GUSTAVO KÜPPER MARINO

Análise da integridade da membrana basal epitelial durante a geração, persistência, e o desaparecimento da opacidade corneana tardia após injúria corneana

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Marcony Rodrigues de
Santhiago

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marino, Gustavo Küpper

Análise da integridade da membrana basal
epitelial durante a geração, persistência, e o
desaparecimento da opacidade corneana tardia após
injúria corneana / Gustavo Küpper Marino. -- São
Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oftalmologia.

Orientador: Marcony Rodrigues Santhiago.

Descritores: 1.Opacidade da córnea 2.Membrana
basal 3.Miofibroblastos 4.Ceratócitos 5.Lesões da
córnea 6.Ceratectomia fotorrefrativa 7.Úlcera da
córnea

USP/FM/DBD-234/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

À minha heroína, Carmem, e ao meu
melhor amigo, Ricardo. “*Mamãe*” e
“*Caco*”, eu dedico esta obra inteiramente
à vocês.

Agradecimentos

Ao meu orientador e amigo, **Dr. Marcony R. Santhiago**, que com seu exemplo norteou meu caminho durante esta jornada. Levarei comigo a lição: “A palavra convence, o exemplo arrasta”.

Ao meu coorientador e mestre, **Dr. Steven E. Wilson**, por compartilhar comigo o seu vasto conhecimento clínico e cirúrgico, e por em mim despertar o interesse pela ciência feita de forma ética, responsável, e perfeccionista.

Ao grande amigo **Andre Torricelli**, por me acolher, me ajudar, e me ensinar tudo sobre a nova vida em um laboratório longe do Brasil.

Aos meus demais amigos e fundamentais colaboradores da Cleveland Clinic: **Abirami Santhanam, Carla Medeiros, Jiahui Wu, Luciana Lassance, Mei Yin, Shanmugapriya Thangavadivel, e Vandana Agrawal.**

À querida **Raquel Moreno**, por ter sido minha imprescindível companheira ao longo desta jornada.

Aos amigos **Fabício Witzel** e **Marcelo Netto**, por me incentivarem e ajudarem a tornar possível este sonho.

À querida **Regina Ferreira de Almeida**, por todo seu carinho, respeito, e profissionalismo.

À você, que lê esta obra, e acredita na ciência e no conhecimento como instrumentos para melhorar a vida do próximo.

Muito obrigado!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

— Albert Einstein

Sumário

Lista de tabelas.....	VIII
Lista de abreviaturas e siglas.....	IX
Lista de símbolos.....	X
Resumo.....	XI
<i>Abstract</i>	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 Artigo de revisão - <i>Corneal molecular and cellular biology for the refractive surgeon: the critical role of the epithelial basement membrane</i>	7
4. MÉTODOS.....	8
4.1 Contexto.....	9
4.2 Tipo e objeto do estudo.....	9
4.3 Grupos de estudo e Procedimentos.....	9
5. RESULTADOS.....	14
5.1 Primeiro artigo - <i>Regeneration of Defective Epithelial Basement Membrane and Restoration of Corneal Transparency After Photorefractive Keratectomy</i>	15
5.2 Segundo artigo - <i>Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits</i>	16
6. CONCLUSÃO.....	17
7. ANEXOS.....	19
7.1 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	20
7.2 Documento de adequação do estudo às recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	21

7.3 Protocolo de aprovação pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i> – IACUC) da Cleveland Clinic.....	22
8. REFERÊNCIAS.....	23

Lista de tabelas

Tabela 1 – Número de animais nos diferentes grupos de estudo em cada um dos momentos de análise.....	11
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

MBE	Membrana basal epitelial
D	Dioptria
PRK	Ceratectomia fotorrefrativa (<i>photorefractive keratectomy</i>)
IHQ	Imunohistoquímica
MTE	Microscopia de transmissão eletrônica
LASIK	Ceratomileusis <i>in situ</i> a laser (<i>laser in situ keratomileusis</i>)
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)
IL-1	Interleucina-1 (<i>interleukin-1</i>)
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IRB	Conselho de revisão institucional (<i>Institutional Review Board</i>)
EUA	Estados Unidos da América
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>)
α -SMA	Actina de músculo liso alfa (<i>alpha smooth muscle actin</i>)

Lista de símbolos

μm	micrômetro (10^{-6} m)
kg	quilograma (10^3 g)
mg	miligrama (10^{-3} g)
%	porcentagem
ml	mililitro (10^{-3} L)
mm	milímetro (10^{-3} m)
UFC	Unidade formadora de colônia
μl	microlitro (10^{-6} L)
cm	centímetro (10^{-2} m)
°C	graus Celsius
M	concentração molar
nm	nanômetro (10^{-9} m)

Resumo

Marino GK. *Análise da integridade da membrana basal epitelial durante a geração, persistência, e o desaparecimento da opacidade corneana tardia após injúria corneana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

OBJETIVOS: Determinar a correlação entre a completa regeneração da membrana basal epitelial (MBE) e o desaparecimento de miofibroblastos do estroma anterior e consequente restauração da transparência corneana após diferentes mecanismos de trauma em coelhos. **MÉTODOS:** Foram utilizados 32 coelhos que tiveram um de seus olhos incluídos em um dos três grupos de estudo: (1) -9 dioptrias (D) ceratectomia fotorrefrativa (PRK), (2) Incisões corneanas verticais de espessura parcial (350 μ m), ou (3) Ceratite bacteriana, enquanto os olhos contralaterais compuseram o grupo controle. Os animais foram examinados, sacrificados, e tiveram suas córneas analisadas em diferentes momentos afim de investigar com detalhes o processo de cicatrização corneano usando técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e microscopia de transmissão eletrônica (MTE). **RESULTADOS:** No grupo “-9D PRK”, as córneas apresentavam opacidade corneana densa e nenhuma evidência de regeneração da MBE 1 mês após a cirurgia. Dois meses após a cirurgia, no entanto, pequenas áreas de córnea transparente começaram a surgir em meio à opacidade difusa, correspondendo a pequenas ilhas de MBE completamente regenerada. Após 4 meses da cirurgia a MBE estava completamente regenerada e a transparência corneana havia sido reestabelecida na região ablada pelo laser. No grupo “incisões corneanas”, o par de densas opacidades corneanas lineares observadas após 1 mês do procedimento tornou-se progressivamente mais tênue ao longo dos próximos 2 meses. A ultraestrutura da MBE estava completamente regenerada e não houve formação de miofibroblastos no local das incisões 1 mês após o procedimento, inclusive ao redor dos *plugs* epiteliais que se estendiam até o estroma. No grupo “ceratite bacteriana”, as córneas que haviam sido infectadas apresentaram opacidade densa, vascularização, miofibroblastos em toda a sua espessura, e nenhuma evidência de

regeneração da MBE 1 mês após a infecção. Observou-se ao longo dos próximos 3 meses substancial redução da opacidade, evidências ultraestruturais de regeneração da MBE, e desaparecimento de miofibroblastos das porções mais anteriores do estroma, persistindo apenas nas regiões do estroma mais posterior nas quais o endotélio e a membrana de Descemet encontravam-se lesadas.

CONCLUSÃO: No modelo animal apresentado, a resolução espontânea da opacidade corneana tardia mediada por miofibroblastos após a ablação com excimer laser ou ceratites infecciosas graves é desencadeada pela completa regeneração da estrutura e função da MBE. As incisões corneanas de espessura parcial em coelhos, no entanto, cicatrizam sem geração de miofibroblastos devido à completa regeneração da MBE após 1 mês do procedimento. Determinou-se, portanto, a correlação entre a reparação da membrana basal epitelial e a consequente redução da opacidade e restauração da transparência corneana.

Descritores: opacidade da córnea; membrana basal; miofibroblastos; ceratócitos; lesões da córnea; ceratectomia fotorrefrativa; úlcera da córnea.

Abstract

Marino GK. *Analysis of the integrity of epithelial basement membrane during the generation, persistence, and disappearance of late corneal opacity after corneal injury* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

PURPOSE: To determine the correlation between epithelial basement membrane (EBM) regeneration and the disappearance of myofibroblasts from anterior stroma and consequent restoration of corneal transparency after different types of injury in rabbits. **METHODS:** Thirty-two rabbits had one of their eyes included in one of the 3 study groups: (1) -9 diopters (D) photorefractive keratectomy (PRK), (2) Two vertical partial-thickness (350 μm) corneal incisions, or (3) Bacterial keratitis, whereas the opposite eyes served as unwounded control group. The animals were examined, sacrificed, and had their corneas analysed in different time points in order to investigate the corneal wound healing process using immunohistochemistry and transmission electron microscopy. **RESULTS:** In the “-9D PRK” group, corneas at 1 month after surgery had dense corneal opacity and no evidence of regenerated EBM. However, by 2 months after surgery small areas of stromal clearing began to appear within the confluent opacity, and these corresponded to small islands of normally regenerated EBM. By 4 months after surgery, the EBM was fully regenerated and the corneal transparency was completely restored in the ablated zone. In the “corneal incisions” group, the two dense, linear corneal opacities observed at 1 month after the procedure progressively faded during the next 2 months. The EBM ultrastructure was fully regenerated and there were no myofibroblasts at the site of the incisions by 1 month after the procedure, including around the epithelial plugs that extended into the stroma. In the “bacterial keratitis” group, all the corneas that have been infected presented dense stromal scarring, vascularization, myofibroblasts in the full stromal thickness and no evidence of EBM regeneration by 1 month after the infection. There was a definite decrease in opacity during the next 3 months, besides ultrastructural evidence of EBM regeneration and disappearance of myofibroblasts in the most anterior part of the stroma, which persisted only in the most posterior stroma where

the endothelium and Descemet's membrane were damaged. **CONCLUSION:** In the rabbit model, spontaneous resolution of myofibroblast-mediated corneal opacity (fibrosis) after high correction PRK or infectious keratitis is triggered by regeneration of normal EBM structure and function. Conversely, incisional wounds heal in rabbit corneas without the development of myofibroblasts because the EBM regenerates normally by 1 month after the injury. Therefore, it has been determined the correlation between the EBM regeneration and the restoration of corneal transparency after different types of corneal injury.

Descriptors: corneal opacity; basement membrane; myofibroblasts; keratocytes; corneal injuries; photorefractive keratectomy; corneal ulcer.

1. Introdução

O processo de cicatrização corneano envolve uma complexa cascata de eventos biológicos que visa reparar a injúria ao tecido—como trauma, infecção, ou lesão causada por cirurgia—e reestabelecer a sua função normal.¹ Por muitas vezes, no entanto, a natureza e a gravidade da agressão à córnea podem levar à formação de cicatrizes (fibrose/opacidade) que sobremaneira afetam a sua transparência e, conseqüentemente, a sua função. Este processo cicatricial é, portanto, objeto de particular interesse dos cirurgiões ceratorrefrativos por representar ameaça a segurança, previsibilidade, e estabilidade de procedimentos cirúrgicos notadamente eletivos e de alta precisão como a ceratectomia fotorrefrativa (PRK) e a ceratomileusis *in situ* a laser (LASIK).^{1, 2}

Estudos prévios detalharam a interação entre citocinas e fatores de crescimento produzidos por células epiteliais, glândulas lacrimais, e células derivadas da medula óssea em resposta à injúria corneana, e que modulam a ativação dos ceratócitos estromais e o desenvolvimento dos fibroblastos e miofibroblastos.^{3, 4} Estas complexas interações celulares estão envolvidas na reorganização da matriz extracelular e no remodelamento estromal, e irão definir se o processo de cicatrização terá caráter regenerativo (reestabelecimento da transparência) ou fibrótico (formação de opacidade). Sabe-se que a membrana basal epitelial (MBE) intacta, estrategicamente localizada entre o epitélio e o estroma corneano, age como estrutura reguladora de mediadores bioquímicos tais como os fatores de crescimento transformador beta (TGF- β) e derivado de plaquetas (PDGF), e que desempenha papel essencial na determinação do caráter regenerativo da reparação corneana.⁵⁻⁷

A geração e persistência de miofibroblastos, células contráteis com transparência naturalmente reduzida e que produzem matriz extracelular desorganizada capaz de alterar a precisa distribuição das fibras colágenas essenciais à transparência corneana, é apontada como o substrato celular da opacidade corneana tardia.⁸ O TGF- β , PDGF, e a interleucina-1 (IL-1), entre outras tantas citocinas e mediadores químicos derivados do epitélio e glândulas lacrimais, penetram o estroma corneano através de defeitos (estruturais ou funcionais) da MBE, atingindo níveis críticos responsáveis pela formação de miofibroblastos a partir de suas células precursoras, tais como os ceratócitos e células derivadas da medula óssea.^{9, 10}

O TGF- β e a IL-1 apresentam efeitos antagonistas sobre a formação e persistência de miofibroblastos no estroma corneano.⁹⁻¹² O TGF- β é um importante indutor do desenvolvimento dos miofibroblastos a partir de suas células precursoras e de sua persistência (inibe a ação da IL-1 quando em altas concentrações), ao passo que a IL-1 atua como indutora da apoptose destas células. Acredita-se, portanto, que a modulação da diferenciação, viabilidade, e morte celular programada dos miofibroblastos provavelmente dependa da relação entre os níveis de TGF- β e IL-1 no estroma anterior. A MBE íntegra age, portanto, como uma barreira à penetração do TGF- β e PDGF em direção ao estroma, regulando, em última análise, a formação e persistência de miofibroblastos no estroma anterior.^{9, 10}

2. Objetivos

Considerando-se o exposto acima, os objetivos do presente estudo são:

1. Determinar se a regeneração espontânea da MBE está diretamente relacionada ao desaparecimento de miofibroblastos do estroma anterior e consequente restauração da transparência de córneas de coelhos que desenvolveram opacidade (fibrose) estromal tardia após o PRK.
2. Determinar se a opacidade corneana decorrente de incisões corneanas de espessura parcial está associada à MBE parcialmente regenerada e ao surgimento de miofibroblastos, e se a eventual regeneração espontânea da MBE está associada ao desaparecimento de miofibroblastos e consequente restauração da transparência corneana.
3. Determinar se a opacidade corneana decorrente de uma ceratite bacteriana grave está associada à MBE parcialmente regenerada e ao surgimento de miofibroblastos, e se a eventual regeneração espontânea da MBE está associada ao desaparecimento de miofibroblastos e consequente restauração da transparência corneana.

3. Revisão da literatura

3.1 Artigo de revisão

Apresenta-se a seguir artigo de revisão da literatura¹³ sobre a fisiopatologia, principais causas, e possíveis formas de prevenção e tratamento da opacidade corneana tardia após as cirurgias ceratorrefrativas (PRK e LASIK), além de descrever o até então conhecido papel da MBE no processo de cicatrização corneano após estas cirurgias.

- Marino GK, Santhiago MR, Torricelli AAM, Santhanam A, Wilson SE. Corneal molecular and cellular biology for the refractive surgeon: the critical role of the epithelial basement membrane. *J Refract Surg.* 2016; 32:118–25

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que visa determinar o papel da MBE nos processos de geração, persistência, e desaparecimento da opacidade corneana após incisões de espessura parcial e ceratites infecciosas graves.

4. Métodos

4.1 Contexto

O presente estudo foi idealizado conjuntamente pelo Setor de Cirurgia Refrativa da Clínica Oftalmológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e pelo *Cole Eye Institute, Cleveland Clinic*, Cleveland, EUA, e executado nas dependências da *The Cleveland Clinic Lerner College of Medicine of Case Western Reserve University* entre 2015 e 2016.

O estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) de Nível Superior por meio de bolsa de doutorado direto.

4.2 Tipo e objeto de estudo

Trata-se de estudo experimental prospectivo que utilizou 32 coelhos da espécie *New Zealand*, gênero feminino, entre 12-15 semanas de vida e pesando entre 2,5-3,0 kg provenientes de Rocky River, Ohio, EUA. Os coelhos foram selecionados para este estudo por já terem sua resposta de cicatrização corneana amplamente estudada, além de apresentarem grande similaridade no processo de formação de fibrose do estroma corneano com os seres humanos.¹⁴

Os 32 coelhos tiveram um de seus olhos incluídos em um dos três grupos de estudo (-9D PRK, incisões corneanas, ou ceratite bacteriana), enquanto os olhos contralaterais compuseram o grupo controle. O estudo foi previamente aprovado pelo *Institutional Review Board* (IRB) da Cleveland Clinic, Cleveland, EUA, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP (Protocolo de pesquisa nº 038/16) para o uso e cuidado de animais, e seguiram os princípios estabelecidos pela *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

4.3 Grupos de estudo e Procedimentos:

Os animais foram divididos em três grupos de estudo: (1) -9D PRK, (2) Incisões corneanas, (3) Ceratite bacteriana (tabela 1). Os animais foram sacrificados e tiveram suas córneas removidas e analisadas em diferentes momentos afim de caracterizar-se com detalhes o processo de cicatrização corneano usando técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e microscopia de transmissão eletrônica (MTE).

Anestesia geral foi realizada com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (30 mg/kg) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg). Adicionalmente, instilou-se

cloridrato de proparacaína 0,5% tópico (Akorn Inc., Lake Forest, IL) em ambos os olhos imediatamente antes do procedimento. No período pós-operatório, todos os animais foram tratados com acetaminofeno diluído em água para beber (20mg/100ml) por 10 dias e injeção subcutânea de buprenorfina (0,05 mg/kg), duas vezes ao dia, nos primeiros 5 dias e enquanto os animais apresentassem sinais de desconforto.

Grupo “-9D PRK”

Animais do grupo “-9D PRK” (n=15 olhos) foram submetidos a remoção manual da camada epitelial, incluindo a membrana basal, e a ablação de 9D miópicas (zona óptica de 6 mm) com o excimer laser VISX Star S4 IR (Abbott Medical Optics, Irvine, EUA). Em suma, posicionou-se o blefarostato no olho do estudo e removeu-se os 7 mm centrais de epitélio corneano com lâmina Beaver (Beaver-Visitec International, Waltham, EUA), incluindo a remoção da MBE, e em seguida procedeu-se com a ablação da superfície estromal exposta com excimer laser. Uma gota de cloridrato de ciprofloxacino 0,3% (Alcon Laboratories, Inc., For Worth, TX) foi instilada imediatamente após a ablação estromal e mantida por duas vezes ao dia até a completa reepitelização corneana ao redor de 4 a 5 dias. Corticosteróides não foram utilizados para evitar o possível efeito confundidor da droga sobre a resposta de cicatrização corneana. Três animais foram sacrificados em cada um dos momentos de análise, a saber: 2 semanas, 1 mês, 2 meses, 3 meses, e 4 meses.

Grupo “incisões corneanas”

Animais do grupo “incisões corneanas” (n=9 olhos) foram submetidos a incisões corneanas de espessura parcial (aproximadamente 350 µm de profundidade). Em suma, posicionou-se o blefarostato no olho do estudo e foram feitas duas incisões paralelas e verticalmente orientadas que passavam pela região central da córnea com uma lâmina calibrada. Uma gota de cloridrato de ciprofloxacino 0,3% foi instilada imediatamente após o procedimento e mantida por duas vezes ao dia até a completa reepitelização corneana ao redor de 3 a 4 dias. Corticosteróides não foram utilizados para evitar o possível efeito confundidor da droga sobre a resposta de cicatrização corneana. Três animais foram sacrificados em cada um dos momentos de análise, a saber: 1 mês, 2 meses, e 3 meses.

Grupo “ceratite bacteriana”

Animais do grupo “ceratite bacteriana” (n=8 olhos) tiveram inoculadas bactérias previamente isoladas de um caso de grave ceratite bacteriana em humano secundária ao uso de lentes de contato e com perfil de sensibilidade conhecido. Em suma, posicionou-se o blefarostato no olho do estudo e produziu-se defeito epitelial (~1x1 mm) central com lâmina Beaver no qual inoculou-se as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (20 UFC/ μ l em solução salina balanceada). Os olhos foram acompanhados a cada 12 horas até que desenvolvessem úlceras corneanas graves (~6x6 cm), quando passaram a ser tratados com colírio de tobramicina fortificado (13,5 mg/ml), de hora em hora nos primeiros dois dias e depois tiveram a frequência ajustada conforme a evolução do quadro até completa reepitelização corneana. Corticosteróides não foram utilizados para evitar o possível efeito confundidor da droga sobre a resposta de cicatrização corneana. Dois animais foram sacrificados em cada um dos momentos de análise, a saber: 1 mês, 2 meses, e 3 meses.

Tabela 1 – Número de animais nos diferentes grupos de estudo em cada um dos momentos de análise

Amostra (n) por grupos / Momento da análise	-9D PRK	Incisões Corneanas	Ceratite Bacteriana
2 semanas	3	-	-
1 mês	3	3	2
2 meses	3	3	2
3 meses	3	3	2
4 meses	3	-	2

Fixação do material:

A eutanásia dos animais foi realizada com injeção intravenosa de pentobarbital (100 mg/kg) sob anestesia geral (cloridrato de quetamina 30 mg/kg e cloridrato de xilazina 5 mg/kg). O botão corneoescleral dos olhos estudo e controle foi removido com tesoura Westcott e dividido em duas metades idênticas através do centro da

córnea. Uma metade foi imediatamente fixada em bloco contendo líquido de conservação OCT (*Optimal Cutting Temperature* – temperatura de corte ideal) e rapidamente congelada com gelo seco e conservada a -80°C até que fossem feitos os cortes histológicos para estudo imunohistoquímico. A segunda metade foi imediatamente conservada em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,2M a 4°C até a análise por MTE.

Imunohistoquímica (IHQ)

Ensaio imunohistoquímico foram realizados a fim de detectar (1) o marcador de miofibroblastos α -SMA (actina de músculo liso tipo alfa), (2) colágeno tipo III—um tipo de colágeno normalmente ausente em córneas normais mas um dos primeiros a ser sintetizado e secretado durante o processo de cicatrização corneano, e (3) o marcador de monócitos CD11b, um marcador indireto de reação inflamatória.

Para a visualização do α -SMA utilizou-se um anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano α -SMA clone 1A4 (Cat# M-0851; Dako, Carpinteria, CA) que também reconhece antígenos de coelhos. As lâminas contendo os cortes histológicos foram incubadas com anticorpo anti- α -SMA na diluição 1:50 em albumina sérica bovina 1% por 90 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com tampão fosfato-salino e então incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 568 de cabra anti-camundongo (Cat# A-11004, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL) na diluição 1:100 em albumina sérica bovina 1% por 60 minutos. O colágeno tipo III foi detectado usando-se um anticorpo policlonal de cabra anti-humano Colágeno α 1 tipo III (sc-8781; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, TX) que também reconhece antígenos de coelhos. O anticorpo foi aplicado nas lâminas contendo os cortes histológicos na diluição 1:50 em soro de burro 5% e incubadas durante a noite a 4°C. As lâminas foram então lavadas com tampão fosfato-salino e incubadas em anticorpo secundário de burro anti-cabra (sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) na diluição 1:100 em soro de burro 5% por 60 minutos em temperatura ambiente. Para o marcador CD11b utilizou-se o anticorpo primário monoclonal de rato anti-camundongo (Cat# MA1-80091, ThermoFisher Scientific) que também reconhece antígenos de coelhos. As lâminas foram incubadas em anticorpo anti-CD11b na diluição 1:25 em albumina

sérica bovina 1% por 90 minutos em temperatura ambiente, lavadas com tampão fosfato-salino e então incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-rato Alexa Fluor 488 (Cat# A-11006, ThermoFisher) na diluição 1:100 em albumina sérica bovina 1% por 60 minutos em temperatura ambiente.

As lamínulas foram montadas com solução contendo 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) que permite a visualização de todos os núcleos celulares no corte histológico. O controle negativo do colágeno tipo III foi realizado com pré-absorção do anticorpo com o peptídeo de bloqueio (sc-8781P; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) correspondente, enquanto os controles negativos do α -SMA e CD11b incluíram anticorpos inespecíficos do mesmo isotipo uma vez que não haviam anticorpos disponíveis para pré-absorção. Os cortes histológicos foram analisados e fotografados com um microscópio Leica DM5000 (Leica, Buffalo Grove, IL) equipado com câmera Q-imaging Retiga 4000RV (Surrey, BC, Canada) e o software Image-Pro (MediaCybernetics, Inc., Bethesda, MD).

Microscopia de transmissão eletrônica (MTE)

As amostras para MTE foram preparadas conforme o protocolo descrito por Fantes e colaboradores.¹⁵ Em suma, as amostras foram retiradas da solução contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,2M em que estavam conservadas e colocadas em solução fixadora por no mínimo 24 horas. As córneas foram então lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,2M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 60 minutos a 4°C, e desidratadas em concentrações crescentes de etanol de 30% a 100% por 5 minutos cada a 4°C, até serem irrigadas com óxido de propileno em temperatura ambiente e incorporadas em meio de resina epóxi. Cortes ultrafinos de 85 nm de espessura foram cortados com uma lâmina de diamante, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados usando um microscópio de transmissão eletrônica Philips CM12 (FEI Company, Hillsboro, OR).

5. Resultados

Os resultados desta tese foram objetos de duas publicações originais.

O primeiro artigo,¹⁶ intitulado *Regeneration of Defective Epithelial Basement Membrane and Restoration of Corneal Transparency After Photorefractive Keratectomy*, corrobora estudos prévios ao demonstrar que a regeneração incompleta da MBE está associada ao surgimento da opacidade do estroma corneano mediada por miofibroblastos após o tratamento de altas ametropias com a técnica PRK. Mais que isso, demonstra de forma conclusiva que a completa regeneração (estrutural e funcional) da MBE leva ao desaparecimento dos miofibroblastos do estroma anterior e à restauração da transparência corneana nos meses que se sucedem à ablação. O artigo destaca ainda que ocorre completa regeneração da MBE sem que haja, portanto, formação de miofibroblastos no processo de cicatrização das incisões corneanas. A opacidade corneana decorrente deste tipo de injúria decorre, provavelmente, da ativação e recrutamento de fibroblastos corneanos, o que explica o seu caráter mais tênue e efêmero em comparação às opacidades pós-PRK.

O segundo artigo,¹⁷ intitulado *Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits*, demonstra que uma grave agressão às membranas basais anterior e posterior da córnea (MBE e membrana de Descemet, respectivamente) leva a formação de miofibroblastos por toda a espessura corneana. O estudo sugere que a passagem de TGF- β proveniente da camada epitelial através de uma MBE lesada, à semelhança do processo de cicatrização que leva à formação de fibrose após o PRK, seja responsável pela formação dos miofibroblastos nas camadas mais anteriores do estroma, ao passo que a passagem de TGF- β provavelmente proveniente do humor aquoso através de uma membrana basal posterior da córnea (membrana de Descemet) lesada seja responsável pela formação e persistência dos miofibroblastos nas camadas mais profundas do estroma.

5.1 Primeiro artigo:

- Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, Torricelli AAM, Wilson SE. Regeneration of Defective Epithelial Basement Membrane and Restoration of Corneal Transparency After Photorefractive Keratectomy. *J Refract Surg*. 2017;33:337-346

5.2 Segundo artigo:

- Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, Lassance L, Thangavadivel S, Medeiros CS, Bose K, Tam KP, Wilson SE. Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits. *Exp Eye Res.* 2017;161:101-105

6. Conclusões

Os resultados deste estudo possibilitaram as seguintes conclusões:

1. A regeneração espontânea da MBE está diretamente relacionada ao desaparecimento de miofibroblastos do estroma anterior e consequente restauração da transparência de córneas de coelhos que desenvolveram opacidade (fibrose) corneana após o PRK. A regeneração da MBE causa interrupção do aporte de citocinas epiteliais essenciais a manutenção dos miofibroblastos no estroma anterior da córnea.
 - 2.1 Incisões de espessura parcial em córneas de coelhos apresentam completa regeneração da MBE e ausência de formação de miofibroblastos.
 - 2.2 A opacidade decorrente de incisões corneanas de espessura parcial em coelhos não é mediada por miofibroblastos e se deve, provavelmente, à ativação e recrutamento de fibroblastos corneanos. Os fibroblastos corneanos produzem apenas pequena quantidade de proteínas cristalinas (menos que os ceratócitos, mais que os miofibroblastos) e sofrem processo de apoptose mais precocemente, o que justificaria o caráter mais brando e efêmero da opacidade produzida pelas incisões corneanas.
- 3.1 A grave injúria às membranas basais anterior e posterior da córnea (MBE e membrana de Descemet, respectivamente) pode levar à formação de miofibroblastos por toda a espessura corneana após episódio de ceratite bacteriana.
 - 3.2 A regeneração espontânea da MBE está diretamente relacionada ao desaparecimento dos miofibroblastos mais anteriormente localizados e consequente diminuição da opacidade de córneas de coelhos que desenvolveram fibrose corneana após ceratites bacterianas.
 - 3.3 A passagem de TGF- β através de uma membrana basal posterior da córnea (membrana de Descemet) lesada leva à geração e persistência de miofibroblastos nas camadas mais posteriores do estroma corneano.

7. Anexos

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº: 038/16	Data de entrada: 20/04 /2016 Data sessão: 27 /04/2016
---	--

TÍTULO: Análise da influência da integridade da membrana basal epitelial na geração e persistência da opacidade corneana tardia após diferentes mecanismos de trauma corneano em coelhos.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Marcony Rodrigues de Santhiago

PESQUISADOR(A) EXECUTANTE: Gustavo Kupper Marino

DEPARTAMENTO: Oftalmologia

CONSIDERAÇÕES DO RELATOR APROVADAS PELO PLENÁRIO:

Quantidade de Animais: .30

Espécie: .Coelhos NZW

Idade: 12 a 15 semanas

Sexo: Fêmeas

Protocolo interessante, bem apresentado, objetivando analisar a influência da integridade da membrana basal epitelial após diferentes traumas corneanos e correlacioná-la ao surgimento e persistência da opacidade corneana tardia. Toda fase experimental do protocolo em questão será realizada no The Cleveland Clinic Lerner College of Medicine (CCLCM) of Case Western Reserve University. Os autores anexaram carta de aprovação do Comitê de Ética da referida instituição, datado de 15/04/2016. Como envolve pós-graduação na FMUSP, existe a necessidade de aprovação da CEUA-FMUSP. Entretanto, analisando a metodologia experimental, o grau de invasividade assinalado é 2 e a analgesia que será utilizada, após manipulação do globo acular dos coelhos, é o Acetaminofeno (20 mg/100 ml) na água de bebida de forma contínua até reepitelização corneana. Assim gostaríamos de sugerir aos autores, a inclusão do Cloridrato de Tramadol, 5 mg/kg a cada 12 horas, IM ou SC, no primeiros 5 dias de pós-operatório e posteriormente manutenção da analgesia com acetaminofeno como proposto originalmente. Pela experiência de alguns pesquisadores com manipulação de coelhos em procedimentos invasivos na FMUSP, os animais com dor tendem a ingerir pouca água e em consequência terão pouco efeito do analgésico no pós-operatório imediato.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
CEUA - FMUSP

CONCLUSÃO: Diligência

São Paulo, 29 de abril de 2016.

Ilmo.Sr.

Dr. Eduardo Pompeu

Coordenador da Comissão de Ética de Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Ref: *Protocolo de Pesquisa 038/16 "Análise da influência da integridade da membrana basal epitelial na geração e persistência da opacidade corneana após diferentes mecanismos de trauma corneano em coelhos"*

Prezado Doutor,

Em resposta ao Parecer emitido em 20 abril de 2016 sobre o protocolo acima mencionado informo que foi acatada a sugestão de inclusão de droga para controle da dor no período pós-operatório, sendo definida pelo corpo de veterinários do Biotério da Cleveland Clinic a Buprenorfina (0,05 mg/kg), através de via subcutânea, a cada 12 horas, pelo período de 5 dias.

PROF.DR. MARCONY RODRIGUES DE SANTHIAGO
Orientador do Programa de Pós-Graduação Oftalmologia FMUSP
Responsável pelo Protocolo de Pesquisa 038/16

GUSTAVO KUPPER MARINO
Pós-graduando Programa de Oftalmologia FMUSP
N.USP 9190354

Neal S. Peachey, Ph.D.
Chairman
Institutional Animal Care and Use
Committee (IACUC)

April 15, 2016

The Cleveland Clinic's Institutional Animal Care and Use Committee reviewed and approved the following protocol (2014-1199) for annual renewal for the period from June 11, 2016 through May 31, 2017. This protocol is congruent with a grant application submitted to the Public Health Service.

Title of Protocol: Rabbit Corneal Epithelial Growth Factors and Receptors

Principal Investigator: Steven Wilson

Grant Number: R01 EY010056

Institution: The Cleveland Clinic Lerner College of Medicine (CCLCM) of
Case Western Reserve University

This institution has an approved Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare. The Assurance number is A 3145-01. The composition of the Institutional Animal Care and Use Committee and its review procedures are in accordance with PHS guidelines, as documented in the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals revised September, 1996, by the Office of Laboratory Animal Welfare of NIH. The Animal Facility at the CCLCM is fully accredited by AAALAC International.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads "Neal S. Peachey". The signature is fluid and cursive, with the first letters of the first and last names being capitalized and prominent.

Neal S. Peachey, Ph.D.

NSP/jk

8. Referências bibliográficas

1. Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R, Jr., Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* 2005;24:509-522.
2. Wilson SE. Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon: programmed cell death and wound healing. *J Refract Surg.* 1997;13:171-175.
3. Wilson SE, Medeiros CS, Santhiago MR. Pathophysiology of corneal scarring in persistent epithelial defects after PRK and other corneal injuries. *J Refract Surg.* 2018;34:59-64.
4. Torricelli AA, Wilson SE. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. *Exp Eye Res* 2014;129:151-160.
5. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Progress in retinal and eye research* 1999;18:529-551.
6. Netto MV, Mohan RR, Sinha S, Sharma A, Dupps W, Wilson SE. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res* 2006;82:788-797.
7. Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4237-4246.
8. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *Journal of cell science* 1999;112:613-622.
9. Barbosa FL, Lin M, Santhiago MR, Singh V, Agrawal V, Wilson SE. Interleukin-1 receptor role in the viability of corneal myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2012 Mar;96(1):65-9
10. Singh V, Santhiago MR, Barbosa FL, Agrawal V, Singh N, Ambati BK, Wilson SE. Effect of TGF β and PDGF-B blockade on corneal myofibroblast development in mice. *Exp Eye Res.* 2011;93:810-817.
11. Kaur H, Chaurasia SS, Agrawal V, Suto C, Wilson SE. Corneal myofibroblast viability: opposing effects of IL-1 and TGF beta1. *Exp Eye Res* 2009;89:152-158.
12. Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res* 2002;75:645-657

13. Marino GK, Santhiago MR, Torricelli AAM, Santhanam A, Wilson SE. Corneal molecular and cellular biology for the refractive surgeon: the critical role of the epithelial basement membrane. *J Refract Surg.* 2016; 32:118–25
14. Torricelli AAM, Singh V, Agrawal V, Santhiago MR, Wilson SE. Transmission Electron Microscopy Analysis of Epithelial Basement Membrane Repair in Rabbit Corneas With Haze. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:4026-4033.
15. Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, Pouliquen Y, Thompson KP, Savoldelli M. Wound Healing After Excimer Laser Keratomileusis (Photorefractive Keratectomy) in Monkeys. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:665-675.
16. Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, Torricelli AAM, Wilson SE. Regeneration of Defective Epithelial Basement Membrane and Restoration of Corneal Transparency After Photorefractive Keratectomy. *J Refract Surg.* 2017;33:337-346
17. Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, Lassance L, Thangavadivel S, Medeiros CS, Bose K, Tam KP, Wilson SE. Epithelial basement membrane injury and regeneration modulates corneal fibrosis after pseudomonas corneal ulcers in rabbits. *Exp Eye Res.* 2017;161:101-105.