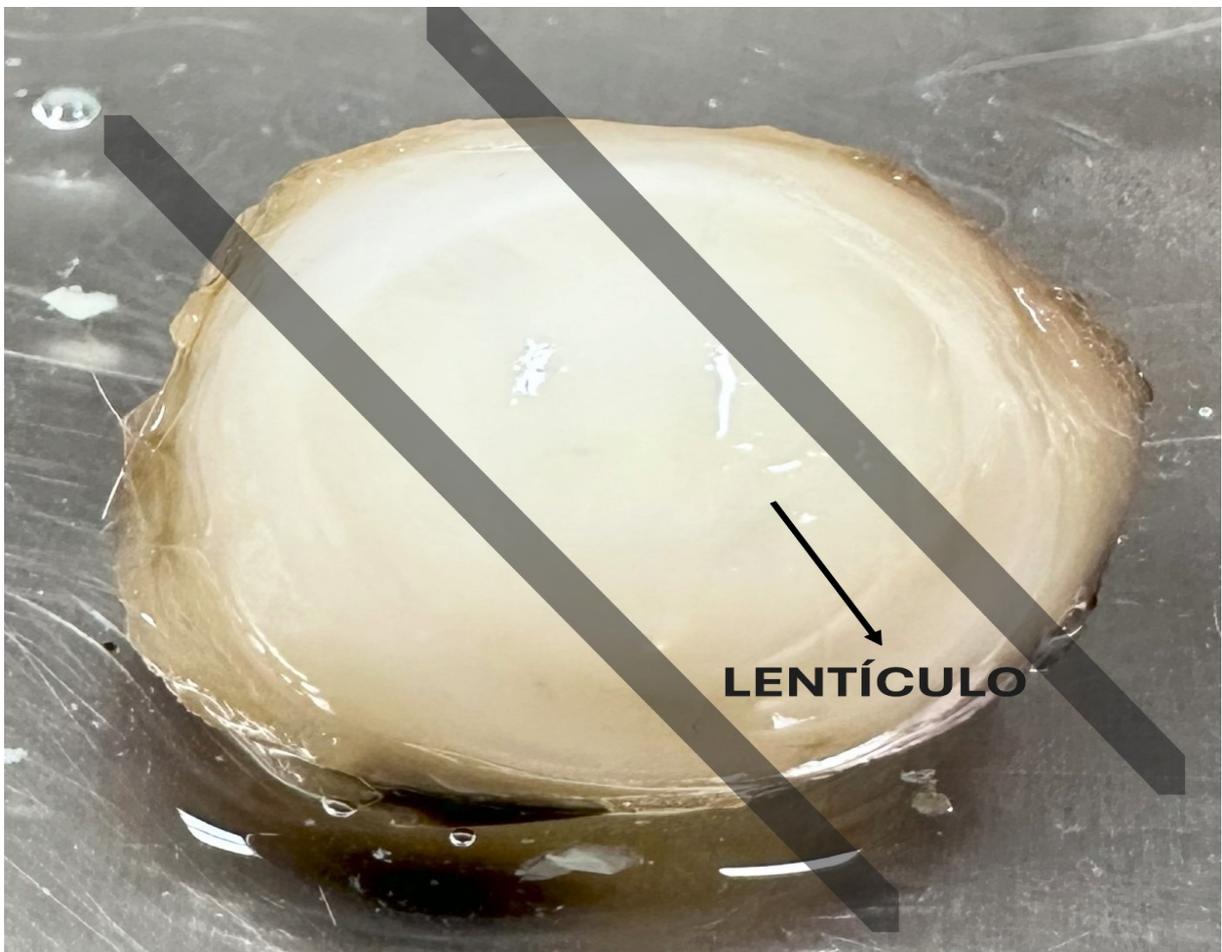
9.2.6 Topografia da Córnea

Através da topografia da córnea buscou-se avaliar a curvatura da córnea. Para isso no 60º dia pós implante do lenticulo os animais foram avaliados usando o método Plácido com 25 anéis cônicos por meio do Sistema de Modelagem Topográfica (TMS-4N, Tomey Corporation) que permite adquirir imagens topográficas das córneas com leve opacidade, embora seu design primário seja otimizado para córneas claras. A curvatura da córnea foi medida como o valor médio de K na ceratometria simulada e o índice de irregularidade da superfície (IRF). Os valores foram comparados antes e 60 dias após a ceratoplastia em ambos os grupos avaliados neste estudo.

9.2.7 Histologia e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após a topografia da córnea de todos os animais, estes foram eutanasiados com overdose intravenosa de tiopental sódico (90 mg/Kg). Os olhos foram enucleados (Figura 11) e preparados para análise histológica com a coloração por H&E de um fragmento contendo a área do lenticulo, conforme descrito em 4.1.1, associado à cornea do hospedeiro. Parte deste material também foi enviado para análise por MET, conforme descrito previamente.

Figura 11: Imagem De Um Globo Ocular Enucleado No 60º Dia Pós Implante Do Lenticulo



Legenda: A delimitação indica a região que contém tecido do hospedeiro associado ao lenticulo implantado. Fonte: Da Autora

9.2.8 Análise Estatística

Para análise estatística, os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). O GraphPad Prism® (versão 8.4.2) foi utilizado para criação de gráficos e análises estatísticas. A significância estatística foi definida como p menor que 0,05. As comparações entre os dois grupos foram feitas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

10 RESULTADOS

10.1 Avaliação Clínica

O procedimento cirúrgico para inserção do lenticulo transcorreu sem intercorrências. No pós-operatório imediato, todos os animais apresentaram secreção mucosa nos olhos, sendo que as pálpebras inferiores e superiores apresentaram sinais de irritação no tecido, uma condição comum que ocorre neste tipo de cirurgia, devido ao uso Blefarostato Oftálmico. Esse quadro clínico foi resolvido em poucos dias devido à assepsia diária com solução salina estéril e aplicação de pomada de trobamicina.

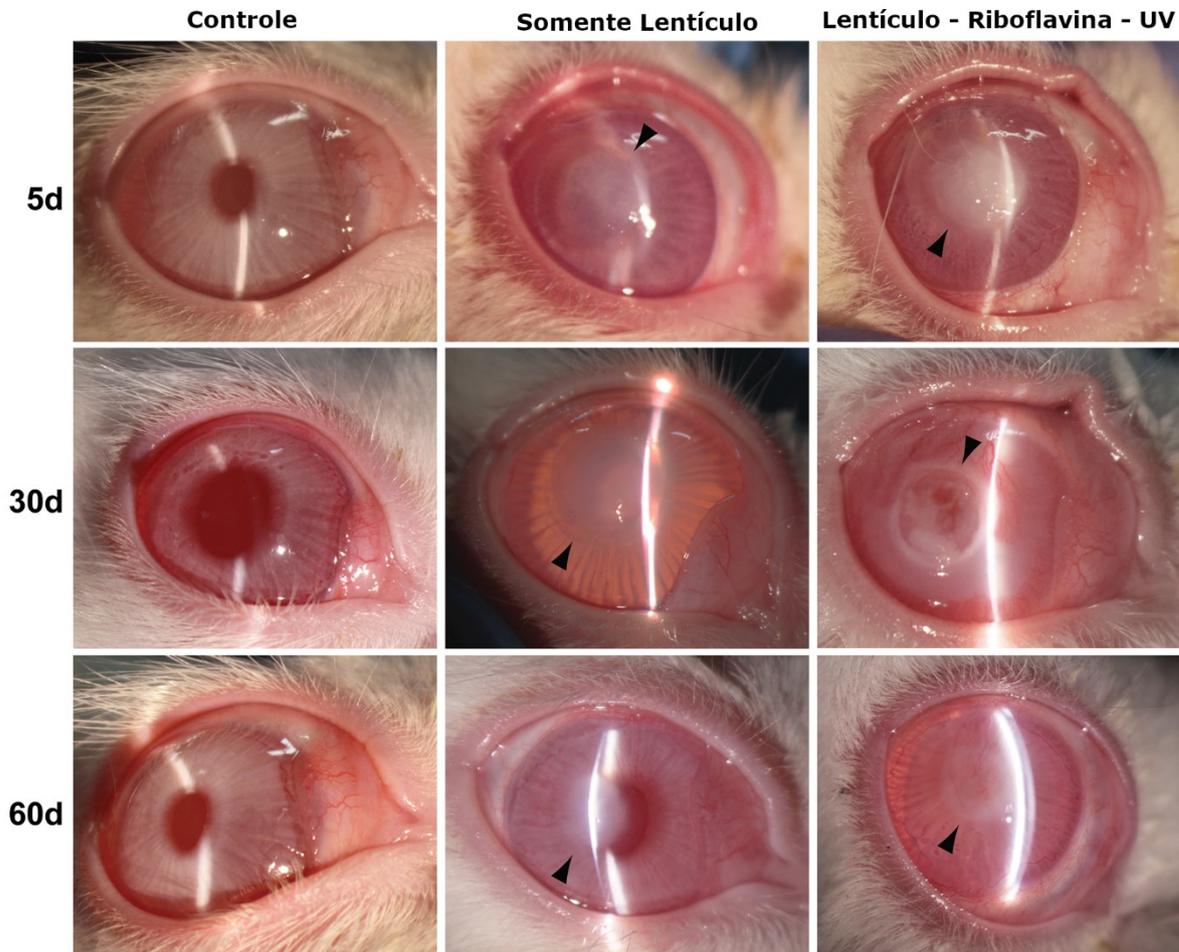
Não houve extrusão da lenticulo, por nenhum animal, durante os 2 meses de experimento.

Na terceira semana pós implante dois animais desenvolveram neovascularização corneal que com o decorrer dos dias e assepsia com solução salina estéril em temperatura ambiente, três vezes ao dia, teve regressão do quadro sem prejudicar o enxerto.

Através da lâmpada de fenda, observamos que cinco dias após o implante, o lenticulo estava opaco em ambos os grupos, com exceção do grupo controle.

A Figura 12 mostra os resultados do acompanhamento dos olhos com o implante, destacando o lenticulo e a transparência da córnea. Por meio da tecnologia da lâmpada de fenda, observamos que no quinto dia pós-operatório, o lenticulo apareceu opaco nos grupos com enxerto, sendo que no grupo Lenticulo-Riboflavina-UV, a opacidade estava mais pronunciada. No entanto, essa opacidade não interferiu na visibilidade da íris.

Figura 12: Exame de Lâmpada de Fenda



Legenda: Imagens obtidas com lâmpada de fenda dos grupos controle, Somente Lenticulo e Lenticulo-Riboflavina-UV, realizadas entre 5 e 60 dias após a ceratoplastia para implante de lenticulo. As setas indicam a posição da lenticulo em cada imagem. Fonte: Da autora.

Após trinta dias decorridos do implante do lenticulo, o grupo Somente-Lenticulo ainda apresentava opacidade moderada quando avaliada através da luz direta, comparado ao grupo controle e Lenticulo-Riboflavina-UV, que já apresentavam opacidade reduzida. No 60º dia pós ceratoplastia, o lenticulo do grupo Somente-Lenticulo permanecia mais opaca em comparação ao grupo Lenticulo-Riboflavina-UV.

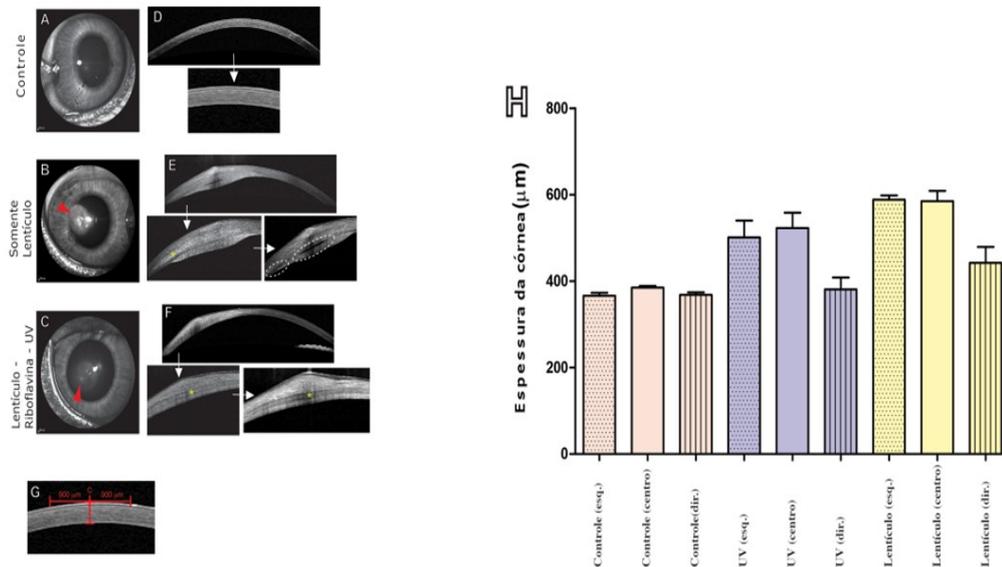
A partir desses dados, avaliamos que os resultados favoráveis de uma suposta adesão do lenticulo ao tecido do hospedeiro, realizamos imagens por OCT e análise histológica com a coloração H&E e MET, que será discutido nos tópicos seguintes.

10.1.1 Tomografia De Coerência Óptica Do Segmento Anterior (AS-OCT)

Para avaliar a eficácia do transplante heterólogo de lenticulo porcino seguido da aplicação de riboflavina-UV, foi empregada a AS-OCT, realizada no 60º dia pós implante do lenticulo. Especificamente através dessa tecnologia, avaliamos a eficácia do transplante heterólogo do lenticulo porcino ao tecido corneano do hospedeiro a partir da aderência do tecido e medimos a espessura da córnea.

Imagens da AS-OCT demonstraram que o lenticulo estava aderido ao estroma da cornea do hospedeiro, em ambos os grupos avaliadas neste experimento. No entanto, no grupo Lenticulo-Riboflavina-UV, em que os animais foram tratados com riboflavina seguido de exposição à radiação UV, o lenticulo apresentou uma adesão mais eficaz, caracterizada por uma superfície lisa e sem sinais de edema (Figura 13). Já o grupo Somente-Lenticulo apresentou uma área de edema e uma superfície irregular no olho com o implante, o que indica que o lenticulo não estava totalmente incorporado ao tecido do hospedeiro. Na figura 13, é possível observar os espaços vazios, o que vai de apoio ao que foi relatado anteriormente. Ademais, é importante ressaltar que, nenhum dos grupos apresentou sinais de células inflamatórias nas imagens avaliadas.

Figura 13:Imagens AS-OCT



Legenda: Imagens representativas de tomografia de coerência óptica do segmento anterior (AS-OCT) de córneas de coelhos, 60 dias após a ceratoplastia para implante de lenticulo. Painéis A-C mostram cortes transversais do segmento anterior dos olhos dos coelhos nos diferentes grupos avaliados, com as setas vermelhas indicando a lenticula implantada. No painel D, as imagens AS-OCT evidenciam a lenticula (asterisco amarelo) incorporada ao estroma corneano nos grupos somente lenticulo e lenticulo-riboflavina-UV. No grupo somente lenticulo, regiões de edema e espaços vazios são destacadas por círculos pontilhados brancos. As setas brancas indicam o aumento progressivo do tamanho das imagens AS-OCT. O painel G apresenta as camadas da córnea com a identificação das regiões utilizadas para medir a espessura corneana (linhas vermelhas). Finalmente, no painel H, estão as medidas da espessura corneana dos grupos avaliados, tanto no centro quanto em intervalos de 900 µm à esquerda e à direita do centro, apresentadas como média \pm desvio padrão (n=4). Fonte: Da Autora

Foi observado, que nos grupos somente-lenticulo e lenticulo-riboflavina-UV, houve um aumento na espessura central da cornea de aproximadamente 52% e 35%, respectivamente. Esse aumento já era esperado devido à implantação de um tecido xenogênico no EC do hospedeiro. No grupo controle, a espessura central da córnea foi superior, mas não apresentou variações significativas entre os lados direito e esquerdo no intervalo medido. Em contrapartida,

ambos os grupos apresentaram maior espessura da córnea no lado esquerdo em relação ao lado direito, o que supomos que pode ter ocorrido devido à localização do lenticulo, uma vez que este tecido não foi implantado, precisamente, no centro da córnea do hospedeiro, o que pode ser observado na **(Figura 9)**, onde é possível observar a técnica de implante e o posicionamento posterior do lenticulo.

No grupo Somente-Lenticulo, o lado direito demonstrou aumento da espessura da córnea, provavelmente devido ao edema visível nas imagens de OCT. Tal condição não foi observada nos demais grupos.

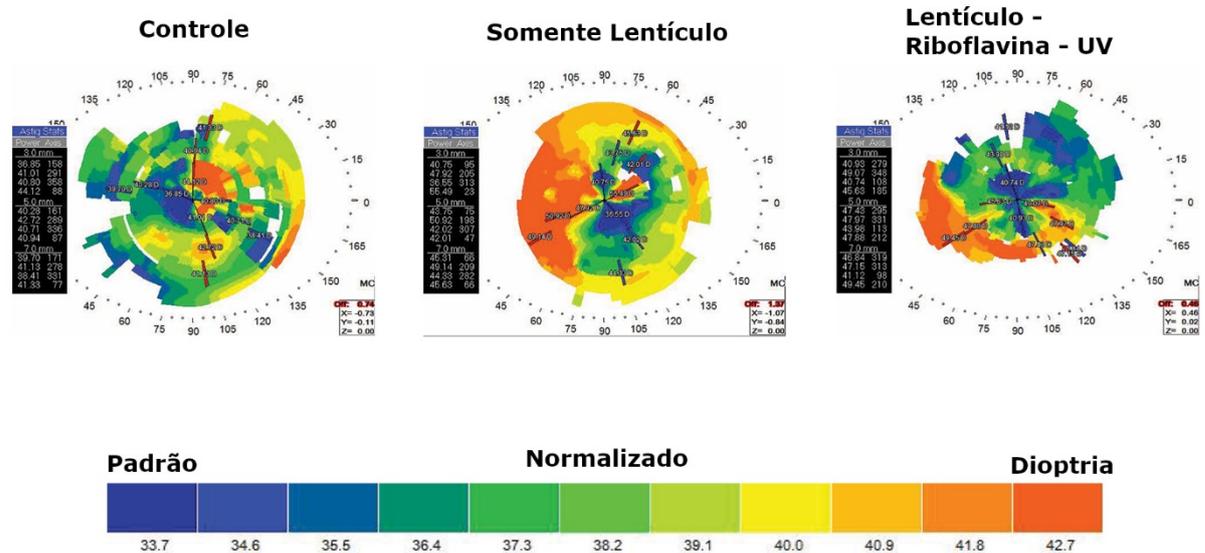
Em nosso estudo, a espessura central da córnea dos animais do grupo controle foi de $385,0 \pm 4,0$. Já o lado esquerdo e direito mediram $366,0 \pm 7,0$ μm e $368,3 \pm 6,0$ μm , respectivamente. O grupo lenticulo-riboflavina-UV, a espessura do olho contralateral direito, que não possuía lenticulo, foi de $381,0 \pm 7,62$ μm . Esses dados sugerem que, ao 60º dia após a cirurgia, o procedimento de transplante xenogênico seguido da administração de riboflavina e radiação UV, não resulta em edema corneal.

Logo, diante de todos os dados apresentados, o uso de riboflavina com radiação UV após a ceratoplastia pode ser uma estratégia viável para promover a integração e o repovoamento celular de lenticulos descelularizados heterólogos transplantados.

10.1.2 Topografia Da Córneas Pós Transplante Heterólogo

A análise topográfica é uma técnica não invasiva para avaliar qualitativa e quantitativamente a superfície da córnea. Em nosso estudo, empregamos o Método de Plácido® para analisar a superfície anterior da cornea após o implante do lenticulo, via ceratoplastia, comparado ao grupo controle. A topografia dos grupos Somente-Lenticulo e Lenticulo-Riboflavina-UV (n=4/grupo) foi medida no 60º dia pós transplante heterólogo e comparada ao grupo controle. Ademais, também avaliamos se o uso da riboflavina com radiação UV teria alguma influência no desenvolvimento do CK pós transplante, visto que o tratamento proposto deveria resultar em um tecido com fibras de colágeno mais organizadas e conseqüentemente ao não desenvolvimento do CK.

Figura 14: Topografia da Córnea



Legenda: Ilustração topográfica da superfície anterior da córnea de coelhos dos grupos controle; grupo somente lenticulo e grupo lenticulo-riboflavina-UV, avaliados após 60 dias do implante do lenticulo. Fonte: Da Autora

A Figura 14 ilustra a topografia da superfície anterior da córnea dos animais dos grupos controle, somente lenticulo e grupo lenticulo-riboflavina-UV, todos avaliados no mesmo dia sob as mesmas condições ambientais. A tabela 2 apresenta os resultados para os parâmetros avaliados, incluindo a curvatura da córnea, representado pelo Valor K e o índice de irregularidade superficial (ISR) derivados da análise topográfica.

As imagens topográficas revelaram que o grupo tratado, ou seja, o grupo lenticulo-riboflavina-UV apresentou maior número de áreas com topografia normal quando comparado ao grupo apenas lenticulo. Esse resultado sugere que a radiação UV sobre a riboflavina foi capaz favorece o cross-linking corneano, resultando em fibras de colágeno mais organizadas.

Após 60 dias de pós-operatório, foram observadas diferenças significativas na curvatura da córnea entre os três grupos (**Tabela 2:**

Parâmetros avaliados nas medições de topografia corneana). Esse achado era esperado pois, conforme foi apresentado nas imagens AS-OCT, o implante do lenticulo promove um aumento da espessura e do volume da córnea, sendo que a curvatura da cornea no grupo apenas lenticulo foi maior do que no grupo tratado com riboflavina e UV.

Tabela 2:
Parâmetros avaliados nas medições de topografia corneana

	Controle	Somente Lenticulo	Riboflavina-Lenticulo-UV
K (D)	41,41 ± 1,62	48,32 ± 1,37*	44,61 ± 1,39*#
SRI	2,11 ± 0,06	2,21 ± 0,19	2,30 ± 0,25

Legenda:

K = valor de ceratometria simulada que indica a curvatura da córnea; SRI = Índice de Irregularidade da Superfície.

Os valores são representados como média ± DP, n=4. *Significativamente diferente do controle;

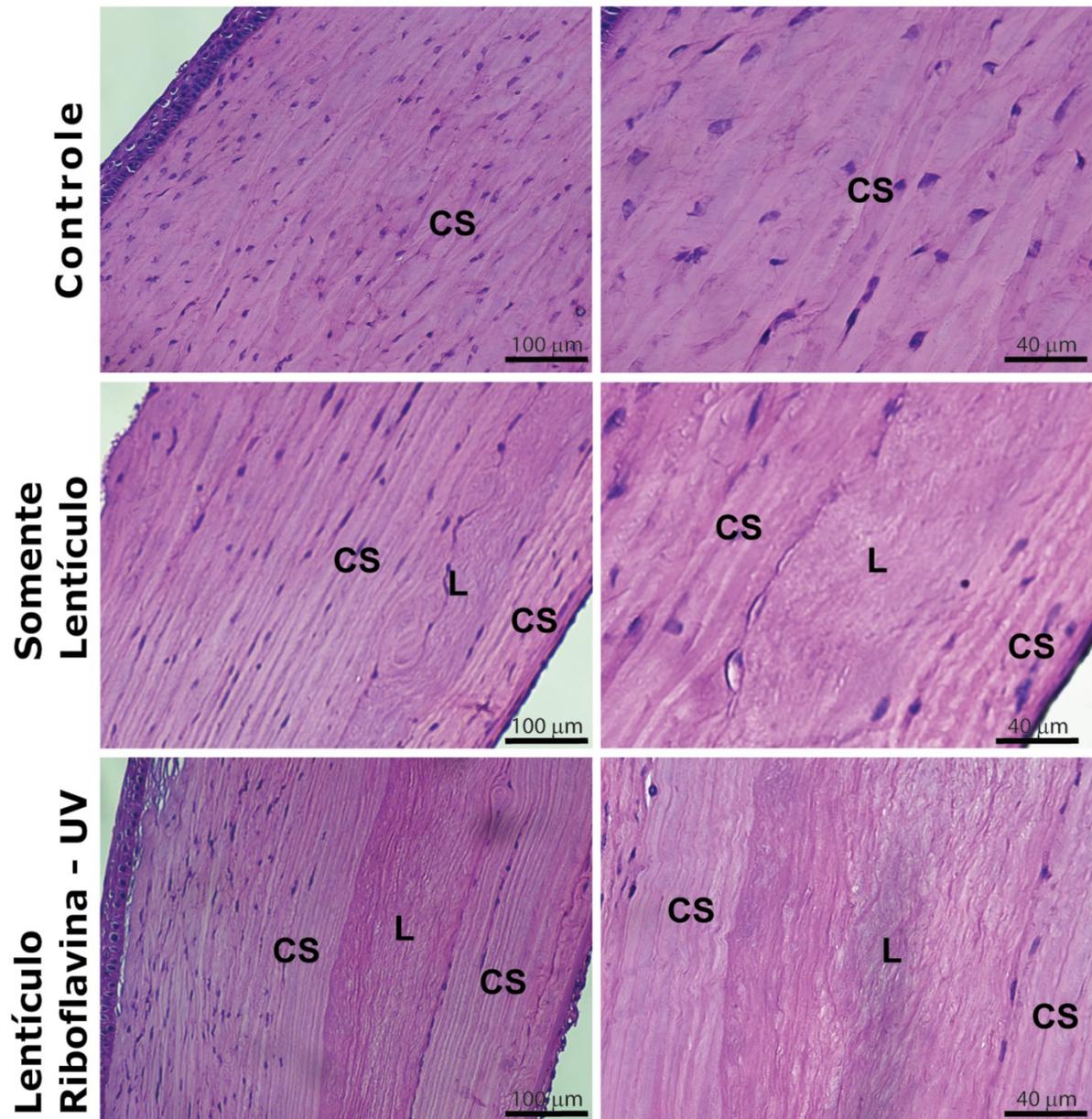
#Significativamente diferente do Apenas Lenticulo, p<0,05

O SRI, ao medir a irregularidade da superfície da córnea, não demonstrou irregularidades capazes de provocar distúrbios da córneas pós transplante e que poderiam afetar a qualidade visual dos animais. Em nosso estudo, não observamos mudança significativa entre os grupos demonstrando a eficácia do procedimento e a ausência de complicações cirúrgicas.

10.1.3 Análise Histológica

A Figura 15 apresenta as fotomicrografias histológicas da córnea dos animais dos grupos controle, somente-lenticulo e lenticulo-riboflavina-UV. Observa-se que, após 60 dias de ceratoplastia, o lenticulo se integrou ao tecido estromal dos coelhos, com fibras de colágeno organizadas. Nos dois grupos submetidos à cirurgia, nota-se a presença de queratócitos e a ausência de células inflamatórias, o que indica que o procedimento foi seguro e não houve rejeição do transplante xenográfico. No grupo controle, o tecido permanece intacto, com queratócitos bem-organizados e fibrilas de colágeno.

Figura 15: Imagens Histológicas Com Coloração Por H&E.



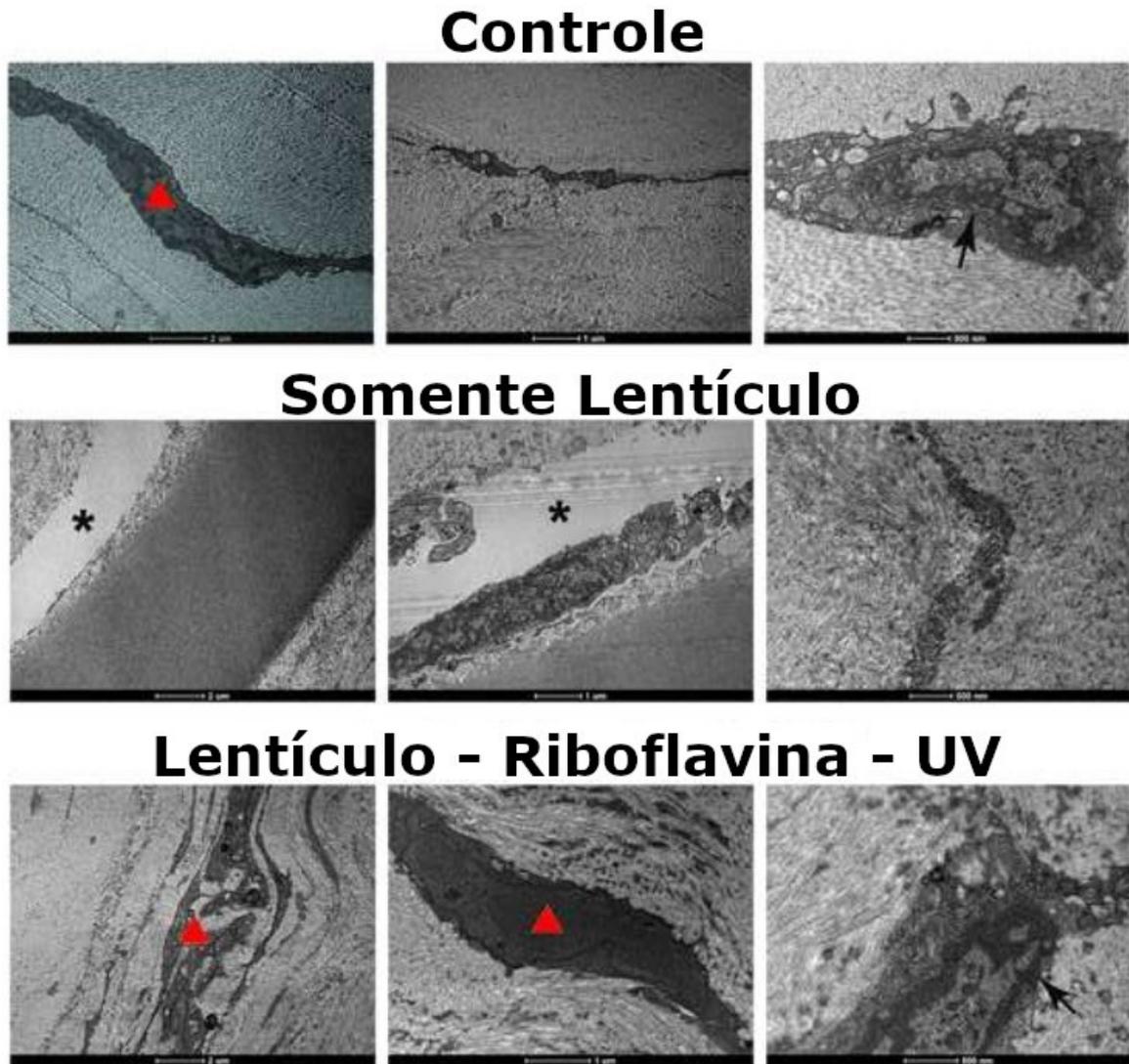
Legenda: Imagens histológicas da córnea, dos grupos avaliados neste estudo, em diferentes ampliações. As seções foram coradas com hematoxilina e eosina. Nos grupos Somente Lenticulo e Lenticulo-Riboflavina-UV, observa-se o lenticulo integrado no estroma corneano após 60 dias de ceratoplastia. CS = estroma corneano; L = lenticulo.

Fonte: Da Autora

10.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão evidenciou uma adesão superior do lentículo implantado no grupo tratado com Riboflavina-UV, quando comparado ao grupo Somente-Lentículo. Além disso, observou-se que o arranjo ultra estrutural das fibrilas de colágeno apresentava uma organização mais regular e ordenada no grupo tratado com Riboflavina-UV, em comparação com o grupo somente-lentículo(Figura 16). Tal melhoria pode ser atribuída ao processo de cross-linking promovido pela riboflavina e pela exposição à luz UV, que facilita a reorganização das fibrilas de colágeno, contribuindo potencialmente para o aumento da resistência da córnea e para a restauração de sua estabilidade mecânica. Adicionalmente, foi notada uma maior presença de queratócitos neste grupo, indicando o repovoamento do tecido descelularizado pelas células do hospedeiro.

Figura 16: Imagens de Microscopia eletrônica De Transmissão.



Legenda: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão da córnea dos grupos avaliados em diferentes ampliações. A - Grupo controle (somente cirurgia, sem implantação de lentículo); B - Grupo somente lentículo: presença de espaços vazios (asterisco) entre o lentículo implantado e as fibras de colágeno, demonstrando que o lentículo não estava bem aderido ao hospedeiro; C - Grupo lentículo-riboflavina-UV: A ausência de espaços vazios entre o lentículo implantado e as fibras de colágeno mostra que o lentículo estava mais aderido ao hospedeiro. Também é possível observar que as fibras de colágeno estão mais organizadas neste grupo. Setas vermelhas demonstram a presença de queratócitos, setas pretas indicam detritos celulares

Fonte: Da autora.

11 DISCUSSÃO

O lenticulo implantado foi confeccionado com o sistema de laser Femtossegundo que possibilita uma maior precisão no corte lamelar desse tecido refrativo, tendo este comprimento, diâmetro e espessura ideais para o implante de acordo com o globo ocular do receptor (ALMODIN et al., 2018; RIAU et al., 2020). Em nosso estudo foi demonstrado que o lenticulo obtido a partir do estroma de córneas porcinas tinha dimensões adequadas para o implante nos olhos dos coelhos, o que comprova a eficiência e importância do Femtossegundo para nosso estudo.

Após a descelularização e os resultados obtidos com os estromas porcinos, optamos pela utilização do SDS a 1% visto que na descelularização dos EC esta concentração foi capaz de remover as células e o material genético deste tecido e ainda manter a estrutura da MEC. estrutura responsável pela sustentação do tecido e que daria o suporte necessário para o repovoamento com as células do hospedeiro dos lenticulos implantados. Yam, GF *et al.* (2016) relatou em seu estudo sobre a importância do espaço celular vazio encontrado dentro do estroma, pós descelularização com SDS, e que o EC exibia arquitetura das fibras de colágeno alinhadas semelhante ao estroma nativo (YAM et al., 2016b).

O SDS (Dodecil sulfato de sódio) apresenta um grupo iônico responsável pela interação nas ligações proteína-proteína, o que facilita a solubilização tanto da membrana celular quanto da membrana nuclear (DU et al., 2011b).

Em contrapartida, no ano de 2011, Gonzáles-Andrades et al., relatou em seu estudo que o SDS, em uma concentração menor comparada à utilizada para descelularizar os lenticulos em nosso estudo, resultou em alto nível de desorganização das fibras colágenas e comprometimento da MEC. Essas duas citações demonstram o quão importante é o estudo e teste, “*in vitro*” e “*in vivo*”, de uma mesma solução descelularizadora por diferentes pesquisadores.

Após o implante dos lenticulos nos dois grupos deste estudo, havia o receio da rejeição do tecido pelo sistema imune do hospedeiro visto que se tratava de um transplante heterólogo e na literatura revisada, havia relatos de rejeição de enxerto de córneas devido a respostas imunes complexas do hospedeiro que envolviam o reconhecimento de antígenos de histocompatibilidade estranhos do enxerto não reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro (PANDA et al., 2007).

Nossos resultados, demonstraram que o implante heterólogo de lenticulos foi realizado com sucesso e não provocou uma resposta imune, a longo prazo, do hospedeiro. O lenticulo

permaneceu aderido e promoveu o aumento de espessura do estroma da córnea, principalmente no grupo riboflavina-lenticulo-UV. Estes resultados são semelhantes a estudos que aplicaram técnicas semelhantes em enxertos xenogênicos (ALIO DEL BARRIO et al., 2015).

Para verificar se havia células inflamatórias ou uma possível rejeição do enxerto realizamos o acompanhamento diário da evolução dos olhos dos animais, registradas por meio de fotografias e pela lâmpada de fenda ao 5º, 30º e 60º dia pós transplante. Visualmente não identificamos quaisquer sinais de rejeição do implante advindo de comportamento animal diferenciado. Todos os animais se adaptaram ao responsável pelos cuidados diários e se mostravam extremamente dóceis e fáceis de lidar, seja por manipulação para imagens ou higienização do ambiente. Sendo assim, nossos resultados demonstraram que o implante heterólogo de lenticulos foi bem-sucedido em ambos os grupos.

Resultados diferentes foram encontrados nos dois grupos testados quanto ao AS-OCT, topografia de córnea, histologia e MET. O grupo riboflavina-lenticulo-UV teve melhores resultados quando comparados ao grupo somente lenticulo, nossos achados por meio da AS-OCT, topografia de Córnea, H&E e MET corroboraram com os resultados encontrados em outros estudos descritos na literatura. O cross-linking da cornea por meio Riboflavina e incidência de luz UV confere maior resistência ao tecido e córneas reticuladas podem apresentar diâmetro das fibras de colágeno relativamente maiores do que um tecido não tratado por riboflavina-UV (MEEK; HAYES, 2013).

Com relação aos resultados encontrados, nos dois grupos através da AS-OCT, eles também se mostraram semelhantes aos já relatados na literatura e até mesmo em exames de seres humanos portadores de CK. Nestes pacientes, o AS-OCT calcula a espessura da camada de Bowman e através da espessura média da cornea inferior e superior, preveem a evolução ou até mesmo o diagnóstico desta ectasia (VENKATESWARAN et al., 2018b). Em nosso estudo, nenhum dos grupos apresentou um possível afinamento da córnea ou formação de cone durante o tempo de estudo, o que pode ser um indício de que o transplante heterólogo não é um predisponente ao desenvolvimento do CK. Venkateswaran e colaboradores (2018) afirma que o AS-OCT veio para preencher uma lacuna deixada pela lâmpada de fenda ao realizar imagens da cornea superior e inferior, além de realizar a medida entre o centro e a periferia.

Nosso grupo ao realizar as imagens AS-OCT, MET e H&E buscava comprovar a aderência do tecido heterólogo ao tecido estromal do hospedeiro. E conforme foi evidenciado nos resultados acima descritos, o lenticulo estava aderido ao tecido estromal do hospedeiro. Sendo que o grupo lenticulo-riboflavina-UV obteve melhores resultados quanto à adesão do tecido que o grupo somente lenticulo.

Os resultados histológicos do nosso estudo não demonstraram sinais de inflamação como presença de neutrófilos ou perda de endotélio próximo à lesão cirúrgica ou até mesmo no tecido implantado. O lenticulo implantado nos dois grupos de estudo se mostrava perfeitamente aderido ao tecido hospedeiro.

Nossos resultados foram diferentes de alguns estudos em que foi realizado o cross-linking da cornea com riboflavina e UV, onde houve desde dano apoptótico de ceratócitos ao longo do estroma até dano endotelial, visualizados em imagens histológicas conforme pode ser visto e comparado ao estudo realizado por Wollensak G. et al (2009).

Com relação ao exame topográfico da córnea, nosso grupo utilizou um topografo humano adaptado para exames em coelhos, no entanto, os olhos destes animais são lateralizados o que dificultou, de uma certa forma, a realização do exame, mas não comprometeu os resultados. As imagens geradas através dos anéis de Plácido do Topográfico, confirmaram o que já esperávamos como resultado do estudo: o cross-linking corneano não causaria Ceratocone nos animais que receberam Riboflavina e indução através de UV. Ademais, as imagens quando comparadas com o grupo somente lenticulo mostram que o uso da riboflavina e UV pode ter contribuído para a formação de imagens que se aproximam mais do grupo controle, ou seja, imagens normais enquanto as geradas pelo grupo somente lenticulo estavam mais próximas ao desenvolvimento de dioptrias.

Diversos estudos mostram que o exame de Topografia é essencial para o diagnóstico e acompanhamento da evolução de doenças como o CK (FAN et al., 2018b).

Com relação a opacidade apresentada nas imagens por Lâmpada de Fenda, nossos resultados estão de acordo com os já apresentados na literatura científica. Essa opacidade, principalmente por volta do 30º dia, ocorre devido ao aumento de espaçamento entre as fibras de colágeno e alterações parciais na MEC (PANTIC et al., 2023). No entanto, como já mencionado em nossos resultados, o grupo Somente Lenticulo, no 30º dia pós implante, apresentava um lenticulo mais opaco comparado ao grupo controle e grupo Lenticulo-Riboflavina-UV. Logo inferimos que, a o cross-linking foi um fator essencial na organização das fibras de colágeno e redução da opacidade do lenticulo no grupo tratado.

12 CONCLUSÃO

O experimento desenvolvido por nosso grupo de pesquisa demonstrou que o xenotransplante de lenticulos porcinos descelularizados resultou em aumento da espessura no estroma, sem que fosse observada rejeição tecidual em nenhum dos animais hospedeiros em todos os métodos de avaliação. Isso sugere que a imunotividade do lenticulo é negligenciável. Além disso, a aplicação tópica de solução de riboflavina combinada com radiação UV promoveu de forma eficaz o cross-linking das fibras de colágeno após a ceratoplastia, resultando em um tecido mais organizado e bem integrado. Logo, a abordagem de usar implantação xenográfica de lenticulo seguida pela aplicação de riboflavina e radiação UV parece ser uma alternativa promissora para o tratamento de doenças corneanas como o ceratocone. No entanto, são necessários mais estudos de longo prazo para validar a técnica e confirmar os benefícios da riboflavina e da irradiação UV na reticulação do tecido xenogênico transplantado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, P.; FREITAS, V. Histologia Interativa. Conceitos Básicos. Disponível em: <<https://mol.icb.usp.br/index.php/1-23-conceitos-basicos/>>. Acesso em: 5 set. 2022.

AHEARNE, M. Corneal extracellular matrix decellularization. Em: [s.l: s.n.]. p. 81–95.

ALIO DEL BARRIO, J. L. et al. Acellular human corneal matrix sheets seeded with human adipose-derived mesenchymal stem cells integrate functionally in an experimental animal model. *Experimental Eye Research*, v. 132, p. 91–100, mar. 2015.

ALMODIN, E. et al. Tratamento aditivo do ceratocone por “crosslinking” do colágeno após implante de anel de Ferrara. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 68, n. 3, p. 138–145, jun. 2009.

ALMODIN, E. M. et al. Femtosecond laser–assisted intrastromal corneal lenticule implantation for treatment of advanced keratoconus in a child’s eye. *Journal of Cataract and Refractive Surgery Online Case Reports*, v. 6, n. 2, p. 25–29, abr. 2018.

ALTURKISTANI, H. A.; TASHKANDI, F. M.; MOHAMMEDSALEH, Z. M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global journal of health science*, 25 jun. 2015.

ANDERSON, J.; ROLLS, G. An Introduction to Routine and Special Staining. Disponível em: <<https://www.leicabiosystems.com/pt-br/knowledge-pathway/an-introduction-to-routine-and-special-staining/>>. Acesso em: 5 set. 2022.

ANDREASSEN, T. T.; HJORTH SIMONSEN, A.; OXLUND, H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Experimental Eye Research*, v. 31, n. 4, p. 435–441, out. 1980.

BALASUBRAMANIAN, D.; KANWAR, R. Molecular pathology of dityrosine cross-links in proteins: Structural and functional analysis of four proteins. Em: *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease*. Boston, MA: Springer US, 2002. p. 27–38.

BARKER, N. H. Ocular herpes simplex. *BMJ clinical evidence*, v. 2008, 23 jul. 2008.

BARRIENTEZ, B. et al. Corneal injury: Clinical and molecular aspects. *Experimental Eye Research*, v. 186, p. 107709, set. 2019.

BAYYOUNG, T. et al. Decellularized Bovine Corneal Posterior Lamellae as Carrier Matrix for Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. *Current Eye Research*, v. 37, n. 3, p. 179–186, 15 mar. 2012.

BONFADINI, G. et al. Donation and waiting list for corneal transplantation in the State of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Oftalmologia Sociedade Brasileira de Oftalmologia*, , 2014.

BRADFORD, S. et al. A review of the epithelial and stromal effects of corneal collagen crosslinking. *The Ocular Surface*, v. 30, p. 150–159, out. 2023.

CASCALHO, M.; PLATT, J. L. Challenges and potentials of xenotransplantation. Em: *Clinical Immunology*. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 1215–1222.

CHAN, J. K. C. The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, v. 22, n. 1, p. 12–32, 9 fev. 2014.

CONSELHO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA. Fila para transplante de córnea no Brasil quase triplica em uma década. Disponível em: <<https://www.cbo.net.br/fila-para-transplante-de-cornea-no-brasil-quase-triplica-em-uma-decada?page=fila-para-transplante-de-cornea-no-brasil-quase-triplica-em-uma-decada>>. Acesso em: 10 dez. 2024.

COOPER, D. K. C. et al. Xenotransplantation—the current status and prospects. *British Medical Bulletin*, v. 125, n. 1, p. 5–14, 1 mar. 2018.

COURVILLE, C. B.; SMOLEK, M. K.; KLYCE, S. D. Contribution of the ocular surface to visual optics. *Experimental Eye Research*, v. 78, n. 3, p. 417–425, mar. 2004.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, abr. 2011.

CRITCHFIELD, J. W. et al. Keratoconus: I. Biochemical studies. *Experimental Eye Research*, v. 46, n. 6, p. 953–963, jun. 1988.

DAVIDSON, A. E. et al. The pathogenesis of keratoconus. *Eye*, v. 28, n. 2, p. 189–195, 20 fev. 2014.

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.

DI GIROLAMO, N. Biologicals and Biomaterials for Corneal Regeneration and Vision Restoration in Limbal Stem Cell Deficiency. *Advanced Materials*, 28 maio 2024.

DOWNIE, L. E. et al. Redefining the human corneal immune compartment using dynamic intravital imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 120, n. 31, 24 ago. 2023.

DU, L. et al. Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. *British Journal of Ophthalmology*, v. 95, n. 3, p. 410–414, 1 mar. 2011a.

DU, L. et al. Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. *British Journal of Ophthalmology*, v. 95, n. 3, p. 410–414, 1 mar. 2011b.

EKSER, B.; LI, P.; COOPER, D. K. C. Xenotransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, v. 22, n. 6, p. 513–521, dez. 2017.

ESPANDAR, L.; MEYER, J. Keratoconus: Overview and update on treatment. *Middle East African Journal of Ophthalmology*, v. 17, n. 1, p. 15, 2010.

FAN, R. et al. Applications of corneal topography and tomography: a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 46, n. 2, p. 133–146, 11 mar. 2018a.

FAN, R. et al. Applications of corneal topography and tomography: a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 46, n. 2, p. 133–146, 11 mar. 2018b.

FEIZI, S. et al. Central and Peripheral Corneal Thickness Measurement in Normal and Keratoconic Eyes Using Three Corneal Pachymeters. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, v. 9, n. 3, p. 296–304, 1 jul. 2014.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; AHEARNE, M. Decellularization and recellularization of cornea: Progress towards a donor alternative. *Methods*, v. 171, p. 86–96, jan. 2020.

FISCHBARG, J. The Corneal Endothelium. Em: [s.l: s.n.]. p. 113–125.

GARCÍA-GARETA, E. et al. Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions. *Journal of Tissue Engineering*, v. 11, 22 jan. 2020.

GHEZZI, C. E.; RNJAK-KOVACINA, J.; KAPLAN, D. L. Corneal Tissue Engineering: Recent Advances and Future Perspectives. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, v. 21, n. 3, p. 278–287, 1 jun. 2015.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, jul. 2006.

GILLETTE, T. E.; CHANDLER, J. W.; GREINER, J. V. Langerhans Cells of the Ocular Surface. *Ophthalmology*, v. 89, n. 6, p. 700–711, jun. 1982.

GOKUL, A.; VELLARA, H. R.; PATEL, D. V. Advanced anterior segment imaging in keratoconus: a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 46, n. 2, p. 122–132, 21 mar. 2018.

GONZÁLEZ-ANDRADES, M. et al. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. *Translational Vision Science & Technology*, v. 4, n. 2, p. 13, 10 abr. 2015.

GRAUR, D.; DURET, L.; GOUY, M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, v. 379, n. 6563, p. 333–335, jan. 1996.

GRIFFITH, M. et al. Functional Human Corneal Equivalents Constructed from Cell Lines. *Science*, v. 286, n. 5447, p. 2169–2172, 10 dez. 1999.

GURNANI, B.; KAUR, K. *Penetrating Keratoplasty*. [s.l: s.n.].

HAROLD CROSS, D. E.; EDWARD MAUMENEE, A.; CANTOLINO, S. J. Inheritance of Fuchs' Endothelial. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://archophth.jamanetwork.com/>>.

HAYES, S. et al. A study of corneal thickness, shape and collagen organisation in keratoconus using videokeratography and X-ray scattering techniques. *Experimental Eye Research*, v. 84, n. 3, p. 423–434, mar. 2007.

HUANG, R.; CHOE, E.; MIN, D. B. Kinetics for Singlet Oxygen Formation by Riboflavin Photosensitization and the Reaction between Riboflavin and Singlet Oxygen. *Journal of Food Science*, v. 69, n. 9, 31 dez. 2004.

HUANG, Y.-H. et al. Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology. *Acta Biomaterialia*, v. 58, p. 238–243, ago. 2017.

IPEA. Desafios e necessidades no processo de transplante de órgãos no Brasil. Disponível em: <<https://www.ipea.gov.br/portal/categorias/45-todas-as-noticias/noticias/13999-desafios-e-necessidades-no-processo-de-transplante-de-orgaos-no-brasil>>. Acesso em: 19 dez. 2024.

ISIDAN, A. et al. Comparison of porcine corneal decellularization methods and importance of preserving corneal limbus through decellularization. *PLoS ONE*, v. 16, n. 3 March 2021, 1 mar. 2021.

JHANJI, V. et al. Combined Therapy Using Human Corneal Stromal Stem Cells and Quiescent Keratocytes to Prevent Corneal Scarring after Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 13, p. 6980, 23 jun. 2022.

KATO, Y.; UCHIDA, K.; KAWAKISHI, S. AGGREGATION OF COLLAGEN EXPOSED TO UVA IN THE PRESENCE OF RIBOFLAVIN: A PLAUSIBLE ROLE OF TYROSINE MODIFICATION. *Photochemistry and Photobiology*, v. 59, n. 3, p. 343–349, 2 mar. 1994.

KAZAILI, A.; GERAGHTY, B.; AKHTAR, R. Microscale assessment of corneal viscoelastic properties under physiological pressures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 100, 1 dez. 2019.

KLINTWORTH, G. K. Corneal dystrophies. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 4, n. 1, p. 7, 23 dez. 2009.

KRACHMER, J. H.; MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. *Cornea*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/cornea-2-volume-set/mannis/978-0-323-35757-9>>. Acesso em: 23 jan. 2022.

LIPMAN, R. M.; RUBENSTEIN, J. B.; TORCZYNSKI, E. Keratoconus and Fuchs' Corneal Endothelial Dystrophy in a Patient and her Family. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://archophth.jamanetwork.com/>>.

LIU, J.; LI, Z. Resident Innate Immune Cells in the Cornea. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 620284, 2021.

LOISEAU, A. et al. Animal Models in Eye Research: Focus on Corneal Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 23, p. 16661, 23 nov. 2023.

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

MA, J. et al. Biomechanics and structure of the cornea: implications and association with corneal disorders. *Survey of Ophthalmology*, v. 63, n. 6, p. 851–861, nov. 2018.

MARCOVICH, A. L. et al. Stiffening of Rabbit Corneas by the Bacteriochlorophyll Derivative WST11 Using Near Infrared Light. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 53, n. 10, p. 6378, 19 set. 2012.

MARTINS, T. Desenvolvimento e caracterização de córneas humanas descelularizadas e recelularização com células-tronco visando regeneração do epitélio corneano anterior. 2017.

MATHEWS, P. et al. 2022 Eye Banking Statistical Report—Executive Summary. *Eye Banking and Corneal Transplantation*, v. 2, n. 3, p. e0008, set. 2023.

MEEK, K. M.; HAYES, S. Corneal cross-linking – a review. *Ophthalmic and Physiological Optics*, v. 33, n. 2, p. 78–93, 13 mar. 2013.

MENDIBIL, U. et al. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 15, p. 5447, 30 jul. 2020.

MHANNA, R.; HASAN, A. Introduction to Tissue Engineering. Em: *Tissue Engineering for Artificial Organs*. [s.l.] Wiley, 2017. p. 1–34.

MIMURA, T. et al. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Molecular vision*, v. 14, p. 1819–28, 2008.

MOREIRA, H. et al. Anel intracorneano de Ferrara em Ceratocone. 2002.

MORO, J. DA S. et al. Tissue engineering perspectives in dentistry: review of the literature. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*, v. 66, n. 4, p. 361–367, dez. 2018.

MOSHIRFAR, M.; WEST, W.; RONQUILLO, Y. Lattice Corneal Dystrophy. [s.l: s.n.].

NAGATA, S.; HANAYAMA, R.; KAWANE, K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell*, v. 140, n. 5, p. 619–630, mar. 2010.

NANAVATY, M. A.; VIJAN, K. S.; YVON, C. Deep anterior lamellar keratoplasty: A surgeon's guide. *Journal of Current Ophthalmology*, v. 30, n. 4, p. 297–310, dez. 2018.

NISHIDA, K. et al. Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium. *engl j med.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nejm.org>.

NOGUEIRA, J. C. Olho: uma visao histologica. Texto e atlas (livro eletronico). Belo Horizonte: [s.n.].

OH, J. Y. et al. Processing Porcine Cornea for Biomedical Applications. [s.l: s.n.].

ORTIZ-HIDALGO, C.; PINA-OVIEDO, S. Hematoxylin: Mesoamerica's Gift to Histopathology. *Palo de Campeche (Logwood Tree), Pirates' Most Desired Treasure, and Irreplaceable Tissue Stain. International Journal of Surgical Pathology*, v. 27, n. 1, p. 4–14, 13 fev. 2019.

PANDA, A. et al. Corneal Graft Rejection. *Survey of Ophthalmology*, v. 52, n. 4, p. 375–396, jul. 2007.

PANTIC, I. V. et al. Computational approaches for evaluating morphological changes in the corneal stroma associated with decellularization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 11, 26 maio 2023.

PARKER, J. S.; DOCKERY, P. W.; MELLES, G. R. J. Bowman Layer Transplantation—A Review. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, v. 9, n. 6, p. 565–570, nov. 2020.

PIÑERO, D. P.; NIETO, J. C.; LOPEZ-MIGUEL, A. Characterization of corneal structure in keratoconus. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 38, n. 12, p. 2167–2183, dez. 2012.

PODOLEANU, A. GH. Optical coherence tomography. *Journal of Microscopy*, v. 247, n. 3, p. 209–219, 18 set. 2012.

PONCE MÁRQUEZ, S. et al. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 6, p. 1839–1847, jul. 2009.

PROCHÁZKOVÁ, A. et al. Chemical, Physical, and Biological Corneal Decellularization Methods: A Review of Literature. *Journal of Ophthalmology*, v. 2024, p. 1–17, 25 mar. 2024.

RAFATI, S. et al. Demographic profile, clinical, and topographic characteristics of keratoconus patients attending at a tertiary eye center. *Journal of Current Ophthalmology*, v. 31, n. 3, p. 268–274, set. 2019.

RAISKUP, F.; SPOERL, E. Corneal Crosslinking with Riboflavin and Ultraviolet A. I. Principles. *The Ocular Surface*, v. 11, n. 2, p. 65–74, abr. 2013.

RAMIREZ, K.; WITHERDEN, D. A.; HAVRAN, W. L. All hands on DE(T)C: Epithelial-resident $\gamma\delta$ T cells respond to tissue injury. *Cellular Immunology*, v. 296, n. 1, p. 57–61, jul. 2015.

RAMOS, A. Fisiologia da Visao - Um estudo sobre o ver e o enxergar. [s.l: s.n.].

RANDLEMAN, J. B.; KHANDELWAL, S. S.; HAFEZI, F. Corneal cross-linking. *Survey of Ophthalmology*, v. 60, n. 6, p. 509–523, nov. 2015.

RIAU, A. K. et al. Stromal keratophakia: Corneal inlay implantation. *Progress in Retinal and Eye Research* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2020.

SADY, C.; KHOSROF, S.; NAGARAJ, R. Advanced Maillard Reaction and Crosslinking of Corneal Collagen in Diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 214, n. 3, p. 793–797, set. 1995.

SANTHIAGO, M. R.; RANDLEMAN, J. B. The biology of corneal cross-linking derived from ultraviolet light and riboflavin. *Experimental Eye Research*, v. 202, p. 108355, jan. 2021.

SANTODOMINGO-RUBIDO, J. et al. Keratoconus: An updated review. *Contact Lens and Anterior Eye*, v. 45, n. 3, p. 101559, jun. 2022.

SAÚDE, M. DA. PORTARIA No 486, DE 06 DE MARÇO DE 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/pcdt/arquivos/2017/protocolouso_crosslinking.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2025.

- SHARMA, S. Keratitis. *Bioscience Reports*, v. 21, n. 4, p. 419–444, 1 ago. 2001.
- SINGH, A. K. et al. Cardiac Xenotransplantation: Progress in Preclinical Models and Prospects for Clinical Translation. *Transplant International*, v. 35, 23 mar. 2022.
- SINGH, R. B. et al. Keratoconus. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 10, n. 1, p. 81, 24 out. 2024.
- STAPLETON, F. The epidemiology of infectious keratitis. *The Ocular Surface*, v. 28, p. 351–363, abr. 2023.
- TANG, C. Y.; YANG, Z. *Transmission Electron Microscopy (TEM). Em: Membrane Characterization*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 145–159.
- TORQUETTI, L.; BERBEL, R. F.; FERRARA, P. Long-term follow-up of intrastromal corneal ring segments in keratoconus. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 35, n. 10, p. 1768–1773, out. 2009.
- VACANTI, J. P.; VACANTI, C. A. *The History and Scope of Tissue Engineering. Em: Principles of Tissue Engineering*. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 3–8.
- VENKATESWARAN, N. et al. Optical coherence tomography for ocular surface and corneal diseases: a review. *Eye and Vision*, v. 5, n. 1, p. 13, 12 dez. 2018a.
- VENKATESWARAN, N. et al. Optical coherence tomography for ocular surface and corneal diseases: a review. *Eye and Vision*, v. 5, n. 1, p. 13, 12 dez. 2018b.
- WILLOUGHBY, C. E. et al. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 38, n. s1, p. 2–11, 5 ago. 2010.
- WILSHAW, S.-P. et al. Production of an Acellular Amniotic Membrane Matrix for Use in Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, v. 12, n. 8, p. 2117–2129, ago. 2006.

WILSON, S. L. et al. Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation? *Current Eye Research*, v. 41, n. 6, p. 769–782, 2 jun. 2016.

WINEY, M. et al. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, n. 3, p. 319–323, fev. 2014.

WOLLENSAK, G.; IOMDINA, E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 35, n. 3, p. 540–546, mar. 2009.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; SEILER, T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*, v. 135, n. 5, p. 620–627, maio 2003.

WU, H. et al. Safety and efficacy of repeated crosslinking assisted by transepithelial double-cycle iontophoresis in keratoconus progression after primary corneal crosslinking. *Eye*, v. 35, n. 11, p. 3020–3027, 7 nov. 2021.

Y. ZERNII, E. et al. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 15, n. 3, p. 267–291, 10 mar. 2016.

YAM, G. H.-F. et al. Decellularization of human stromal refractive lenticules for corneal tissue engineering. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 26339, 23 maio 2016a.

YAM, G. H.-F. et al. Decellularization of human stromal refractive lenticules for corneal tissue engineering. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 26339, 23 maio 2016b.

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. e125–e131, mar. 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, jan. 2021.

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de aprovação do protocolo do estudo *in vivo* pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (n° 206/2022)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da segurança e eficiência *in vivo* da implantação intraestromal de lenticulas estromais descellularizadas em olhos de coelhos", protocolo do CEUA: 206/2022 sob a responsabilidade de Armando da Silva Cunha Junior que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/09/2022.

Vigência da Autorização	26/09/2022 a 25/09/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	8
Peso/Idade	2kg / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental UFMG
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	8
Peso/Idade	2kg / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental UFMG
*Espécie/linhagem	Suíno / Landrace
Nº de animais	8
Peso/Idade	80kg / 7(meses)
Sexo	masculino
Origem	Abatedouro Frigo Rick Frigorífico

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	12
Idade	2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental UFMG
*Espécie/linhagem	Suíno / Landrace
Nº de animais	8
Idade	7(meses)
Sexo	masculino
Origem	Abatedouro Frigo Rick Frigorífico

Considerações posteriores:

26/06/2022	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 26/06/2022. Validade: 26/06/2022 à 25/06/2027.
------------	---

Belo Horizonte, 31/01/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicita CELA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicita_cela/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2006
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4618
www.ufmg.br/blococe/cela - cela@nms.ufmg.br

Anexo 2: Portaria Nº 486, de 06 de março de 2017: Estabelece protocolo de uso da radiação para cross-linking corneano no tratamento do ceratocone.



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

PORTARIA Nº 486, DE 06 DE MARÇO DE 2017

Estabelece Protocolo de Uso da radiação
para cross-linking corneano no
tratamento do ceratocone.

O SECRETÁRIO DE ATENÇÃO À SAÚDE, no uso de suas atribuições,

Considerando o Relatório de Recomendação nº 225 – Setembro/2016, da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC);

Considerando a Portaria nº 30/SCTIE/MS, de 20 de setembro de 2016, que torna pública a decisão de incorporar o cross-linking corneano para o tratamento do ceratocone no âmbito do Sistema Único de Saúde; e

Considerando a avaliação técnica do Departamento de Gestão da Incorporação de Tecnologias em Saúde (DGITS/SCTIE/MS), do Departamento de Economia da Saúde, Investimentos e Desenvolvimento - DESID/SE/MS, do Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde (DECIIS/SCTIE/MS), do Departamento de Regulação, Avaliação e Controle de Sistemas (DRAC/SAS/MS) e do Departamento de Atenção Especializada e Temática (DAET/SAS/MS), resolve:

Art. 1º Fica aprovado, na forma do Anexo, disponível no sítio: www.saude.gov.br/sas, o Protocolo de Uso da radiação para cross-linking corneano no tratamento do ceratocone.

Parágrafo único. O Protocolo de Uso de que trata este artigo, que contém o conceito geral do ceratocone, sinais e sintomas, critérios de diagnóstico, tratamento, técnica utilizada, indicação e contra indicação e mecanismos de regulação, controle e avaliação, é de caráter nacional e deve ser utilizado pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e Municípios na regulação do acesso assistencial, autorização, registro e ressarcimento dos procedimentos correspondentes.



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

Art. 2º Os gestores estaduais, distrital e municipais do SUS, conforme a sua competência e pactuações, deverão estruturar a rede assistencial, definir os serviços referenciais e estabelecer os fluxos para o atendimento dos indivíduos com a doença em todas as etapas descritas no Anexo desta Portaria.

Art. 3º Fica incluído na Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses/Próteses e Materiais Especiais do SUS o procedimento 04.05.05.040-2- Radiação para cross-linking corneano, conforme a seguir:

Procedimento:	04.05.05.040-2 - RADIAÇÃO PARA CROSS-LINKING CORNEANO
Descrição:	Consiste na técnica utilizada para o fortalecimento do tecido corneano. É realizada pela aplicação de radiação ultravioleta à superfície corneana, previamente tratada com colírio, com ou sem remoção do epitélio corneano, com o objetivo de reduzir ou mesmo paralisar a progressão do afinamento corneano que ocorre nos casos de ceratocone. Excluído com o procedimento 04.05.05.014-3-Implante intraestromal. Inclui o colírio necessário ao procedimento.
Instrumento de registro:	02- BPA (individualizado) 03- AIH (procedimento principal)
Complexidade:	MC - Média Complexidade
Modalidade de Atendimento:	01- Ambulatorial 02- Hospitalar 03- Hospital -Dia
Tipo de Financiamento:	06 - Média e Alta Complexidade (MAC)
Média de permanência	1
Quantidade máxima	1
Pontos	150
Sexo	Ambos
Idade mínima	15 anos
Idade máxima	45 anos
Valor Ambulatorial Total:	R\$ 292,72
Valor Hospitalar (SH):	R\$ 291,08
Valor do Serviço profissional (SP)	R\$ 81,64
Valor Hospitalar Total:	R\$ 372,72



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

CBO:	225265
CID:	H18.6 - Ceratocone
Leito:	01 - Cirúrgico 09 - Leito dia/cirúrgicos
Serviço / Classificação:	131- Serviço de Oftalmologia 033 – Tratamento cirúrgico do aparelho da visão
Atributo complementar:	Inclui valor de anestesia
Renases	164 - Cirurgia do aparelho da visão

Art. 4º O procedimento 04.05.05.040-2- RADIAÇÃO PARA CROSS-LINKING CORNEANO a ser incluído na Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses/Próteses e Materiais Especiais do SUS é excludente com o procedimento 04.05.05.014-3-Implante intraestromal.

Art. 5º Os recursos orçamentários necessários à implementação do procedimento 04.05.05.040-2 RADIAÇÃO PARA CROSS-LINKING CORNEANO, incluído por esta Portaria, correrão por conta do orçamento do Ministério da Saúde, onerando o Programa de Trabalho 10.302.12.20.8585 Atenção à Saúde da População para Procedimentos de Média e Alta Complexidade.

Art.6º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, com efeitos operacionais nos sistemas de informações do SUS para a competência seguinte à da sua publicação.

FRANCISCO DE ASSIS FIGUEIREDO



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

ANEXO

**PROTÓCOLO DE USO DA RADIAÇÃO PARA CROSS-LINKING CORNEANO
NO TRATAMENTO DO CERATOCONE**

INTRODUÇÃO

O ceratocone consiste em doença degenerativa do olho que ocasiona deformidade da córnea, levando ao seu afinamento, abaulamento e enfraquecimento. Causa piora da acuidade visual, com impacto na qualidade de vida do paciente, além de outros sintomas de menor gravidade, tais como irritação ocular, halos luminosos e fotossensibilidade. A literatura relata que a incidência do ceratocone é baixa. Um estudo de acompanhamento populacional, ao longo de 48 anos, identificou uma incidência de 2 casos por 100.000 habitantes/ano e prevalência média de 54,5 casos por 100.000 habitantes(1). Outros recentes relatam incidência de aproximadamente um caso a cada 2.000 pessoas(2).

Frequentemente, manifesta-se de forma bilateral, porém de forma assimétrica. A faixa etária prevalente dos pacientes é a puberdade, porém o quadro pode evoluir principalmente durante a segunda e terceira décadas de vida, excepcionalmente até a quinta década. A progressão do ceratocone varia entre pacientes e também no mesmo indivíduo ao longo do tempo, tendo evolução mais agressiva em pacientes jovens(3-5).

Inexiste alteração na incidência de ceratocone conforme gênero e raça, porém tem sido associado a doenças oculares prévias, tais como ceratoconjuntivite alérgica, retinite pigmentosa e amaurose congênita de Leber. Supõe-se também associação com doenças sistêmicas e do tecido conjuntivo. Fatores predisponentes incluem história de atopia, especialmente alergia ocular, uso de lentes de contato rígidas e fricção ocular vigorosa. Em torno de 13% dos casos têm história familiar da doença(5).



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

DIAGNÓSTICO

Sintomas:

Comprometimento unilateral da visão devido à miopia progressiva e astigmatismo; ocasionalmente, a apresentação inicial é com hidropsia aguda.

Sinais:

- Oftalmoscopia direta a uma distância de meio metro **revela reflexo em "gota de óleo"**.

- **Retinoscopia revela reflexo irregular "em touzura"**.

- Biomicroscopia com lâmpada de fenda revela estrias estromais, verticais, finas e profundas (linhas de Vogt) que desaparecem ao se exercer pressão no globo ocular.

- Depósitos epiteliais de ferro, visualizados com filtro azul de cobalto, circundando a base do cone.

- Progressiva protrusão corneana na forma de cone, com afinamento estromal máximo em seu ápice.

- Abaulamento da pálpebra inferior na mirada para baixo (Sinal de Munson).

- Hidropsia aguda é causada pela ruptura da membrana de Descemet, permitindo o influxo de humor aquoso para o estroma corneano. Promove uma súbita redução da acuidade visual associado a desconforto, fotofobia, dor e lacrimejamento.

- Ceratometria: Leituras com aumento progressivo da curvatura corneana.

- Topografia Corneana: Astigmatismo que varia de simétrico para assimétrico infero-temporalmente (Parte abaixo da córnea (infero) temporalmente (que está ao lado do osso nasal) oposto do osso nasal).

Os métodos mais frequentemente utilizados para avaliar a progressão do ceratocone são:

- Acuidade visual - frequentemente analisada pela melhor acuidade visual corrigida (BCVA) e acuidade visual não corrigida (UDVA), medida por um logaritmo do ângulo mínimo de resolução (LogMAR) ou por linhas do teste de Snellen.

- Ceratometria: medida da curvatura da córnea em dioptrias ou milímetros.

- Topografia da córnea - medida da curvatura da córnea por três análises da ceratometria - máxima (Kmax), média (Kmed) e mínima (Kmin) - em dioptria (D).



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

- Paquimetria - medida da espessura da córnea em micra (km).

Os instrumentos utilizados para essas medidas são: ceratômetro, topógrafo, paquímetro e tomógrafo de córnea.

Há vários sistemas de classificação da evolução do ceratocone. A mais aceita consiste em alterações, à reavaliação do paciente no máximo em um ano, com:

- Aumento do astigmatismo corneal central de 1.00D ou mais;
- Aumento da ceratometria máxima (Kmax) de 1.00D ou mais;
- Aumento na refração subjetiva de 1.00DC ou mais(6-9).

A estabilização do ceratocone é medida pela manutenção ou regressão dos valores de ceratometria (Kmax, Kmed) em, pelo menos, um ano. Pode haver melhora nas medidas de acuidade, entretanto esta não é o objetivo do tratamento.

INDICAÇÃO

O principal objetivo do uso do cross-linking é conter a progressão do ceratocone. Logo, o melhor candidato ao tratamento é o indivíduo com sinais claros de progressão da doença. Atualmente, não existem critérios definitivos para a progressão do ceratocone, porém os parâmetros a serem considerados são a mudança do erro refrativo, piora da acuidade visual, bem como progressão nos valores encontrados nas topografias e tomografias da córnea.

Estudos mostram que o cross-linking foi mais eficaz na faixa etária pediátrica (10 anos) e naqueles com menos de 26 anos de idade em comparação com aqueles com mais idade. Idade acima de 35 anos e acuidade visual com correção pré-operatória melhor que 20/25 foram identificados como fatores de risco para complicação (perda de duas ou mais linhas de Snellen).

Nenhum estudo encontrado cita mais de uma aplicação por paciente.

CONTRA INDICAÇÃO

- Espessura corneana menor que 400 micrômetros para uso do protocolo clássico;
- Infecção herpética prévia;
- Infecção concomitante;
- Cicatriz corneana grave ou opacificação corneana;
- Doença de superfície ocular grave; ou



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

- Doença auto-imune.

TÉCNICAS

O cross-linking consiste em procedimento terapêutico minimamente invasivo que visava bloquear a evolução do ceratocone, por meio do aumento da força biomecânica, levando ao enrijecimento do tecido da córnea. Este fenômeno ocorre pela criação adicional de ligações químicas no estroma corneal, por meio de fotopolimerização altamente localizada que minimiza a exposição de estruturas adjacentes do olho. Esta metodologia foi desenvolvida em meados dos anos 1990, por pesquisadores da Universidade de Dresden, Alemanha, com base no observado em processo fisiológico de cross-linking no tecido conectivo em pacientes com diabetes melito e angina. Na córnea, com o avanço da idade do indivíduo, as fibras de colágeno desenvolvem naturalmente quantidade superior de ligações covalentes, o que explica a estabilização do ceratocone em paciente com maior idade(9,10). A técnica clássica do cross-linking pode ser realizada com ou sem remoção do epitélio corneal (cerca de 7mm de diâmetro), mediante anestesia tópica. Utiliza solução de riboflavina (vitamina B2) isotônica a 0,1%, com administração tópica, a cada cinco minutos, ao longo de meia hora, para saturar o estroma corneal. A riboflavina age como um fotossensibilizador que aumenta a absorção da luz ultravioleta A pela córnea. A radiação ultravioleta A é aplicada com 365nm, por 30 minutos, a 5 cm da córnea. Após a irradiação, o olho é enxaguado com solução fisiológica, aplicado colírio antibiótico e anti-inflamatório e colocada lente de contato protetora. Estes colírios, além de lubrificante ocular e analgésicos, são mantidos no pós-operatório por 1 semana. Neste período o paciente pode apresentar dor, lacrimejamento e embaçamento visual. Há também descrição na literatura de variações da técnica clássica, em geral, por meio de equipamentos que possibilitam a redução do tempo do procedimento(6).

COMPLICAÇÕES

O risco per-operatório e de complicações pós-operatórias é menor que 1%, e, dos casos publicados, a infecção pós-operatória foi resolvida com tratamento clínico, sendo que nenhum paciente perdeu a visão irreversivelmente(11).



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

REGULAÇÃO, CONTROLE E AVALIAÇÃO PELO GESTOR.

Doentes com indicação de radiação para cross-linking corneano no tratamento do ceratocone devem ser atendidos em serviços especializados em oftalmologia, conforme definido na Portaria Nº 288/SAS/MS, de 19 de maio de 2008, e com porte tecnológico suficiente para avaliar e realizar o procedimento e o acompanhamento dos indivíduos tratados, para o adequado atendimento e obtenção dos resultados terapêuticos esperados.

A regulação do acesso é um componente essencial da gestão para a organização da rede assistencial e garantia do atendimento dos doentes, e muito facilita as ações de controle e avaliação. Estas incluem, entre outras: a manutenção atualizada do Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde (CNES); a autorização prévia dos procedimentos; o monitoramento da produção dos procedimentos (por exemplo, frequência apresentada versus autorizada, valores apresentados versus autorizados versus ressarcidos), entre outras. Ações de auditoria devem verificar in loco, por exemplo, a observância deste Protocolo; regulação do acesso assistencial; qualidade da autorização; a conformidade da indicação, do procedimento e do acompanhamento; compatibilidade do procedimento codificado com o diagnóstico; a compatibilidade da cobrança com os serviços executados; a abrangência e a integralidade assistenciais; e o grau de satisfação dos doentes.

Constam da Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do SUS os seguintes procedimentos específicos para o tratamento do ceratocone, excludentes entre si:

04.05.05.014-3-IMPLANTE INTRAESTROMAL e

04.05.05.040-2 - RADIAÇÃO PARA CROSS-LINKING CORNEANO.

Ressalta-se que o procedimento 04.05.05.040-2 - Radiação para cross-linking corneano inclui o colírio necessário ao procedimento e que o transplante de córnea continua sendo o tratamento convencional dos casos graves, que é indicado em cerca de 10% a 20% dos casos de ceratocone.

Relativamente ao transplante de córnea, constam da Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do SUS os seguintes procedimentos:

05.05.01.009-7 - TRANSPLANTE DE CÓRNEA,

05.05.01.010-0 - TRANSPLANTE DE CÓRNEA (EM CIRURGIAS COMBINADAS),



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

05.05.01.011-9 - TRANSPLANTE DE CÓRNEA (EM REOPERAÇÕES) e

05.06.01.001-5 - ACOMPANHAMENTO DE PACIENTE PÓS-TRANSPLANTE DE CÓRNEA.

Cada serviço deve coletar rotineiramente seus dados e computar os resultados, detectando possíveis nichos suspeitos de resultados piores para análise detalhada de suas causas, pois os dados negativos podem apenas sugerir um pior resultado associado, por exemplo, a um perfil assistencial a pacientes mais graves.

TERMO DE ESCLARECIMENTO E RESPONSABILIDADE

É obrigatória a informação ao paciente, ou a seu responsável legal, dos potenciais riscos, benefícios e eventos adversos relacionados à radiação para cross-linking corneano no tratamento do ceratocone, o que poderá ser formalizado por meio da assinatura de Termo de Esclarecimento e Responsabilidade.

REFERÊNCIAS

- 1- Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1986;101(3):267-73.
- 2- Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998; 42(4):297-319.
- 3 - Stenevi U, Claesson M, Holmberg Y, Liljegren A, Toftgård A, Wonneberger W, et al. Corneal Crosslinking in Keratoconus. Göteborg: VästraGötalandsregionen, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, HTA-centrum; 2011 01 set. 2015]. Available from: <https://www2.sahlgrenska.se/upload/SU/HTA-centrum/HTA-rapporter/HTA-rapport%20Corneal%20Cross%20linking%202011-07-25%20inkil%20bil.%20till%20publicering.pdf>.
- 4 - Health CAfDaTi. Corneal Cross-linking with Riboflavin for Keratoconus: A Review of the Clinical and Cost-Effectiveness 2013 01 set. 2015]. Available from: <https://www.cadth.ca/corneal-cross-linking-riboflavin-keratoconus-review-clinical-and-cost-effectiveness>.
- 5 - Sykakis E, Karim R, Evans J, Bunce C, Amisah-Arthur K, Patwary S, et al. Corneal collagen cross-linking for treating keratoconus. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2015(9).
- 6 - Kanellopoulos AJ. Comparison of sequential vs same-day simultaneous collagen cross-linking and topography-guided PRK for treatment of keratoconus. *J Refract Surg.* 2009;25(9):S812-8.



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

7 - Wittig-Silva C, Chan E, Islam FMA, Wu T, Whiting M, Snibson GR. A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: Three-year results. *Ophthalmology*. 2014;121(4):812-21.

8 - Lang SJ, Messmer EM, Geerling G, Mackert MJ, Brunner T, Dollak S, et al. Prospective, randomized, double-blind trial to investigate the efficacy and safety of corneal cross-linking to halt the progression of keratoconus. *BMC Ophthalmol*. 2015;15:78.

9 - Seyedian MA, Aliakbari S, MirafTAB M, Hashemi H, Asgari S, Khabazkhoob M. Corneal Collagen Cross-Linking in the Treatment of Progressive Keratoconus: A Randomized Controlled Contralateral Eye Study. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2015;22(3):340-5.

10 - Sharma N, Suri K, Sehra SV, Titiyal JS, Sinha R, Tandon R, et al. Collagen cross-linking in keratoconus in Asian eyes: visual, refractive and confocal microscopy outcomes in a prospective randomized controlled trial. *Int Ophthalmol*. 2015.

11 – Conselho Federal de Medicina. PROCESSO-CONSULTA CFM nº 1.923/10 – PARECER CFM nº 30/10. Disponível em https://sistemas.cfm.org.br/normas/arquivos/pareceres/BR/2010/30_2010.pdf

Anexo 3: Publicação relacionada ao trabalho

Methods 234 (2025) 296–304



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth



Xenographic lenticule implantation followed by riboflavin and UV treatment: A promising alternative for corneal ectasias management

Fernanda Aparecida Silva Vieira^a, Lays Fernanda Nunes Dourado^b, Thomas Toshio Inoue^a,
Lufiana Amaral Melo^c, Paulo Ferrara de Almeida Cunha^d, Sílvia Ligorio Fialho^e,
Armando Silva-Cunha^{a,*}

^a Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
^b Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de Fora and Murari Valleys – Campus JK, MG 367-Km 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000 Diamantina, Minas Gerais, Brazil
^c Pharmaceutical Research and Development, Enxaid Dias Foundation, R. Conde Pereira Carneiro 80, Gameleira, 30510-010 Belo Horizonte, MG, Brazil
^d Ferrara Ophthalmics, R. Maranhão 1642, Funcionários, 30150-338 Belo Horizonte, MG, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Cornea
Lenticule
Cross-linking
Riboflavin
Ultraviolet
Xenotransplant

ABSTRACT

The cornea is the primary refracting surface of the eye, requiring precise curvature to ensure optimal vision. Any distortion in its shape may result in significant visual impairment. Corneal ectasias, such as keratoconus (KC), is characterized by gradual thinning and protrusion of the thinned area, due to biomechanical weakening of the tissue, leading to astigmatism and vision loss. KC affects approximately 1 in 2000 individuals globally. While corneal transplantation is the main treatment, limited donor availability and potential immunogenic reactions have spurred the search for alternatives. Stromal lenticule implantation using decellularized porcine corneas offers a promising solution, with reduced immunogenicity and risk of rejection. Additionally, combining this approach with riboflavin and UV radiation treatment post-surgery enhances collagen fibril cross-linking, promoting tissue integration and organization. This study evaluated the efficacy of heterologous transplantation of decellularized porcine lenticules into the corneal stroma of rabbits, followed by riboflavin application and UV radiation. Results demonstrated increased stromal thickness and no signs of tissue rejection, indicating minimal immunogenicity of the lenticules. The cross-linking technique successfully improved tissue organization, suggesting that xenographic lenticule implantation, combined with riboflavin and UV light, is a promising alternative for treating corneal ectasias like KC. Further research is necessary to confirm the long-term efficacy and safety of this method in human subjects.

1. Introduction

The cornea is the initial barrier of the eye to the environment, protecting its internal tissues from trauma, microorganisms, chemicals, radiation, among others [1]. It is an avascular tissue characterized by a curved shape and transparency [2]. The cornea is composed of five distinct layers: the epithelium, Bowman's membrane, stroma, Descemet's membrane, and endothelium [3]. The corneal stroma is responsible for the framework structure of the cornea, representing approximately 90 % of its total thickness. It is composed of a network of collagen fibers within an extracellular matrix and keratocytes [4]. The transparency of the cornea is due to the precise organization of these collagen fibers that interact with proteoglycans in the extracellular

matrix [2,3,5]. Corneal stroma rigidity also is very important to maintain corneal shape and curvature [5].

The cornea is the major refracting surface of the eye and to ensure optimal light refraction, it must maintain a precise curvature [2]. Any distortion in its shape may result in significant visual impairment. Corneal ectasias, characterized by gradual thinning and protrusion of the thinned area, due to biomechanical weakening of the tissue, leads to progressive astigmatism and subsequent decrease in visual acuity [6,7]. Keratoconus (KC) is the most common corneal ectasia, affecting around 1 out of every 2000 people in the world. It is a non-inflammatory condition characterized by thinning and steepening of the cornea, which gradually takes on the shape of a cone as the disease progresses. In advanced stages, keratoconus can result in complete vision loss [6].

* Corresponding author.
E-mail address: armando@ufmg.br (A. Silva-Cunha).

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2025.01.010>

Received 1 October 2024; Received in revised form 23 December 2024; Accepted 15 January 2025
Available online 17 January 2025

1046-2023/© 2025 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.