



TRANSPLANTE DE CÓRNEAS DESCELULARIZADAS COLONIZADAS COM CÉLULAS-TRONCO DAS BOLSAS DE GORDURA DA PÁLPEBRA: RESULTADOS PRELIMINARES EM COELHOS COM INSUFICIÊNCIA LÍMBICA

Artur W. Veloso¹, Rummenigge Oliveira Silva¹, Sebastião Cronemberger¹, Alfredo Miranda de Goes¹, Thaís Maria da Mata Martins^{1,2,3}

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil (arturwilliam_email@yahoo.com.br)

²Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil

³Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do transplante de córneas humanas descelularizadas (CDs) colonizadas com células-tronco das bolsas de gordura da pálpebra (OFSCs) em reconstruir a superfície ocular de coelhos com insuficiência límbica. As OFSCs foram isoladas e criopreservadas com sucesso, mantendo a viabilidade e capacidade de colonizar as CDs. Análises histológicas pós-transplante demonstraram integração e reepitelização, sugerindo o potencial terapêutico das CDs e OFSCs.

Palavras-chave: Córnea; células-tronco; descelularização; transplante; insuficiência límbica

INTRODUÇÃO

O epitélio da córnea é fundamental para a visão e manutenção da transparência da córnea. As células-tronco responsáveis pela renovação constante e reparação desse epitélio estão localizadas na camada basal do epitélio límbico, sendo o limbo corneoescleral a região de transição entre a córnea e a conjuntiva bulbar (Shortt et al., 2007). Além de ser fonte de células-tronco para o epitélio corneano, o limbo corneoescleral também atua como uma barreira entre os epitélios da córnea e da conjuntiva. Dessa forma, o limbo impede a neovascularização e a invasão da superfície da córnea pelo epitélio conjuntival, ajudando a manter a transparência e integridade da córnea (Dua e Azuara-Blanco, 2000; Baylis et al., 2011).

A insuficiência límbica (LSCD - *limbal stem cell deficiency*) é uma condição ocular grave que resulta na disfunção das células-tronco límbicas, levando à perda da capacidade de renovação do epitélio corneano e comprometimento visual (Casaroli-Marano et al., 2013). A LSCD afeta milhões de pessoas ao redor do mundo sendo um dos grandes fatores responsáveis pelas doenças da córnea (Sharma et al., 2011). A reconstrução da superfície ocular em casos de LSCD representa um desafio clínico significativo, e pesquisas por abordagens terapêuticas inovadoras são contínuas.

As técnicas mais empregadas no tratamento da LSCD consistem no transplante de células-tronco límbicas ou de células epiteliais da mucosa oral, frequentemente utilizando membrana amniótica ou fibrina como suporte (Yazdanpanah et al., 2019; Oliva et al., 2020). No entanto, essas abordagens apresentam diversas limitações, tais como a capacidade restrita de autorrenovação das células cultivadas e o risco de contaminação por componentes xenogênicos utilizados nas culturas celulares e/ou na preparação da fibrina. A membrana amniótica, por sua vez, é de difícil manipulação, possui transparência limitada e baixa resistência mecânica (Rahman et al., 2009; Nguyen et al., 2018). Além disso, o transplante autólogo de células-tronco límbicas pode induzir LSCD iatrogênica no olho doador e não pode ser feito em pacientes com LSCD bilateral (Kiritoshi et al., 2019). Por outro lado, o transplante alogênico está associado ao risco de rejeição imunológica e aos efeitos adversos decorrentes da imunossupressão (Kiritoshi et al., 2019).

As limitações das terapias atualmente disponíveis para a LSCD têm impulsionado o desenvolvimento de pesquisas por estratégias inovadoras para a reconstrução do epitélio corneano. O presente estudo explorou o potencial terapêutico das células-tronco das bolsas de gordura da pálpebra humana (OFSCs) em combinação com córneas humanas descelularizadas (CDs). As OFSCs, por serem células-



tronco mesenquimais, apresentam características promissoras como a capacidade de autorrenovação e diferenciação celular, além de propriedades imunomoduladoras (Martins et al., 2014). A utilização de CDs oferece um arcabouço natural e biocompatível que serve como um substrato para adesão, proliferação e diferenciação celular, minimizando o risco de rejeição imunológica e permitindo a reconstrução tecidual (Martins et al., 2020).

Os objetivos gerais deste trabalho foram avaliar o transplante lamelar anterior das CDs colonizadas com as OFSCs em olhos de coelhos portadores de insuficiência límbica. Especificamente, foram realizadas as seguintes etapas: isolamento, cultivo e criopreservação das OFSCs em meio de cultura suplementado com soro humano; descelularização das córneas humanas; colonização das matrizes descelularizadas com as OFSCs; indução e avaliação do desenvolvimento de LSCD em coelhos; avaliação da capacidade do transplante lamelar das CDs colonizadas com as OFSCs em reconstruir a superfície ocular no modelo animal de LSCD, verificando a segurança do procedimento e a existência de eventos adversos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do soro humano (SH)

O soro humano utilizado no estudo foi coletado de doadores voluntários com idades entre 21 e 35 anos, seguindo o método convencional de coleta de sangue a vácuo, utilizando tubos sem anticoagulante (Vacuplast). Todo o procedimento foi realizado em conformidade com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE: 02887512.6.0000.5149).

Após a coagulação espontânea do sangue, foi feita a centrifugação a 252 g, à temperatura ambiente, por 10 minutos, para separar o soro. O soro obtido de diferentes doadores foi então combinado, formando um *pool* de SH. Esse *pool* foi, posteriormente, submetido à inativação térmica a 56°C por 30 minutos e, em seguida, congelado a -20°C.

Isolamento e cultivo das OFSCs

O tecido adiposo foi obtido das bolsas de gordura da pálpebra superior removidas durante blefaroplastia de pacientes internados na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou na Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 02887512.6.0000.5149). Logo após a remoção da gordura, esta foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura DMEM sem soro.

Em capela de fluxo laminar, o tecido foi lavado em tampão fosfato salina 0,15M, pH 7,4 (PBS). A gordura

foi picotada e tratada com solução de colagenase tipo I 0,10% em PBS 0,15 M, por 1 hora, em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, para digestão da matriz extracelular. Durante esse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo a gordura foi agitado vigorosamente. Decorrido o período de 1 hora, a digestão foi interrompida pela adição de meio DMEM suplementado com 10% de SH. A seguir, o tubo foi centrifugado a 1400 rpm, por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo a fração celular foi ressuspenso em meio de cultura basal suplementado com SH e transferido para garrafas de cultura celular T-25 que foram mantidas em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ (Martins et al., 2014).

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,4, para remoção de células sanguíneas residuais e não aderentes, e em seguida foi adicionado novo meio de cultura basal. Quando as células atingiram 70-80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,4 e tratadas com 1 mL de tripsina 0,05% EDTA, por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal (10 mL), a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura celular T-75 e acrescentado mais meio de cultura basal. As células foram expandidas, dessa maneira, até a 2ª passagem, quando foram congeladas.

Criopreservação e descongelamento das OFSCs

Para a criopreservação, as culturas de OFSCs com aproximadamente 70% de confluência foram tripsinizadas e centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos. As células foram então ressuspendidas em meio de cultura basal, contadas, e transferidas para um meio de congelamento composto por 50% de meio DMEM, 40% de soro humano (SH) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Este meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm. Aliquotas de 1 mL, contendo 1×10^6 células, foram acondicionadas em tubos criogênicos devidamente identificados.

Os tubos foram colocados em rack contendo isopropanol e transferidos para -80 °C. O isopropanol permite um congelamento lento, o que é crucial para prevenir a formação de cristais de gelo no interior das células, minimizando danos celulares. No dia seguinte, os tubos foram transferidos para o nitrogênio líquido, onde permaneceram estocados até o momento do uso.

Para o descongelamento, os criotubos foram rapidamente retirados do nitrogênio líquido e imersos em banho-maria a 37 °C para um descongelamento rápido. Subsequentemente, as células foram transferidas para tubos de polietileno contendo 10 mL de meio de cultura basal e centrifugadas a 1400 rpm



por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado celular foi ressuspensão no meio de cultura basal e transferido para garrafas de cultura celular T-75, as quais foram mantidas em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Descelularização de córneas humanas

Para este estudo, foram utilizadas córneas humanas oriundas de botões corneoesclerais, os quais estavam preservados em meio Optisol GS (Bausch e Lomb) e foram considerados inviáveis para transplante. Essa inviabilidade decorreu de fatores como tempo de preservação prolongado ou baixa contagem celular. O material foi obtido junto ao Banco de Tecidos Oculares Humanos do MG Transplantes/Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (Fhemig), em conformidade com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, sob o CAAE: 49967715.0.0000.5149. A faixa etária dos doadores variou de 29 a 69 anos.

O protocolo de descelularização foi iniciado com a remoção do excesso de esclera dos botões corneoesclerais. Subsequentemente, as córneas foram incubadas em uma solução de NaCl 1,5 M por um período de 48 horas. A etapa seguinte consistiu no tratamento das córneas com 5U/mL de DNase e 150 µg/mL de RNase (Invitrogen), por 48 horas, a uma temperatura de 37°C. Posteriormente, as córneas foram submetidas a uma lavagem com PBS por 72 horas (Martins et al., 2020). Todos os procedimentos foram conduzidos sob agitação contínua e à temperatura ambiente, com exceção do tratamento com nucleases, que foi realizado sob temperatura controlada.

Colonização das CDs com as OFSCs

Previamente à recelularização, as CDs foram incubadas em meio DMEM/F12 (Gibco) contendo 100 unidades/mL de PSA e 60 mg/L de gentamicina em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. No dia seguinte, as OFSCs foram semeadas sobre a membrana basal das CDs na densidade de 1×10^4 células por CD. As células foram mantidas em cultivo com meio de cultura basal por 7 dias.

A avaliação da adesão, viabilidade, morfologia e distribuição das OFSCs cultivadas sobre a membrana basal das CDs foi realizada após 7 dias por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e do ensaio de Calceína-AM (Calcein Acetoxymethyl ester).

Para o ensaio de Calceína-AM, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos em estufa (37°C, 5% CO₂) com 5 µM de Calceína-AM (Invitrogen) em meio basal sem soro. A Calceína-AM é um composto não fluorescente que, ao ser hidrolisado por esterases intracelulares em células viáveis, se torna fluorescente e impermeável à

membrana, permitindo a detecção de células vivas. As amostras foram visualizadas em Microscópio Confocal (Zeiss 5 Live).

Para análises por MEV, as CDs colonizadas com as OFSCs foram fixadas em solução de Karnovsky: glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, overnight a 4°C. Em seguida, as córneas foram lavadas em tampão fosfato (3 vezes/5 minutos) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato por 2 horas a 4°C. Após lavagens com água destilada (3 vezes/10 minutos), as amostras foram desidratadas em uma série ascendente de etanol: 30 - 50 - 70 - 80 - 95% (2 vezes/10 minutos cada) e, por fim, em álcool absoluto (3 vezes/10 minutos). Finalizada a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO₂ (Balzers, CPD-020). A seguir, as amostras foram montadas em suporte de alumínio padrão e submetidas ao processo de metalização em ouro (Edwards Scancoat six). As imagens foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200 FEG) do Centro de Microscopia da UFMG.

Desenvolvimento do modelo animal de LSCD e transplante lamelar anterior

O estudo *in vivo* foi realizado nas instalações do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, empregando coelhos Nova Zelândia albinos provenientes da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa-UFMG, em Igarapé, Brasil. A utilização dos animais seguiu as normas aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo número 9/2018.

A LSCD foi induzida no olho direito de três coelhos, machos, pesando entre 2,0 a 2,5 kg, por meio de desbridamento mecânico da superfície ocular utilizando o instrumento Alger Brush II, conforme protocolo estabelecido por Li et al. (2016) A anestesia para a indução da LSCD foi administrada via intramuscular (cetamina 35 mg/Kg + xilazina 5 mg/Kg + acepromazina 0,75 mg/Kg) e topicamente (cloridrato de proparacaína 0,5%).

Após intervalo de um mês, que permitiu a manifestação da LSCD, dois coelhos foram submetidos ao transplante lamelar das CDs previamente colonizadas com as OFSCs. Um coelho não foi transplantado, sendo o controle.

Durante todo período, antibióticos tópicos foram administrados conforme as recomendações protocolares. Após o transplante lamelar, os animais receberam cuidados pós-operatórios que incluíram analgesia (cetoprofeno 2mg/kg, subcutâneo, a cada 24 horas nos primeiros dois dias), hidratação perioperatória (solução glicosalina 2 ml/Kg/hora), e medicação ocular tópica (moxifloxacina 0,5% e cloridrato de dexametasona 0,1% 3x/dia por 90 dias).

Decorridos 90 dias do pós-operatório, os coelhos foram eutanasiados com pentobarbital (150 mg/kg) via intravenosa e foi feita a coleta dos bulbos oculares.

Análises histológicas

Após 3 meses do transplante, os coelhos foram eutanasiados, e o bulbo ocular enucleado foi fixado com paraformaldeído tamponado 4%. Para a preparação das amostras para análise histológica, o tecido foi submetido a uma fase de desidratação por imersão em séries crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto I, II e III) por 30 minutos em cada banho. Em seguida, foi realizada a diafanização por meio da imersão das amostras em três banhos de xilol por 20 minutos em cada.

Após a diafanização, seguiu-se a fase de infiltração, com imersão das amostras em três banhos de parafina a 58°C por 20 minutos em cada banho. Finalmente, foi feita a inclusão em parafina. Cortes de 7 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas e submetidos às colorações de hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram observados e fotografados ao microscópio de luz (Olympus BX-41/câmera digital colorida Q-Color3 da QImaging).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento, cultivo e criopreservação das OFSCs

O processo de isolamento das OFSCs começou com o processamento enzimático do tecido adiposo palpebral. Inicialmente, essa etapa resultou em uma população celular mista, contendo tanto células aderentes de morfologia fibroblastoide quanto células não aderentes e arredondadas. Com as trocas sucessivas do meio de cultura e expansão celular, as células não aderentes foram gradualmente eliminadas. A partir da segunda passagem, obteve-se uma população homogênea de células aderentes, com a típica morfologia fibroblastoide, demonstrando potencial de autorrenovação e capacidade de formar colônias. Essas células foram então criopreservadas e, após o descongelamento, observou-se que não houve alteração em sua morfologia (Figura 1). A manutenção da morfologia e viabilidade após criopreservação é um achado significativo, pois a preservação a longo prazo é crucial para aplicações clínicas.

Em trabalhos anteriores pioneiros no Brasil, nosso grupo de pesquisa isolou e caracterizou com sucesso as OFSCs (Martins et al., 2014), bem como colonizou córneas descelularizadas com essas células (Martins et al. 2022). Entretanto, nestes estudos prévios, não foi realizada a criopreservação das OFSCs e há uma escassez de estudos envolvendo esse tipo celular, apesar da sua potencialidade clínica.

Diversos métodos e meios de congelamento foram desenvolvidos para criopreservação das MSCs de diferentes fontes, com exceção das OFSCs (Crowley

et al., 2021; Gonda et al., 2008; Marquez-Curtis et al., 2015; Yong et al., 2015). No entanto, os meios de congelamento utilizados apresentam limitações e ainda não há protocolo seguro e padronizado para a criopreservação das MSCs. No presente trabalho, a fim de evitar o uso de componentes xenogênicos, nós propomos a utilização do soro humano, em substituição do soro fetal bovino comumente utilizado nos meios de congelamento celular.

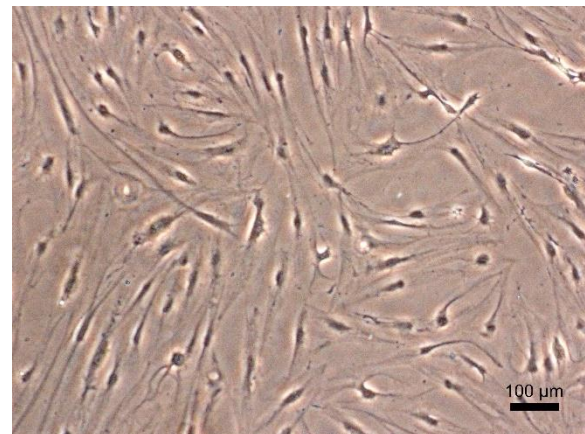


Figura 1. Fotomicrografia demonstrando aspecto morfológico das células-tronco das bolsas de gordura da pálpebra humana após o processo de criopreservação. As células mativeram a capacidade de aderência à superfície plástica e morfologia fusiforme típica. Barra = 100 µm. Imagem representativa de n = 3.

Colonização das CDs com as OFSCs

As córneas humanas foram descelularizadas utilizando protocolo previamente padronizado pelo nosso grupo de pesquisa. A eficácia da remoção dos componentes celulares e a caracterização da matriz descelularizada obtida por este protocolo foram previamente publicadas pelo nosso grupo de pesquisa (Martins et al., 2020).

Os resultados da colonização da membrana basal das CDs com as OFSCs descongeladas foram promissores. O ensaio de Calceína-AM demonstrou que as OFSCs foram capazes de aderir à matriz descelularizada e permaneceram viáveis após 7 dias de cultivo (Figura 2). A viabilidade celular foi evidenciada pela emissão de fluorescência verde resultante da metabolização do composto. Tal resultado comprova a biocompatibilidade da matriz descelularizada desenvolvida. Tais resultados sugerem que as OFSCs possam ser uma fonte promissora de células autólogas para reconstrução da superfície ocular.

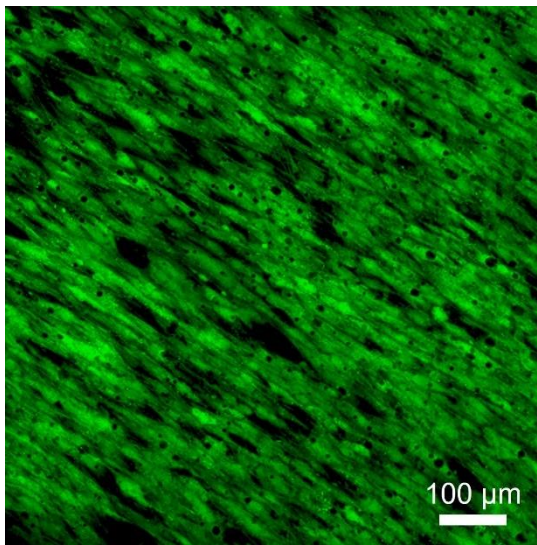


Figura 2. Viabilidade e morfologia das OFSCs cultivadas sobre a membrana basal das CDs. Imagens de microscopia confocal, verde: calceína-AM. Barra = 100 µm. Imagem representativa de n = 3.

Análises das micrografias eletrônicas de varredura complementaram esses achados, confirmando que as células estavam bem aderidas e distribuídas uniformemente pela superfície da membrana basal das CDs (Figura 3). Essa adesão celular e distribuição homogênea são fundamentais para a formação de um tecido de revestimento funcional e para o sucesso de um futuro transplante. A capacidade das OFSCs de colonizar eficientemente as CDs sugere que essa combinação pode servir como um excelente arcabouço para a reconstrução da superfície ocular.

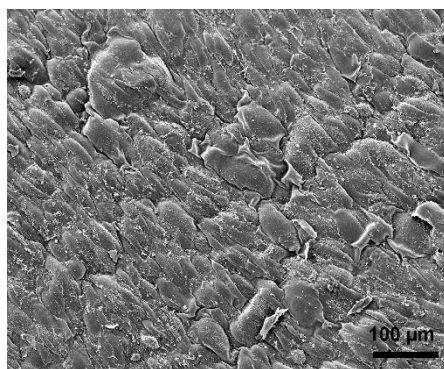


Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura das OFSCs aderidas à membrana basal das CDs, evidenciando a morfologia celular e distribuição homogênea. Barra = 100 µm. Imagem representativa de n = 3.

Análises histológicas pós-transplante

Todos os animais mantiveram-se clinicamente saudáveis, sem perda de peso, ao longo de todo período experimental.

Foram realizadas análises histológicas preliminares, 3 meses após o transplante das CDs colonizadas com as OFSCs em coelhos com insuficiência límbica. Por meio das colorações com hematoxilina e eosina, foi possível observar a integração das lamelas anteriores das CDs aos tecidos adjacentes. Essa integração é um sinal positivo de biocompatibilidade e de sucesso do procedimento de implante (Figura 4).

Foi notável a ausência de focos necróticos tanto na região do implante quanto nos tecidos adjacentes, o que indica tolerância satisfatória do organismo do hospedeiro ao material transplantado e ao procedimento. Os tecidos adjacentes ao local do transplante permaneceram íntegros, reforçando a segurança do procedimento e a ausência de eventos adversos significativos de rejeição ou inflamação exacerbada.

Um achado importante foi a migração de células do hospedeiro para o interior do estroma das lamelas descelularizadas. Essa migração de células nativas para o arcabouço transplantado indica a biocompatibilidade do mesmo e contribui para a remodelação tecidual. Adicionalmente, foi observado que a superfície das lamelas implantadas foi recoberta por epitélio estratificado simples pavimentoso não queratinizado. A reepitelização da córnea é um objetivo crítico no tratamento da LSCD, e a formação de um epitélio não queratinizado é essencial para a manutenção da transparência e função visual da córnea. Esses resultados alinham-se com pesquisas que utilizam matrizes descelularizadas como arcabouço para engenharia tecidual corneana, demonstrando seu potencial na reconstrução do segmento anterior da córnea e do limbo (Fu et al, 2010; Shafiq et al, 2012).

O uso de OFSCs em CDs pode contribuir para a reepitelização, potencialmente devido às propriedades parácrinas das células tronco derivadas de tecido adiposo. Sikora et al. (2021) relataram que células-tronco derivadas de tecido adiposo promovem a proliferação das células-tronco límbicas, além de mitigarem o impacto deletério causado por processos inflamatórios.

Transplante – CDs + OFSCs

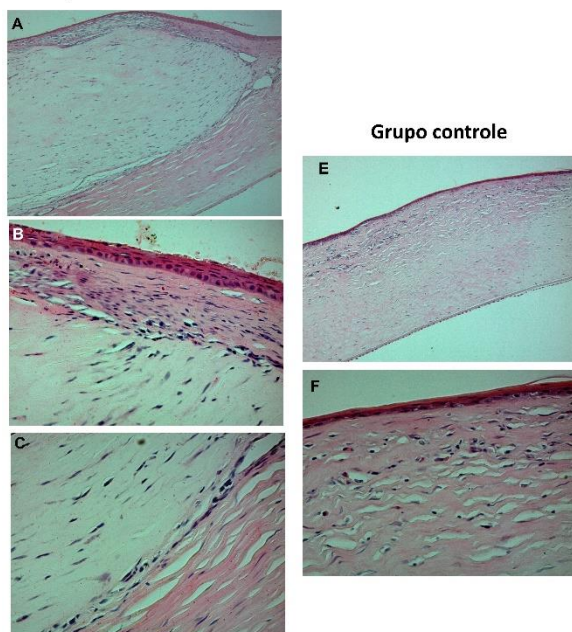


Figura 4. Fotomicrografias dos cortes histológicos das córneas dos coelhos recuperadas após 3 meses do transplante lamelar das CDs colonizadas com as OFSCs corados com hematoxilina e eosina (A-C).

Cortes histológicos das córneas dos coelhos controles, que não receberam o transplante (E, F). Aumento 10X (A, E). Aumento 40X (B, C, F).

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a viabilidade e o potencial terapêutico das OFSCs em combinação com CDs na reconstrução da superfície ocular em um modelo animal de insuficiência límbica.

O protocolo de criopreservação e descongelamento das OFSCs foi eficaz, garantindo a manutenção da morfologia e viabilidade celular após o processo de descongelamento. As OFSCs demonstraram excelente capacidade de adesão e distribuição homogênea sobre a membrana basal das CDs, estabelecendo um constructo promissor. Finalmente, as análises histológicas pós-transplante revelaram a integração bem-sucedida das lamelas descelularizadas aos tecidos do hospedeiro e ausência de necrose. Ademais, verificou-se a migração de células do hospedeiro para o implante e, crucialmente, a formação de um epitélio estratificado não queratinizado sobre a superfície implantada.

Esses resultados preliminares são encorajadores e sugerem que o transplante lamelar anterior de córneas descelularizadas colonizadas com OFSCs pode ser uma estratégia segura e eficaz para a reconstrução da superfície ocular em casos de LSCD, justificando a importância de pesquisas mais aprofundadas, as quais podem abrir caminho para futuras investigações clínicas.

AGRADECIMENTOS

CNPq (Processos: 407867/2023-6, 152272/2022-4). CAPES. Centro de Microscopia da UFMG. Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI – UFMG. Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa-UFMG.

REFERÊNCIAS

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

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

Crowley, C. A.; Smith, W. P. W.; Seah, K. T. M.; Lim, S. K., & Khan, W. S. Cryopreservation of Human Adipose Tissues and Adipose-Derived Stem Cells with DMSO and/or Trehalose: A Systematic Review. *Cells*, 10(7), 1837, 2021.

Dua, H. S.; Azuara-Blanco, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*, v. 44, n. 5, p. 415–425, 2000.

Fu, Y.; Fan, X.; Chen, P.; Shao, C.; Lu, W. Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold. *Cells Tissues Organs*, v. 191, n. 3, p. 193–202, 2010.

Gonda, K.; Shigeura, T.; Sato, T.; Matsumoto, D.; Suga, H.; Inoue, K.; Aoi, N.; Kato, H.; Sato, K.; Murase, S.; Koshima, I.; Yoshimura, K. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 121, n. 2, p. 401–410, 2008.

Li, F. J.; Nili, E.; Lau, C.; Richardson, N. A.; Walshe, J.; Barnett, N. L.; Cronin, B. G.; Hirst, L. W.; Schwab, I. R.; Chirila, T. V.; Harkin, D. G. Evaluation of the AlgerBrush II rotating burr as a tool for inducing ocular surface failure in the New Zealand White rabbit. *Experimental Eye Research*, v. 147, p. 1–11, 2016. doi:10.1016/j.exer.2016.04.005

Kiritoshi, S.; Oie, Y.; Nampei, K.; Hayashi, R.; Nishida, K. Anterior segment optical coherence tomography angiography in patients following cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *American Journal of Ophthalmology*, v. 208, p. 242–250, 2019.

Marquez-Curtis, L. A.; Janowska-Wieczorek, A.; McGann, L. E., & Elliott, J. A. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, 71(2), 181–197, 2015.



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

Martins, T. M. M.; da Silva Cunha, P.; Rodrigues, M. A.; Gomes, D. A.; de Goes, A. M. Epithelial basement membrane of human decellularized cornea as a suitable substrate for differentiation of embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells. *Materials Science and Engineering: C*, v. 116, 111215, 2020.

Martins, T. M. M.; de Carvalho, J. L.; da Silva Cunha, P.; Gomes, D. A.; de Goes, A. M. Induction of corneal epithelial differentiation of induced pluripotent and orbital fat-derived stem cells seeded on decellularized human corneas. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 18, n. 7, p. 2522–2534, 2022.

Nguyen, K. N.; Bobba, S.; Richardson, A.; Park, M.; Watson, S. L.; Wakefield, D.; Di Girolamo, N. Native and synthetic scaffolds for limbal epithelial stem cell transplantation. *Acta Biomaterialia*, v. 65, p. 21–35, 2018.

Oliva, J.; Bardag-Gorce, F.; Niihara, Y. Clinical trials of limbal stem cell deficiency treated with oral mucosal epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 2, 411, 2020.

Rahman, I.; Said, D. G.; Maharajan, V. S.; Dua, H. S. Amniotic membrane in ophthalmology: indications and limitations. *Eye*, v. 23, n. 10, p. 1954–1961, 2009.

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

Sharma, S. M.; Fuchsluger, T.; Ahmad, S.; Katikireddy, K. R.; Armant, M.; Dana, R.; Jurkunas, U. V. Comparative analysis of human-derived feeder layers with 3T3 fibroblasts for the ex vivo expansion of human limbal and oral epithelium. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 8, n. 3, p. 606–705, 2012.

Shortt, A. J.; Secker, G. A.; Notara, M. D.; Limb, G. A.; Khaw, P. T.; Tuft, S. J.; Daniels, J. T. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Survey of Ophthalmology*, v. 52, n. 5, p. 483–502, 2007.

Sikora, B.; Skubis-Sikora, A.; Prusek, A.; Gola, J. Paracrine activity of adipose-derived stem cells on limbal epithelial stem cells. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 19956, 2021.

Yazdanpanah, G.; Haq, Z.; Kang, K.; Jabbehdari, S.; Rosenblatt, M. I.; Djalilian, A. R. Strategies for reconstructing the limbal stem cell niche. *The Ocular Surface*, v. 17, n. 2, p. 230–240, 2019.

Yong, K. W., Wan Safwani, W. K., Xu, F., Wan Abas, W. A., Choi, J. R., & Pingguan-Murphy, B. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. *Biopreservation and biobanking*, 13(4), 231–239, 2015.