

**ROBÉRIO SILVEIRA DE SIQUEIRA FILHO**

**UTILIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA NA  
CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM SUÍNOS E APLICADA A  
AFECÇÕES CORNEAIS EM CÃES E GATO**

**RECIFE**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ROBÉRIO SILVEIRA DE SIQUEIRA FILHO**

**UTILIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA NA  
CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM SUÍNOS E APLICADA A  
AFECÇÕES CORNEAIS EM CÃES E GATO**

**Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de DOUTOR em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá**

**RECIFE**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S618u

Siqueira Filho, Robério Silveira de

Utilização da matriz extracelular corneal de tilápia na ceratoplastia lamelar experimental em suínos e aplicada a afecções corneais em cães e gato / Robério Silveira de Siqueira Filho. - 2020.  
95 f. : il.

Orientador: Fabricio Bezerra de Sa.  
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2020.

1. córnea. 2. descelularização. 3. heterólogo. 4. sequestro corneano. 5. úlcera de córnea. I. Sa, Fabricio Bezerra de, orient. II. Título

CDD 636.089

---

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA NA  
CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM SUÍNOS E APLICADA A  
AFECÇÕES CORNEAIS EM CÃES E GATO**

Tese de Doutorado elaborada por

ROBÉRIO SILVEIRA DE SIQUEIRA FILHO

Aprovada em

17/02/2020

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. FABRÍCIO BEZERRA DE SÁ  
Orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

---

DR. RINALDO CAVALCANTE FERRI  
Hospital Veterinário da UFAPE

---

PROFA. DRA. GRAZIELLE ANAHY DE SOUSA ALEIXO  
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

---

PROFA. DRA. LÍLIAN SABRINA SILVESTRE DE ANDRADE  
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

---

PROF. DR. FRANCISCO DE ASSIS LEITE SOUZA  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

**A Deus;**

Aos meus pais **Robério Silveira de Siqueira e Verônica C. Machado Dias de Siqueira,**  
pelo apoio e confiança.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, causa primária de todas as coisas;

**Aos familiares**, pelo carinho, torcida e apoio;

**Ao meu orientador Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá**, pelo incentivo, conselhos e por tantos conhecimentos transmitidos ao longo de minha vida acadêmica;

**Aos meus irmãos** Thiago Siqueira e Camila Siqueira, pela amizade e companheirismo;

**A minha namorada Leticia Bezerra**, pelo carinho, apoio, companheirismo e por ter me acompanhado durante todo o trajeto do doutorado;

**A família do Laboratório de Oftalmologia Experimental**, em especial a Bruno Daby, Stephanie Ingrand, Taciana Spineli e Rômulo Nunes, pelas experiências, ensinamentos e risos durante todo experimento;

**Aos integrantes da Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina**, em especial a Adrielle e Joab, por todo apoio em Carpina durante o curso do experimento;

**Aos integrantes da base de pesca da UFRPE**, em especial a Dijaci, pelo suporte dado para execução do experimento;

**A família da UFRPE**, Fábio Maranhão, Alexandre Dantas, Janaína Guimarães, Acácio Teófilo, Grazielle Aleixo, Lílian Silvestre, Francisco Leite, Joaquim Evêncio, Edna, Sérgio, Eduardo, Vera (*in memoriam*), Ilma Braga, Severino, Josie e Keyla.

**Aos membros da banca**, por aceitarem colaborar com a tese;

**A Universidade Federal Rural de Pernambuco;**

**Aos animais**, que dão sentido a tudo.

**A todos** que de alguma forma contribuíram para realização desta tese, em cada uma de suas etapas.

*“Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar.”*

(Francisco Cândido Xavier)

# UTILIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA NA CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM SUÍNOS E APLICADA A AFECÇÕES CORNEAIS EM CÃES E GATO

## RESUMO

A córnea é a estrutura mais anterior do olho, e quando encontra-se hígida, é lisa, esférica e transparente. As afecções corneais podem ser causadas por vários fatores e se não tratadas corretamente, podem levar a perda da visão. Devido a escassez de estudos no Brasil sobre a utilização da matriz extracelular corneal (MEC), objetivou-se utilizar a matriz extracelular corneal de tilápia (MECT) em córneas de suínos submetidos a ceratoplastia e em cães e gato com enfermidades corneais. Para a realização dos estudos “in vitro”, as córneas de tilápia foram descelularizadas utilizando o hidróxido de sódio (0,5 M) e conservadas em solução de Dulbecco’s modified minimum essential medium (DMEM) associada ao glicerol. As mesmas foram avaliadas através da extração e quantificação do DNA, onde ocorreu uma diferença estatística do DNA antes da descelularização ( $10,43 \pm 3,84$  ng/mg) e após a descelularização ( $4,6 \pm 2,15$  ng/mg). No teste microbiológico não foram observadas a presença de contaminantes e no cultivo celular observou-se que as células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), 3T3-L1 e fibroblasto bovinos se desenvolveram na MECT. Já nos estudos “in vivo”, observou-se a opacidade corneal em todos os animais do grupo ceratectomia (CT) e em 92,8% (13/14) dos animais do grupo ceratoplastia (CP). A vascularização corneal esteve presente em 92,8% (13/14) dos animais do grupo CP até os 30 dias de pós-operatório (PO), e esteve ausente aos 60 dias de PO no grupo CP e grupo CT. Na avaliação histológica foram observados a presença de vasos nos subgrupos CP15 e CP30, e não foram observados vasos no subgrupo CP60. A reepitelização corneal esteve presente em todos os animais dos subgrupos CP e CT e pôde-se observar através da coloração pelo tricrômio de gomory que a MECT se integrou à córnea receptora. Após a realização dos estudos experimentais, as MECTs foram utilizadas em dois cães com úlceras profundas e um gato com sequestro corneano. Após a ceratectomia, a MECT foi suturada na córnea receptora utilizando poliglactina nº 8-0 no canino 1 e felino e mononylon nº 10-0 no canino 2. O tratamento prescrito no PO consistiu no uso de antibiótico e ciclopéptico tópico e anti-inflamatório sistêmico. Com 30 dias de PO, utilizou-se o corticóide tópico. Na avaliação do PO com sete dias, a reepitelização esteve presente em todos os animais e com 60 dias de PO as córneas apresentaram-se translúcidas nos três pacientes. No canino 1 observou-se a presença de pigmentação em faixa e na área da ceratoplastia, enquanto que no canino 2 e felino, visualizou-se a presença de uma nébula na área do enxerto. Desta forma, a MECT permitiu o crescimento celular, sem efeito citotóxico, sendo integrada na córnea suína, e a mesma foi eficaz no tratamento do sequestro corneal em felino e úlceras complicadas em caninos.

**Palavras-chave:** córnea, descelularização, heterólogo, sequestro corneano, úlcera de córnea.

# **DEVELOPMENT OF CORNEAL EXTRACELLULAR MATRIX OF TILAPIAS FOR EXPERIMENTAL LAMELLAR KERATOPLASTY IN PIGS AND ITS USE FOR TREATMENT OF CORNEAL DISORDERS IN DOGS AND CAT**

## **ABSTRACT**

The cornea is the most anterior structure of the eye and when healthy, it is smooth, spherical and transparent. Corneal disorders can be caused by several factors and if is not treated correctly, can lead to loss of vision. Due to the lack of studies in Brazil on the use of corneal extracellular matrix (ECM), the objective of this study was to evaluate corneal extracellular matrix of tilapia (TECM) in corneas of pigs experimentally submitted to keratoplasty and subsequent use for the treatment of dogs and cat with corneal diseases. Corneas of tilapia were decellularized with sodium hydroxide (0.5 M) and preserved in DMEM with glycerol solution for further in vitro analysis. Corneas were evaluated by the extraction and quantification of DNA and the statistical analysis of DNA had different results before ( $10.43 \pm 3.84$  ng/mg) and after decellularization ( $4.6 \pm 2.15$  ng/mg). TECM cultures showed no microbiological contaminants and cell cultures supported the growth of bovine MDBK, 3T3-L and fibroblast cells. In vivo assessments demonstrated corneal opacities in all animals that underwent keratectomy (KT) and in 92.8% (13/14) of the keratoplasty (KP) group. Corneal vascularization was present in 92,8% (13/14) animals of the KP group at day 30 postoperatively (PO) and was absent at day 60 PO in the KP and KT groups. At histologic evaluation vessels were present in the subgroups CP15 and CP30 and no vessels were observed in the subgroup CP60. Corneal reepithelization occurred in all animals of KP and KT groups. Gomori trichrome stains revealed that the TECM grafts were integrated into the cornea. Next, TECM were used in two dogs with deep ulcers and a cat with corneal sequestrum. After keratectomy TECM graft was sutured in the recipient cornea of case 1 with 8-0 polyglactin and in case 2 and case 3 with mononylon 10-0. PO included topical antibiotic, topical cycloplegic and systemic anti-inflammatory. 30 days after surgery topical corticosteroid was introduced. At day 7 PO reepithelization was present in all animals and at day 60 all animals presented corneal transparency. Band pigmentation was present where keratoplasty was performed in case 1. Corneal nebula was present at graft surfaces in cases 2 and 3. Thus, TECM allowed cell growth, without cytotoxic effect, integrated into swine cornea, and was effective in the treatment of corneal sequestrum in a cat and complicated ulcers in dogs.

**Key words:** corneal, decellularization, heterologous, corneal sequestrum, ulcer.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1** - Fotomicrografia da córnea suína corada em Hematoxilina-Eosina (HE) revelando as camadas: Epitélio (EP), estroma (ES), membrana de Descemet (MD) e endotélio (EN). HE, obj. 10x..... 16

**Figura 2** - Fotomicrografia do epitélio corneal suíno corada em Hematoxilina-Eosina (HE). CB, células basais; CI, células intermediárias; CE, células superficiais escamosas. HE, obj. 40x. .... 18

### ARTIGO 1

**Figura 1** - Cultivo Celular. A. Presença das células MDBK na superfície da Matriz Extracelular Corneal de Tilápia (MECT) após 96 horas de cultivo celular. B. Presença das células 3T3-L1 na superfície da MECT após 96 horas de cultivo celular. C. Presença do Fibroblasto bovino na superfície da MECT após 96 horas de cultivo celular. HE, obj.40x. .... 49

**Figura 2** - Concentração do DNA presente na MECT e na córnea celularizada. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Mann-Whitney comparando grupos ( $p= 0,0317$ ),  $p < 0,05$  significativo..... 50

**Figura 3** - Avaliação da opacidade da córnea em diferentes momentos. A, B e C correspondem a evolução da opacidade na avaliação macroscópica com sete, 15 e 30 dias de pós-operatório de um suíno do grupo ceratoplastia. D, E e F correspondem a evolução da opacidade na avaliação macroscópica com sete, 15 e 30 dias de pós-operatório de um suíno do grupo ceratectomia. A e B foram classificados em opacidade 1 (leve) e C em opacidade 0 (ausente), já D, E e F foram classificadas em opacidade 2 (moderada). .... 51

**Figura 4** - Imagem histológica da córnea suína dos subgrupos CP15, CP30 e CP60 coradas em HE. A. Imagem histológica do subgrupo CP15, notar a presença de edema subepitelial (seta amarela) e a presença de vasos (seta preta) no estroma. B. Imagem histológica do subgrupo CP30, observar a presença de vasos no estroma. C. Imagem histológica CP60, observar ausência de edema subepitelial e ausência de vasos. HE, obj 40x..... 53

**Figura 5** - Imagem histológica da córnea suína dos subgrupos CP15, CP30 e CP60 coradas em Tricrômio de Gomory. A. Imagem histológica do subgrupo CP15, notar que a Matriz Extracelular Corneal de Tilápia (MECT) está integrada a córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno. B. Imagem histológica do subgrupo CP30, observar que a MECT está totalmente integrada a córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno e arranjo similar ao estroma da córnea receptora. C. Imagem histológica do subgrupo CP60, notar que a MECT está totalmente integrada a córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno e arranjo similar ao estroma da córnea receptora. Tricrômio de Gomory, obj.10x..... 53

## ARTIGO 2

**Figura 1** - Lesões corneais. A. Vista frontal do animal 1 com presença de vasos e tecido de granulação. B. Vista lateral do animal 1 evidenciando-se a descemetocele. C. Vista frontal do animal 2 com úlcera profunda e presença de vasos. D. Vista frontal do felino com sequestro corneano e presença de vasos..... 66

**Figura 2** - Avaliação do pós-operatório (PO). A. Presença de edema, vasos e tecido de granulação recobrimdo todo o enxerto no canino 1 com sete dias de PO. B. Presença de melanose na área do enxerto no canino 1 com 60 dias de PO. C. Presença de nébula na área do enxerto e vasos atenuados no canino 2 com 60 dias de PO. D. Presença de nébula na área do enxerto e vaso atenuado no quadrante nasal do felino com 60 dias de PO..... 70

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** - Avaliação da opacidade para os grupos CT e CP aos sete, 15, 21, 30 e 60 dias de PO..... 51

**Quadro 2** - Avaliação macroscópica da vascularização para os grupos CT e CP realizadas aos sete, 15, 21, 30 e 60 dias. .... 52

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

% Por cento

°C Graus Celsius

± mais ou menos

ARVO Association for Research in Vision and Ophthalmology

ATPase Adenosina trifosfatase

bFGF Fator de crescimento de fibroblasto básico

Ca<sup>++</sup> Cálcio

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CP Ceratoplastia

CT Ceratectomia

DMEN Dulbecco's modified minimum essencial medium

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEPAC Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina

EGF Fator de crescimento epidermal

g Força G

G-CSF Fator estimulador de colônia de granulócitos

GAG Glicosaminoglicano

HE Hematoxilina-Eosina

HGF Fator de crescimento do hepatócito

HOVET Hospital Veterinário

IL-1 Interleucina 1

IM Intramuscular

Kg Quilograma

KGF Fator de crescimento do ceratócito

L litro

LAVIAN Laboratório de Virologia Animal

LOE Laboratório de Oftalmologia Experimental

M Molar

MCAF Fator ativador de monócitos

ME Matriz extracelular

MEC Matriz extracelular corneal

MECT Matriz extracelular corneal de tilápia

mg Miligramas  
min minuto  
mL Mililitros  
mm Milímetros  
mm<sup>2</sup> Milímetro quadrado  
MMP Metaloproteinase  
MPA Medicação pré-anestésica  
n° Número  
Na<sup>+</sup> Sódio  
ng Nanogramas  
PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas  
PEDF Fator pigmentar derivado do epitélio  
PO Pós-operatório  
RPMI Roswell park memorial institute medium  
SDS Dodecil sulfato de sódio  
seg Segundos  
SFB Soro fetal bovino  
SIS Submucosa intestinal suína  
SRD Sem raça definida  
TGF-beta Fator de crescimento de transformação beta  
TNF- $\alpha$  Fator de necrose tumoral  
UBM Submucosa da vesícula urinária suína  
UFRPE Universidade Federal Rural de Pernambuco  
UTR Unidade de retenção de turbidez  
VEGF Fator de crescimento endotelial vascular  
VEGFR-3 Receptor ectópico VEGF-3  
 $\mu$ L Microlitros  
 $\mu$ m Micrômetros

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA CórNEA .....	15
2.2 REEPITELIZAÇÃO E CICATRIZAÇÃO CORNEAL .....	22
2.3 CERATOPLASTIA .....	25
<b>3. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>
<b>ARTIGO 1: CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM SUÍNOS UTILIZANDO MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA.....</b>	<b>43</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>44</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>44</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA MECT .....	46
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	46
CULTIVO CELULAR.....	46
EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA .....	47
ESTUDO EXPERIMENTAL.....	47
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>ARTIGO 2: UTILIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA NO TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS ÚLCERAS CORNEAIS EM CANINOS E SEQUESTRO CORNEAL EM FELINO .....</b>	<b>61</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>62</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>62</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA MECT .....	64
CASO CLÍNICO .....	65
PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	66
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>79</b>

<b>ANEXO 2</b> .....	<b>86</b>
<b>ANEXO 3</b> .....	<b>93</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da oftalmologia no âmbito da Medicina Veterinária, deram-se início a diversas práticas clínico-cirúrgicas, que obrigaram o desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas cirúrgicas específicas, com vistas não só a aumentar a expectativa de vida dos animais, como também dar conforto e qualidade de vida para os mesmos. Assim como na Medicina, a Medicina Veterinária vem evoluindo cada vez mais no que se refere ao tratamento das afecções corneais. Na oftalmologia veterinária, a córnea é a estrutura mais acometida por distúrbios (ANDRADE; LAUS, 1998).

A córnea é a estrutura mais anterior do olho e é a porção única da túnica fibrosa do olho que é transparente. Ela apresenta várias camadas que são: o epitélio corneano e sua membrana basal, que é estratificado e não queratinizado; o estroma, que é composto por fibras de colágeno e ceratócitos; a membrana de Descemet, que é uma camada acelular elástica; e o endotélio, que é formado por uma monocamada de células poligonais (SLATTER, 2005; TURNER, 2010; SAMUELSON, 2013).

A córnea é vista como uma porção importante do globo ocular devido a sua curvatura e transparência e também pela capacidade de refração e transmissão da luz. Existem vários fatores estruturais e fisiológicos que são responsáveis pela manutenção da transparência corneana (JU et al., 2012; SAMUELSON, 2013).

Os animais domésticos são frequentemente acometidos por afecções corneais que requerem de cirurgia como forma de tratamento, desta forma, as ceratoplastias são realizadas visando a recuperação das mesmas com o mínimo de sequelas e evitando a diminuição da acuidade visual (GELATT; BROOKS, 2011).

Esse procedimento cirúrgico possui variações em relação a sua realização, diferenciando-se em ceratoplastia penetrante, no qual o tecido afetado é removido em toda a sua espessura e lamelar anterior e posterior, onde ocorre a substituição parcial de sua espessura (NITA et al., 2012). Além das córneas homólogas, outros materiais heterólogos podem ser utilizados como enxertos na ceratoplastia lamelar de cães e gatos (DULAURENT et al., 2013; LACERDA et al., 2016).

A engenharia de tecidos esteve concentrada na construção de matriz à base de biomateriais e na semeadura das células corneais. Vários polímeros desses biomateriais foram desenvolvidos com este propósito (LI et al, 2005; GARAGORRI et al., 2008; MIMURA et al., 2008; AHEARNE et al., 2010), no entanto, o principal obstáculo para o sucesso está na construção de uma matriz com as composições estruturais e bioquímicas

semelhantes à córnea nativa (LYNCH; AHEARNE, 2013). Segundo Lynch e Ahearne (2013), a matriz extracelular corneal tem sido utilizada como alternativa para aplicação em defeitos corneais, já que a mesma possui similaridades estruturais e também na sua composição.

De maneira geral, os componentes da matriz extracelular (ME) se mantêm constantes entre diferentes espécies animais, sendo, portanto, bem tolerados mesmo em receptores xenógenos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Van Essen et al. (2016) demonstraram que a matriz extracelular de escama de tilápia facilitou a adequada proliferação e adesão epitelial, podendo ser implantada na córnea de coelhos. As tilápias são bastante reproduzidas em escala industrial, por apresentar rápido crescimento, grande rusticidade, fácil manejo e alto nível de rendimento.

A realização de ceratoplastia lamelar utilizando enxertos homólogos de córnea em cães e gatos é incipiente na oftalmologia veterinária, pois além da escassez de doadores, há sempre a necessidade de uma grande equipe técnica que garanta a coleta, a manutenção e a realização de exames virais, bacteriológicos e fúngicos. Estes impasses levam a novas pesquisas com enxertos heterólogos descelularizados, técnica que está surgindo como método promissor e inovador no tratamento das afecções corneais. Desta forma, objetivou-se no presente estudo utilizar a MECT em suínos submetidos a ceratoplastia lamelar na fase experimental e em cães e gato na fase clínica.

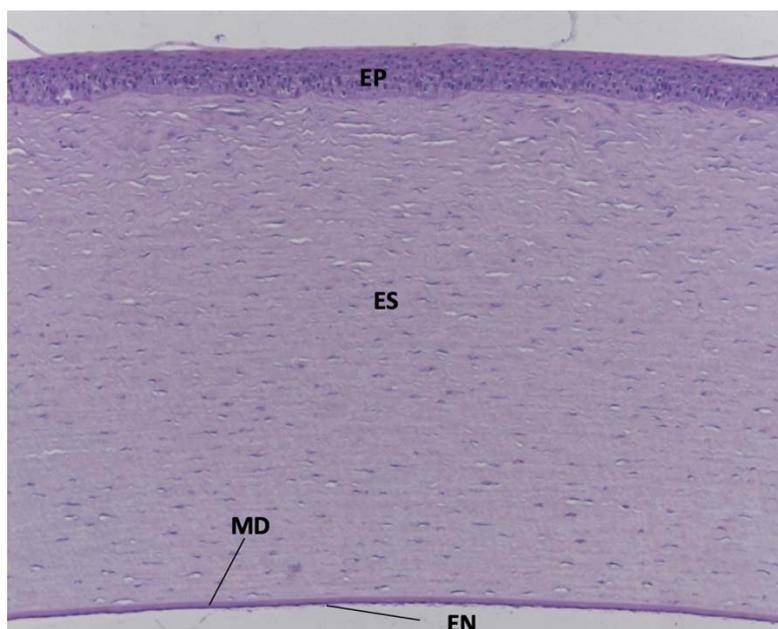
## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Anatomofisiologia da Córnea**

A córnea, em conjunto com a esclera, compõe a túnica fibrosa do globo ocular, sendo também denominada de túnica externa (SLATTER, 2005). A córnea é a estrutura mais anterior do olho, e quando encontra-se hígida, é lisa, esférica e transparente (SLATTER, 2005; GALERA; LAUS; ORIÁ, 2009; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019). Sua transparência se deve ao fato de possuir as fibras de colágeno do estroma organizadas de forma paralela e regular, além de ser avascular, não pigmentada e inervada por fibras amielínicas (SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019).

Apesar da cuidadosa distribuição das suas fibras, a transparência da córnea não é somente um fenômeno estrutural, mas também um fenômeno fisiológico que depende do bombeamento contínuo de líquidos intersticiais, este processo é realizado pelas células endoteliais que mantêm o estroma desidratado a um nível de 78% a 85% através das bombas de sódio e potássio presentes nas membranas celulares. A principal função da córnea é realizar a refração dos raios luminosos para a formação da visão, e também servir como barreira entre o meio externo e as estruturas intraoculares (SLATTER, 2005; JU et al., 2012; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019).

No que diz respeito à sua composição (Figura 1), a córnea é composta por cinco camadas: o filme lacrimal pré-corneal, o epitélio e sua membrana basal, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (SLATTER, 2005).



**Figura 1** - Fotomicrografia da córnea suína corada em Hematoxilina-Eosina (HE) revelando as camadas: Epitélio (EP), estroma (ES), membrana de Descemet (MD) e endotélio (EN). HE, obj. 10x.

O filme lacrimal pré-corneano, embora não seja visível ao corte histológico, é considerado a camada externa que recobre a córnea e a conjuntiva (SLATTER, 2005). O filme lacrimal é constituído por três camadas distintas: a porção lipídica externa, a aquosa intermediária e a mucosa interna. A porção lipídica é produzida pelas glândulas sebáceas de Zeis e glândulas meibomianas e é responsável por retardar a evaporação da porção aquosa da lágrima (SAMUELSON, 2013). A porção aquosa é a responsável pela absorção do oxigênio e transporte de nutrientes solúveis em água, substâncias bactericidas como lactoferrina, imunoglobulinas, lisozima, beta-lisina e defensinas (HAYNES; TIGHE; DUA, 1999) e também o transporte dos fatores de crescimento essenciais para determinar a proliferação e diferenciação do epitélio da superfície ocular, como o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF) e fator de crescimento do ceratócito (KGF), a porção intermediária do filme lacrimal é secretada pela glândula lacrimal(61%), glândulas acessórias de Kraus e Wolfring (3%) e a glândula da terceira pálpebra (35%) (WILSON, 1991; LOHMANN; HOFFMANN; REISCHL, 1998; WILSON, 1999; FAGERHOLM, 2000; BALDWIN; MARSHALL, 2002; SAMUELSON, 2013).

A porção mucosa, que é produzida em grande parte pelas células caliciformes conjuntivais, é essencial para manutenção da lubrificação no epitélio corneano, esta camada, por intermédio das microvilosidades das células superficiais do epitélio, confere uma hidrofilia à essência hidrofóbica da superfície ocular (DARTT, 2004; SAMUELSON, 2013). As funções do filme lacrimal pré-corneano compreendem o fornecimento primário de oxigênio para a córnea, o suprimento de proteínas antimicrobianas, a lubrificação da superfície ocular e a remoção de debris e de células esfoliativas através da drenagem da lágrima, além da manutenção opticamente uniforme da superfície corneal (SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009; SAMUELSON, 2013).

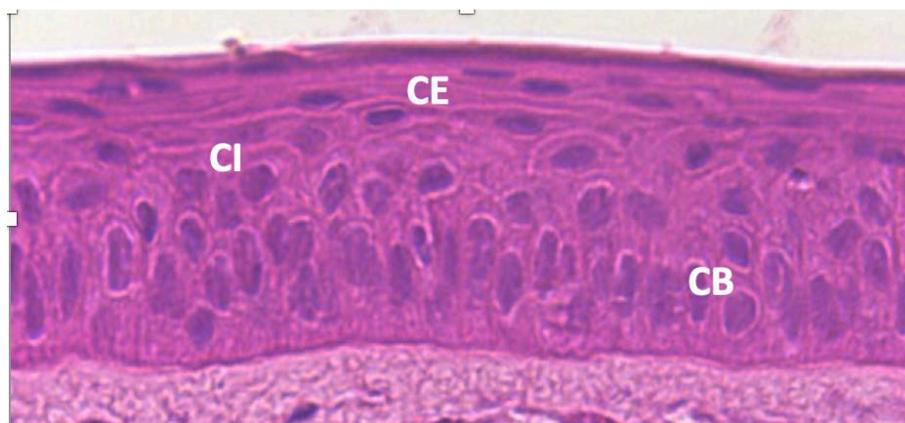
O epitélio corneano possui padrão do tipo pavimentoso estratificado, não queratinizado, não secretor e este repousa sobre uma membrana basal composta por colágenos dos tipos IV, VI e VII, por hialuronato de sódio e por fibronectina e laminina (POWER; NEVES, 2005; GALERA et al., 2009; PIPPI; GONÇALVES, 2009; SAMUELSON, 2013; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019).

O epitélio apresenta entre 25-40 micrômetros de espessura nos carnívoros domésticos e é quatro vezes mais espesso nos grandes animais. Em cães e gatos, o epitélio consiste em uma única camada de células colunares basais, duas ou três camadas de células aladas (células intermediárias) e duas ou três camadas de células superficiais escamosas (células superficiais), no entanto, nos grandes animais, a camada intermediária e a camada superficial são mais numerosas (SAMUELSON, 2013).

As células superficiais escamosas (figura 2) são achatadas, com poucas organelas citoplasmáticas. Estas células apresentam microvilos, isto é, projeções na porção externa que determinam maior superfície de contato com a camada mucosa do filme lacrimal (HARDING et al., 1974; DAWSON et al., 2009; SAMUELSON, 2013). Por serem parte da camada celular em contato com o meio externo, há um complexo sistema de adesão entre as células. A “zônula ocludens” funciona como uma barreira mecânica que protege a córnea e diminui a descamação prematura destas células. Durante o processo de descamação, os desmossomas entre as células diminuem ou desaparecem, facilitando o desprendimento da célula (WATSKY; OLSEN; EDELHAUSER, 1999; DAWSON et al., 2009; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019). As células intermediárias (figura 2) são um grupo de células poligonais que têm formato alongado com núcleo tipicamente ovalado. Estas células apresentam-se sobre as células basais, aderentes entre si por meio

de projeções citoplasmáticas periféricas denominadas desmossomas (WATSKY; OLSEN; EDELHAUSER, 1999; DAWSON et al., 2009; SAMUELSON, 2013).

As células basais (figura 2) têm um aspecto colunar, com base achatada e ápice abobadado. A mitose ocorre nas células basais ou nas células imediatamente superficiais às células basais (*stratum germinativum*). A presença de núcleos redondos e uma maior quantidade de organelas citoplasmáticas diferenciam essas células. Na porção posterior, as células basais são planas e estão aderidas à membrana basal por um complexo sistema de hemidesmossomos (GIPSON; INATOMI, 1995; ZAGON et al., 2001; ESPANA et al., 2003; TURNER, 2010; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019). Acredita-se que os grânulos de glicogênio presentes no citoplasma das células basais servem como reserva energética para determinadas situações, como o reparo de um defeito epitelial, quando se observa intensa atividade mitótica (LU; REINACH; KAO, 2001).



**Figura 2** - Fotomicrografia do epitélio corneal suíno corada em Hematoxilina-Eosina (HE). CB, células basais; CI, células intermediárias; CE, células superficiais escamosas. HE, obj. 40x.

O estroma compreende aproximadamente 90% da espessura corneana e este é composto por um arranjo extremamente bem organizado de fibras colágenas e de proteoglicanos, que são glicosaminoglicanos (GAGs) covalentemente aderidos a um núcleo proteico. As fibras de colágeno se dispõem de forma precisamente paralela em lamelas, que são feixes paralelos de fibras de colágeno que percorrem toda a extensão da córnea. Essa disposição contribui para a manutenção da transparência da córnea e diferencia o estroma do colágeno existente no tecido cicatricial e na esclerótica (SLATTER, 2005; SAMUELSON, 2013; ABASS et al., 2015).

As células estromais correspondem a menos que 3% de sua composição e os ceratócitos são as principais células encontradas no estroma corneano. As extensões dessas células contribuem para a formação e manutenção das lamelas estromais. Os ceratócitos possuem núcleos finos, bordas mal definidas e delicadas membranas celulares. Essas células possuem cristalinas, que no cristalino, acredita-se que esta seja a principal responsável pela transparência da lente, promovendo no citoplasma a transmissão da luz em ondas de curto alcance e sem impedimentos (JESTER, 2008; SAMUELSON, 2013; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019). Os ceratócitos são responsáveis pela manutenção dos componentes da matriz estromal e sintetizam moléculas de colágeno e GAGs. Ao mesmo tempo, estas células sintetizam metaloproteinases (MMPs), que são enzimas capazes de degradar a matriz extracelular (WHEATER; KERNACKI; HAZLETT, 2001; SAIKA et al., 2002; SIVAK; FINI, 2002; DAWSON et al., 2009; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019)

Em geral, a organização precisa do estroma da córnea é o fator mais importante na manutenção da transparência da córnea, que envolve a integração do colágeno aos proteoglicanos (HASSELL; BIRK, 2010). A maior parte do estroma da córnea é composta por fibras de colágeno, que estão uniformemente posicionadas nas lamelas e são transversais ao diâmetro total da córnea. Acredita-se que esse arranjo especial no estroma permita que 99% da luz passe na córnea sem dispersão (SAMUELSON, 2013).

O estroma é composto por pelo menos cinco tipos de colágenos, que são: I, III, V, VI e XII. Desses cinco, o colágeno tipo I é o mais comum, formando pequenas fibrilas estriadas de tamanho uniforme. O tipo VI está associado à matriz interfibrilar, formando uma rede em torno das fibrilas. Estudos em camundongos adultos sugerem que o tipo VI está conectado ao tipo I através dos GAGs sulfato de condroitina e sulfato de dermatan. Nos coelhos, essa associação também é observada durante o desenvolvimento da córnea (TAKAHASHI et al., 1993). O tipo VI, que está próximo ao ceratócito, parece desempenhar algum tipo de papel nas interações célula-matriz, o que seria especialmente importante durante o desenvolvimento e o reparo (DOANE; YANG; BIRK, 1992). Em comparação, o tipo V está combinado ao tipo I e acredita-se ser um fator responsável pela formação do diâmetro pequeno e uniforme da fibrila estriada (LINSENMAYER et al., 1993). Acredita-se que os tipos III e XII são formas de desenvolvimento, sendo o tipo III o mais comum (SAMUELSON, 2013)

As fibras de colágeno, juntamente com os proteoglicanos e associados com os GAGs e glicoproteínas, compõem de 15 a 25% do estroma da córnea e atuam como a principal estrutura de suporte da córnea (BORCHERDING et al., 1978; HASSELL; BIRK, 2010).

Os GAGs da córnea consistem em sulfatos de heparan, ácido hialurônico, sulfatos de condroitina, sulfatos de queratan e sulfatos de dermatan. O mais abundante deles é o sulfato de queratan, seguido pelo sulfato de dermatan (CINTRON; COVINGTON, 1990; QUANTOCK; YOUNG; AKAMA, 2009; SAMUELSON, 2013). Quase todos os sulfatos de queratan são derivados dos ceratócitos, enquanto os sulfatos de heparan são derivados do epitélio da córnea. Os ácidos hialurônicos, no entanto, são formados pelo endotélio da córnea. Conseqüentemente, cada tipo de célula da córnea contribui com sua própria matriz específica de classes de GAGs. Com base nas diferentes habilidades de ligação dos GAGs à água, o sulfato de dermatan está mais presente na córnea anterior, enquanto o sulfato de queratan, está mais presente na córnea posterior. Funcionalmente, essa dualidade é bastante útil porque o sulfato de dermatan é mais eficiente em reter água, já que este absorve menor quantidade da água total (WATSKY; OLSEN; EDELHAUSER, 1999; DAWSON et al., 2009; SAMUELSON, 2013).

Posterior ao estroma, encontra-se a membrana de Descemet, que é considerada a membrana basal do endotélio (SLATTER, 2005; SAMUELSON, 2013). Ela é uma estrutura elástica, formada por fibras delgadas de colágeno, e é continuamente depositada pelo endotélio. Suas fibras são pouco resistentes e, em casos de descemetocelose, essa camada fica facilmente protruída (SLATTER, 2005; PIPPI; GONÇALVES, 2009; SAMUELSON, 2013). Esta membrana normalmente está sob alguma tensão e, se rompida, tende a se enrolar como um pergaminho. Ela contém vários tipos de colágeno, incluindo o tipo VIII, encontrado no ângulo iridocorneal, mas não em outras partes da córnea e também possui os colágenos tipo I, III, IV, V e VI (TAMURA et al., 1991; SAMUELSON, 2013).

A camada mais interna da córnea é o endotélio, que fica em contato direto com o humor aquoso, atuando como barreira para a entrada de líquidos no interior da córnea (JOYCE, 2003; ANDRADES; ARGUESO; GIPSON, 2019). O endotélio é constituído por uma monocamada de células poligonais (hexagonal) e achatadas que reveste a córnea interna e em razão da alta atividade metabólica, as células endoteliais contêm número elevado de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e retículo endoplasmático rugoso (SLATTER, 2005; JU et al., 2012). Existe alguma controvérsia em relação à capacidade regenerativa do endotélio e, de fato, esta pode variar com a idade dos animais, e em geral,

a mitose ativa pode ocorrer no animal imaturo (SAMUELSON, 2013). Nos animais adultos, a capacidade de cicatrização do endotélio é limitada, uma vez que estas possuem mínima capacidade regenerativa. Desta forma, elas cicatrizam por meio de hipertrofia e deslizamento (TURNER, 2010).

Em cães jovens, a densidade endotelial é superior a 3000 células/mm<sup>2</sup> (KAFARNIK; FRITSCHÉ; REESE, 2007). À medida que os animais envelhecem, a densidade endotelial pode diminuir gradualmente. Com uma população menor, essas células se espalham e produzem mais bombas para compensar. Assim, uma diminuição relacionada à idade na densidade das células endoteliais da córnea resulta em pouca alteração na espessura geral da córnea (ANDREW et al., 2001). Se a tendência continuar, no entanto, as células se tornam muito atenuadas, o que resulta em uma bomba insuficiente, incapaz de suportar o aumento do vazamento, ocorrendo espessamento concomitante da córnea e perda de claridade. Este estado é conhecido como o ponto de descompensação da córnea. A descompensação e a inabilidade em remover água do estroma ocorrem quando a densidade de células endoteliais está entre 500 a 800 células/mm<sup>2</sup> (SLATTER, 2005; SAMUELSON, 2013).

Além de ser a principal responsável pelo estado de desidratação da córnea, o endotélio funciona também como uma barreira que impede o influxo de fluidos e eletrólitos através do humor aquoso. O componente barreira é fornecido pela mácula ocludens (junção tigh) na face apical e pelas junções gap na face lateral da célula endotelial (WATSKY; OLSEN; EDELHAUSER, 1999; DAWSON et al., 2009; SAMUELSON, 2013).

A córnea apresenta entre 75 a 85% de água, e é relativamente desidratada em comparação com outros tecidos. Esse estado de desidratação é denominado deturgescência e é, em parte, uma função do endotélio e epitélio. Essas células movem a água para fora do estroma por bombas de adenosina trifosfatase (ATPase), sendo mais ativas no endotélio. Também podem existir outras "bombas" para manter o estado de deturgescência, incluindo a anidrase carbônica. Essas células bombeiam os íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup> para o humor aquoso e filme lacrimal. O controle energia-dependente de água ou manutenção de estado de deturgescência é importante para a transparência. As células endoteliais são os principais locais dessa bomba de fluido, sendo desta forma, o principal responsável pelo estado de deturgescência da córnea (SLATTER, 2005; DAWSON et al., 2009; SAMUELSON, 2013).

Por ser uma estrutura avascular, a córnea recebe a maior parte do oxigênio necessário para sua manutenção por intermédio do filme lacrimal pré-corneano. Os capilares provenientes do limbo e da conjuntiva também atuam na manutenção da sua oxigenação (MILLER, 2001; SLATTER, 2005). A nutrição da córnea ocorre devido ao contato com o humor aquoso, do qual ela recebe oxigênio, aminoácidos, glicose e demais nutrientes. O metabolismo da glicose é a principal fonte de energia (MILLER, 2001; SLATTER, 2005).

A inervação da córnea tem origem no nervo trigêmeo (nervo craniano V), que se ramifica e origina os ramos sensitivos não mielinizados dos nervos ciliares longos. Essa inervação se estende a partir da esclera em direção ao estroma anterior, alcançando o seu epitélio. Isto significa que os terminais nervosos sensíveis à dor são mais numerosos no epitélio e no estroma anterior, se comparados ao estroma mais profundo, e este fato é particularmente relevante quando consideramos as úlceras corneais, visto que, por este fato, as úlceras superficiais são mais dolorosas do que as profundas (MILLER, 2001; TURNER, 2010).

## **2.2 Reepitelização e Cicatrização Corneal**

As células da superfície epitelial são constantemente liberadas no filme lacrimal, sendo substituídas no processo de renovação pelas células basais do epitélio e estas são repostas por outras células basais que se movimentam do limbo em direção ao centro (LU; REINACH; KAO, 2001; WEST; DORA; COLLINSON, 2015).

As células germinativas estão normalmente presentes em tecidos que conservam a capacidade de auto-renovação. Essas células têm ciclo celular longo e grande potencial para a divisão celular. Estima-se que 30% das células basais do limbo são germinativas e estão nas cristas das paliçadas de Vogt (TSENG, 1989; DUA; GOMES; SING, 1994; KINOSHITA et al., 2001).

O processo de cicatrização inicia-se logo após a lesão do epitélio corneano e essencialmente, o reparo do defeito epitelial se caracteriza pela amplificação do processo fisiológico de regeneração. O processo de reepitelização começa imediatamente depois da lesão epitelial e envolve interações entre as células epiteliais e estromais, a glândula lacrimal e as células do sistema imunológico (LU; REINACH; KAO, 2001; WILSON et al., 2001).

O reparo do defeito epitelial da córnea pode ser dividido em três fases, que são: a fase de migração, a fase de proliferação e a fase de adesão epitelial. Esses fenômenos são

integrados e podem ocorrer de forma concomitante (DUA; GOMES; SING, 1994; LU et al., 2001; LIU; KAO, 2015; LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015).

Após a lesão no epitélio corneano, inicia-se a migração das células epiteliais na tentativa de fechar o defeito epitelial (LIU; KAO, 2015; LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015). As células na periferia da lesão tornam-se achatadas e suas membranas emitem processos digitiformes (filopodia) ou coraliformes (lamellipodia) que se estendem em direção à ferida (CROSSON; KLYCE; BEUERMAN, 1986; LU; REINACH; KAO, 2001).

Na segunda fase, evidencia-se uma intensa atividade mitótica, com a participação de várias camadas celulares. O defeito epitelial é recoberto inicialmente por uma única camada de células, e uma vez recoberta a área lesada, a migração celular cessa e a resposta mitótica diminui consideravelmente (DUA; GOMES; SING, 1994; LU; REINACH; KAO, 2001; LIU; KAO, 2015). Embora sejam eventos distintos e independentes, a migração e a proliferação celular completam-se durante a cicatrização corneana para promover o fechamento do defeito epitelial (DUA; GOMES; SING, 1994).

A cicatrização corneana só estará concluída quando o epitélio estiver firmemente aderido ao tecido conectivo adjacente e as adesões permanentes só serão formadas quando não houver mais defeito epitelial (DUA; GOMES; SING, 1994; VARGAS; ARNALICH-MONTIEL; BARRIO, 2019). Esse processo pode se prolongar durante meses após a lesão (LU; REINACH; KAO, 2001; VARGAS; ARNALICH-MONTIEL; BARRIO, 2019).

Durante o processo de reparo do epitélio corneano, ocorre uma complexa sequência de eventos no estroma, que são regulados pelas interações entre células epiteliais, ceratócitos, nervos corneanos, glândulas lacrimais, filme lacrimal e células do sistema imunológico. Estas interações são mediadas por diversas citocinas e fatores de crescimento (WILSON; LIU; MOHAN, 1999; WILSON et al., 2001; AMBRÓSIO; MILTON; WILSON, 2002; LIU; KAO, 2015; LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015).

Após o trauma epitelial são liberados os fatores que desencadeiam diversos eventos estromais (WILSON et al., 1996; WILSON; KIM, 1998). A apoptose dos ceratócitos é o primeiro evento que ocorre depois da lesão epitelial. Citocinas provenientes de células epiteliais lesadas são consideradas o principal fator desencadeador da apoptose celular. Várias citocinas já foram identificadas por suas propriedades de induzir apoptose, incluindo a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (MOHAN et al., 2003; WILSON et al., 2001).

Mediadores inflamatórios produzidos no estroma da córnea são também considerados extremamente importantes na regulação da cicatrização epitelial, bem como na atração de células inflamatórias provenientes de vasos límbicos e produtos da secreção glandular (O'BRIEN et al., 1998; MOHAN et al., 2003). As citocinas fator ativador de monócitos (MCAF) e fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) são produzidas pelos ceratócitos em resposta à IL-1 e ao TNF- $\alpha$  que são liberados pelas células epiteliais devido ao trauma (HONG et al., 2001). Esse é um dos exemplos mais importantes da existência de interações entre o epitélio e as células do sistema imunológico (WILSON et al., 2001).

Dentre as várias células inflamatórias, identificam-se principalmente macrófagos, monócitos, linfócitos T e polimorfonucleares (O'BRIEN et al., 1998). Essas células originam-se dos vasos sanguíneos do limbo e do filme lacrimal. Algumas células de defesa podem ser encontradas em estado inativo na córnea normal, e podem ser ativadas com o estímulo adequado (QIAN; DANA, 2001). A função delas é essencialmente de defesa, porém, elas também são responsáveis pela limpeza dos restos das células que sofreram apoptose (HUANG et al., 2003).

Wilson, Liu e Mohan (1999) descreveram um aumento significativo na expressão de vários fatores de crescimento que modulam o crescimento epitelial, como o HGF e o EGF logo após a lesão epitelial. Até o aparecimento de ceratócitos ativados na superfície, as glândulas lacrimais são os principais fornecedores de fatores de crescimento, uma vez que os ceratócitos da superfície, que são os maiores responsáveis pela produção destes fatores, entram em morte celular programada depois da lesão epitelial. Estes fatores exercem funções altamente específicas no restabelecimento da integridade da superfície ocular (WILSON et al., 2001).

A proliferação dos ceratócitos remanescentes inicia-se de 12 a 24 horas após a injúria epitelial. Intensas atividades mitóticas podem ser observadas na zona de acelularidade criada pelos ceratócitos que sofreram apoptose (MOHAN et al., 2003; TORRICELLI et al., 2016).

Acredita-se que citocinas, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de transformação beta (TGF-beta), que são liberadas pelas células epiteliais, sejam responsáveis pela ativação e manutenção do processo de repopulação estromal, enquanto a membrana basal do epitélio estiver com a função de barreira alterada (DENK; KNORR, 1997; WILSON, 2012; TORRICELLI et al., 2016).

Dependendo da estimulação, os ceratócitos em proliferação podem transformar-se em miofibroblastos (JESTER et al., 1995; MASUR et al., 1996; GABISON et al., 2009; TORRICELLI et al., 2016), por ação do TGF-beta e PDGF (MASUR et al., 1996; MOLLER PEDERSEN et al., 1998; MALTSEVA et al., 2001; JESTER et al., 2002; TORRICELLI et al., 2016; MENKO; WALKER; STEPP, 2019; VARGAS; ARNALICH-MONTIEL; BARRIO, 2019).

Os miofibroblastos são células maiores e menos transparentes do que os ceratócitos. Essa diferença está relacionada com a diminuição na expressão citoplasmática de proteínas do tipo cristalinas (JESTER et al., 1999; TORRICELLI et al., 2016; MARINO et al., 2017; VARGAS; ARNALICH-MONTIEL; BARRIO, 2019). Desta forma, os miofibroblastos são apontados como uma das causas de formação de opacidade (MOHAN et al., 2003; WILSON, 2012). Além disso, os miofibroblastos têm intensa atividade metabólica, produzindo diversos fatores do crescimento, como o HGF e o KGF, que estimulam o processo proliferativo estromal e promovem hiperplasia epitelial, mecanismos considerados responsáveis pela regressão do efeito refrativo (LOHMANN; REISCHL, MARSHALL, 1999). Os miofibroblastos também produzem e secretam colágeno e GAGs. A produção desta matriz extracelular pode ocorrer de forma menos organizada, contribuindo para diminuir a transparência corneana e induzir irregularidade (WILSON, 2012; TORRICELLI et al., 2016; VARGAS; ARNALICH-MONTIEL; BARRIO, 2019).

### **2.3 Ceratoplastia**

O transplante de córnea é o mais antigo, mais comum e o procedimento de maior sucesso entre os transplantes de tecidos (JONAS; RANK; BUDDE, 2002). A técnica de transplante de córnea penetrante foi realizada pela primeira vez em 1824 por Reisinger, porém, a melhora da acuidade visual só foi reportada em 1905, quando Eduard Zirm publicou um caso de ceratoplastia penetrante em que houve sucesso. Na medicina veterinária, no ano de 1837, o Dr. Bigger foi quem primeiro descreveu o enxerto de córnea em uma gazela de estimação e em 1957, o Dr. Holt realizou o primeiro homoenxerto documentado em um cão.

Segundo Braga (2007) o transplante de córnea está indicado para melhorar a visão, aliviar a dor, manter a integridade visual do olho e ocasionalmente para deter ou controlar processos infecciosos.

Esse procedimento cirúrgico possui variações em relação a sua realização, diferenciando-se em ceratoplastia penetrante, no qual o tecido afetado é removido em toda a sua espessura e as ceratoplastias lamelar anterior e posterior, onde ocorre a substituição parcial de sua espessura (GELATT; BROOKS, 2011; NITA et al., 2012; YOUNG et al., 2012; LACERDA et al., 2016).

Na ceratoplastia penetrante, o tecido é removido em toda a sua espessura e é substituído por um “botão” doador. Contudo, na ceratoplastia lamelar anterior, ocorre a substituição do epitélio e do estroma anterior, podendo ser substituído, se necessário, o estroma posterior, preservando-se desta forma a membrana de Descemet e o endotélio. Já a ceratoplastia lamelar posterior consiste na substituição do estroma posterior e da membrana de Descemet em conjunto com o endotélio, ou somente a substituição da membrana de Descemet e endotélio (GELATT; BROOKS, 2011; NITA et al., 2012; YOUNG et al., 2012).

As ceratoplastias lamelares anteriores surgiram como uma alternativa para evitar as complicações referentes a rejeição endotelial. Tecnicamente, elas são mais difíceis de serem realizadas em relação ao penetrante, pois exigem maior habilidade do cirurgião e instrumental especializado, porém, melhores resultados pós-operatórios são alcançados (NITA et al., 2012).

A ceratoplastia lamelar tem como principal vantagem a manutenção das camadas saudáveis da córnea, o que resulta na recuperação cirúrgica mais rápida, menor risco de rejeição, diminuição das complicações pós-cirúrgicas e uma estabilidade refracional mais precoce (YOUNG et al., 2012; KEANE et al., 2014; LOBELLO, 2018).

Realizando a comparação entre o transplante lamelar anterior e o transplante penetrante, o lamelar anterior tem a seu favor o fato de minimizar complicações transoperatórias intraoculares como a hemorragia expulsiva e a sinéquia. O fato do procedimento cirúrgico ser realizado com o bulbo do olho íntegro, gera menor perda de células. Contudo, essa técnica pode apresentar como intercorrência a perfuração da membrana de Descemet no transoperatório e o risco de rejeição subepitelial e/ou estromal, além de ser um procedimento mais demorado e que requer maiores habilidades cirúrgicas (ARDJOMAND et al., 2007; NITA et al., 2012).

Existem vários métodos cirúrgicos que podem ser utilizados para separar a membrana de Descemet do estroma durante a realização da ceratoplastia lamelar anterior, incluindo a dissecação manual (TSUBOTA et al., 1998), a dissecação viscoelástica com metilcelulose (MELLES et al., 1999, HELLER et al., 2019) e a injeção de ar (KIM et al., 2016). Kim

et al. (2016) realizaram a técnica de “Big Bubble” (injeção de ar) e concluíram que esta pode ser realizada na ceratoplastia lamelar anterior em cães para preservação da membrana de Descemet e endotélio.

Em animais, as indicações para ceratoplastia incluem: distrofia e degeneração endotelial da córnea, perfuração corneana, opacidade corneal severa, úlceras profundas, úlcera em melting, descemetocelose, abscesso estromal, perfuração corneana, neoplasia corneal e sequestro da córnea (WILKIE; WHITTAKER, 1997; TOWNSEND et al., 2008; GELATT; BROOKS, 2011; MCMULLEN; GILGER; MICHAU, 2014; CHOW; WESTERMEYER, 2015; ARMOUR; ASKEW; EGHARI, 2019). Embora as ceratoplastias penetrantes sejam claramente indicadas para as duas primeiras condições, pode-se também lançar mão da realização da ceratoplastia lamelar posterior no tratamento das distrofias e degenerações endoteliais em pequenos animais. Embora tal fato seja incipiente na Medicina Veterinária, Armour, Askew e Eghari (2019) realizaram a ceratoplastia lamelar posterior no tratamento da distrofia endotelial canina e o mesmo apresentou retorno da transparência corneal com duas semanas de pós-operatório.

As indicações para um enxerto de córnea na oftalmologia veterinária incluem razões ópticas (devolvem a transparência e regularidade da córnea), tectônicas (promovem a integridade da córnea), terapêuticas (realizadas para remoção de infecções e distrofias) e estéticas (atuam no melhoramento do aspecto visual, mas sem melhorias à visão) (WILKIE; WHITTAKER, 1997; BRAGA, 2007; LACERDA et al., 2016).

A realização da ceratoplastia visando resultados tectônicos fornecem pronto acesso aos materiais para enxertia, restauração da espessura corneal e resultado visual aceitável. A principal vantagem destas técnicas está na fácil disponibilidade de material para preencher e reforçar o defeito estromal (HANSEN; GUANDALINI, 1999).

Vários materiais já foram aplicados na ceratoplastia de forma experimental e também no tratamento de enfermidades corneais nos animais. Godoy-Esteves et al. (2013) realizaram a ceratoplastia lamelar em coelhos, e aplicou de forma experimental a membrana amniótica humana e de coelho e segundo os autores, em 30 dias os materiais estavam integrados à córnea do doador. Costa et al. (2019) realizaram um estudo retrospectivo multicêntrico dos transplantes corneais utilizando membrana amniótica criopreservada para o tratamento de úlceras complicadas em 111 cães e os mesmos concluíram que este material é eficaz para o tratamento de úlceras complicadas, com resultados visuais e estéticos extremamente satisfatórios.

Em outro estudo, Garcia et al. (1996) realizaram ceratoplastia lamelar em cães e aplicaram de forma experimental o peritônio homólogo conservado em glicerina, desta forma os autores afirmaram que este material poderá ser aplicado na reparação de defeitos lamelares na espécie.

Já Damasceno et al. (2004), aplicaram a mucosa oral autógena na ceratoplastia lamelar de forma experimental em caninos e concluíram que o mesmo pode ser indicado na reparação das lesões corneanas superficiais para fins tectônicos ou reconstrutivos.

Galera, Laus e Ferreira (2000) utilizaram a túnica vaginal, a fresco, na ceratoplastia lamelar e Vicenti et al. (2002) realizaram a ceratoplastia lamelar em caninos aplicando a túnica vaginal conservada em glicerina a 98% e os mesmos confirmaram que a túnica vaginal se mostrou eficaz na ceratoplastia lamelar.

No estudo realizado por Featherstone, Sansom e Heinrich (2001), os mesmos utilizaram uma preparação comercial da submucosa intestinal suína em felinos afetados com sequestros corneais, ulcerações ou descemetoceloses e estes apresentaram resultados favoráveis em oito dos dez animais tratados. Já Gouille (2012), realizou um estudo retrospectivo de 106 casos de caninos e felinos onde foram aplicadas a submucosa intestinal suína e concluiu que este material é efetivo para manter a transparência corneal na maioria dos casos.

Chow e Westermeyer (2015) realizaram um estudo retrospectivo onde utilizaram a submucosa da vesícula urinária suína (ACELL Vet<sup>TM</sup>) na reconstrução corneal de 82 caninos e felinos e estes concluíram que a reconstrução da córnea apenas com o ACell Vet<sup>TM</sup> é uma alternativa viável, que resulta em cicatrizes e complicações mínimas em gatos. No entanto, nos cães a cicatrização é mais acentuada do que nos gatos, e a taxa de deiscência do enxerto é maior em comparação às técnicas convencionais.

O uso de uma preparação comercial do pericárdio bovino (Tutopatch) em três felinos com sequestro corneano e três caninos com úlcera em melting ofereceram uma opção promissora para reconstrução cirúrgica da córnea após ceratectomia para o tratamento de úlceras e sequestros de córnea (DULAURENT et al., 2013).

No trabalho de realizado por Lacerda et al. (2016), foram utilizadas córneas homólogas e córneas heterólogas, frescas ou congeladas, no tratamento de defeitos corneais de 50 caninos e estes concluíram que o enxerto de córnea é eficaz no tratamento cirúrgico para defeitos corneais na espécie.

Além desses materiais, outros já foram pesquisados com essa finalidade. São eles a escama de sardinha (LAUS; FERREIRA; ANDRADE, 2000), a cápsula esplênica de

bovinos (EURIDES et al., 2006), a cápsula renal equina (ANDRADE et al., 1999) e o pericárdio equino (BARROS et al., 1995).

Alguns aspectos devem ser considerados quando da realização da ceratoplastia, sendo eles: o tamanho do defeito a ser substituído e sua profundidade, o tipo de tecido que irá ser utilizado para a substituição e, finalmente, o tipo de resultado esperado após o transplante (BRAGA, 2007).

A engenharia de tecidos estava concentrada na construção de matriz a base de biomateriais e na semeadura das células corneais. A princípio, as células iriam produzir um novo tecido ao longo do tempo através da produção de produtos da matriz extracelular (ME) e do remodelamento do andaime (LYNCH; AHEARNE, 2013). Vários polímeros desses biomateriais foram desenvolvidos com este propósito (LI et al., 2005; GARAGORRI et al., 2008; MIMURA et al., 2008; AHEARNE et al., 2010), no entanto, o principal obstáculo para o sucesso está na construção de uma matriz com as composições estruturais e bioquímicas semelhantes à córnea nativa (LYNCH; AHEARNE, 2013). Segundo Yoeruek et al. (2012a) e Lynch e Ahearne (2013), a ME corneal tem sido sugerida como alternativa para aplicação em defeitos corneais, já que o mesmo possui similaridades estruturais e também na sua composição.

Segundo Brown et al. (2010) e Leite (2015), a vantagem de se utilizar uma matriz acelular como um andaime para o crescimento celular ou remodelação reconstrutiva de órgãos e tecidos, é que ela apresenta os mesmos constituintes que a ME nativa. Destaca-se ainda que uma matriz íntegra e com ausência de células seja essencial para obtenção de enxertos que venham a ser adequadamente repovoados por células específicas, desta forma, a matriz não fornece apenas o suporte físico e organização espacial, mas também oferece um microambiente bioativo que direciona e influencia as funções celulares (KEANE; SALDIN; BADYLAK, 2016).

Nos últimos anos, foram desenvolvidas uma grande variedade de produtos comerciais de ME alogênicos ou xenogênicos disponíveis para utilização em diversos tratamentos (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009; KEANE; SALDIN; BADYLAK, 2016). Os suínos, equinos e bovinos são as principais espécies envolvidas na produção dos mais diversos enxertos descelularizados comerciais, por conseguinte, as matrizes heterólogas podem facilmente serem obtidas em abatedouros comerciais de animais de produção, permitindo a formação de uma reserva ou banco para diferentes enxertos (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009; LEITE, 2015; KEANE; SALDIN; BADYLAK, 2016).

Van Essen et al. (2016) utilizaram a ME da escama de tilápia em estudo “in vitro” e “in vivo” e estes demonstraram que o material facilitou a adequada proliferação e adesão epitelial, sem imunogenicidade e podendo ser implantada na córnea de coelhos.

De maneira geral, os componentes da ME se mantêm constantes entre diferentes espécies animais, sendo, portanto, bem tolerados mesmo em receptores xenógenos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Esse fato abre caminho para que estudos utilizem tais fontes teciduais na produção de arcabouços descclularizados, submetendo-as a variados processos de remoção celular. Acredita-se que uma vez obtidos os arcabouços contendo somente componentes da ME, isentar-se-ão, em teoria, do dano imunológico, característico de enxertos celularizados (OSÓRIO JÚNIOR et al., 2012).

Segundo Badylak e Gilbert (2008) e Leite (2015), o principal evento que se deseja evitar em um processo de enxertia, é o desencadeamento de uma resposta imunomediada desfavorável, que envolve tanto o sistema imune inato, quanto o adquirido, sendo essa resposta afetada por variáveis específicas do enxerto, incluindo a sua aplicação clínica, a fonte da matéria prima e o processo de descclularização pelo qual foi submetido.

Para diminuir a chance de rejeição do enxerto heterólogo, lança-se mão da descclularização, que é um procedimento que consiste na remoção eficiente de todo o material celular e nuclear, do tecido, minimizando quaisquer efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica na ME remanescente (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; KEANE; SALDIN; BADYLAK, 2016).

O protocolo ideal de descclularização deve remover completamente o material celular e as moléculas antigênicas do xenoenxerto para diminuir uma reação imune do hospedeiro; deve reter proteínas estruturais e funcionais da ME sem destruí-las; deve manter a transparência da córnea e também dar o suporte para crescimento das células na córnea. É importante observar que todo método de descclularização resultará em alguma interrupção na ultraestrutura da ME, no entanto, a otimização do processo de descclularização deve tentar minimizar esses efeitos indesejáveis (LYNCH; AHEARNE, 2013; KEANE; SALDIN; BADYLAK, 2016).

Os métodos que podem ser utilizados para descclularização corneana são: os métodos físicos, químicos e biológicos (enzimáticos) (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; LYNCH; AHEARNE, 2013). Os tratamentos físicos incluem: agitação, pressão, congelamento e descongelamento. Alta pressão hidrostática tem sido utilizada com sucesso para descclularização de córneas suínas (SASAKI et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2010; HASHIMOTO et al., 2015).

Os métodos químicos caracterizam-se pela utilização de ácidos, bases, detergentes iônicos, detergentes não iônicos, detergentes zwitteriônicos, que possuem propriedades iônicas e não iônicas, tratamentos hipertônico e hipotônico, álcoois e agentes quelantes, enquanto que os métodos biológicos, utilizam enzimas (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; LYNCH; AHEARNE, 2013; KEANE; SALDIN; BADYLAK, 2016). Combinações dos métodos físicos, químicos e biológicos geralmente são utilizadas para obter a descelularização completa (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; DU; WU, 2011).

Nos métodos químicos e biológicos, é importante adequar a concentração e o tempo de exposição da solução descelularizante de acordo com o tipo do tecido a ser tratado (WOLLMANN et al., 2011). Além disso, deve-se ter uma maior atenção no momento da retirada dos resíduos, pois, resquícios dos produtos podem permanecer no tecido descelularizado e induzir uma grave resposta inflamatória após a sua implantação no receptor (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; FRANCISCO, 2012).

Para que as matrizes extracelulares corneais (MECs) sejam aplicadas no tratamento das enfermidades corneais, devem-se realizar estudos “in vitro” para avaliação do repovoamento celular na MEC. No estudo realizado por Yoeruek et al. (2012a), foram implantadas células epiteliais, estromais e endoteliais de origem humana na MEC suína e estes autores concluíram que a córnea descelularizada suína pode ser utilizada em transplantes corneais.

Além desse trabalho, outras pesquisas foram desenvolvidas com a realização de cultivo celular em MEC, podendo-se destacar a pesquisa de Bayyoud et al. (2012), onde foram realizados cultivo celular de células endoteliais na MEC bovina, e as pesquisas de Pang, Du e Wu (2010), Du et al. (2011) e Ju et al. (2012), os quais realizaram cultivo de células corneais na MEC suína, podendo-se ressaltar que em todos esses trabalhos, ocorreram a integração das células na MEC. Du e Wu (2011) realizaram a semeadura de fibroblasto de coelho na MEC suína, e estes observaram de forma satisfatória a proliferação dos fibroblastos na matriz corneal.

O transplante “in vivo” de córneas descelularizadas fornece informações valiosas sobre a biocompatibilidade e a integração da matriz. O transplante de córneas suínas descelularizadas demonstraram integração na córnea de coelho e sem rejeição clínica (PANG; DU; WU, 2010; DU e WU, 2011; YOERUEK et al., 2012b); além disso, após análise histológica, as células hospedeiras migraram para a região do implante e se infiltraram na matriz transplantada. As córneas suínas descelularizadas com alta pressão

hidrostática e transplantadas “in vivo” na córnea de coelho provocaram pouca ou nenhuma resposta imune (SASAKI et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2015).

No trabalho realizado por Leite (2015), realizou-se a ceratoplastia lamelar em canino com neoplasia corneana utilizando MEC suína e segundo o autor, a utilização desse material apresentou resultados satisfatórios, visto que, aos 52 dias do pós-operatório, observaram-se ausência de vasos e transparência corneal com discreta nébula.

Outro ponto que se deve dar a devida importância, consiste no meio para conservação das MECs (BRAGA, 2007). Entre os meios conservantes utilizados para manutenção das córneas estão a solução supersaturada de açúcar a 300% e a glicerina a 98%, que apresentam bons resultados por um período de 30 dias (GONÇALVES et al., 2003) e RPMI associado ao glicerol (1:1), que apresentaram bons resultados por um período de três meses (LEITE, 2015).

A escama de tilápia já foram utilizadas como ME nos enxertos de córneas (Van Essen et al., 2016), porém o uso da MECT em ceratoplastias lamelares não foram evidenciadas. Nesse contexto, decidiu-se realizar a ceratoplastia lamelar experimental em suínos e posteriormente realizou-se a ceratoplastia lamelar em dois caninos e um felino com afecções corneais, ambas aplicadas utilizando-se a MECT.

### 3. REFERÊNCIAS

- ABASS, A.; HAYES, S.; WHITE, N.; SORENSEN, T.; MEEK, K. M. Transverse depth-dependent changes in corneal collagen lamellar orientation and distribution. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 12, n. 104, p.1-131, 2015.
- AHEARNE, M.; WILSON, S. L. LIU, K.; RAUZ, S.; EL HAJ, A. J.; YANG Y. Influence of cell and collagen concentration on the cell–matrix mechanical relationship in a corneal stroma wound healing model. **Experimental Eye Research**, v. 91, n. 5, p.584-591, 2010.
- AMBRÓSIO, R. JR.; MILTON, R.; K.; WILSON, S. E. Apoptose dos ceratócitos e sua importância em cirurgia refrativa. **Sinopse de Oftalmologia**, v. 4, n.4, p. 408-13, 2002.
- ANDRADE, A. L.; LAUS, J. L. Enfermidades da córnea de pequenos animais. **Clínica Veterinária**, v.12, p.34-9, 1998.
- ANDRADE, A.L; LAUS, J.; FIGUEIREDO, F.; BATISTA C. M. et al. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, p. 79-82, 1999.
- ANDRADES, M.G.; ARGUESO, P.; GIPSON, I. Corneal Anatomy. In: BARRIO, J. L. A.; ARNALICH-MONTIEL, F. **Corneal regeneration: therapy and surgery**. Suíça: Springer, 2019. Cap. 1. p. 1-12.
- ANDREW, S. e.; RAMSEY, D. T.; HAUPTMAN, J. G.; BROOKS, D. E. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanized horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 479–482, 2001.
- ARDJOMAND, N.; HAU S.; MCALISTER; J. C.; BUNCE; C.; GALARETTA, D.; TUFT, S. T. LARKIN, D. F. P. Quality of Vision and Graft Thickness in Deep Anterior Lamellar and Penetrating Corneal Allografts. **American Journal of Ophthalmology**, v. 143, n. 2, p.228-235, 2007.
- ARMOUR, M. D.; ASKEW, T. E.; EGHARARI, A. O. Endothelial keratoplasty for corneal endothelial dystrophy in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 22, n. 4, p.545-551, 2019.
- BADYLAK, S. F.; GILBERT, T. W. Immune response to biologic scaffold materials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p.109-116, 2008.
- BADYLAK, S.; FREYTES, D.; GILBERT, T. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p.1-13, 2009.
- BALDWIN, H.C.; MARSHALL, J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 80, n.3, p. 238-47, 2002.
- BARROS, P. S. M. SAFATLE, A. M. V.; RIGUEIRO, M. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprosthesis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32, n. 4, p. 251-255, 1995.

BAYYOUNG, T.; THALER, S.; HOFMANN, J.; MAURUS, C. SPITZER, M. S.; SCHMIDT, K. U. B.; SZURMAN, P.; YOERUEK, E. Decellularized Bovine Corneal Posterior Lamellae as Carrier Matrix for Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. **Current Eye Research**, v. 37, n. 3, p.179-186, 2012.

BORCHERDING, L.J.; BLACIK, L. J.; SITTIG, R. A.; BIZZELL, J. W.; BREEN, M.; WEINSTEIN, H. G. Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. **Experimental Eye Research**, v. 21, p. 59–70, 1978.

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

BROWN, B. N.; BARNES, C. A.; KASICK, R. T.; MICHEL, R.; GILBERT, T. W.; BEER-STOLZ, D.; CASTNER D. G.; RATNER B. D.; BADYLAK, S. F. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 428-437, 2010.

CHOW, D. W. Y.; WESTERMEYER, H. D. Retrospective evaluation of corneal reconstruction using ACell Vet™alone in dogs and cats: 82 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, n. 5, p. 357-366, 2015.

CINTRON, C.; COVINGTON, H. I. Proteoglycan distribution in developing rabbit cornea. **The Journal Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, p. 675–680, 1990.

COSTA, D.; LEIVA, M.; VERGARA, J.; DÍAZ, C.; PEÑA, M. T. A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 22, n. 5, p. 695-702, 2019.

CROSSON, C.E.; KLYCE, S.D.; BEUERMAN, R.W. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 27, n.4, p. 464-73, 1986.

DAMASCENO, A. D.; CHAVES, N. S. T.; ATHAYDE, I. B.; PRADO, V. R. C. Estudo clínico e histológico da mucosa oral autógeno na ceratoplastia lamelar experimental. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 2, p.117-124, 2004.

DARTT, D.A. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. **Exp Eye Res**, v. 78, n. 2, p. 173-85, 2004.

DAWSON; D.G.; WATSKY, M. A.; GEROSKI, D.H.; EDELHAUSER, H. F. Cornea and Sclera. In: TASMANN, W.; JAEGER, E. A. **Duane's Ophthalmology**. Lippincott: Williams & WILKINS, 2009, Cap. 4, p. 1764-1842.

DENK P. O.; KNORR M. The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 235, n. 8, p. 530-4, 1997.

DOANE, K.J.; YANG, G.; BIRK, D.E. Corneal cell-matrix interactions: type VI collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblasts. **Experimental Eye Research**, v. 200, p. 490– 499, 1992.

DU, L.; WU, X. Development and Characterization of a Full-Thickness Acellular Porcine Cornea Matrix for Tissue Engineering. **Artificial Organs**, v. 35, n. 7, p.691-705, 2011.

DU, L.; WU, X.; PANG, K.; YANG, Y. Histological evaluation and biomechanical characterization of an acellular porcine cornea scaffold. **British Journal of Ophthalmology**, v. 95, n. 3, p.410-414, 2011.

DUA, H. S.; GOMES, J. A.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **Br J Ophthalmol**, v. 78, n. 5, p. 401-8, 1994.

DULAURENT, T.; AZOULAY, T.; GOULLE, F.; DULAURENT, A.; MENTEK, M.; PEIFFER, A. R. L.; ISARD, P. F. Use of bovine pericardium (Tutopatch®) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, n. 2, p. 91-99, 2013.

ESPANA, E. M.; GRUETERICH, M.; MATEO, A.; ROMANO, A. C.; YEE, S. B.; YEE, R. W.; TSENG, S. C. G. Cleavage of corneal basement membrane components by ethanol exposure in laser-assisted subepithelial keratectomy. **J Cataract Refract Surg**, v. 29, n.6, p. 1192-7, 2003.

EURIDES, D.; DALECK, C. R.; SILVA, M.; SILVA, L. A. F.; GONÇALVES, G. F.; PRIETO, L. A.; BORREZZI, C. The use of bovine esplanic capsule in lamellar keratoplasty with rabbits. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 9, n. 2, p. 117-121, 2006.

FAGERHOLM, P. Wound healing after photorefractive keratectomy. **J Cataract Refract Surg**, v. 26, n.3, p. 432-47, 2000.

FEATHERSTONE, H. J.; SANSOM, J.; HEINRICH, C. L. The use of porcine small intestinal submucosa in ten cases of feline corneal disease. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 2, p.147-153, 2001.

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

GABISON, E. E.; HUET, E.; BAUDOUIN, C.; MENASHI, S. Direct epithelial–stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 28, n. 1, p.19-33, 2009.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L. Use of fresh autogenous vaginal tunic in the experimental lamellar keratoplasty in dogs (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, 2000.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; ORÍ, A. P. Afecções da túnica fibrosa. **In: Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 69-97.

GARAGORRI, N. FERMANIAN, S.; THIBAUT, R.; AMBROSE, W. M.; SCHEIN, O. D.; CHAKRAVAR, S. Keratocyte behavior in three-dimensional photopolymerizable poly(ethylene glycol) hydrogels. **Acta Biomaterialia**, Elsevier, v. 4, n. 5, p.1139-1147, 2008.

GARCIA, J. A.; BARROS, P. S. M.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; SAFATLE, A. M. V. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 33, p.290-294, 1996.

GELATT, K. N.; BROOKS, D. E. Surgery of Cornea and Sclera. In: GELATT, Kirk N.; GELATT, Janice Peterson. **Veterinary Ophthalmic Surgery**. Gainesville: Elsevier, 2011. Cap. 8. p. 192-231.

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

GIPSON, I. K.; INATOMI, T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 6, n.4, p. 3-10, 1995.

GODOY-ESTEVEZ, C. A. L. GOMES, J. A. P.; YAZBEK, K.; GUERRA, J. L.; BARROS, P. S. M. Lamellar keratoplasty in rabbits using human and rabbit amniotic membrane grafts: a comparative study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 3, p.191-197, 2013.

GONÇALVES, G. F.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; OLIVEIRA, S. T.; GRAÇA, D. L.; MAZZANTI, A.; STEDILE, R. Ceratoplastia lamelar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina – Aspectos macroscópicos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 6, n. 1, p. 31-37, 2003.

GOULLE, F. Use of porcine small intestinal submucosa for corneal reconstruction in dogs and cats: 106 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 1, p.34-43, 2012.

HANSEN, P. A.; GUANDALINI, A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, n. 4, p.233-241, 1999.

HARDING, C.; BAGCHI, M.; WEINSIEDER, A.; PETERS V. A comparative study of corneal epithelial cell surfaces utilizing the scanning electron microscope. **Investigative Ophthalmology**, v. 13, p. 906–912, 1974.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S.; SASAKI, S.; NEGISHI, J.; HONDA, T.; HATTORI, S.; NAM, K.; KIMURA, T.; MOCHIZUKI, M.; KOBAYASHI, K. H.; KISHIDA, A. Corneal Regeneration by Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) Using Decellularized Corneal Matrix. **Plos One**, v. 10, n. 7, p.1-10, 2015.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S.; SASAKI, S.; NEGISHI, J.; HONDA, T.; HATTORI, S.; NAM, K.; KIMURA, T.; MOCHIZUKI, M.; KOBAYASHI, K. H.; KISHIDA, A. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 14, p. 3941-3948, 2010.

HASSELL, J. R.; BIRK, D. E. The molecular basis of corneal transparency. **Experimental Eye Research**, v. 91, p. 326–335, 2010.

HAYNES, R. J.; TIGHE, P. J.; DUA, H. S. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. **Br J Ophthalmol**, v. 83, n.6, p. 737-41, 1999.

HELLER, A. R.; DIFAZIO, M. R.; GOMES, F. E.; LEDBETTER, E. C. Clinical and diagnostic evaluation of intraocular expulsion of a corneal epithelial inclusion cyst in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 22, n. 5, p.710-715, 2019.

HONG, J.W; LIU, J. J.; LEE, J. S.; MOHAN, R. R.; WOODS, D. J.; HE, Y. G.; WILSON, S. E. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n.12, p. 2795-803, 2001.

HUANG, J.; POSSIN, D.; KNOWN, R.; AMBRÓSIO, R. JR.; WILSON, S.E. Characterization of Inflammatory Cell Infiltration in Rabbits Following PRK and LASIK. **Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting**. Fort Lauderdale. Program number 4235, 2003.

JESTER, J. V. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 82–93, 2008.

JESTER, J.V.; HUANG, J.; PETROLL, W. M.; CAVANAGH, H. D. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. **Exp Eye Res**, v. 75, n.6, p. 645-57, 2002.

JESTER, J.V.; MOLLER-PEDERSEN; T.; HUANG, J.; SAX, C. M.; KAYS, W. T.; CAVANGH, H. D.; PETROLL, W. M.; PIATIGORSKY, J. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. **J Cell Sci**, v. 112, n. 5, p. 613-22, 1999.

JESTER, J.V.; PETROLL, W. M.; BARRY, P. A.; CAVANAGH, H. D. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 36, n. 5, p. 809- 19, 1995.

JONAS, J. B; RANK, R. M; BUDDE, W. M. Immunologic graft reactions after allogenic penetrating keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology**, Elsevier v. 133, n. 4, p.437-443, 2002.

JOYCE, N. C. Proliferative capacity of corneal endothelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 359-389, 2003.

JU, C.; GAO, L.; WU, X.; PANG, K. A human corneal endothelium equivalent constructed with acellular porcine corneal matrix. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 6, p. 887-894, 2012.

KAFARNIK C.; FRITSCHKE, J.; REESE, S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, p. 222–230, 2007.

KEANE, M.; COSTER, D.; ZIAEI, D.; WILLIAMS, K. Deep anterior lamellar keratoplasty versus penetrating keratoplasty for treating keratoconus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, p.1-51, 2014.

KEANE, T. J.; SALDIN, L. T.; BADYLAK, S. F. Decellularization of mammalian tissues. **Characterization and Design of Tissue Scaffolds**, v. 106, n. 4, p. 75-103, 2016.

KIM, S.; KWAK, J. Y.; JEONG, M.; SEO, K. Deep anterior lamellar keratoplasty of dog eyes using the big-bubble technique. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 3, p.347-352, 2016.

KINOSHITA, S.; ADACHI, W.; SOTOZONO, C.; NISHIDA, K.; YOKOI, N.; QUANTOCK, A. J.; OKUBO, K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. **Prog Retin Eye Res**, v. 20, n. 5, p. 639-73, 2001.

LACERDA, R. P.; GIMENEZ, M. T. P.; LAGUNA, F.; COSTA, D.; RIOS, J.; LEIVA, M. Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: a review of 50 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 3, p. 222-231, 2016.

LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; ANDRADE, A. L. Emprego de escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), conservada em glicerina, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2000.

LEITE, A. G. B. **Utilização de matriz corneal suína descelularizada em ceratoplastias**. 2015. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LI, F.; GRIFFITH, M.; LI, Z.; TANODEKAEW, S.; SHEARDOWN, H.; HAKIM, M.; CARLSSON, D. J. Recruitment of multiple cell lines by collagen-synthetic copolymer matrices in corneal regeneration. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3093-3104, 2005.

LINSENMAYER, T.F.; GIBNEY, E.; IGOE, F.; GORDON, M. K.; FITCH, J. M.; FESSLER, L. I.; BIRK, D. E. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1 (V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 121, n. 5, p. 1181–1189, 1993.

LIU, C; KAO, W. W. Corneal Epithelial Wound Healing. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 134, p.61-71, 2015.

LJUBIMOV, A.V., SAGHIZADEH, M. Progress in corneal wound healing. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 49, p. 17-45, 2015.

LOBELLO, F. Evolução dos transplantes lamelares de córnea. **Universo Visual**, v. 104, n. 4, p. 20-23, 2018.

LOHMANN, C. P.; HOFFMANN, E.; REISCHL, U. Epidermal growth factor (EGF) in tears in excimer laser photorefractive keratectomy. Responsible for postoperative refraction and "haze"? **Ophthalmology**, v. 95, n. 2, p. 80-7, 1998.

LOHMANN, C.P.; REISCHL, U.; MARSHALL, J. Regression and epithelial hyperplasia after myopic photorefractive keratectomy in a human cornea. **J Cataract Refract Surg**, v. 25, n. 5, p. 712-5, 1999.

LU, L.; REINACH, P.S.; KAO, W.W. Corneal epithelial wound healing. **Exp Biol Med**, Maywood, v. 226, n. 7, p. 653-64, 2001.

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

MALTSEVA, O.; FOLGER, P.; ZEKARIA, D.; PETRIDOU, S.; MASUE, S. K. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n.11, p. 2490-5, 2001.

MARINO, G. K.; SANTHIAGO, M. R.; SANTHANAM, A.; DIBBIN, L. L.; THANGAVADIVEL, S.; MEDEIROS, C. S.; BOSE, K.; TAM, K. P.; WILSON, S. E. Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits. **Experimental Eye Research**, v. 161, p.101-105, 2017.

MASUR, S.K.; DEWALT, H. S.; DINHT, T. T.; ERENBURGT, I.; PETRIDOUT, S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 9, p. 4219-23, 1996.

MCMULLEN, R. J.; GILGER, B. C.; MICHAU, T. M. Modified lamellar keratoplasties for the treatment of deep stromal abscesses in horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 5, p. 393-403, 2014.

MELLES, G. R. J.; LANDER, F.; RIETVELD, F. J. R.; REMEIJER, L.; BEEKHUIS, W. H.; BINDER, P. S. A new surgical technique for deep stromal, anterior lamellar keratoplasty. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, n. 3, p. 327-333, 1999.

MENKO, A. S.; WALKER, J. L.; STEPP, M. A. Fibrosis: Shared Lessons from the Lens and Cornea. **The Anatomical Record**, p. 1-14, 2019.

MILLER, W. W.; Evaluation and management of corneal ulcerations: A systematic approach. **Clinical Techniques Small Practice**, v.6, n. 1, p. 51-57, 2001.

MIMURA, T.; AMANO, S.; YOKOO, S.; UCHIDA, S.; YAMAGAMI, S.; USUI, T.; KIMURA, Y.; TABATA, Y. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. **Molecular Vision**, v. 143, p.1819-1828, 2008.

MOHAN R. R.; HUTCHEON A. E.; CHOI R.; HONG J.; LEE J.; MOHAN R. R.; AMBRÓSIO JR, R.; ZIESKE, J. D.; WILSON, S. E. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. **Exp Eye Res**, v. 76, n. 1, p. 71-87, 2003.

MOLLER-PEDERSEN, T.; CAVANAGH, H.D.; PETROLL, W.M.; JESTER, J.V. Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but not regression of photoablative effect following PRK. **Curr Eye Res**, v. 17, n.7, p. 736-47, 1998.

NITA, M.; MROZIK, B. S.; GRZYBOWSKI, A.; ROMANIUK, W.; MAZUREK, U. Ophthalmic transplantology: Anterior segment of the eye – Part I. **Medical Science Monitor**, v. 5, n. 18, p. 64-72, 2012.

O'BRIEN T.; LI Q.; ASHRAF M. F.; MATTESON D. M.; STARK W. J.; CHAN C. C. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. **Arch Ophthalmol**, v. 116, n.11, p.1470-4, 1998.

OSÓRIO JÚNIOR, H. A.; SILVA, J. S. P.; BARBOZA, C. A. G.; ROCHA, H. A. O. Estudo da descélularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxerto. **In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS**, 2012.

PANG, K.; DU, L.; WU, X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7257-7265, 2010.

PIPI, N. L.; GONÇALVES, G. F.; Anatomofisiologia ocular. **In: Oftalmologia Clínica e Cirurgia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca; 2009. p. 01-10.

QIAN, Y.; DANA, M. R. Molecular mechanisms of immunity in corneal allotransplantation and xenotransplantation. **Expert Rev Mol Med**, v. 3, p. 1-21, 2001.

QUANTOCK, J.; YOUNG, R. D.; AKAMA, T. O. Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 6, p.891-906, 2009.

SAIKA, S.; OHNISHI, Y.; OOSHIMA, A.; LIU, C.; KAO, W. W. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. **Cornea**, v. 21, n. 2, p. 23- 9, 2002.

SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. In: GELATT, K. N.; GILGER, B. C.; KERN, T. J. **Veterinary Ophthalmology**. 5. ed. Iowa: Wiley-blackwell, 2013. Cap. 2. p. 39-170.

SASAKI, S.; FUNAMOTO, S.; HASHIMOTO, Y.; KIMURA, T.; HONDA, T.; HATTORI, S.; KOBAYASHI, H.; KISHIDA, A.; MOCHIZUKI, M. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. **Molecular Vision**, n. 15, p. 2022-2028, 2009.

SIVAK, J. M.; FINI, M. E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Prog Retin Eye Res**, v. 21, n.1, p. 1-14, 2002.

SLATTER, D. Córnea e Esclera. In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3. Ed. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 11, p. 283-338.

TAKAHASHI, T.; CHO, H. I.; KUBLIN, C. L.; CINTRON, C. Keratan sulfate and dermatan sulfate proteoglycans associated with type IV collagen in fetal rabbit cornea. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 41, p. 1447–1457, 1993.

TAMURA, Y.; KONOMI H.; SAWADA H.; TAKASHIMA S.; NAKAJIMA, A. Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, p. 2636–2644, 1991.

TORRICELLI, A. A. M.; SANTHANAM, A.; WU, J.; SINGH, V. A The corneal fibrosis response to epithelial–stromal injury. **Experimental Eye Research**, v. 142, p. 110-118, 2016.

TOWNSEND, W. M.; RANKIN, A. J.; STILES, J.; KROHNE, S. G. Heterologous penetrating keratoplasty for treatment of a corneal sequestrum in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, n. 4, p. 273-278, 2008.

TSENG, S.C. Concept and application of limbal stem cells. **Eye**, v. 3, n. 2, p. 141-57, 1989.

TSUBOTA, K.; MINAKO KAIDO, M.; MONDEN, Y.; SATAKE, Y.; BISSEMIYAJIMA, H.; SHIMAZAKI, J. A new surgical technique for deep lamellar keratoplasty with single running suture adjustment. **American Journal of Ophthalmology**, v. 126, n. 1, p. 1-8, 1998.

TURNER, S. M. Córnea. In: TURNER, S. M. **Oftalmologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 4. p. 121-124.

VAN ESSEN, T. H.; VAN ZIJL, L.; POSSEMIERS, T.; MULDER, A. A.; ZWART, S. J.; CHOU, C. H.; LIN, C. C.; LAI, H. J.; LUYTEN, G. P. M.; TASSIGNON, M. J.; ZAKARIA, N.; EL GHALBZOURI, A.; JAGER, M. J. Biocompatibility of a fish scale-derived artificial cornea: Cytotoxicity, cellular adhesion and phenotype, and in vivo immunogenicity. **Biomaterials**, v. 81, p. 36-45, 2016.

VARGAS, V.; ARNALICH-MONTIEL, F.; BARRIO, J. L. A. Corneal Healing. In: BARRIO, J. L. A.; ARNALICH-MONTIEL, F. **Corneal regeneration: therapy and surgery**. Suíça: Springer, 2019. Cap. 2. p. 13-22.

VICENTI, F. A. M.; LAUS, J. L.; COSTA NETO, J. M.; TAGLIERI, I. C.; CAMPOS, C. F.; JORGE, A. T.; FERREIRA, A. L.; FANTINATTI, A. P. Use of an allogeneous tunica vaginalis conserved in 98% glycerine for keratoplasty in dogs. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 3, p.182-187, 2002.

WATSKY, M. A.; OLSEN, T. W.; EDELHAUSER, H. F. Cornea and Sclera. In: KAUFMAN, H. B.; BARRON, B. A.; MCDONALD, M. B. **The Cornea**. Portland: Butterworth-Heinemann, 1999. Cap. 2. p. 52-82.

WEST, J. D.; DORA, N. J.; COLLINSON, J. M. Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p.281-299, 2015.

WHEATER, M.K.; KERNACKI, K.A.; HAZLETT, L.D. Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. **Prog Histochem Cytochem**, v. 36, n. 3, p. 185-259, 2001.

WILKIE, D. A.; WHITTAKER, C. Surgery of the Cornea. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, n. 5, p.1067-1107, 1997.

WILSON, S. E. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: Generation, persistence, and transparency. **Experimental Eye Research**, v. 99, p.78-88, 2012.

WILSON, S. E. Stimulus-specific and cell type-specific cascades: emerging principles relating to control of apoptosis in the eye. **Exp Eye Res**, v. 69, n. 3, p. 255-66, 1999.

WILSON, S. E.; HE, Y.; WENG, J.; LI, Q.; MCDOWALL, A. W.; VITAL, M.; CHWANG, E. L. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. **Exp Eye Res**, v. 62, n. 4, p. 325-7, 1996.

WILSON, S. E.; KIM, W. J. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 39, n. 2, p. 220-6, 1998.

WILSON, S. E.; LIU, J. J.; MOHAN, R. R. Stromal-epithelial interactions in the cornea. **Prog Retin Eye Res**, v. 18, n. 3, p. 293-309, 1999.

WILSON, S. E.; MOHAN, R. R.; MOHAN, R. R.; AMBRÓSIO JR, R.; HONG, J.; LEE, J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. **Prog Retin Eye Res**, v. 20, n. 5, p. 625-37, 2001.

WILSON, S.E. Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. **Am J Ophthalmol**, v. 111, n. 6, p. 763-5, 1991.

WOLLMANN, L. C. F N.; LAURINDO, C. A. H.; COSTA, F. D. A.; MORENO, A. N. Efeito da criopreservação e/ou da descélularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 3, n. 26, p. 490-496, 2011.

YOERUEK, E.; BAYYOUNG, T.; MAURUS, C.; HOFMANN, J.; SPITZER, M. S.; BARTZ-SCHMIDT, K.; SZURMAN, P. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. **Acta Ophthalmologica**, v. 90, n. 2, p.125-131, 2012a.

YOERUEK E.; BAYYOUNG T.; MAURUS C.; HOFMANN J.; SPITZER M. S.; BARTZ-SCHMIDT K. U.; SZURMAN P. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. **Acta Ophthalmologica**, v. 90, n. 3, p. 206-210, 2012b.

YOUNG A. L.; KAM, K. M.; JHANJI, V.; CHENG, L. L.; RAO, S. K. A new era in corneal transplantation: paradigm shift and evolution of techniques. **Hong Kong Med J**, v. 18, p. 509-516, 2012.

ZAGON, I. S.; SASSANI, J.W.; RUTH, T.B.; MCLAUGHLIN, P.J. Epithelial adhesion complexes and organ culture of the human cornea. **Brain Res**, v. 900, n.2, p. 205-13, 2001.

**ARTIGO 1: CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM SUÍNOS  
UTILIZANDO MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA**

O artigo será submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (Anexo 1)

CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM SUÍNOS UTILIZANDO MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE  
TILÁPIA

Robério S. Siqueira Filho<sup>1</sup>; Rômulo N. Rocha<sup>1</sup>; Bruno D. F. Souza<sup>1</sup>; Stephanie I. Araújo<sup>1</sup>; Taciana Spinelli<sup>1</sup>;  
Francisco A. L. Souza<sup>1</sup>; Fabrício B. Sá<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** - Siqueira Filho R.S., Rocha R.N., Souza B.D.F., Araújo S.I., Spinelli T., Souza F.A.L. & Sá F.B. 2020. [Experimental lamellar keratoplasty in swine using tilapia corneal extracellular matrix graft] Ceratoplastia lamelar experimental em suínos utilizando matriz extracelular corneal de tilápia. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(00):00-00. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. Email: crleucas@yahoo.com <sup>1</sup>

The aim of the present study was to perform lamellar keratoplasty in swines using the extracellular corneal matrix of tilapia (TECM) graft. Corneas of tilapia were decellularized with sodium hydroxide (0.5 M) and preserved in DMEM with glycerol solution for further in vitro analysis. Corneas were evaluated by the extraction and quantification of DNA, statistical analysis of DNA had different results before ( $10.43 \pm 3.84$  ng/mg) and after decellularization ( $4.6 \pm 2.15$  ng/mg). TECM cultures showed no microbiological contaminants and cell cultures supported the growth of bovine MDBK, 3T3-L and fibroblast cells. In vivo assessments demonstrated corneal opacities in all animals that underwent keratectomy (KT) and in 92.8% (13/14) of the keratoplasty (KP) group. Corneal vascularization was present in 13 (13/14) animals of the KP group at day 30 postoperatively (PO) and was absent at day 60 PO in the KP group and KT group. At histologic evaluation vessels were present in the subgroups CP15 and CP30 and no vessels were observed in the subgroup CP60. Corneal reepithelization occurred in all animals of KP and KT groups. Gomori trichrome stains revealed that the TECM grafts were integrated into the cornea. Thus, TECM allowed cell growth, without cytotoxic effect, integrated into swine cornea and therefore can be used as extracellular matrix grafts to reconstruct the cornea.

INDEX TERMS: cornea, decellularization, heterologous, extracellular matrix.

**RESUMO.** - Objetivou-se no presente estudo realizar a ceratoplastia lamelar em suínos utilizando a matriz extracelular corneal de tilápia (MECT). Para a realização dos estudos "in vitro", as córneas de tilápia foram descelularizadas utilizando o hidróxido de sódio (0,5 M) e foram conservadas em solução de DMEN associada ao glicerol. As mesmas foram avaliadas através da extração e quantificação do DNA, onde ocorreu uma diferença estatística na concentração do DNA antes da descelularização ( $10,43 \pm 3,84$  ng/mg) e após a descelularização ( $4,6 \pm 2,15$  ng/mg). No teste microbiológico não foram observadas a presença de contaminantes e no cultivo celular, observou-se que as células MDBK, 3T3-L e fibroblasto bovinos se desenvolveram na MECT. Já nos estudos "in vivo", constatou-se a opacidade corneal em todos os animais do grupo ceratectomia (CT) e em 92,8% (13/14) dos animais do grupo ceratoplastia (CP). A vascularização corneal esteve presente em 92,8% (13/14) dos animais do grupo CP até os 30 dias de pós-operatório (PO), e esteve ausente aos 60 dias de PO no grupo CP e grupo CT. Na

---

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. Email: crleucas@yahoo.com

avaliação histológica foram observados a presença de vasos nos subgrupos CP15 e CP30, e não foram observados vasos no subgrupo CP60. A reepitelização corneal ocorreu em todos os animais dos subgrupos CP e CT e pôde-se observar através da coloração pelo tricrômio de gomory que a MECT se integrou à córnea receptora. Desta forma, a MECT permitiu o crescimento celular, sem efeito citotóxico, sendo bem tolerado na córnea e, portanto, pode ser empregada como matriz extracelular para reconstituir a córnea enferma.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: córnea, cirurgia, descelularização, heterólogo.

## INTRODUÇÃO

A córnea é a principal estrutura do olho responsável pela refração da luz, e também serve como barreira entre o meio externo e as estruturas intraoculares (Slatter 2005, Andrades et al. 2019). A córnea pode ser acometida por diversas afecções que podem levar o paciente a uma deficiência visual profunda, cegueira ou até mesmo a perda do bulbo oftálmico (Turner 2010). Desde o primeiro transplante de córnea realizado em animal em 1837, as ceratoplastias lamelares e penetrantes não se tornaram cirurgias convencionais na oftalmologia veterinária, pois além dos custos e da escassez de doadores, há sempre a necessidade de uma grande equipe técnica que garanta a coleta, manutenção e realização de exames virais, bacteriológicos e fúngicos (Gellaty & Brooks 2011, Leite 2015, Kim et al. 2016).

Portanto, faz-se necessário o uso de alternativas que viabilizem o suprimento de enxertos para a córnea. A engenharia de tecidos tem se concentrado na construção de matriz à base de biomateriais e na sementeira das células corneais. A princípio, as células iriam produzir um novo tecido ao longo do tempo através da produção de produtos da matriz extracelular (ME) e do remodelamento do andaime (Lynch & Ahearne 2013). Vários polímeros desses biomateriais foram desenvolvidos com este propósito (Li et al. 2005, Garagorri et al. 2008, Mimura et al. 2008, Ahearne et al. 2010), no entanto, o principal obstáculo para o sucesso está na construção de uma ME com as composições estruturais e bioquímicas semelhantes à córnea nativa (Mimura et al. 2004, Shimmura et al. 2005, Lynch & Ahearne 2013).

Uma nova estratégia para a preparação de uma ME, consiste no uso de tecido xenogênico descelularizado. Desta forma, as células doadoras e os antígenos são removidos na sua maior parte durante o processo de descelularização, diminuindo a reação imune do hospedeiro e facilitando o repovoamento das células receptoras na matriz (Wilshaw et al. 2006, Ingram et al. 2007, Ott et al. 2008). Essa técnica permite utilizar o tecido xenogênico como uma matriz natural para o repovoamento celular (Lynch & Ahearne 2013). Segundo Yoruek et al. (2012b) e Lynch & Ahearne (2013), a matriz extracelular corneal (MEC) tem sido sugerida como alternativa para aplicação em defeitos corneais, já que a mesma possui similaridades estruturais e também na sua composição.

Sendo assim, objetivou-se realizar o cultivo celular para avaliação da viabilidade de repovoamento celular na matriz extracelular corneal de tilápia (MECT) e posteriormente aplicar de forma experimental a MECT na ceratoplastia lamelar em suínos, a fim de desenvolver um substituto corneal que pudesse restaurar a visão em animais com enfermidades corneais, podendo essa restauração ser aplicada tanto para fins funcionais, quanto para fins tectônicos, promovendo desta forma o reparo e a regeneração dos tecidos danificados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Após análise e emissão do parecer quanto aos aspectos éticos dos procedimentos científicos desenvolvidos, o presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), de acordo com o número da licença número 137/2018 (Anexo 3) e 122/2019 (Anexo 4).

### PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA MECT

Logo após a captura dos peixes na base experimental de pesca da UFRPE, as tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram encaminhados para o Laboratório de Oftalmologia Experimental (LOE) da mesma instituição, onde foram submetidas à eutanásia utilizando eugenol na concentração de 286,55 mg/L durante 600 segundos (Vidal et al. 2008). Após o procedimento de eutanásia, cada bulbo oftálmico foi avaliado, verificando a ausência de alterações e infecções, garantindo a higidez das córneas. Uma vez certificada a integridade dos olhos, coletaram-se as córneas pelo método de incisão “in situ” do disco corneal.

Depois de lavadas em solução de ringer com lactato, as córneas foram esterilizadas por imersão em solução de iodopovidona a 10% durante 10 minutos e lavadas posteriormente através de três passagens em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Em seguida, a descelularização foi realizada utilizando solução de hidróxido de sódio (0,5 molar), na qual as mesmas foram imersas por três minutos e ao serem retiradas da solução, foram friccionadas em ambas as faces (externa e interna), utilizando-se bastões envolvidos em algodão estéril e novamente lavadas por três vezes em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Após a descelularização, as córneas foram conservadas em meio Dulbecco's modified minimum essencial medium (DMEM) associado ao glicerol (1:1) sob temperatura de - 20°C.

### ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Para verificar se as amostras estavam livres de contaminantes, os fragmentos descelularizados foram imersos em caldo tioglicolato, e os meios de conservação coletados utilizando a alça microbiológica e semeados em placas de Petri contendo ágar sangue, incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com avaliações destes materiais após 48 e 96 horas. Foram selecionadas duas amostras com sete, 15, 30, 60 e 90 dias de conservação, respectivamente, totalizando dez amostras para avaliação microbiológica.

### CULTIVO CELULAR

Para avaliação da viabilidade de repovoamento celular na MECT, utilizaram-se fragmentos descelularizados de 5 mm de diâmetro da córnea, obtidos através do uso de “punch”. Por conseguinte, as células utilizadas para o cultivo foram: células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), que são células de linhagem contínua originárias de células renais bovinas; células 3T3-L1, que são fibroblastos de linhagem contínua provenientes de embriões de camundongos e as células de fibroblastos de bovinos, que são células de cultivo primário, as quais foram coletadas e desenvolvidas no Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN) da UFRPE.

Após a obtenção do fragmento corneal, as mesmas foram lavadas por três vezes em DMEM e em seguida dispostos em uma placa de 12 poços. Na sequência semeou-se 50.000 células/mL, contendo DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e posteriormente incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A análise foi realizada em duplicata seguida do respectivo controle celular, com avaliação a cada 24 horas no microscópio de

campo invertido. Para cada tipo de cultivo celular, foram colhidas amostras com 48 e 96 horas, respectivamente, sendo utilizados no total, seis fragmentos corneais para o cultivo celular. Em seguida, as matrizes cultivadas foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 48 horas, e processadas pelas técnicas de rotina e impregnadas em paraplast e posteriormente coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação da viabilidade das células na MECT.

#### EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Para a extração do DNA, foram utilizadas cinco matrizes descelularizadas e três córneas de tilápia como controle. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit Purelink® Genomic DNA Mini Kit (INVITROGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Neste caso, para cada amostra macerou-se 20mg do material adicionando 180µL do tampão de digestão e 20µL de proteinase K, sendo estes incubado em banho maria a 55°C durante 2 horas. Em seguida, foi adicionado 20µL de RNase A, agitou-se no vórtex e adicionou-se 200µL da solução tampão de lise e 200 µL de etanol absoluto. Essa mistura foi agitada no vórtex e centrifugada à 10000 x g durante 1 min, logo em seguida foi adicionado mais 500µL do tampão de lavagem 1 e centrifugado à 10000 x g durante 1 min, acrescido com mais 500µL do tampão de lavagem 2 e centrifugado à 30000 x g durante 3 min, por fim adicionou-se 200µL do tampão de eluição e foi centrifugado por 1 min e 30 seg, armazenando-se na temperatura de -20 °C até a quantificação. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™).

#### ESTUDO EXPERIMENTAL

Para o delineamento do presente estudo, utilizaram-se 20 suínos oriundos da Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina (EEPAC) da UFRPE. Os animais utilizados foram das raças Large White, Pietrã e Duroc, com idade entre 30 e 60 dias, de ambos os sexos. Os procedimentos experimentais desenvolvidos seguiram as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), a qual exige que apenas um dos olhos de cada animal seja comprometido, para que as alterações relacionadas ao ato cirúrgico e ao processo de reparação não interfiram com o bem-estar do animal durante o período do pós-operatório (PO).

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais (n=20), designados Grupo Ceratoplastia Lamelar (CP) (n=14) e Grupo Ceratectomia Lamelar (CT) (n=6). O grupo CP foi dividido em três subgrupos, de acordo com os períodos finais de avaliação e eutanásia, ou seja, Ceratoplastia Lamelar 15 dias (CP15) (n=4), Ceratoplastia Lamelar 30 dias (CP30) (n=7), Ceratoplastia Lamelar 60 dias (CP60) (n=3). O grupo CT foi dividido em dois subgrupos designados: Ceratectomia Lamelar 15 dias (CT15) (n=3) e Ceratectomia Lamelar 30 dias (CT30) (n=3).

Antes da realização do procedimento cirúrgico, foram realizados o exame clínico e oftálmico constituído pela oftalmoscopia direta, oftalmoscopia indireta e fluoresceína, com vistas a verificar e excluir animais portadores de qualquer alteração que pudesse interferir com os resultados.

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à restrição alimentar de 12 horas. Para realização da anestesia, foi instituída como medicação pré-anestésica, uma associação de Acepromazina (Apromazin; Syntec, São Paulo, Brasil) na dose de 0,1 mg/Kg, Midazolam (Midazolam; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil) na dose de 1 mg/Kg, Ketamina (Cetamin; Syntec, São Paulo, Brazil) na dose de 15 mg/kg e Cloridrato de Tramadol (Tramadol; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil) na dose de 4 mg/Kg, administradas pela via intramuscular (IM) e após a observação da sedação, instilou-se uma gota do colírio anestésico a base de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®; Alcon, São Paulo, Brasil) no olho esquerdo e realizou-se o bloqueio peribulbar associando 1 ml de

lidocaína à 2% (Lidocaína; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil) e hialuronidase (25 UTR/ml) de acordo com a técnica descrita por Siqueira Filho (2015), posteriormente realizou-se intubação direta e manutenção dos animais em plano cirúrgico com isoflurano (Isoflurano; Biochimico; Rio de Janeiro, Brasil) vaporizado com oxigênio em sistema semiaberto.

Em seguida, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico no globo ocular do lado esquerdo, realizado com auxílio de microscópio cirúrgico e previamente ao procedimento cirúrgico, foi realizada a antisepsia com iodopovidona a 10% na região periocular e com solução de iodopovidona 1:50 no globo ocular.

Após os procedimentos de antisepsia e delimitação do campo operatório, foi realizada a blefarostase com o uso de afastador oftálmico. Com vistas a obtenção de um botão lamelar e realização de úlceras experimentais, realizou-se incisão cirúrgica circular na região corneal central, com o auxílio de um punch de 5 mm, desta forma permitiu-se delimitar o botão constituído de epitélio e aproximadamente 1/3 do estroma anterior, o qual foi delaminado com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº15. Ato contínuo, realizou-se a colocação do botão doador descelularizado de 6 mm na córnea receptora, e esta foi fixada nos pontos cardinais utilizando-se o padrão de sutura isolado simples com fio de poliglactina nº 8-0. No grupo CT, apenas realizou-se a ceratectomia lamelar, para que servisse de controle para o presente estudo.

Como terapia analgésica, o meloxicam (Maxicam 2%; Ourofino, São Paulo, Brasil) foi aplicado na dose de 0,4mg/kg por via IM no PO imediato e nos dois dias subsequentes à cirurgia. Como medida profilática à infecção e ao espasmo ciliar, foram instilados tobramicina 3mg/mL (Tobramicina; Neo Química, São Paulo, Brasil) colírio a cada seis horas durante três dias e posteriormente a cada oito horas e tropicamida 10 mg/mL (Mydriacyl®; Alcon, São Paulo, Brasil) colírio a cada oito horas. Os animais foram mantidos com colar protetor durante todo o período do experimento.

Com auxílio do oftalmoscópio direto e indireto, o protocolo de avaliação oftalmológica consistiu na realização do teste de fluoresceína semanalmente até a ausência de coloração, observando-se a presença da reepitelização corneana. Também foram observadas: reflexo pupilar, biomicroscopia do segmento anterior com lâmpada de fenda portátil e também avaliaram-se as reações de fotofobia, blefarospasmo e uveíte, caso estes apresentassem. A reepitelização corneana foi classificada da seguinte forma: 0 (reepitelização total da região), 1 (reepitelização de  $\frac{3}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  da região), 2 (reepitelização inferior a  $\frac{1}{2}$  até  $\frac{1}{4}$  da região) e 3 (reepitelização inferior a  $\frac{1}{4}$  da região). A neoformação vascular foi quantificada de acordo com a quantidade de vasos observadas. Já a opacidade foi classificada da seguinte maneira: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (intenso).

Após o término da avaliação oftálmica, os animais foram submetidos à eutanásia utilizando uma associação de Ketamina (Cetamin; Syntec, São Paulo, Brazil) na dose de 15 mg/kg e Midazolam (Midazolam; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil) por via IM, após a sedação, injetou-se Propofol (Propovan®; Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 4 mg/kg pela via endovenosa e em seguida o Cloreto de Potássio 10% (Cloreto de Potássio; Hypofarma, Minas Gerais, Brasil). As córneas foram coletadas pelo método de incisão "in situ" do disco corneal, as quais foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,2 Molar com pH 7,4 durante 48 horas, em seguida foram processadas pelas técnicas de rotina, impregnadas e incluídas em paraplast. Para a realização da avaliação histológica, as lâminas foram coradas em HE e também foram coradas em Tricrômio de Gomory para observação da disposição das fibras de colágeno e para avaliação da integração da matriz extracelular na córnea receptora. No HE avaliaram-se a presença de neoformação vascular, reepitelização, infiltrado inflamatório e edema.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

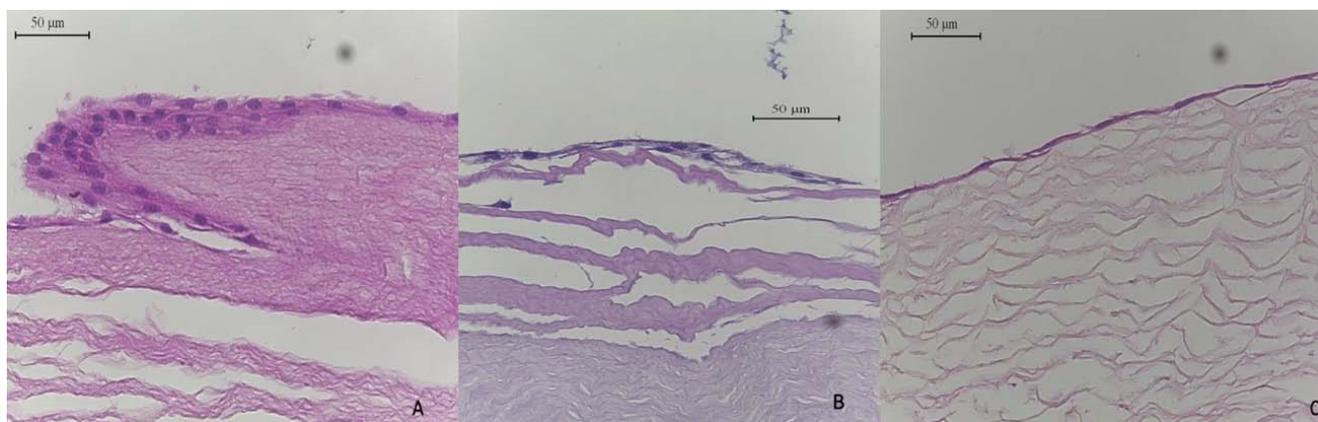
Todos os grupos experimentais foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk com o propósito de indicar se os grupos possuem uma distribuição normal, e a partir desses dados, determinar a realização de teste paramétrico ou não paramétrico.

Em relação a extração de DNA, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para a comparação entre os grupos em relação aos escores de opacidade, utilizou-se o teste de Mann-Whitney e para comparação dentro do mesmo grupo nos diferentes momentos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Na avaliação macroscópica da vascularização, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os momentos dentro do mesmo grupo. Os testes foram efetuados por meio do software Graphpad Prisma, versão 7.0.

#### RESULTADOS

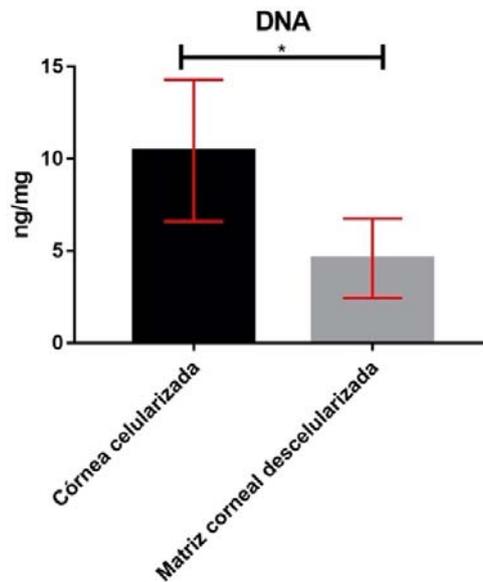
Em relação ao caldo tioglicolato, esta permaneceu límpida nas amostras com sete, 15, 30, 60 e 90 dias de conservação e na avaliação das placas de petri contendo ágar sangue, verificaram-se ausência de contaminantes nas amostras com os mesmos tempos de conservação.

Em relação ao cultivo celular, na avaliação observaram-se que as células MDBK, 3T3-L1 e fibroblasto bovino, desenvolveram dentro dos padrões, sem efeito citotóxico ou contaminação para a monocamada bem definida para todos os tipos celulares utilizados e respectivos controles. Na avaliação dos cortes histológicos corados em HE com 48 e 96 horas respectivamente, pôde-se observar que as células MDBK, 3T3-L1 e fibroblasto bovino aderiram-se a MECT e formaram uma monocamada bem definida, desenvolvendo-se dentro dos padrões e sem efeito citotóxico da matriz para todos os tipos celulares cultivados (Fig. 1).



**Figura 1** - Cultivo Celular. A. Presença das células MDBK na superfície da Matriz Extracelular Corneal de Tilápia (MECT) após 96 horas de cultivo celular. B. Presença das células 3T3-L1 na superfície da MECT após 96 horas de cultivo celular. C. Presença do Fibroblasto bovino na superfície da MECT após 96 horas de cultivo celular. HE, obj.40x.

Já em relação a quantificação e extração do DNA, observou-se uma diferença estatística em relação a quantidade de DNA remanescente, que ficou maior na córnea celularizada ( $10,43 \pm 3,84$  ng/mg) em comparação com a MECT ( $4,6 \pm 2,15$  ng/mg), conforme ilustrado na figura 2.



**Figura 2** - Concentração do DNA presente na MECT e na córnea celularizada. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Mann-Whitney comparando grupos ( $p= 0,0317$ ),  $p < 0,05$  significativo.

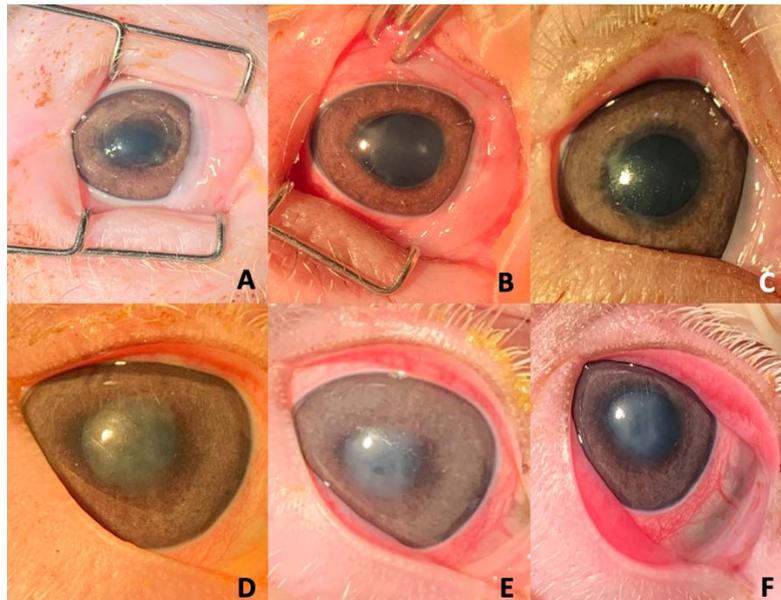
No que diz respeito a avaliação oftálmica, no grupo CT ( $n=6$ ), o teste de fluoresceína foi negativo para todos os animais com sete dias de pós-operatório, desta forma a reepitelização foi quantificada em 0 para todos os animais do grupo CT. Já no grupo CP, 78,5% (11/14) dos animais apresentaram-se negativo no teste de fluoresceína com sete dias de avaliação, sendo quantificada em 0 segundo o escore de avaliação, no entanto, 21,5% (3/14) dos animais apresentaram-se positivo no teste de fluoresceína, desta forma, desses três animais que foram positivos no teste, a reepitelização foi quantificada em 3 para dois dos animais e 1 para um animal. Com 15 dias de avaliação, o teste de fluoresceína foi positivo para dois animais do grupo CP, com a reepitelização quantificada em 2 e 1 respectivamente, e com 21 dias de avaliação, um animal apresentou-se positivo no teste de fluoresceína, com a reepitelização quantificada em 1. Já com 30 dias de avaliação, todos os animais deram negativo no teste de fluoresceína.

Em relação a opacidade, tanto no grupo CP (Fig. 3A, B, C), quanto no grupo CT (Fig. 3D, E, F) foram observadas a opacidade corneal. Dentre os grupos, em apenas um animal do grupo CP pôde-se observar opacidade 0 após 30 dias do procedimento cirúrgico. Em relação aos outros animais, no grupo CP a opacidade variou entre 1 e 3, já no grupo CT a opacidade permaneceu em 2 para todos os animais. Não houve diferença estatística entre os grupos e os momentos em relação a opacidade (Quadro 1).

**Quadro 1** - Avaliação da opacidade para os grupos CT e CP aos sete, 15, 21, 30 e 60 dias de PO.

GRUPO	DIAS					
	7	15	21	30	60	
Ceratectomia	2±0	2±0	2±0	2±0	---	p=1
Ceratoplastia	2±0	2±0	2±0,75	2±0,75	0	p=0,43
	p=1	p=0,8	p=0,8	p=0,8		

Valores correspondem a mediana e desvio interquartílico dos scores de avaliação de opacidade (0) = ausente, (1) = leve, (2) = moderado, (3) = intenso. Teste de Mann-Whitney para comparar a opacidade entre os grupos CP e CT, não houve diferença estatística entre os grupos CP e CT em relação à opacidade nos diferentes dias. Teste de Kruskal-Wallis para comparar a opacidade entre os diferentes dias dentro do grupo CT e dentro do grupo CP, não houve diferença significativa de opacidade entre os diferentes dias para o grupo CT (p=1) e grupo CP (p=0,43).



**Figura 3** - Avaliação da opacidade da córnea em diferentes momentos. A, B e C correspondem a evolução da opacidade na avaliação macroscópica com sete, 15 e 30 dias de pós-operatório de um suíno do grupo ceratoplastia. D, E e F correspondem a evolução da opacidade na avaliação macroscópica com sete, 15 e 30 dias de pós-operatório de um suíno do grupo ceratectomia. A e B foram classificados em opacidade 1 (leve) e C em opacidade 0 (ausente), já D, E e F foram classificados em opacidade 2 (moderada).

Conforme ilustrado no quadro 2, na avaliação macroscópica, a vascularização corneal não foi observada no grupo CT, já no grupo CP, observou-se a presença de vasos em 92,8% (13/14) animais até os trinta dias de PO, no entanto, não foram observadas a presença de vasos com 60 dias de pós-cirúrgico. A presença de abscesso em alguns pontos no local da sutura ocorreu em quatro animais do grupo CP com 15 dias de pós-operatório.

**Quadro 2** - Avaliação macroscópica da vascularização para os grupos CT e CP realizadas aos sete, 15, 21, 30 e 60 dias.

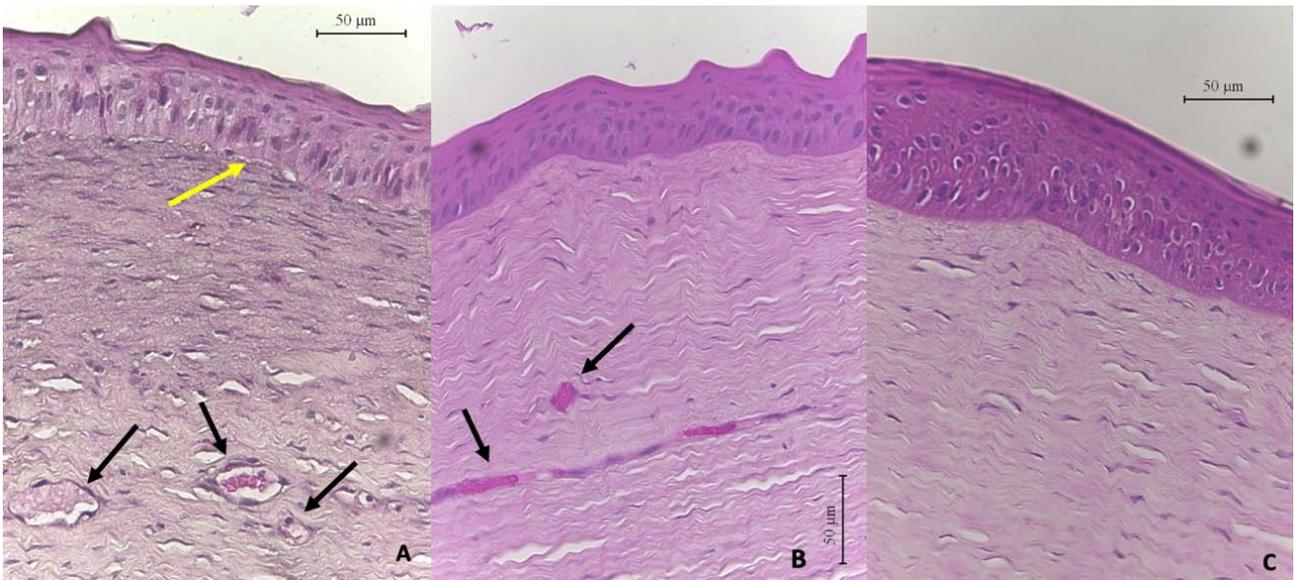
GRUPO	DIAS				
	7	15	21	30	60
Ceratectomia	0	0	0	0	--
Ceratoplastia	1±1,24	1,50±1,09	1,50±1,27	1,50 ±1,27	0

Valores correspondem a média e desvio padrão no número de vasos dos grupos CT e CP nos diferentes momentos. Teste de Kruskal-Wallis para comparar a vascularização de CP entre os diferentes dias, não houve diferença entre os diferentes dias para a vascularização de CP ( $p=0,22$ ).

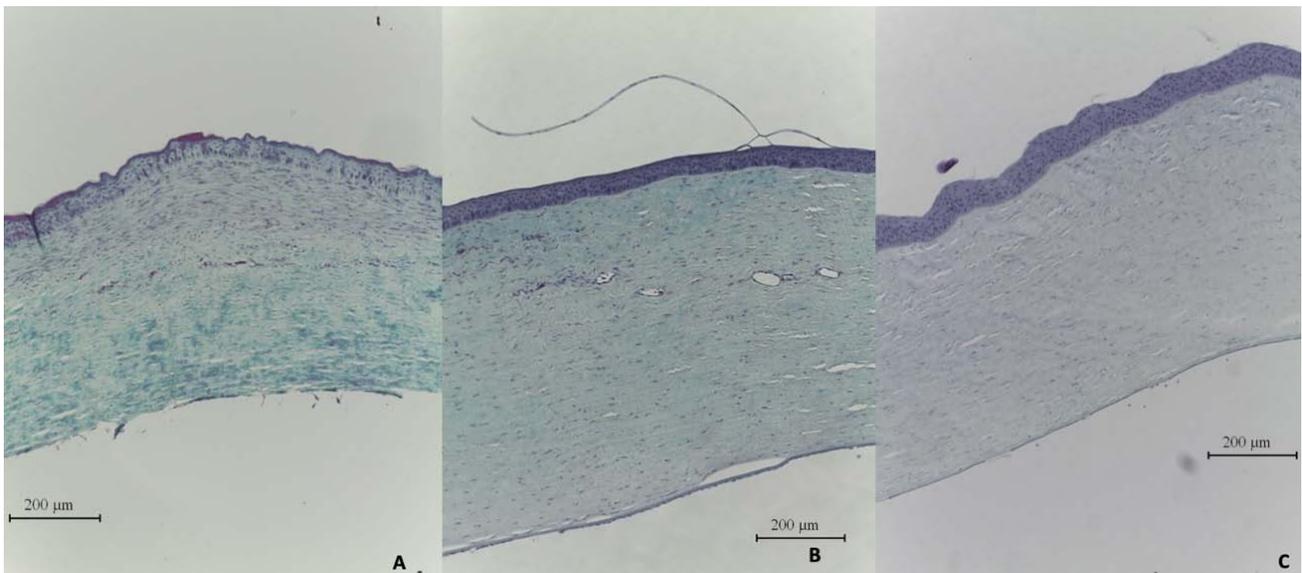
Na avaliação microscópica, observou-se que no subgrupo CP15 ( $n=4$ ) (fig. 4A) a reepitelização esteve presente em todos os animais, com presença de edema subepitelial. Também foram observados a presença de vasos profundos na interface entre o enxerto e o estroma receptor. Além disso, notou-se a presença de infiltrado inflamatório perivascular e na coloração com Tricrômio de Gomory (fig. 5A), pôde-se notar que a matriz estava totalmente integrada na córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno.

Já no subgrupo CP30 ( $n=7$ ) (fig. 4B), a reepitelização esteve presente em todos os animais e pôde-se observar uma aparente redução do número de vasos profundos na transição entre a matriz e o estroma receptor em comparação ao subgrupo CP15. A presença de infiltrado inflamatório não foi observada e na avaliação com o Tricrômio de Gomory (fig. 5B), observou-se que as fibras de colágeno encontravam-se paralelas e integradas à córnea receptora, com arranjo similar ao estroma da córnea receptora. Em relação ao subgrupo CP60 ( $n=3$ ) (fig. 4C), a reepitelização esteve presente em todos os animais e não foram observadas a presença de vasos e infiltrados inflamatórios e na coloração com o Tricrômio de Gomory (fig. 5C), pôde-se notar que a matriz estava totalmente integrada na córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno e arranjo similar ao estroma da córnea receptora.

Em relação ao grupo CT, na avaliação microscópica foi observado a presença de um vaso em um animal (1/3) do subgrupo CT30, e nos demais animais do subgrupo CT15 e CT30, não foram observados vasos. Também não foram observadas a presença de infiltrado inflamatório nos dois subgrupos e a reepitelização corneal esteve presente em todos os animais do subgrupo CT15 e CT30 no presente estudo.



**Figura 4** - Imagem histológica da córnea suína dos subgrupos CP15, CP30 e CP60 coradas em HE. A. Imagem histológica do subgrupo CP15, notar a presença de edema subepitelial (seta amarela) e a presença de vasos (seta preta) no estroma. B. Imagem histológica do subgrupo CP30, observar a presença de vasos no estroma. C. Imagem histológica CP60, observar ausência de edema subepitelial e ausência de vasos. HE, obj 40x



**Figura 5** - Imagem histológica da córnea suína dos subgrupos CP15, CP30 e CP60 coradas em Tricrômio de Gomory. A. Imagem histológica do subgrupo CP15, notar que a Matriz Extracelular Corneal de Tilápia (MECT) está integrada a córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno. B. Imagem histológica do subgrupo CP30, observar que a MECT está totalmente integrada a córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno e arranjo similar ao estroma da córnea receptora. C. Imagem histológica do subgrupo CP60, notar que a MECT está totalmente integrada a córnea receptora, com organização paralela entre a fibras de colágeno e arranjo similar ao estroma da córnea receptora. Tricrômio de Gomory, obj.10x.

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o método de descélularização e o meio de conservação foram eficientes para manutenção da inocuidade do material, além disso, demonstrou-se a biocompatibilidade da MECT através de estudos “in vitro” e “in vivo”.

Segundo Gilbert et al. (2006), os componentes da ME se mantêm constantes entre diferentes espécies animais, sendo, portanto, bem tolerados mesmo em receptores xenógenos. Destaca-se ainda que uma matriz íntegra e com ausência de células seja essencial para obtenção de enxertos que venham a ser adequadamente repovoados por células específicas, desta forma, a matriz não fornece apenas o suporte físico e organização espacial, mas também oferece um microambiente bioativo que direciona e influencia as funções celulares (Keane et al. 2016).

Desta forma, optou-se pela utilização da MECT, visto que as tilápias (*Oreochromis niloticus*) são facilmente encontrados em criatórios e estas espécies são as mais procuradas para criação em escala industrial, por apresentar rápido crescimento, grande rusticidade, fácil manejo e alto nível de rendimento. Também optou-se baseado no estudo de Van Essen et al. (2016), os quais utilizaram a ME de escama de tilápia em estudo “in vitro” e “in vivo” e estes demonstraram que o material facilitou a adequada proliferação e adesão epitelial, sem imunogenicidade e podendo ser implantada na córnea de coelhos.

Existem várias estratégias que podem ser utilizadas para lisar a célula e remover o material celular de um tecido, entre elas podemos citar os métodos físicos, químicos e biológicos (Gilbert et al. 2006, Lynch & Ahearne 2013). Segundo Saghizadeh et al. (2013), entre os métodos químicos, pode-se utilizar o hidróxido de sódio (NaOH), que tem como vantagens a sua velocidade e eficiência. Estes autores realizaram um estudo comparativo sobre a eficiência da descélularização da membrana amniótica humana com soluções de etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e NaOH e os mesmos concluíram que o NaOH apresentou melhores resultados, realizando a remoção das células sem causar lesões na estrutura das membranas. Por conseguinte, na pesquisa realizada por Leite (2015), que utilizou a solução de NaOH (0,5 M), esta concluiu que foi possível retirar uma grande parte das células da córnea de suíno, preservando a ME. Corroborando com estes autores, no presente estudo utilizou-se o NaOH (0,5 M) para descélularização da córnea de tilápia e os mesmos resultados foram obtidos, visto que foi possível retirar uma grande parte das células da córnea, com preservação da ME e produção da mesma em curto espaço de tempo (16 minutos) e com baixo custo.

Condizendo com o presente estudo, outros métodos de descélularização foram aplicados com sucesso, de acordo com as pesquisas de Sasaki et al. (2009), Hashimoto et al. (2010) e Hashimoto et al. (2015), os quais aplicaram alta pressão hidrostática na MEC de suíno. No estudo realizado por Lin et al. (2019), foram comparados o uso de três ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido acético e ácido cítrico), e estes recomendaram o uso do ácido fórmico para descélularização da córnea suína, visto que o tratamento preservou a arquitetura e as biomoléculas da matriz, além da recelularização da matriz em estudos “in vitro” e “in vivo”. No estudo realizado por Du et al. (2011), estes utilizaram detergentes não-iônicos e detergentes zwitteriônicos na descélularização de córneas suínas e os mesmos concluíram que os protocolos utilizando o dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,5% ou 1% durante 24 horas foram utilizadas com sucesso para descélularização da córnea suína.

Além da descélularização, é preciso garantir a inocuidade do material, desta forma, a esterilização das matrizes biológicas é necessária antes da sua implantação em um organismo ou utilização “in vitro”, visando eliminar endotoxinas, vírus, bactérias e fungos que possam estar presentes (Capro et al. 2011). Desta forma, utilizou-se o iodopovidona na concentração de 10% durante dez minutos, baseado na pesquisa realizada por

Yoruek et al. (2012b), que esterilizaram as córneas de suíno utilizando a mesma solução e com resultados satisfatórios. No presente estudo, essa metodologia foi eficaz na esterilização da MECT, visto que não foram observados contaminantes para todas as matrizes avaliadas durante a pesquisa. Já na pesquisa realizada por Leite (2015), apenas uma única amostra teve resultado positivo para *Staphylococcus sp.*

Outro ponto que se deve dar a devida importância, consiste no meio para conservação das MECs. Esta pode ser realizada com glicerina a 98% e solução supersaturada de açúcar a 300%, os quais preservaram por um período de 30 dias (Gonçalves et al. 2003) e o Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) associado ao glicerol (1:1), que preservaram a MEC suína por um período de três meses (Leite 2015). Diferindo dos estudos citados anteriormente, optou-se pela utilização do DMEM, que é um meio de cultivo e conservação de células e tecidos, além disso, o mesmo contém em sua composição dois antibióticos (penicilina e estreptomicina) e um antifúngico (anfotericina B) (Lirá & Sá 2012) e pode ser associado a um agente crioprotetor como o glicerol, que atua reduzindo o estresse físico causado pelo congelamento e descongelamento do tecido (Lima 2011). O glicerol tem sido utilizado também para restaurar a transparência corneal através da desidratação (Pang et al. 2010, Shafik et al. 2012, Yoruek et al. 2012a, 2012b).

Existe uma variedade de métodos disponíveis para determinar a eficiência da descélularização (Gilbert et al. 2006, Lynch & Ahearne 2013). Dentre essas técnicas, podemos citar a extração e quantificação do DNA. No trabalho realizado por Yoruek et al. (2012b), estes utilizaram como protocolo para descélularização, EDTA, aprotinina e SDS. Neste estudo, o DNA das córneas suínas antes da descélularização estava em  $75,45 \pm 13,71$  ng/mg e depois do procedimento ficou em  $9,87 \pm 2,04$  ng/mg, indicando uma redução de mais de 80% do material genético. Já no estudo de Leite (2015), onde esta utilizou o NaOH (0,5 M) na córnea suína, o DNA antes da descélularização estava em média 140 ng/mg e depois do procedimento ficou em torno de 40 ng/mg, conseguindo uma redução de 71% do material genético.

Bayyoud et al. (2012), realizaram a descélularização da córnea bovina utilizando EDTA, aprotinina e SDS e observaram uma redução significativa do DNA antes da descélularização ( $365,3 \pm 88,6$  ng/mg), quando comparado com o DNA remanescente após o processo de descélularização ( $27,4 \pm 17,3$  ng/mg), indicando uma redução de 92% do material genético. No presente estudo, embora tenha ocorrido uma diferença estatística entre a córnea e a matriz descélularizada, pôde-se observar que ocorreu uma redução de 55% ao se comparar a córnea antes da descélularização ( $10,43 \pm 3,84$  ng/mg) e a córnea depois da descélularização ( $4,6 \pm 2,25$  ng/mg). Embora o processo de descélularização não tenha sido tão eficiente em relação as pesquisas de Bayyoud et al. (2012), Yoruek et al. (2012b) e Leite (2015), já que não houve uma redução tão significativa quando comparada a quantificação do DNA da córnea antes da descélularização e após o processo de descélularização, mesmo assim o presente estudo apresentou valores menores do DNA remanescente da MECT ao se comparar com o DNA remanescente da MEC dessas pesquisas.

Para que as MECs sejam aplicadas no tratamento das enfermidades corneais, devem-se realizar estudos "in vitro" para avaliação do repovoamento celular na matriz corneal. No estudo realizado por Yoruek et al. (2012a), foram implantadas células epiteliais, estromais e endoteliais de origem humana na matriz corneal suína e estes autores concluíram que a córnea descélularizada suína pode ser utilizada em transplantes corneais. Além desse trabalho, outras pesquisas foram desenvolvidas com a realização de cultivo celular em matriz corneal, podendo-se destacar a pesquisa de Bayyoud et al. (2012), onde foram realizados cultivo celular de células endoteliais na matriz corneal bovina, e as pesquisas de Pang et al. (2010), Du et al. (2011) e Ju et al. (2012), os quais realizaram cultivo de células corneais na MEC suína, podendo-se ressaltar que em todos esses trabalhos, ocorreram a

integração das células na matriz corneal. Du & Wu (2011) realizaram a semeadura de fibroblasto de coelho na MEC suína, e estes observaram de forma satisfatória a proliferação dos fibroblastos na matriz corneal. Em consonância com essas pesquisas, no presente estudo, pôde-se observar através de cortes histológicos corados em HE que as células MDBK, 3T3-L1 e fibroblasto bovino aderiram-se a MECT e formaram uma monocamada bem definida, desenvolvendo-se dentro dos padrões e sem efeito citotóxico da matriz para todos os tipos celulares cultivados e avaliados com 48 e 96 horas respectivamente, sugerindo desta forma que a MECT pode ser aplicada na ceratoplastia lamelar, através de estudos “in vivo”.

O transplante “in vivo” de córneas descelularizadas fornece informações valiosas sobre a biocompatibilidade e a integração da matriz. O transplante de córneas suínas descelularizadas demonstraram integração na córnea de coelho e sem rejeição clínica (Pang et al. 2010, Du & Wu 2011, Yoeruek et al. 2012b, Lin et al. 2019); além disso, após análise histológica, as células hospedeiras migraram para a região do implante e se infiltraram na matriz transplantada. As córneas suínas descelularizadas com alta pressão hidrostática e transplantadas “in vivo” na córnea de coelho provocaram pouca ou nenhuma resposta imune no hospedeiro (Sasaki et al. 2009, Hashimoto et al. 2015). Convergindo com esses estudos, demonstrou-se através da análise microscópica na coloração com o Tricrômio de Gomory que a MECT se integrou à córnea receptora em todos os animais do subgrupo CP 15, 30 e 60 dias respectivamente, com organização paralela entre as fibras de colágeno.

Na avaliação macroscópica dos olhos através do teste de fluoresceína, observaram-se que após sete dias de pós-operatório, todos os animais do grupo CT e em 78,5% (11/14) dos animais do grupo CP, a reepitelização corneal estava presente em toda a região. Estes dados corroboram com os estudos de Lin et al. (2019), os quais observaram que as células epiteliais tinham migrado para a região central com três dias e com sete dias, a área estava totalmente recoberta por células epiteliais e diferem do estudo realizado por Hashimoto et al. (2015), no qual a cicatrização epitelial da córnea foi totalmente concluída após três meses de PO. Tal diferença deve-se provavelmente pelo uso do colírio a base de betametasona (0,01 mg/mL) na pesquisa de Hashimoto et al. (2015). Na avaliação microscópica, a reepitelização corneal esteve presente em todos os animais dos subgrupos CT e CP.

Na avaliação macroscópica da opacidade corneal, esta esteve presente em todos os animais do grupo CT e em 92,8% (13/14) dos animais do grupo CP, tal fato deve ter ocorrido pela diferenciação dos ceratócitos em miofibroblastos. Os miofibroblastos são apontados como uma das causas de formação de opacidade (Mohan et al. 2003, Torricelli et al. 2016, Vargas et al. 2019), já que suas células são maiores e menos transparentes do que os ceratócitos, além disso, as mesmas produzem e secretam colágeno e glicosaminoglicanos de forma menos organizada (Jester et al. 1999, Torricelli et al. 2016, Marino et al. 2017; Vargas et al. 2019).

Em relação à vascularização corneal, na avaliação macroscópica, não foram observados a presença de vasos no grupo CT, sendo visibilizado um vaso na avaliação microscópica do subgrupo CT30. Já em relação ao grupo CP, foram visibilizados na avaliação macroscópica a presença de vasos em 92,8% dos animais até os 30 dias de PO e não foram observados vasos aos 60 dias de PO. Em relação a avaliação microscópica, observaram-se a presença de vasos em todos os animais do subgrupo CP15 e CP30, e não foram visibilizados a presença de vasos no subgrupo CP60. Acredita-se que a presença de vasos no grupo CP se deve provavelmente à presença da MECT, que provavelmente estimulou a neovascularização corneal. Sugere-se que em resposta ao processo inflamatório gerado pela presença da MECT, os ceratócitos, as células epiteliais e as células inflamatórias liberaram fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e as metaloproteinases, as quais estimularam a neovascularização corneal. Pode-se notar que na avaliação macroscópica e microscópica do subgrupo CP60, não foram observados a presença de vasos, tal fato deve-se

provavelmente pela produção dos fatores antiangiogênicos, tais como a angiostatina, a endostatina, o fator pigmentar derivado do epitélio (PEDF), o receptor solúvel VEGF-1 e o receptor ectópico VEGF-3 (VEGFR-3), os quais permitiram a regressão e o desaparecimento dos vasos na córnea (Chang et al. 2001, Clements & Dana 2011, Sharif & Sharif 2019).

Outro fato relevante em relação a vascularização corneal, é que no presente estudo, não foram utilizados colírios à base de corticóides. Acredita-se que o efeito antiangiogênico dos esteróides tópicos sejam resultantes de suas propriedades anti-inflamatórias, incluindo a inibição da quimiotaxia das células inflamatórias e a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Os esteróides também inibem diretamente a proliferação e migração de células endoteliais vasculares (Chang et al. 2001, Sharif & Sharif 2019).

A presença de abscesso em alguns pontos no local da sutura em animais do grupo CP com 15 dias (n=4) de pós-operatório deve-se provavelmente pela utilização do fio, que é a poliglactina. Por ser um fio multifilamentar, esta apresenta capilaridade, que por conseguinte pode ter carregado as bactérias para o interstício das fibras multifilamentadas (Macphail 2015). Após a retirada dos fios, os abscessos desapareceram.

## CONCLUSÃO

Esses resultados demonstram que a matriz extracelular corneal de tilápia pode ser utilizada na ceratoplastia lamelar em suínos, uma vez que permitiu o crescimento celular, sem gerar efeito citotóxico, atendendo aos critérios para servir como matriz extracelular no tratamento de lesões corneais.

## DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores não têm conflitos de interesse para declarar.

## REFERÊNCIAS

- Ahearne, M.; Wilson, S.L. Liu, K.; Rauz, S.; El Haj, A. J. & Yang Y. 2010. Influence of cell and collagen concentration on the cell-matrix mechanical relationship in a corneal stroma wound healing model. *Experimental Eye Research*. 91(5): 584-591.
- Andrade, A.L. & Laus, J.L. 1998. Enfermidades da córnea de pequenos animais. *Clínica Veterinária*. 12: 34-9.
- Andrades, M.G.; Argueso, P. & Gipson, I. 2019. Corneal Anatomy, p. 1-12. In: Barrio, J. L. A.; Arnalich-montiel, F. *Corneal regeneration: therapy and surgery*. Springer, Suíça.
- Bayyoud, T.; Thaler, S.; Hofmann, J.; Maurus, C. Spitzer, M. S.; Schmidt, K.U.B.; Szurman, P. & Yoeruek, E. 2012. Decellularized Bovine Corneal Posterior Lamellae as Carrier Matrix for Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. *Current Eye Research*. 37(3): 179-186.
- Braga, F.V.A. 2007. Uso de adesivo de cianoacrilato para a fixação de botão corneal autógeno ou alógeno conservado em glicerina a 98% na ceratoplastia penetrante em coelhos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 65p.
- Chang, J.; Gabison, E.E.; Kato, T. & Azar, D.T. 2001. Corneal neovascularization. *Current Opinion In Ophthalmology*. 12(4): 242-249.
- Clements, J.L. & Dana, R. 2011. Inflammatory Corneal Neovascularization: Etiopathogenesis. *Seminars In Ophthalmology*. 26(4): 235-245.

- Crapo, P.M.; Gilbert, T.W. & Badylak, S.F. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 32: 3233-3243.
- Du, L. & Wu, X. Development and Characterization of a Full-Thickness Acellular Porcine Cornea Matrix for Tissue Engineering. 2011. *Artificial Organs*. 35(7): 691-705.
- Du, L.; Wu, X.; Pang, K. & Yang, Y. 2011. Histological evaluation and biomechanical characterization of an acellular porcine cornea scaffold. *British Journal of Ophthalmology, BMJ*. 95(3): 410-414.
- Garagorri, N. Fermanian, S.; Thibault, R.; Ambrose, W.M.; Schein, O.D. & Chakravar, S. 2008. Keratocyte behavior in three-dimensional photopolymerizable poly(ethylene glycol) hydrogels. *Acta Biomaterialia*. 4(5): 1139-1147.
- Gelatt, K.N. & Brooks, D.E. 2011. Surgery of Cornea and Sclera, p. 192-231. In: Gelatt, K.N. & Gelatt, J.P. *Veterinary Ophthalmic Surgery*. 5<sup>a</sup> ed. Elsevier, Gainesville.
- Gilbert, T.W.; Sellaro, T.L.; Badylak, S.F. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 27: 3675-3683.
- Gonçalves, G.F.; Pippi, N.L.; Raiser, A.G.; Oliveira, S.T.; Graça, D.L.; Mazzanti, A. & Stedile, R. 2003. Ceratoplastia lamelar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina – Aspectos macroscópicos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*. 6(1): 31-37.
- Hashimoto, Y.; Funamoto, S.; Sasaki, S.; Negishi, J.; Honda, T.; Hattori, S.; Nam, K.; Kimura, T.; Mochizuki, M.; Kobayashi, K.H. & Kishida, A. 2015. Corneal Regeneration by Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) Using Decellularized Corneal Matrix. *Plos One*. 10(7): 1-10.
- Hashimoto, Y.; Funamoto, S.; Sasaki, S.; Negishi, J.; Honda, T.; Hattori, S.; Nam, K.; Kimura, T.; Mochizuki, M.; Kobayashi, K.H. & Kishida, A. 2010. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*. 31(14): 3941-3948.
- Ingram, J.H.; Korossis, S.; Howling, G.; Fisher, F. & Ingham, E. 2007. The Use of Ultrasonication to Aid Recellularization of Acellular Natural Tissue Scaffolds for Use in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Tissue Engineering*. 13(7): 1561-1572.
- Jester, J.V.; Huang, J.; Petroll, W. M. & Cavanagh, H. D. 2002. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res*. 75(6): 645-57.
- Jester, J.V.; Moller-Pedersen, T.; Huang, J.; Sax, C. M.; Kays, W. T.; Cavanagh, H. D.; Petroll, W. M. & Piatigorsky, J. 1999. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci*. 112(5): 613-22.
- Ju, C.; Gao, L.; Wu, X. & Pang, K. 2012. A human corneal endothelium equivalent constructed with acellular porcine corneal matrix. *Indian Journal of Medical Research*. 135(6): 887-894.
- Keane, T.J.; Saldin, L.T. & Badylak, S.F. 2016. Decellularization of mammalian tissues. Characterization and Design of Tissue Scaffolds. 106(4): 75-103.
- Kim, S.; Kwak, J.Y.; Jeong, M. & Seo, K. 2016. Deep anterior lamellar keratoplasty of dog eyes using the big-bubble technique. *Journal Of Veterinary Science*. 17(3): 347-352.
- Leite, A.G.B. 2015. Utilização de matriz corneal suína descelularizada em ceratoplastias. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 36p.
- Li, F.; Griffith, M.; Li, Z.; Tanodekaew, S.; Sheardown, H.; Hakim, M. & Carlsson, D.J. 2005. Recruitment of multiple cell lines by collagen-synthetic copolymer matrices in corneal regeneration. *Biomaterials*. 26(16): 3093-3104.
- Lima, D.T. Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas. 2011. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 120p.
- Lin, H.; Wang, T.; Li, T.; Chang, Y.; Sheu, M.; Huang, Y. & Liu, D. 2019. Development of Decellularized Cornea by Organic Acid Treatment for Corneal Regeneration. *Tissue Engineering Part A*. 25(8): 652-662.

- Lira F. & Sá F.B. 2012. Uso do meio Roswell Park Memorial Institute como conservante de córneas de camundongos Swiss. *Revista Medicina Veterinária*. 6(2): 18-25.
- Lynch, A.P. & Ahearne, M. 2013. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Experimental Eye Research*. 108:42-47.
- Macphail, C.M. 2015. Instrumentação Cirúrgica, p. 64-77. In: Fossum, T.W. *Cirurgia de pequenos animais*. 4<sup>a</sup> ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Maltseva, O.; Folger, P.; Zekaria, D.; Petridou, S. & Masue, S. K. 2001. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42(11): 2490-2495.
- Marino, G.K.; Santhiago, M.R.; Santhanam, A.; Dibbin, L.L.; Thangavadivel, S.; Medeiros, C.S.; Bose, K.; Tam, K.P. & Wilson, S.E. 2017. Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits. *Experimental Eye Research*. 161: 101-105.
- Masur, S.K.; Dewalt, H.S.; Dinht, T.T.; Erenburgt, I. & Petridout, S. 1996. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(9): 4219-4223.
- Menko, A.S.; Walker, J.L. & Stepp, M.A. 2019. Fibrosis: Shared Lessons From the Lens and Cornea. *The Anatomical Record*. 10: 1-14.
- Mimura, T.; Amano, S.; Yokoo, S.; Uchida, S.; Yamagami, S.; Usui, T.; Kimura, Y. & Tabata, Y. 2008. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Molecular Vision*. 143: 1819-1828.
- Mimura, T.; Yamagami, S.; Yokoo, S.; Usui, T.; Tanaka, K.; Hattori, S.; Irie, S.; Miyata, K.; Araie, M. & Amano, S. 2004. Cultured Human Corneal Endothelial Cell Transplantation with a Collagen Sheet in a Rabbit Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 45(9): 2992-2997.
- Mohan R. R.; Hutcheon A. E.; Choi R.; Hong J.; Lee J.; Mohan R. R.; Ambrósio Jr, R.; Zieske, J. D. & Wilson, S. E. 2003. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res*. 76(1): 71-87.
- Moller-Pedersen, T.; Cavanagh, H.D.; Petroll, W.M. & Jester, J.V. 1998. Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but not regression of photoablative effect following PRK. *Curr Eye Res*. 17(7): 736-747.
- Ott, H.C.; Matthiesen, T. S.; Goh, S.; Black, L.D.; Kren, S.M.; Netoff, T.N. & Taylor, D.A. 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*. 14(2): 213-221.
- Pang, K.; Du, L. & Wu, X. 2010. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials*. 31(28): 7257-7265.
- Power, W.J. & Neves, R.A. 2005. Anatomia e Fisiologia da Córnea, p. 3-15. In: Belfort Jr, R. & Kara-Jose, N. *Córnea Clínica Cirúrgica*. Roca, São Paulo.
- Saghizadeh M., Winkler M.A.; Kramerov A.A.; Hemmati D.M.; Ghiam C.A.; Dimitrijevič S.D.; Sareen D.; Ornelas L.; Ghiasi H.; Brunken W.J.; Maguen E.; Rabinowitz Y.S.; Svendsen C.N.; Jirsova K. & Ljubimov A.V. 2013. A simple alkaline method for decellularizing human amniotic membrane for cell culture. *PlosOne*. 8(11): 1-10.
- Sasaki, S.; Funamoto, S.; Hashimoto, Y.; Kimura, T.; Honda, T.; Hattori, S.; Kobayashi, H.; Kishida, A. & Mochizuki, M. 2009. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Molecular Vision*. 15(1): 2022-2028.
- Shafiq, M.A.; Gemeinhart, R.A.; Yue, B.Y. & Djalilian, A.R. 2012. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. *Tissue Engineering*. 18(5): 340-348.
- Sharif, Z. & Sharif, W. 2019. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. *Romanian Journal Of Ophthalmology*. 63(1): 15-22.

- Shimmura, S.; Miyashita, H.; Konomi, K.; Shinozaki, N.; Taguchi, T.; Kobayashi, H.; Shimazaki, J.; Tanaka, J. & Tsubota, K. 2005. Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hyroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *British Journal Of Ophthalmology*. 89(2): 134-137.
- Siqueira Filho, R.S. 2015. Efeito da clonidina e hialuronidase associada à lidocaína na anestesia peribulbar em cães submetidos à cirurgia de catarata. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52p.
- Slatter, D. 2005. Córnea e Esclera, p. 283-338. In: Slatter, D. *Fundamentos de Oftalmologia Veterinária*. 3ª ed. Roca, São Paulo.
- Torricelli, A.A.M.; Santhanam, A.; Wu, J. & Singh, V.A. 2016. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Experimental Eye Research*. 142: 110-118.
- Turner, S. M. 2010. Córnea, p. 121-124. In: TURNER, S. M. *Oftalmologia em Pequenos Animais*. 1ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Van Essen, T.H.; Van Zijl, L.; Possemiers, T.; Mulder, A.A.; Zwart, S.J.; Chou, C.H.; Lin, C.C.; Lai, H.J.; Luyten, G.P.M.; Tassignon, M.J.; Zakaria, N.; El Ghalbzouri, A. & Jager, M.J. 2016. Biocompatibility of a fish scale-derived artificial cornea: Cytotoxicity, cellular adhesion and phenotype, and in vivo immunogenicity. *Biomaterials*. 81: 36-45.
- Vargas, V.; Arnalich-Montiel, F. & Barrio, J. L. A. 2019. Corneal Healing, p. 13-22. In: Barrio, J. L. A. & Arnalich-Montiel, F. *Corneal regeneration: therapy and surgery*. 1ª ed. Springer, Suíça.
- Vidal, L.V.O.; Albinati, R.C.B.; Albinati, A.C.L.; Lira, A.D.; Almeida, T.R. & Santos, G.B. 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(8), p.1069-1074.
- Wilshaw, S.; Kearney, J. N.; Fisher, J. & Ingram, E. 2006. Production of an Acellular Amniotic Membrane Matrix for Use in Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. 12(8): 2117-2129.
- Yoeruek E.; Bayyoud T.; Maurus C.; Hofmann J.; Spitzer M. S.; Bartz-Schmidt K. U. & Szurman P. 2012b Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. *Acta Ophthalmologica*. 90(3): 206-210.
- Yoeruek, E.; Bayyoud, T.; Maurus, C.; Hofmann, J.; Spitzer, M. S.; Bartz-Schmidt, K. & Szurman, P. 2012a Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta Ophthalmologica*. 90(2): 125-131.

ARTIGO 2: UTILIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR CORNEAL DE TILÁPIA NO  
TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS ÚLCERAS CORNEAIS EM CANINOS E  
SEQUESTRO CORNEAL EM FELINO

O artigo será submetido à Revista Ciência Rural (Anexo 2)

**Utilização da matriz extracelular corneal de tilápia no tratamento cirúrgico das úlceras corneais em caninos e sequestro corneal em felino**

**Corneal extracellular matrix of tilapia in surgical treatment of corneal ulcers in two dogs and in a cat with corneal sequestrum**

**Robério Silveira de Siqueira Filho<sup>1</sup>; Rômulo Nunes da Rocha<sup>1</sup>; Bruno Daby Figuerêdo de Souza<sup>1</sup>; Stéphanie Ingrand Vieira de Araújo<sup>1</sup>; Taciana Spinelli<sup>1</sup>; Fabrício Bezerra de Sá<sup>12</sup>**

**RESUMO**

Objetivou-se utilizar a matriz extracelular corneal de tilápia (MECT) no reparo de afecções corneais em dois cães com úlceras profundas e um gato com sequestro corneal. Para aplicação das MECTs, as córneas foram descelularizadas utilizando o hidróxido de sódio (0,5 M) e conservadas em solução de DMEN associada ao glicerol sob temperatura de - 20 °C. O canino 1 foi um animal da raça shih tzu, que apresentava descemetocel, já o canino 2 se tratava de um animal sem raça definida, que apresentava úlcera profunda não responsiva ao tratamento clínico e o felino foi acometido pelo sequestro corneal. Após a ceratectomia, a MECT foi suturada na córnea receptora utilizando poliglactina nº 8-0 no canino 1 e felino e mononylon nº 10-0 no canino 2. O tratamento prescrito no pós-operatório (PO) consistiu no uso de antibiótico e cicloplégico tópico e anti-inflamatório sistêmico. Com 30 dias de PO, utilizou-se o corticóide tópico. Na avaliação do PO com sete dias, a reepitelização esteve presente em todos os animais e com 60 dias de PO as córneas apresentaram-se translúcidas nos três pacientes. No canino 1 observou-se a presença de pigmentação em faixa e na área da ceratoplastia, enquanto que no canino 2 e felino, visualizou-se a presença de uma nébula na área do enxerto. Desta forma, a MECT oferece uma opção promissora para a reconstrução cirúrgica da córnea no tratamento de úlceras e sequestro corneal.

**Palavras-chave:** ceratoplastia, córnea, enxerto, heterólogo.

**ABSTRACT**

The objective of this study was to use corneal extracellular matrix of tilapias (TECM) as grafts to repair deep corneal ulcers in two dog and in a cat with corneal sequestrum. To develop

---

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

TECM, corneas were decellularized with sodium hydroxide (0.5 M) and preserved in DMEM with glycerol solution at - 20 °C. Case 1 was a shih-tzu dog presented with descemetocoele; the second described herein was a case of a mongrel dog presented with history of stromal ulcer non responsive to clinical treatment. Case 3 was a cat presented with corneal sequestrum. After keratectomy TECM graft was sutured in the recipient cornea of case 1 with 8-0 polyglactin and in case 2 and case 3 with mononylon 10-0. Postoperative treatment (PO) included topical antibiotic, topical cycloplegic and systemic anti-inflammatory. 30 days after surgery topical corticosteroid was introduced. At day 7 PO reepithelization was present in all animals and at day 60 all animals presented corneal transparency. Band pigmentation was present where keratoplasty was performed in case 1. Corneal nebula was present at graft surfaces in cases 2 and 3. Thus, TECM provides a promising option for corneal surgical reconstruction in the treatment of ulcers and corneal sequestrum.

**Keywords:** keratoplasty, cornea, graft, heterologous.

## INTRODUÇÃO

A ulceração da córnea é uma doença ocular comum e clinicamente importante em cães (WILKIE & WHITTAKER, 1997). Úlceras simples e não complicadas rapidamente reepitelizam e apenas a terapia médica resolve, que consiste no uso de antibióticos tópicos e cicloplégicos. Caso exista o risco de perfuração, a cirurgia é indicada para evitar a perda da visão que poderá ocorrer de forma associada a este evento (GELATT & BROOKS, 2011).

O sequestro da córnea é uma doença que se caracteriza pela necrose do estroma da córnea, levando a formação de uma pigmentação que pode variar de marrom a preto, sendo esta enfermidade mais comum nos felinos das raças persa e himalaia (TURNER, 2010; STILES, 2013). A doença é raramente descrita em caninos (BOUHANNA et al., 2008) e equinos (MCLELLAN & ARCHER, 2000). Nos felinos, esta enfermidade tem sido associada ao vírus do herpes felino tipo 1 (FHV-1), e também por irritação crônica causada por fatores físicos, como o entrópio e a distiquíase, que levam à úlceras corneais (ANDREW, 2001; FEATHERSTONE & SANSOM, 2004; WILLIAMS & KIM, 2009; BARACHETTI et al., 2010; LAGUNA et al., 2015). O debridamento do tecido necrótico da córnea através da ceratectomia facilita a resolução, no entanto, se a ceratectomia for profunda, poderá ser necessário a utilização do enxerto (GIMENEZ & FARINA, 1998; ANDREW et al., 2001; TOWNSEND et al., 2008; BARACHETTI et al., 2010; LAGUNA et al., 2014).

No caso de defeitos grandes e profundos da córnea, vários tratamentos cirúrgicos são utilizados para a reparação corneal de forma rápida e efetiva, incluindo o enxerto pediculado

de conjuntiva (SOONTORNVIPART et al., 2003), a transposição córnea-escleral (GRAHAM et al., 2019) e a ceratoplastia (LAGUNA et al., 2014; KIM et al., 2016).

As ceratoplastias lamelares anteriores surgiram como uma alternativa para evitar as complicações referentes a rejeição endotelial. Tecnicamente, elas são mais difíceis de serem realizadas em relação à penetrante, pois exigem maior habilidade do cirurgião e instrumental especializado, porém, melhores resultados pós-operatórios são alcançados (NITA et al., 2012; YOUNG et al., 2012; KEANE et al., 2014). A ceratoplastia lamelar anterior tem como principal vantagem a manutenção das camadas saudáveis da córnea, que são a membrana de Descemet e o endotélio, o que resulta na recuperação cirúrgica mais rápida, menor risco de rejeição, diminuição das complicações pós-cirúrgicas e uma estabilidade refracional mais precoce (YOUNG et al., 2012; KIM et al., 2016).

Para diminuir a chance de rejeição do enxerto heterólogo, lança-se mão da descelularização, este procedimento consiste na remoção eficiente de todo o material celular e nuclear do tecido, minimizando quaisquer efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica na matriz extracelular remanescente (GILBERT et al., 2006; KEANE et al., 2016).

Desta forma, objetivou-se utilizar a matriz extracelular corneal de tilápia no reparo de afecções corneais em cães com úlceras profundas e um gato com sequestro corneal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Após análise e emissão do parecer quanto aos aspectos éticos dos procedimentos científicos desenvolvidos, o presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), de acordo com o número da licença número 137/2018 (Anexo 3).

### **PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA MECT**

Logo após a captura dos peixes na base experimental de pesca da UFRPE, as tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram encaminhadas para o Laboratório de Oftalmologia Experimental (LOE) da mesma instituição, onde foram eutanasiadas utilizando-se eugenol na concentração de 286,55 mg/L durante 600 segundos (VIDAL et al., 2008). Após o procedimento de eutanásia, cada bulbo oftálmico foi avaliado, verificando a ausência de alterações e infecções, garantindo a higidez das córneas. Uma vez certificada a integridade dos olhos, as córneas foram coletadas pelo método de incisão “in situ” do disco corneal. As córneas foram lavadas em solução de ringer com lactato e esterilizadas por imersão em solução de iodopovidona a 10% durante 10

minutos e lavadas posteriormente através de três passagens em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4).

Em seguida, a descelularização foi realizada utilizando-se solução de hidróxido de sódio (0,5 molar), na qual as mesmas foram imersas por três minutos e ao serem retiradas da solução, foram friccionadas em ambas as faces (externa e interna), utilizando-se bastões envolvidos em algodão estéril e novamente lavadas por três vezes em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Após a descelularização, as córneas foram conservadas em meio Dulbecco's modified minimum essencial medium (DMEM) associado ao glicerol (1:1) sob temperatura de - 20 °C.

#### CASO CLÍNICO

Este estudo consistiu em ensaio clínico prospectivo, realizado no Hospital Veterinário (HOVET) da UFRPE, no período de junho a outubro de 2019. Todos os responsáveis concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice). Para a realização do presente estudo, foram utilizados dois cães com úlceras profundas e um gato com sequestro corneano, oriundos da rotina oftalmológica do HOVET/UFRPE.

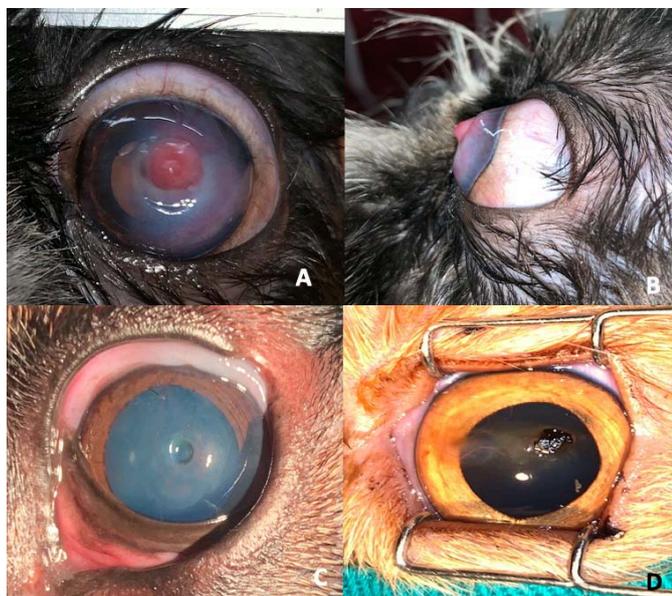
Após a realização do exame clínico, realizou-se a avaliação de ambos os olhos segundo a dinâmica do exame oftálmico. Os exames realizados foram: reflexo pupilar, oftalmoscopia direta e indireta e biomicroscopia do segmento anterior com lâmpada de fenda.

O canino 1 era um animal da raça shih-tzu, fêmea e com um ano de idade, no qual o tutor relatou que estava tratando a úlcera do animal há um mês, e o mesmo não apresentou melhora na evolução do quadro. Durante o exame oftálmico, observou-se uma úlcera na região paracentral da córnea no olho esquerdo com exposição da membrana de descemet (descemetocèle) (Figura 1A, B), com a presença de tecido de granulação na área e edema intenso ao redor da úlcera, com a presença de vasos no quadrante temporal superior.

Já o canino 2 consistiu em um animal sem raça definida, macho, com dois anos de idade, o mesmo foi atendido no serviço de oftalmologia do HOVET/UFRPE, e segundo o tutor, o paciente estava sendo tratado com tobramicina (Tobramicina; Neo Química, São Paulo, Brasil) e tropicamida (Mydriacyl®; Alcon, São Paulo, Brasil) durante 21 dias. Durante avaliação oftálmica, constatou-se a presença de uma úlcera profunda em região central no olho esquerdo (Figura 1C), com a presença de neovascularização no quadrante temporal superior e nasal superior.

O felino era um gato da raça persa, fêmea e com três anos de idade, que segundo relatou o tutor, o animal apresentava uma lesão enegrecida na córnea há um mês. Durante o exame

oftálmico observou-se que o paciente apresentava desconforto, demonstrando dor e notou-se que o mesmo apresentava o sequestro corneal (Figura 1D) em região paracentral no olho esquerdo, com a presença de vasos nos quadrantes nasal superior e inferior.



**Figura 1** - Lesões corneais. A. Vista frontal do animal 1 com presença de vasos e tecido de granulação. B. Vista lateral do animal 1 evidenciando-se a descemetocel. C. Vista frontal do animal 2 com úlcera profunda e presença de vasos. D. Vista frontal do felino com sequestro corneano e presença de vasos.

#### PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à jejum alimentar de dez horas e hídrico de quatro horas. Para realização da anestesia nos caninos, foi instituída como medicação pré-anestésica (MPA), uma associação de Midazolam na dose de 1 mg/kg (Midazolam; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil) e Cloridrato de Tramadol na dose de 4 mg/kg (Tramadol; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil), administradas pela via intramuscular (IM) e no felino foram utilizados na MPA uma associação de Ketamina (Cetamin; Syntec, São Paulo, Brazil) na dose de 10 mg/kg e Midazolam (Midazolam; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil) na dose de 1 mg/kg pela via IM. Após a observação da sedação, instilou-se uma gota do colírio anestésico à base de proximetacaína (Anestalcon<sup>®</sup>; Alcon, São Paulo, Brasil) no olho esquerdo e realizou-se o bloqueio peribulbar associando 1 mL de lidocaína a 2% (Lidocaína; Hipolabor, Minas Gerais, Brasil) e hialuronidase (25 UTR/mL) de acordo com a técnica descrita por SIQUEIRA FILHO (2015). O acesso venoso foi realizado através da veia cefálica, e a indução foi realizada com Propofol (Propovan<sup>®</sup>; Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 4 mg/kg pela

via endovenosa e manutenção em plano anestésico com isoflurano (Isoflurano; Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil) vaporizado com oxigênio em sistema semiaberto.

Em seguida, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico no globo ocular do lado esquerdo, realizado com auxílio de microscópio cirúrgico e previamente ao procedimento cirúrgico, foi realizada a antissepsia com iodopovidona a 10% na região periocular e com solução de iodopovidona 1:50 no globo ocular.

Após os procedimentos de antissepsia e delimitação do campo operatório, foi realizada a blefarostase com o uso de afastador oftálmico. Nos caninos, realizou-se incisão cirúrgica circular com o auxílio de um “punch” de 5 mm, e em seguida, com o auxílio da tesoura de Castroviejo e lâmina nº 15, realizou-se a ceratectomia para retirada do tecido necrosado. No canino 1, removeu-se também o tecido de granulação que se encontrava na região ulcerada. Posteriormente, realizou-se incisão circular na matriz extracelular corneal de tilápia (MECT) através da utilização de punch de 6 mm, e o mesmo foi fixado na córnea receptora através de pontos cardinais utilizando-se o padrão de sutura isolado simples. No canino 1 utilizou-se a poliglactina nº 8-0 e no canino 2 foi empregado o mononylon nº 10-0.

Já no felino, com vistas a obtenção de um botão lamelar, realizou-se a incisão cirúrgica circular na região com o sequestro corneal, utilizando um punch de 5 mm. Desta forma permitiu-se delimitar o botão constituído de epitélio e aproximadamente 2/3 do estroma, o qual foi delaminado com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº15. Ato contínuo, realizou-se a colocação do botão doador descelularizado de 6 mm na córnea receptora, e esta foi fixada nos pontos cardinais utilizando o padrão de sutura isolado simples com poliglactina nº 8-0.

Como terapia analgésica, o meloxicam (Maxicam 2%; Ourofino, São Paulo, Brasil) foi aplicado na dose de 0,2 mg/kg por via IM no pós-operatório (PO) imediato e foi prescrito para administração por via oral na dose de 0,1 mg/kg nos três dias subsequentes à cirurgia. Como medida profilática à infecção e ao espasmo ciliar, foram instilados tobramicina 3mg/mL (Tobramicina; Neo Química, São Paulo, Brasil) colírio a cada seis horas durante três dias e posteriormente a cada 8 horas e tropicamida 10 mg/mL (Mydriacyl®; Alcon, São Paulo, Brasil) colírio a cada oito horas, ambos durante 30 dias. Após 30 dias de PO, instilou-se dexametasona 1 mg/mL (Maxidex®; Alcon, São Paulo, Brasil) a cada 12 horas durante 30 dias. Os tutores foram recomendados para manter o colar protetor nos animais durante todo o período de avaliação do PO.

Com auxílio do oftalmoscópio direto e indireto, o protocolo de avaliação oftalmológica consistiu na realização do teste de fluoresceína semanalmente até a ausência de coloração, observando-se a presença da reepitelização corneana. Também foram observadas: reflexo

pupilar, opacidade, neovascularização, biomicroscopia do segmento anterior com lâmpada de fenda portátil e também as reações de fotofobia, blefarospasmo e uveíte, caso estes apresentassem.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do presente estudo pôde-se demonstrar que o manejo cirúrgico utilizando a MECT no tratamento do sequestro corneal e úlceras corneanas complicadas foram bastante eficientes, visto que a MECT se integrou à córnea receptora, alcançando bons resultados anatômicos e visuais, sem complicações nos animais.

Na ceratoplastia lamelar anterior, além da córnea homóloga e heteróloga (LAGUNA et al., 2014; LEITE, 2015; KIM et al., 2016; LACERDA et al., 2016), outros materiais podem ser utilizados no reparo de defeitos e perfurações profundas da córnea, incluindo pericárdio (BARROS et al., 1995; DULAURENT et al., 2013), submucosa intestinal suína (SIS) (FEATHERSTONE & SANSOM; HEINRICH, 2001; GOULLE, 2012), submucosa da vesícula urinária suína (UBM) (CHOW & WESTERMEYER, 2015), membrana amniótica (COSTA et al., 2019), peritônio (GARCIA et al., 1996), mucosa oral (DAMASCENO et al., 2004), túnica vaginal (GALERA et al., 2000; VICENTI et al., 2002), escama de sardinha (LAUS et al., 2000), cápsula esplênica (EURIDES et al., 2006) e cápsula renal (ANDRADE et al., 1999).

Desta forma, optou-se pela utilização da córnea descelularizada de tilápia, visto que as tilápias são facilmente encontradas em criatórios e estas espécies são as mais procuradas para criação em escala industrial, por apresentar rápido crescimento, grande rusticidade, fácil manejo e alto nível de rendimento. Também optou-se por esse material baseado no estudo de VAN ESSEN et al. (2016), os quais utilizaram a escama de tilápia descelularizada em estudo “in vitro” e “in vivo” e estes demonstraram que o material facilitou a adequada proliferação e adesão epitelial, sem imunogenicidade e podendo ser implantada na córnea de coelhos.

Embora as camadas profundas da córnea estivessem comprometidas nos caninos e no felino, optou-se pela realização da ceratoplastia lamelar anterior em vez da ceratoplastia penetrante, visto que a membrana de descemet e o endotélio encontravam-se intactos. Desta forma, realizou-se a ceratoplastia lamelar anterior baseado nos estudos de NITA et al. (2012), YOUNG et al. (2012) e KEANE et al. (2014), os quais citam que esta técnica surgiu como uma alternativa para evitar as complicações referentes à rejeição endotelial, mantendo as camadas saudáveis da

córnea, o que resulta na recuperação cirúrgica mais rápida, menor risco de rejeição, diminuição das complicações pós-cirúrgicas e uma estabilidade refracional mais precoce.

Dentre os dois cães tratados utilizando a MECT no tratamento de úlceras corneais profundas, um dos cães era da raça Shih Tzu e o outro era SRD. Na pesquisa de LACERDA et al. (2016), onde o mesmo utilizou o enxerto corneal no tratamento de afecções corneais em 50 cães, 74% (37/50) dos animais eram braquiocefálicos. Esses dados corroboram com os estudos de CHOW & WESTERMEYER (2015) e COSTA et al. (2019), os quais demonstraram que 64,8% (24/37) e 66,6% (74/111) respectivamente, dos cães acometidos com afecções corneais, eram cães braquiocefálicos. Já em relação ao felino com sequestro corneal, trata-se de um animal da raça persa, sendo este dado condizente com os estudos de FEATHERSTONE & SANSOM (2004), LAGUNA et al. (2014), GRAHAM et al. (2016) e PUMPHREY et al. (2019), os quais observaram que em 60,9% (39/64), 92% (12/13), 66,9% (73/109) e 56,2% (9/16) respectivamente, dos felinos acometidos pelo sequestro corneal, tratavam-se de felinos braquiocefálicos.

Após sete dias de PO, a reepitelização corneal esteve presente nos três animais, visto que todos os olhos foram negativos no teste de fluoresceína. Estes dados corroboram com os estudos de LIN et al. (2019), os quais observaram que as células epiteliais tinham migrado para a região central com três dias e com sete dias, a área estava totalmente recoberta por células epiteliais e diferem do estudo realizado por HASHIMOTO et al. (2015), no qual a cicatrização epitelial da córnea foi totalmente concluída após três meses de PO. Tal diferença deve-se provavelmente pelo uso do colírio a base de betametasona (0,01 mg/mL) na pesquisa de HASHIMOTO et al. (2015), a qual retarda a cicatrização.

Na avaliação com uma semana de PO, observaram-se nos cães a presença de tecido de granulação na área do enxerto, onde no canino 1 o tecido de granulação recobriu todo o enxerto (Figura 2A) e no canino 2 e no felino o tecido de granulação recobriu 75% do enxerto. Nos caninos também foram observados a presença de edema corneal difuso, com a presença de novos vasos no quadrante superior nasal do animal 2 e com a mesma quantidade dos vasos remanescentes que foram observados no canino 1 no dia do procedimento cirúrgico. No animal 2 observou-se sinais de desconforto por apresentar blefaroespasmos, este fato deve-se provavelmente pela presença do enxerto, visto que o animal não apresentava sinais de uveíte e conjuntivite. No felino não foi evidenciado o edema corneal, e observou-se a presença de um novo vaso no quadrante superior.

Na avaliação de 15 dias de PO, a neovascularização, edema e tecido de granulação permaneceu da mesma forma ao se comparar com sete dias de PO, porém o desconforto ocular estava ausente em todos os animais.

Com 30 dias de PO, o tecido de granulação regrediu nos caninos e no felino, permanecendo a fibrose e a mesma quantidade de vasos foram observadas quando comparadas com as avaliações anteriores. O edema corneal regrediu bastante em comparação com as avaliações anteriores.

Dois meses após a cirurgia, as córneas apresentaram-se translúcidas nos caninos e no felino. No canino 1 observou-se a presença de pigmentação em faixa e na área da ceratoplastia (Figura 2B), com ausência de vasos e sem edema corneal. Já no canino 2 (Figura 2C), visualizou-se a presença de uma nébula na área do enxerto, com a presença de vasos atenuados no quadrante superior e sem edema corneal. Em relação ao felino (Figura 2D), observou-se a presença de uma nébula na área do enxerto, com a presença de vasos atenuados no quadrante nasal e sem edema de córnea.



**Figura 2** - Avaliação do pós-operatório (PO). A. Presença de edema, vasos e tecido de granulação recobrimdo todo o enxerto no canino 1 com sete dias de PO. B. Presença de melanose na área do enxerto no canino 1 com 60 dias de PO. C. Presença de nébula na área do enxerto e vasos atenuados no canino 2 com 60 dias de PO. D. Presença de nébula na área do enxerto e vaso atenuado no quadrante nasal do felino com 60 dias de PO.

Em relação a ausência de vasos no canino 1 e diminuição com atenuação dos vasos no canino 2 e no felino, deve-se provavelmente ao uso do colírio a base de dexametasona após 30 dias de PO. Acredita-se que o efeito antiangiogênico dos esteróides tópicos sejam os resultados de suas propriedades anti-inflamatórias, incluindo a inibição da quimiotaxia das células inflamatórias e a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Os esteróides também inibem diretamente a proliferação e migração de células endoteliais vasculares (CHANG et al., 2001; SHARIF; SHARIF, 2019).

No estudo de GOULLE (2012), o qual utilizou a submucosa intestinal suína (SIS) no tratamento de enfermidades corneais em caninos e felinos, realizou-se o tratamento com corticosteróide tópico após 21 dias de PO, e o mesmo observou a presença de vasos de forma atenuada em 47,2% dos pacientes após três meses de cirurgia. FEATHERSTONE et al. (2001) também observaram a presença de vasos na córnea dos felinos tratados com SIS.

A presença de vasos também foi evidenciada no estudo de DULAURENT et al. (2014), que utilizaram o pericárdio bovino (Tutopach<sup>®</sup>), CHOW & WESTERMEYER (2015), que utilizaram a submucosa da vesícula urinária suína (ACell Vet<sup>™</sup>), COSTA et al. (2019), que utilizaram a membrana amniótica e LACERDA et al. (2016), que utilizaram a córnea homóloga e heteróloga. Já nos estudos de KIM et al. (2016), que utilizou a córnea autóloga e HASHIMOTO et al. (2015), que utilizaram a matriz extracelular corneal suína, ambos não observaram a presença de vasos no PO, a ausência de vasos nesses estudos deve-se provavelmente pela utilização de colírios à base de corticóide ou agente imunossupressor logo após o procedimento cirúrgico.

No presente estudo não ocorreu a rejeição da MECT na córnea, já que a matriz integrou-se a córnea receptora em todos os animais, este fato também foi descrito por VANORE et al. (2007) que aplicou a SIS em sete olhos (dois gatos e cinco cães) com úlcera em melting e a visão foi preservada em todos os animais. Já FEATHERSTONE et al. (2001), que utilizou a SIS em dez felinos com enfermidades corneais, necessitaram realizar a enucleação em um caso pela extensão da ceratomalácia, no entanto, todos os animais obtiveram êxito utilizando a SIS no tratamento do sequestro corneal. Em outro estudo conduzido por CHOW & WESTEMEYER (2015), dois olhos desenvolveram “phthisis bulbi” e dois olhos foram enucleados.

No estudo retrospectivo de 106 olhos tratados com SIS, GOULLE (2012) demonstrou que a visão foi preservada em todos os animais com três meses de PO e em 69,8% (74/106) dos casos a córnea apresentou-se transparente ou com uma cicatriz mínima, enquanto em 30,2% (32/106), uma cicatriz mais extensa foi observada. Esses dados corroboram com o presente

estudo, já que a visão foi preservada em todos os animais, ocorrendo a formação de uma cicatriz mínima, caracterizada como uma nébula no canino 2 e no felino. No estudo de CHOW & WESTERMEYER (2015), 87% (59/68) dos animais apresentaram uma cicatriz entre leve e moderada, enquanto 13% (9/68) apresentaram a cicatriz mais extensa, comprometendo a visão. COSTA et al. (2019), observaram a presença de opacidade quantificada entre leve e moderada em 88,5% (100/113) e opacidade severa em 11,5% (13/113) dos olhos operados.

No animal 1, que se trata de um canino braquiocefálico, obsevou-se a presença de uma pigmentação leve, sem prejuízo da visão, na área da ceratoplastia, e também uma ceratite pigmentar em faixa na região central da córnea. Nos estudos de GOULLE (2012) e CHOW & WESTERMEYER (2015), as raças braquiocefálicas foram as que apresentaram a pigmentação em córnea. Nessas raças, a síndrome da ceratite pigmentar é um dos distúrbios nos quais ocorre a pigmentação da córnea, pois a exposição crônica (por causa dos olhos proeminentes com grandes fissuras palpebrais, também conhecidas como euribléfaro) causa irritação crônica da córnea, resultando em pigmentação da córnea, devido à migração de células melanocíticas dos tecidos limbais e perilimbais. O pigmento de melanina dentro das células epiteliais, macrófagos e ceratócitos também pode se desenvolver (LEDBETTER & GILGER, 2013).

Uma pigmentação leve também foi observada após o procedimento em 22,6% (24/106) dos casos e em cinco casos, os cães ficaram com deficiência visual devido à acentuada pigmentação da córnea (GOULLE, 2012). COSTA et al. (2019), observaram a pigmentação em 8,8% (10/114) dos cães e CHOW & WESTERMEYER (2015) perceberam a pigmentação em 13% (9/68) dos animais. HANSEN & GUANDALINI (1999), que realizaram a ceratoplastia lamelar utilizando a córnea homóloga, e GOULLE (2012), notaram que alguns desses casos apresentavam pigmentação da córnea antes da cirurgia, este fato também foi observado no canino 1.

A presença de pigmentação não foram observadas nos felinos no estudo de GOULLE (2012) e DULAREUNT et al. (2013), esses dados se assemelham ao presente estudo, já que não foram observados a presença de pigmentação no felino, no entanto, CHOW & WESTERMEYER (2015) observaram a pigmentação corneal em um (1/38) felino e LAGUNA et al. (2014) notaram a pigmentação em 11% (2/18) dos olhos operados.

De forma oposta a ceratoplastia lamelar homóloga, que é uma prática pouco utilizada na medicina veterinária, o enxerto de matriz corneal descelularizada heteróloga vem ganhando espaço devido aos seus bons resultados, como o trabalho de YORUEK et al. (2012) e HASHIMOTO et al. (2015), que enxertaram a matriz descelularizada de córnea suína em coelhos e observaram que o material se integrou a córnea receptora, com manutenção da

transparência corneal. No estudo de LEITE (2015), que realizou a ceratoplastia lamelar utilizando a matriz extracelular corneal suína em canino com neoplasia corneal, a mesma apresentou-se transparente em seis semanas de PO. O mesmo resultado foi verificado no estudo em questão, pelo qual notou-se a transparência da córnea em oito semanas de PO.

## CONCLUSÃO

Embora tenha sido observado um pequeno número de casos nesse estudo, pode-se inferir a partir dos resultados obtidos que a realização da ceratoplastia lamelar utilizando a matriz extracelular corneal de tilápia foi eficaz no tratamento do sequestro corneal em felino e úlceras complicadas em caninos, visto que o mesmo proporcionou um excelente suporte tectônico, com resultado visual e estético bastante satisfatório.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.L. et al. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.2, n.2, p. 79-82, 1999. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.1999.00052.x>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1046/j.1463-5224.1999.00052.x.

ANDREW, S.E. Ocular manifestations of feline herpesvirus. **Journal of Feline Medicine And Surgery**, v.3, n.1, p.9-16, 2001. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1053/jfms.2001.0110>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1053/jfms.2001.0110.

ANDREW, S.E. et al. Corneoconjunctival transposition for the treatment of feline corneal sequestra: a retrospective study of 17 cases (1990-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v.4, n. 2, p.107-111, 2001. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.2001.00181.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1046/j.1463-5224.2001.00181.x.

BARACHETTI, L. et al. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.5, p.326-330, 2010. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2010.00821.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1111/j.1463-5224.2010.00821.

BARROS, P.S.M. et al. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprosthesis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 32, n. 4, p. 251-255, 1995. Available from: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/52119/56169>>. Accessed: Nov. 02, 2019.

BOUHANNA, L. et al. Corneal stromal sequestration in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.4, p.211-214, 2008. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00627.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1111/j.1463-5224.2008.00627.x.

CHOW, D.W.Y.; WESTERMEYER, H.D. Retrospective evaluation of corneal reconstruction using ACell Vet™ alone in dogs and cats: 82 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v.19, n.5, p.357-366, 2015. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vop.12294>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1111/vop.12294.

CHANG, J. et al. Corneal neovascularization. **Current Opinion in Ophthalmology**, v.12, n.4, p.242-249, 2001. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1097/00055735-200108000-00002>>. Accessed: Dez. 02, 2019. doi: 10.1097/00055735-200108000-00002.

COSTA, D. et al. A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.22, n.5, p.695-702, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vop.12643>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1111/vop.12643.

DULAURENT, T. et al. Use of bovine pericardium (Tutopatch®) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. **Veterinary Ophthalmology**, v.17, n.2, p.91-99, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vop.12047>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1111/vop.12047.

DAMASCENO, A.D. et al. Estudo clínico e histológico da mucosa oral autógeno na ceratoplastia lamelar experimental. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 2, p.117-124, 2004. Available from: <[https://www.researchgate.net/publication/277754903\\_Estudo\\_clinico\\_e\\_histologico\\_da\\_mucosa\\_oral\\_autogena\\_na\\_ceratoplastia\\_lamelar\\_experimental](https://www.researchgate.net/publication/277754903_Estudo_clinico_e_histologico_da_mucosa_oral_autogena_na_ceratoplastia_lamelar_experimental)>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.5433/1679-0359.2004v25n2p117

EURIDES, D. et al. The use of bovine esplanic capsule in lamellar keratoplasty with rabbits. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** Unipar, Umuarama, v. 9, n. 2, p. 117-121, 2006. Available from: <<https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/13471/5/Artigo%20-%20Duvaldo%20Eurides%20-%202006.pdf>>. Accessed: Nov. 02, 2019.

FEATHERSTONE, H. J.; SANSOM, J. Feline corneal sequestra: a review of 64 cases (80 eyes) from 1993 to 2000. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n.4, p.213-227, 2004. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2004.04028.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1111/j.1463-5224.2004.04028.x.

FEATHERSTONE, H. J.; SANSOM, J.; HEINRICH, C. L. The use of porcine small intestinal submucosa in ten cases of feline corneal disease. **Veterinary Ophthalmology**, v.4, n.2, p.147-153, 2001. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.2001.00192.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1046/j.1463-5224.2001.00192.x.

GALERA, P.D.; LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L. Use of fresh autogenous vaginal tunic in the experimental lamellar keratoplasty in dogs (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.37, n.6, p.1-10, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-95962000000600010>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1590/s1413-95962000000600010.

GELATT, K. N.; BROOKS, D. E. Surgery of Cornea and Sclera. In: GELATT, K. N.; GELATT, J. **Veterinary Ophthalmic Surgery**. Gainesville: Elsevier, 2011. Cap. 8. p. 192-231.

GILBERT, T. et al. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, p.3675-3683, 2006. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>>. Accessed: Out. 10, 2019. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.

GIMENEZ, M.T.P.P.; FARINA, I.M. Lamellar keratoplasty for the treatment of feline corneal sequestrum. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, n.2, p.163-166, 1998. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.1998.00031.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1046/j.1463-5224.1998.00031.x

GRAHAM, K.L. et al. Feline corneal sequestra: outcome of corneconjunctival transposition in 97 cats (109 eyes). **Journal Of Feline Medicine And Surgery**, v. 19, n.6, p.710-716, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1177/1098612x16645144>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1177/1098612x16645144.

GOULLE, F. Use of porcine small intestinal submucosa for corneal reconstruction in dogs and cats: 106 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, n.1, p.34-43, 2012. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01149.x>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01149.x.

GARCIA, J.A. et al. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 33, p.290-294, 1996. Available from: <<https://pdfs.semanticscholar.org/3ddb/3defab3c18413eb45d99c47058650864b13e.pdf>>. Accessed: Nov. 02, 2019.

HANSEN, P.A.; GUANDALINI, A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v.2, n.4, p.233-241, 1999. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.1999.00084.x>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1046/j.1463-5224.1999.00084.x.

KEANE, M. et al. Deep anterior lamellar keratoplasty versus penetrating keratoplasty for treating keratoconus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, p.1-51, 2014. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd009700.pub2>>. Accessed: Out. 10, 2019. doi: 10.1002/14651858.cd009700.pub2.

KEANE, T.J. et al. Decellularization of mammalian tissues. **Characterisation and Design of Tissue Scaffolds**, v.106, n.4, p.75-103, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/b978-1-78242-087-3.00004-3>>. Accessed: Out. 10, 2019. doi: 10.1016/b978-1-78242-087-3.00004-3.

KIM, S. et al. Deep anterior lamellar keratoplasty of dog eyes using the big-bubble technique. **Journal of Veterinary Science**, v.17, n.3, p.347-352, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2016.17.3.347>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.4142/jvs.2016.17.3.347.

LACERDA, R.P. et al. Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: a review of 50 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 3, p.222-231, 2016. Available from: < <http://dx.doi.org/10.1111/vop.12392>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1111/vop.12392.

LAGUNA, F. et al. Corneal grafting for the treatment of feline corneal sequestrum: a retrospective study of 18 eyes (13 cats). **Veterinary Ophthalmology**, v.18, n.4, p.291-296, 2014. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vop.12228>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1111/vop.12228

LAUS, J.L et al. Emprego de escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis* - STEIDACHNER, 1859), conservada em glicerina, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research And Animal Science**, v.37, n.1, p.1-10, 2000. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962000000100007>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1590/S1413-95962000000100007.

LEITE, A. G. B. **Utilização de matriz corneal suína descelularizada em ceratoplastias**. 2015. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LIN, H. et al. Development of Decellularized Cornea by Organic Acid Treatment for Corneal Regeneration. **Tissue Engineering Part A**, v.25, n.8, p. 652-662, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0162>>. Accessed: Out. 10, 2019. doi: 10.1089/ten.tea.2018.0162

MCLELLAN; A. Corneal stromal sequestration and keratoconjunctivitis sicca in a horse. **Veterinary Ophthalmology**, v.3, n.2, p.207-212, 2000. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1463-5224.2000.00121.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1046/j.1463-5224.2000.00121.x

NITA, M. et al. Ophthalmic transplantology: Anterior segment of the eye – Part I. **Medical Science Monitor**, v.5, n.18, p.64-72, 2012. Available from: <<http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/882723>>. Accessed: Out. 10, 2019. PMID: 22534721.

PUMPHREY, S.A. et al. Use of cyanoacrylate adhesive in the surgical management of feline corneal sequestrum: 16 cases (2011-2018). **Veterinary Ophthalmology**, v.22, n.6, p.859-863, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vop.12663>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1111/vop.12663.

SHARIF, Z.; SHARIF, W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. **Romanian Journal of Ophthalmology**, v.63, n.1, p.15-22, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.22336/rjo.2019.4>>. Accessed: Dez. 02, 2019. doi: 10.22336/rjo.2019.4.

SIQUEIRA FILHO, R.S. **Efeito da clonidina e hialuronidase associada à lidocaína na anestesia peribulbar em cães submetidos à cirurgia de catarata**. 2015. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SOONTORNVIPART, K. et al. Conjunctival Pedicle Graft in Dogs and Cats: A Retrospective Study of 88 Cases. **Acta Veterinaria Brno**, v.72, n.1, p.63-69, 2003. Available from: <<http://dx.doi.org/10.2754/avb200372010063>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.2754/avb200372010063.

STILES, J. Feline ophthalmology. In: GELATT, K. N.; GILGER, B. C.; KERN, T. J. **Veterinary Ophthalmology**. 5. ed. Iowa: Wiley-blackwell, 2013. Cap. 27. p. 1477-1559.

TOWNSEND, W.M. et al. Heterologous penetrating keratoplasty for treatment of a corneal sequestrum in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.4, p.273-278, 2008. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00634.x>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1111/j.1463-5224.2008.00634.x.

TURNER, S. M. Córnea. In: TURNER, S. M. **Oftalmologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 4. p. 121-124.

VAN ESSEN, T.H. et al. Biocompatibility of a fish scale-derived artificial cornea: Cytotoxicity, cellular adhesion and phenotype, and in vivo immunogenicity. **Biomaterials**, v.81, p.36-45, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.015>>. Accessed: Out. 10, 2019. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.015.

VICENTI, Felipe Antônio Mendes et al. Use of an allogeneous tunica vaginalis conserved in 98% glycerine for keratoplasty in dogs. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 3, p.182-187, 2002. Available from: <<http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2015.257>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.4322/rbcv.2015.257.

VIDAL, L.V.O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2008000800017>>. Accessed: Ago. 08, 2019. doi: 10.1590/s0100-204x2008000800017.

WILKIE, D.A.; WHITTAKER, C. Surgery of the Cornea. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.27, n.5, p.1067-1107, 1997. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(97\)50104-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(97)50104-5)>. Accessed: Nov. 12, 2019. doi: 10.1016/S0195-5616(97)50104-5.

LEDBETTER, E.C.; GILGER, B.C. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K.N.; GILGER, B.C.; KERN, T.J. **Veterinary Ophthalmology**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2013. Cap.18, p. 976-1049.

WILLIAMS, D.L.; KIM, J. Feline entropion: a case series of 50 affected animals (2003-2008). **Veterinary Ophthalmology**, v.12, n.4, p.221-226, 2009. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00705.x>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1111/j.1463-5224.2009.00705.x.

YOUNG A.L. et al. A new era in corneal transplantation: paradigm shift and evolution of techniques. **Hong Kong Med J**, v.18, p.509-516, 2012. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23223653>>. Accessed: Out. 10, 2019. PMID: 23223653

YOERUEK E. et al. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. **Acta Ophthalmologica**, v.90, n.3, p. 206-210, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02300.x>>. Accessed: Oct. 10, 2019. doi: [10.1111/j.1755-3768.2011.02300.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02300.x).

HASHIMOTO, Y. et al. Corneal Regeneration by Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) Using Decellularized Corneal Matrix. **Plos One**, v.10, n.7, p.1-10, 2015. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131989>>. Accessed: Oct. 10, 2019. doi: [10.1371/journal.pone.0131989](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131989).

## ANEXO 1

### Normas para Publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

1. **Os artigos devem ser organizados em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (de preferência os últimos três separadamente), Agradecimentos, Declaração de conflito de interesse e Referências:**
  - a. O **TÍTULO** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.
  - b. **O(s) Autor(es) com numerosos primeiros nomes e sobrenomes, deve(m) padronizar o seu “nome para publicações científicas”,** como por exemplo: Cláudio Severo Lombardo de Barros, escreve Cláudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F. **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores.** O autor para correspondência deve ser um autor que garanta o contato com o Conselho Editorial da PVB. Asteriscos de chamadas para o rodapé não devem ser sobrescritos.
  - c. O **Cabeçalho do ABSTRACT** deve conter além dos nomes dos autores abreviados invertido, o ano, o TÍTULO, o endereço postal do laboratório (inclusive o CEP) ou instituição principal onde foi desenvolvida a pesquisa. Endereços postais brasileiros não devem ser traduzidos para o inglês, mesmo em artigos escritos na língua inglesa, a fim de evitar dificuldade na postagem. Deve-se conferir os nomes dos autores do artigo e do Cabeçalho do Abstract para evitar discrepâncias.
  - d. O **Rodapé da primeira página** deve conter os endereços profissionais postais completos dos autores (evitando-se traços horizontais), na língua do país do respectivo autor (em português, espanhol, inglês) e seus e-mails; o e-mail do autor para correspondência deve ser sublinhado. Os sinais de chamada para os nomes dos autores devem ser números arábicos, colocados em sobrescrito, sem o uso automático de “Inserir nota de fim”, do Word (essas chamadas devem ser contínuas por todo artigo, isto é, em todas as notas de rodapé das outras páginas).

- e. O **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO, mas pode ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que devem incluir termos do título, por não se tratar somente de “ADDITIONAL INDEX TERMS”.
- f. O **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem termos do título, por não se tratar somente de “TERMOS DE INDEXAÇÃO ADICIONAIS”.
- g. A **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal e deve finalizar com a indicação do objetivo do artigo.
- h. **MATERIAL E MÉTODOS** deve reunir a totalidade dos dados que permitam o desenvolvimento de trabalho semelhante por outros pesquisadores.
- i. Em **RESULTADOS** devem ser apresentados concisamente os dados obtidos.
- j. Na **DISCUSSÃO** devem ser confrontados os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los.
- k. **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados obtidos e devem ser apresentados em diferentes parágrafos (uma Conclusão somente deve ser apresentada em parágrafo único).
- l. Os **Agradecimentos** não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; devem ser sucintos e colocados antes da Declaração de conflito de interesse e da Lista de Referências.
- m. A **Declaração de conflito de interesse** é obrigatória e deve ser mencionada nos casos positivos ou negativos; deve ser sucinta e colocada imediatamente antes da Lista de Referências.
- n. A Lista de **REFERÊNCIAS** deve incluir todas as citações apresentadas no texto e que tenham servido como fonte para consulta. A Lista deve ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores (em caixa alta e baixa), do ano, do título da publicação citada, e abreviado (por extenso em casos de dúvida) o nome do periódico. Sugerimos consultar exemplos dos últimos fascículos. (Notem: (1) As Referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem cronológica, mas alfabética tratando-se de referências do mesmo ano; (2) Quando utilizados programas de

formatação (p.ex. Endnote X7), remover o fundo automático cinzento antes da submissão, para não dificultar eventuais correções.

2. **Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:**

- a. Fonte **Cambria, corpo 10; página formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), texto corrido em uma coluna justificada, com as Legendas das Figuras no final (logo após a Lista de REFERÊNCIAS) sem repetir as legendas junto com as Figuras.
- b. **ABSTRACT** e **RESUMO** serão escritos em um só parágrafo corrente e não devem conter citações bibliográficas.
- c. A redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal.
- d. Os nomes científicos usados no manuscrito devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*), no início de cada capítulo (**TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO**, etc.), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviação do gênero (p.ex. *P. marcgravii*).
- e. Nos títulos dos **Quadros** e nas **Legendas das Figuras** os nomes científicos devem ser apresentados por extenso, já que estes são independentes do texto.
- f. No texto, os sinais de chamada para notas de rodapé devem ser números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word. Notem: para evitar a separação em duas linhas, os numerais devem ser apresentados junto com suas unidades, ou seja, sem espaçamento, por exemplo: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, (P<0,05), 15h. A abreviação de número é "n<sup>o</sup>" e não “n<sup>o</sup>” ; grau Celsius é “ °C” e não “<sup>o</sup>C”.
- g. Os Quadros (não usar o termo Tabela) e as Figuras devem ser citados no texto, pelos respectivos números, em ordem crescente e devem ser submetidos separadamente do texto!
- h. Siglas e abreviações das instituições, ao aparecerem pela primeira vez, deverão ser colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso
- i. Citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”, p.ex. (Caldas 2005); artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois (Pedroso &

- Pimentel 2013); e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano (Brito et al. 2015); se dois artigos não se distinguirem, a diferenciação será feita através do acréscimo de letra minúscula ao ano (Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação deve ser cronológica (Barbosa et al. 2003, Armién et al. 2004).
- j. **Recomenda-se consultar na íntegra todos os artigos citados**; se isto não for possível, deve-se colocar no texto a referência original (não consultada na íntegra) seguida do ano, p.ex. (Bancroft 1921); na Lista de Referências deve ser incluída a referência original como: Bancroft 1921. .... título. ... periódico. (Apud Suvarna & Layton 2013). A referência consultada também deve ser incluída na Lista de Referências.
- k. O uso de “comunicação pessoal” e de “dados não publicados” deve ser feito apenas em casos excepcionais; no texto com citação de Nome e Ano, e na Lista de Referências como: Barbosa 2016. Comunicação pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal).
- l. As **Legendas das Figuras** devem conter informações suficientes para sua compreensão (independente do texto); e devem ser precedidas de “Fig.” seguida do número sem espaço, p.ex. “Fig.8. ...”. Para elaboração das legendas sugerimos consultar exemplos nos últimos fascículos.(Notem: Na legenda de Figuras compostas deve-se colocar a letra de cada “subfigura” em negrito com parênteses claros antes do texto correspondente e devem ser mencionados letras ou sinais, que estão dentro de cada “subfigura”, em parênteses e claros após o respectivo texto da legenda.)
- m. O Título dos **Quadros** devem ser em **negrito**, sem ponto, e a “garganta” (título das colunas) deve ser escrita em claro e separada por dois traços longos horizontais; o Título dos Quadros e da “garganta” devem ser escritas em caixa alta e baixa. Os Quadros (não usar o termo Tabela) devem conter os resultados mais relevantes. Não há traços verticais, nem fundos cinzentos; excepcionalmente pode conter traços horizontais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, com “a” em cada Quadro. As chamadas de rodapé deverão ser lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda; e devem evitar números arábicos. Os títulos não têm ponto no final, ao passo que as legendas terminam com um ponto. Os Quadros devem ser

apresentados em Word e ser editáveis, a fim de inserirmos eventuais alterações de apresentação, dentro das normas da revista.

- n. Dados complexos devem ser expressos por Gráficos (devem ser chamados de Figuras). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, **sem fundo e sem linhas horizontais**. Em gráficos contendo texto a fonte deve ser Cambria tamanho 10.

### 3. Apresentação das Figuras

- a. As figuras devem ser salvas em 300dpi, arquivo TIF.
- b. Enviar cada figura separadamente.
- c. Identificar as figuras em ordem conforme a menção no texto.
- d. As figuras solitárias devem ter seus arquivos identificados como (Fig.1, Fig.2 ...).
- e. As figuras que serão destinadas a formar uma prancha devem ter seus arquivos identificados como (Fig.1A, Fig.1B ...). As pranchas devem ser compostas por múltiplas subfiguras. Imagens destinadas a uma prancha devem ser de mesmo tamanho.
- f. Para micrografias usar, de preferência, barras de escala para indicar o aumento; apresentar na legenda sempre o método de coloração e a objetiva, p. ex.: HE, obj.40x.
- g. As legendas de figuras devem conter inicialmente o que se observa na imagem, seguida das informações adicionais (Formato típico da legenda: Fig.1. (A) Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método de coloração e objetiva.).
- h. As legendas de figuras devem ser apresentadas junto com o texto do artigo, após as Referências.

4. **Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências e vice-versa; na revisão final do artigo pelos autores, antes da submissão, isto deve ser conferido criteriosamente, para evitar discrepâncias (o sistema ScholarOne bloqueia automaticamente artigos com discrepâncias).**

### Exemplos de Referências

- o Artigos publicados em periódicos:

- Martins K.P.F., Fonseca T.R.S., Silva E.S., Munhoz T.C.P., Dias G.H.S., Galiza G.J.N., Oliveira L.G.S. & Boabaid F.M. 2018. Bócio em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 38(6):1030-1037.
- Rondelli L.A.S., Silva G.S., Bezerra K.S., Rondelli A.L.H., Lima S.R., Furlan F.H., Pescador C.A. & Colodel E.M. 2017. Doenças de bovinos no Estado de Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). *Pesq. Vet. Bras.* 37(5):432-440.
- Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. *Environ. Health* 17:15-24.
- (Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. O sinal “&” é usado para separar o penúltimo do último autor. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra “Revista” deve ser abreviada como “Revta” em diferença a “Rev.”, do inglês “Review”. Deve-se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados “pontovírgulas” (;) em lugar de vírgulas.
- Livros:
  - Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção*. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.
  - Marsh P. & Martin M. 1992. *Oral Microbiology*. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.
  - (Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.
- Capítulos de livros:

- Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.
- (Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas.)
- Dissertações e Teses:
  - Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 228p.
  - (Notem: (1) Deve-se evitar citações de Dissertações ou Teses; deve-se preferir citar artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.)
- Resumos publicados em eventos:
  - Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). Pesq. Vet. Bras. 36(Supl.2):50-51. (Resumo)
  - Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146. (Resumo)
  - (Notem: Evitar na consulta o uso de Resumos ao invés de artigos na íntegra!)

## ANEXO 2

### Normas para Publicação na Revista Ciência Rural

#### ESCOPO:

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

**2.** Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

#### LIMITE DE PÁGINAS:

Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem**.

**Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuírem páginas **excedentes** terão um custo adicional para a publicação (vide taxa).

**ESTRUTURA:**

**3. O artigo científico** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente, pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**4. A revisão bibliográfica** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**5. A nota** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e Conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

**COVER LETTER:**

6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

#### **TÍTULOS:**

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse [link](#) o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.

#### **REFERÊNCIAS:**

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

11.1. Citação de livro:  
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

11.2. Capítulo de livro com autoria:  
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

11.3. Capítulo de livro sem autoria:  
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.  
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

11.4. Artigo completo:  
O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Available from:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

#### 11.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### 11.6. Tese,

dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### 11.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### 11.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 11.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as**

**possibilidades do tratamento cirúrgico.** São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. **Transgênicos.** Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

## **DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:**

**12.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos, as figuras e os gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

13. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.
15. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).
16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.
19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decorso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.
20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

## ANEXO 3



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



**CEUA - UFRPE**  
Aprovado em  
19/12/2018  
Validade  
19/12/2020

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – K- 04**  
**Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

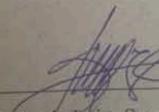
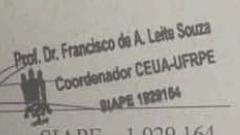
A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	137/2018
Número do processo	23082.024933/2018-62
Data de emissão da licença	19 de dezembro de 2018
Título do Projeto	“Ceratoplastia lamelar experimental e aplicada utilizando matriz corneal descelularizada de tilápia”
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Fabício Bezerra de Sá
Colaboradores	Robério Silveira da Silva Filho, Rômulo Nunes da Rocha, Bruno Daby Figuerêdo de Souza, Stéphanie Ingrid Vieira de Araújo
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Cão macho 07, fêmea 07; gato macho 07, fêmea 07; peixe macho 15, fêmea 15; suíno macho 06, fêmea 06. Total: 70

Prof. Dr. Marleyne Amorim  
Presidente CEUA/UFRPE  
SIAPE 384977

*Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim*  
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)

## 4.4 ANEXO 4

 <b>UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBURGO</b> Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE		 <b>CEUA - UFRPE</b> Aprovado em <u>18/09/2019</u> Validade <u>18/09/2021</u>
<b>Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA K- 04</b> <b>Licença para o uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.</b>		
Número da licença	122/2019	
Número do processo	23082. 024933/2018-62	
Data de emissão da licença	18 de setembro de 2019	
Título do Projeto	Ceratoplastia lamelar experimental e aplicada utilizando matriz corneal descelurizada de tilápia	
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão).	Pesquisa	
Responsável pela execução do projeto	Fabricio Bezerra de Sá	
Colaboradores	Robério Silveira da Silva Filho, Rômulo Nunes da Rocha, Bruno Daby Figuerêdo de Souza, Stéphanie Ingrid Vieira de Araújo	
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Suino Macho 10, fêmea 10.Total: 20	
 Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - SIAPE – 1.929.164 (Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)		
 Prof. Dr. Francisco de A. Leite Souza Coordenador CEUA-UFRPE SIAPE 1929164		

## APÊNDICE



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
LABORATÓRIO DE OFTALMOLOGIA EXPERIMENTAL

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Este projeto pretende aplicar a matriz extracelular corneal de tilápia em cães e gatos com ceratopatias que requeiram tratamento cirúrgico. O tratamento cirúrgico consistirá na ceratoplastia lamelar (transplante de córnea) utilizando matriz extracelular corneal de tilápia. Após a realização do procedimento cirúrgico, serão realizadas avaliações oftálmicas diariamente nos oito dias subsequentes ao pós-operatório, e posteriormente será avaliada semanalmente até a completa cicatrização corneana. Nesses dias os exames realizados serão: reflexo pupilar, teste de Schimer, oftalmoscopia direta e indireta, biomicroscopia do segmento anterior com lâmpada de fenda portátil, teste de fluoresceína observando-se a presença de pontos e a reepitelização corneal. Também serão avaliadas as reações de fotofobia, blefarospasmo, edema, transparência, neovascularização, uveíte e secreção ocular (serosa, sero-mucosa, mucosa, purulenta).

Durante todo o período da pesquisa você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato, com algum dos pesquisadores. Você tem garantido o seu direito de não permitir a participação do seu animal no experimento, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos proprietários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo (Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá, Robério Silveira de Siqueira Filho, Rômulo Nunes da Rocha, Bruno Daby Figuerêdo de Souza, Stéphanie Ingrand Vieira de Araújo), sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Serão também utilizadas imagens do animal durante todo o experimento.

Autorização

Eu, \_\_\_\_\_, após a leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que a participação do meu animal é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, do procedimento que meu animal será submetido, da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em deixar meu animal participar deste estudo.

Assinatura do Proprietário do Animal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

\_\_\_\_\_