

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Geovana de Carvalho Onorato

Desenvolvimento de método de criopreservação de córneas para potencial aplicação em teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP)

Juiz de Fora

2021

Geovana de Carvalho Onorato

Desenvolvimento de método de criopreservação de córneas para potencial aplicação em teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP)

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dra. Michele Munk Pereira

Coorientador: Dr. Humberto de Mello Brandão

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Onorato, Geovana de Carvalho.
Desenvolvimento de método de criopreservação de córnea bovina / Geovana de Carvalho Onorato. -- 2021.
77 f. : il.

Orientadora: Michele Munk Pereira
Coorientador: Humberto de Mello Brandão
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2021.

1. BCOP. 2. Criopreservação. 3. Crioprotetores. 4. Córneas bovinas. I. Pereira, Michele Munk , orient. II. Brandão, Humberto de Mello, coorient. III. Título.

Geovana de Carvalho Onorato

Desenvolvimento de método de criopreservação de córneas para potencial aplicação em teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP)

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em
Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética e
Biotecnologia.

Aprovada em 25 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Orientador

Prof.^a Dr.^a Michele Munk Pereira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Coorientador

Dr. Humberto de Mello Brandão
Embrapa

Dra. Naiara Zoccal Saraiva

Embrapa

Prof. Dr. Janildo Ludolf Reis Júnior

Juiz de Fora, 03/11/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Naiara Zoccal Saraiva, Usuário Externo**, em 25/11/2021, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto de Mello Brandão, Usuário Externo**, em 25/11/2021, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janildo Ludolf Reis Junior, Professor(a)**, em 26/11/2021, às 05:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 29/11/2021, às 07:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Firmino da Silva Neto, Professor(a)**, em 09/01/2022, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0560023** e o código CRC **4DD7D684**.

Dedico este trabalho aqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele eu não teria sido capaz e não teria tido a força suficiente para superar cada obstáculo e desafio que surgiu ao longo desta caminhada.

À Universidade Federal de Juiz de Fora por ter me acolhido e guiado meu desenvolvimento profissional com incríveis professores que conheci.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e todo o seu corpo docente, discente e administrativo por me receber de braços abertos, por todo o companheirismo e suporte ao longo do curso.

Agradeço às empresas de fomento à pesquisa FAPEMIG, CAPES, CNPq, REDE AGRONANO que proporcionaram e possibilitam minha dedicação total a este projeto.

À banca, pela disponibilidade, atenção e contribuição ao trabalho em todas as suas fases de desenvolvimento.

Ao Humberto, Embrapa e colaboradores que permitiram a realização deste trabalho por meio da brilhante parceria, por ter disponibilizado equipamentos necessários a realização desta pesquisa, por todo aprendizado, discussões engrandecedoras e apoio em cada etapa.

À Fripai Alimentos, que abriu as portas e foi solicitada durante todo o projeto.

Aos parceiros de laboratório, e aqui uma menção especial à Leonara, que sempre estenderam a mão sem pedir nada em troca, pela amizade, pela paciência e compreensão.

À Michele pela orientação, pelos conselhos, pela grande paciência e compreensão, por todo suporte, dedicação e carinho ao longo deste período conturbado e fizeram com que eu prosperasse e crescesse como pesquisadora e aluna.

À minha família que foi meu suporte, que teve paciência com minhas ausências e jamais deixou de me incentivar na busca pelos meus sonhos e almejos profissionais. Obrigada a todos vocês.

Agradeço também a cada um que contribuiu direta ou indiretamente para realização desta pesquisa, pelo companheirismo, confiança e por terem acreditado que eu chegaria até aqui.

E a mim mesma, provando que sou capaz de buscar sempre mais. Gratidão!

RESUMO

Atualmente, ensaios biológicos devem ser utilizados para avaliação da segurança para a saúde de produtos antes de irem para o mercado. O teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina (BCOP) é um método alternativo ao uso de animais que utiliza córneas bovinas frescas para avaliar o potencial irritante e corrosivo de qualquer substância em nível ocular. A necessidade de sempre ter que usar córneas viáveis faz com que o escalonamento deste teste seja mais difícil. Para superar esse desafio, a criopreservação de córneas pode ser uma possibilidade para se ter bancos de córneas disponíveis em qualquer momento. Apesar do sucesso obtido no congelamento de córneas humanas, o processo de congelamento pode causar danos ao endotélio e em bovinos não são conhecidos protocolos eficientes para esse fim. O objetivo desse trabalho é desenvolver um método de criopreservação de córneas bovinas para aplicação no teste de BCOP. Inicialmente, as córneas foram criopreservadas em meio DMEM com os crioprotetores (CPA) dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG), em combinações com dois adjuvantes, albumina sérica bovina (BSA) e soro bovino (SB). O controle foi feito a partir de córneas frescas e córneas criopreservadas com DMEM e adjuvante. O ensaio de intumescência foi feito para verificar a resistência do endotélio aos CPAs. Posteriormente, elas foram congeladas em duas temperaturas: -20°C e -80°C . Após congelamento, foi realizada a análise macroscópica da opacidade corneana e viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de tripan (AT). A área celular do endotélio e a morfologia das células foram avaliadas a partir de coloração com vermelho de alizarina (VA). Além disso, cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina foram realizados para avaliar a integridade das diferentes camadas da córnea após a aplicação dos métodos de criopreservação estudados. Os dados de intumescência e viabilidade celular foram avaliados através de modelos lineares seguindo o critério de Akaike (AICc) e valores de R^2 ($R^2 = 1 - \text{erro relativo}$). Os resultados revelaram que as córneas só tiveram aumento de peso, significando um dano à camada endotelial, depois de 6 horas em contato com os CPAs ($p < 0,05$). Os tratamentos com CPAs foram diferentes do controle ($p < 0,05$) e os diferentes adjuvantes mantiveram o peso estabilizado, apresentaram diferença entre si ($p < 0,05$). O SB, que possui BSA em sua composição além de outras proteínas benéficas a criopreservação, foi escolhido como adjuvante

para prosseguir o congelamento. A análise macroscópica revelou que o DMSO apresentou melhor transparência corneal. A viabilidade celular endotelial foi maior no tratamento controle, seguido por DMSO e EG, em ambas as temperaturas de congelamento. O congelamento em -20°C teve melhor resposta quando comparada ao -80°C na viabilidade após criopreservação. Os danos do tratamento EG são evidenciados na análise morfológica e nas análises histológicas. Assim, os dados sugerem que o DMSO no congelamento tem potencial para a criopreservação de córneas bovinas, pois apresentou os melhores resultados nos parâmetros avaliados no presente trabalho. Adicionalmente, o congelamento em -20°C demonstrou potencial uso para a manutenção de córneas bovinas, com a vantagem de facilitar o armazenamento desses materiais em refrigeradores comuns.

Palavras-chave: BCOP; criopreservação; crioprotetores; córneas bovinas.

ABSTRACT

Currently, biological assays must be used to assess the health safety of products before they go to market. The Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP) is an alternative method to the use of animals that uses fresh bovine corneas to assess the irritant and corrosive potential of any substance at the ocular level. The need to always have to use viable corneas makes scaling this test more difficult. To overcome this challenge, corneal cryopreservation can be a possibility to have corneal banks available at any time. Despite the success obtained in the freezing of human corneas, the freezing process can damage the endothelium and efficient protocols for this purpose are not known in cattle. This work aims to develop a method of cryopreservation of bovine corneas for application in the BCOP test. Initially, the corneas were cryopreserved in DMEM with cryoprotectants (CPA) dimethylsulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG), in combinations with two adjuvants, bovine serum albumin (BSA) and bovine serum (SB). The control was made from fresh corneas and corneas cryopreserved with DMEM and adjuvant. The tumescence test was performed to verify the resistance of the endothelium to CPAs. Afterwards, they were frozen at two temperatures: -20°C and -80°C . After freezing, macroscopic analysis of corneal opacity and cell viability was performed using the trypan blue (AT) exclusion method. Endothelial cell area and cell morphology were assessed by staining with alizarin red (VA). Furthermore, histological sections stained with hematoxylin and eosin were performed to assess the integrity of the different layers of the cornea after the application of the studied cryopreservation methods. The tumescence and cell viability data were evaluated using linear models following the Akaike criterion (AICc) and R^2 values ($R^2 = 1 - \text{relative error}$). The results revealed that the corneas only increased in weight, meaning damage to the endothelial layer, after 6 hours in contact with the CPAs ($p < 0.05$). Treatments with CPAs were different from the control ($p < 0.05$) and the different adjuvants kept the weight stabilized, differing from each other ($p < 0.05$). SB, which has BSA in its composition in addition to other proteins beneficial to cryopreservation, was chosen as an adjuvant to continue freezing. Macroscopic analysis revealed that DMSO had better corneal transparency. Endothelial cell viability

was higher in the control treatment, followed by DMSO and EG, at both freezing temperatures. Freezing at -20°C had a better response when compared to -80°C for viability after cryopreservation. The damages of the EG treatment are evidenced in the morphological analysis and in the histological analyses. Thus, the data suggest that freezing DMSO has potential for the cryopreservation of bovine corneas, as it showed the best results in the parameters evaluated in the present work. Additionally, freezing at -20°C showed potential use for the maintenance of bovine corneas, with the advantage of facilitating the storage of these materials in common refrigerators.

Keywords: BCOP. Cryopreservation. Cryoprotectants. Bovine corneas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelos alternativos com valores de R ² e AICc.....	40
Tabela 2 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento em aspectos do superficiais do epitélio corneano e de pseudo paraqueratinização.....	59
Tabela 3 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento em aspectos basais do epitélio corneano.....	60
Tabela 4 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento em aspectos do estroma corneano.....	61
Tabela 5 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento em aspectos do endotélio corneano.....	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de implantação dos métodos alternativos	23
Gráfico 1 – Representação esquemática das células em processo de congelamento	27
Figura 2 – Eventos físicos e crioinjúria durante congelamento e descongelamento .	29
Figura 3 – Fluxograma experimental mostrando os crioprotetores e suas concentrações	34
Figura 4 – Modelo linear de tendência do peso de córneas bovinas ao longo do tempo após exposição à CPAs	41
Gráfico 2 – Curvas de peso das córneas bovinas ao longo do tempo após exposição à CPAs	42
Figura 5 – Córneas frescas (A; B) e córneas após o processo de congelamento e descongelamento no freezer -20°C, mostrando os tratamentos controle positivo (C; D), DMSO (E; F) e EG (G; H).	43
Figura 6 – Córneas frescas (A; B) e córneas após o processo de congelamento e descongelamento no freezer -80°C, mostrando os tratamentos controle positivo (C; D), DMSO (E; F) e EG (G; H).	44
Gráfico 3 – Porcentagem do grau de opacidade das córneas de cada tratamento após congelamento. (A) Congelamento em freezer -20°C. (B) Congelamento em freezer -80°C	45
Figura 7 – Córnea fresca corada com AT (A) e córneas após o processo de congelamento e descongelamento coradas com o AT no freezer -20°C, com os tratamentos controle(B), DMSO (D) e EG (F), e freezer -80°C, com controle (C), DMSO (E) e EG (G).	46
Gráfico 4 – Médias de células viáveis após processo de criopreservação.....	47
Letras diferentes representam diferença estatística (p<0,05). **p<0,01. ***p<0,001.	47
Gráfico 5 – Média de área celular do endotélio corneano após processo de criopreservação. Letras diferentes representam diferença estatística (p<0,05).	48
Figura 8 – Micrografias do endotélio corneano corado com AT e VA após congelamento em freezer -20°C. (A-B) córneas frescas; (C-D) controle; (E-F) DMSO; (G-H) EG	49

Figura 9 – Micrografias do endotélio corneano corado com AT e VA após congelamento em freezer -80 °C. (A-B) córneas frescas; (C-D) controle; (E-F) DMSO; (G-H) EG	50
Figura 10 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento Controle do congelamento em freezer -20°C. (A-B) córneas frescas; (C-H) controle.....	52
Figura 11 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento Controle do congelamento em freezer -80 °C. (A-B) córneas frescas; (C-H) controle.....	53
Figura 12 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento DMSO do congelamento em freezer -20 °C. (A-B) córneas frescas; (C-H) DMSO.....	54
Figura 13 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento DMSO do congelamento em freezer -80 °C. (A-B) córneas frescas; (C-H) DMSO.....	55
Figura 14 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento EG do congelamento em freezer -20°C. (A-B) córneas frescas; (C-H) EG.	57
Figura 15 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento EG do congelamento em freezer -80°C. (A-B) córneas frescas; (C-H) EG.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AICc	<i>Akaike Information Criterion</i>
AT	Azul de tripan
BCOP	<i>Bovine Corneal Opacity and Permeability</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPAs	Agentes Crioprotetores
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
HE	Hematoxilina-eosina
I-PVP	Iodopolividona
M	Molar
MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
mm	Milímetros
mOsm	Miliosmol
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PI	Iodeto de Propídeo
PLC	Projeto de Lei Complementar
PVP	Polivinilpirrolidona
SB	Soro Bovino
SFB	Soro Fetal Bovino
µm	Micrômetros
VA	Vermelho de alizarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 HIPÓTESE	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1 MÉTODOS ALTERNATIVOS A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	22
4.2 CRIOPRESERVAÇÃO	24
4.2.1 Crioprotetores.....	24
4.2.2 Técnicas de criopreservação.....	26
4.2.3 Crioinjúria	28
4.3 PRESERVAÇÃO DE CÓRNEAS	30
4.3.1 Preservação à frio (Hipotermia).....	30
4.3.2 Organocultura.....	31
4.3.3 Criopreservação	32
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 COLETA DAS CÓRNEAS BOVINAS	34
5.2 ENSAIO DE INTUMESCÊNCIA	35
5.3 CONGELAMENTO DAS CÓRNEAS.....	36
5.4 DESCONGELAMENTO DA CÓRNEA.....	36
5.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA	37
5.6 TESTE DE VIABILIDADE ENDOTELIAL	37
5.7 AVALIAÇÃO DA ÁREA E MORFOLOGIA CELULAR.....	37
5.8 HISTOLOGIA.....	38
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6 RESULTADOS	40
6.1 ENSAIO DE INTUMESCÊNCIA	40
6.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA	42

6.3 TESTE DE VIABILIDADE ENDOTELIAL	45
6.4 MORFOLOGIA CELULAR	48
6.5 HISTOLOGIA.....	51
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos destinados ao uso humano, como medicamentos e cosméticos, possui uma criteriosa fase de testes que certificam a segurança para a utilização humana e quaisquer efeitos adversos que podem estar associados com tais produtos. Porém, por muitos anos, grande parte desses testes foram feitos utilizando animais, como ratos, coelhos e cães. William Russel e Rex Burch, em parceria com Charles Westley Hume, expressaram já em 1959 sua preocupação com uso de animais na experimentação, dando origem à expressão 3Rs da pesquisa com animais na obra "*The Principles of Humane Experimental Technique*" (RUSSEL & BURCH & HUME, 1959).

Os 3Rs são abreviados das palavras inglesas *replacement*, *reduction* e *refinement*, que significam substituição, redução e refinamento, respectivamente. Esses princípios incentivam a substituição de animais para experimentos, quando possível; a redução do número de animais usados para a pesquisa desenvolvida; e o refinamento do experimento para evitar desconfortos desnecessários dos animais em experimentação (BEEKHUIJZEN, 2017). Os testes causam, muitas vezes, sofrimento aos animais, além de apresentar divergências no que tange a ensaios laboratoriais e clínicos (ROBINSON *et al.*, 2019). Adicionalmente, a validade preditiva desses testes tem sido questionada devido as diferenças biológicas e/ou fisiológicas entre humanos e animais de experimentação (VAN, 2019). Esses fatores incentivam o desenvolvimento de testes *in vitro* que possam ser mais eficientes e eficazes que os já estabelecidos *in vivo*.

A partir do desenvolvimento de testes *in vitro*, abriu-se a possibilidade da não utilização de animais em testes toxicológicos. Toda a União Europeia já proibiu o uso de animais para testes em cosméticos e a comercialização de produtos que ainda possuem essa prática (EC–EUROPEAN COMMISSION *et al.*, 2013). Alguns países estão construindo legislações que irão fazer essa mesma proibição, e o Brasil é um deles, onde está tramitando no Congresso Nacional brasileiro um Projeto de Lei Complementar - PLC 70/2014 que proíbe o uso em pesquisas e testes para produção de cosméticos. Alguns estados brasileiros, como São Paulo, já possuem legislações próprias que proíbem o uso dos animais para testes de cosméticos desde 2014 (SÃO

PAULO, 2014). A resolução regulamentar de métodos alternativos de pesquisa vigente no momento é a resolução nº 35 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que objetiva o estabelecimento dos 3Rs em nível nacional (BRASIL, 2015). Essa resolução pode fomentar discussões sobre a restrição ao uso de animais em procedimentos de pesquisa em todo o Brasil.

Neste cenário, a ANVISA tem incentivado e internalizado métodos alternativos validados em substituição ao uso de animais. Dentre os métodos existentes, destaca-se o teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina (Bovine Corneal Opacity and Permeability, BCOP), guiado pela norma 437 da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), de 2017. Ele substitui o teste de olho de coelho de Draize classificado como padrão ouro, que é realizado *in vivo* (DRAIZE *et al.*, 1944). O BCOP é capaz de identificar os químicos, sejam substâncias ou misturas, que possuem o potencial de causar irritação ou danos aos olhos, associando o seu resultado com outros testes *in vitro* para a definição da classificação do potencial de irritação (OECD, 2017). Uma grande vantagem do BCOP é a possibilidade da obtenção da córnea bovina em abatedouros, pois animais que são considerados adequados para o consumo humano são também adequados para o uso no teste (OECD, 2017).

Há, porém, certa limitação na disponibilidade de córneas para o escalonamento do teste BCOP. As córneas usadas para este fim devem, preferencialmente, ser coletadas e usadas no mesmo dia, para não comprometer o resultado do teste (OECD, 2017). Assim, a execução do teste fica limitada pelo processo de obtenção da córnea, disponibilidade desse material e de pessoal qualificado para a extração, assim como o transporte desse material do local de abate do animal até onde será executada a análise, podendo influenciar o resultado do teste.

Técnicas de preservação de córneas humanas estão sendo desenvolvidas por muitos anos para resolver problemas de bancos de olhos para transplantes (KATZIN, 1947). Uma dessas técnicas é a criopreservação que consiste no princípio de que o material biológico, quando está a temperaturas criogênicas, ou seja, temperaturas em torno de -150°C (ELLIOT & WANG & FULLER, 2017), tem os processos biológicos e as reações químicas de degradação tecidual interrompidos, podendo manter o material criopreservado indefinidamente (JANG *et al.*, 2017). No entanto, os freezers -80°C , comumente utilizados nessa técnica, podem limitar o armazenamento de

córneas, devido ao alto custo do equipamento. Sendo, portanto, necessária a avaliação da eficiência de congelamento de córneas bovinas a temperatura de -20°C atingidas em freezers comuns.

Para que o processo de criopreservação seja bem-sucedido, alguns parâmetros são importantes. A formação de cristais de gelo pela água é um dos principais empecilhos no uso dessa técnica, pois esses cristais podem danificar as células do tecido, inviabilizando o tecido criopreservado (MAZUR, 1977). Para superá-lo, o controle da taxa de congelamento, da taxa de descongelamento e dos agentes crioprotetores (CPAs) são fundamentais (JANG *et al.*, 2017).

Em 1932, Gersh descreveu a técnica de Altmann com melhorias para fixação e congelamento de tecidos em geral. Desde então, diferentes metodologias para criopreservação foram desenvolvidas para córneas humanas e outros tecidos (CAPELLA *et al.*, 1965; ALVES *et al.*, 2011; FOX *et al.*, 2017). Porém, Vajta e Kuwayama (2006) destacam que os parâmetros a serem controlados podem ser altamente variáveis dependendo das espécies. Existem ainda estudos que sugerem que a córnea humana seja mais tolerante ao processo de congelamento que córneas de coelhos (ARMITAGE, 2009).

Dessa forma, entende-se que as técnicas de criopreservação que funcionam para córneas humanas e de coelhos podem ter uma eficiência distinta para córneas bovinas, visto que não há estudos com esse material. Portanto, é necessário o desenvolvimento de um método de preservação que mantenha as córneas bovinas viáveis para serem utilizadas no teste de BCOP quando necessário.

2 HIPÓTESE

A associação de crioprotetores, adjuvantes e temperatura de congelamento permite a criopreservação de córneas bovinas, mantendo sua viabilidade após o processo de congelamento e descongelamento, sem interferir na opacidade e permeabilidade corneana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de criopreservação de córneas bovinas que melhor mantenha as condições morfológicas de viabilidade celular encontradas em córneas frescas após o processo de congelamento e descongelamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar potenciais efeitos dos CPAs na absorção de solução aquosa por meio da intumescência em córneas bovinas;
- Analisar a transparência e a morfologia do tecido corneano após criopreservação;
- Avaliar a viabilidade celular do tecido corneano após criopreservação.
- Avaliar histologicamente córneas bovinas após criopreservação.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 MÉTODOS ALTERNATIVOS A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A relação entre o desenvolvimento social e econômico humano está diretamente ligado ao uso animal em seus mais variáveis cenários, desde alimentação até transporte e esportes. Ao longo dos anos, o uso se diversificou mais ainda, estendendo para uso em pesquisas. Diferentes animais como ratos, coelhos, peixes, hamsters, pássaros, anfíbios e primatas são usados para esse fim há muitos anos (DOKE & DHAWALE, 2015). Na área da toxicologia e teste de drogas, o uso de animais na experimentação sempre foi frequente para predizer efeitos de drogas e desenvolver novos métodos de tratamentos para determinadas doenças (RAM, 2019).

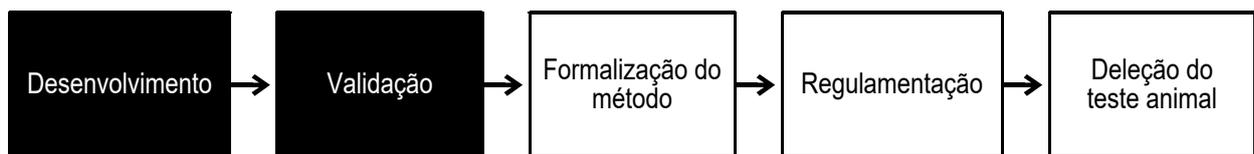
Por muitos anos, o uso de animais para pesquisa aumentou com o avanço das tecnologias, desenvolvimento de novas vacinas, antibióticos, componentes médicos, entre outros. Depois do experimento científico, comumente, o animal é eutanasiado para se obter as informações necessárias. Em alguns casos, dependendo da pergunta a ser respondida, o animal pode vir a morrer durante o andamento do experimento (DOKE & DHAWALE, 2015). Entendendo todo o sofrimento e dor que o animal passa durante os procedimentos e que ele possui o direito de estar vivo, muitas discussões começaram a surgir, principalmente ao final do século 19 no Reino Unido (LANE-PETTER, 1962).

Quando em 1959 criou-se o que seria conhecido mais tarde como os 3Rs da pesquisa animal por Russel e Burch, uma gama de trabalhos buscando métodos alternativos à experimentação animal começou a surgir. O parlamento europeu iniciou discussões sobre o uso animal em pesquisas em 1986, e o prospecto do seu banimento se tornou claro, incentivando as pesquisas na área (TAYLOR, 2019). Diversos protocolos foram desenvolvidos visando a substituição do uso animal em pesquisas, usando células em cultura, tecidos retirados de animais e humanos mortos, ou organismos inferiores, como pequenos invertebrados (DOKE & DHAWALE, 2015). Além dos aspectos éticos, outro motivo para a substituição do uso de animais como

modelos, consiste nas diferenças biológicas entre humanos e outros animais que pode levar a resultados equivocados nos testes toxicológicos (VAN NORMAN, 2019).

Para a substituição dos animais na experimentação, os métodos alternativos passam por um rigoroso processo de implantação com várias etapas (Figura 1). Cada etapa é revisada e refeita em cada setor de uso para garantir uma resposta uniforme a todas as substâncias testadas (TAYLOR, 2019). Um desses testes é o BCOP, que usa córneas bovinas de animais abatidos para consumo para atestar potencial toxicidade corrosiva de substâncias por meio da avaliação da opacidade e da permeabilidade corneana (OECD, 2017).

Figura 1 – Processo de implantação dos métodos alternativos



Fonte: Adaptado de Taylor (2019).

Um dos primeiros testes existentes para atestar a segurança de um produto para as vias oculares foi o teste de Draize (DRAIZE *et al.*, 1944). Esse teste é feito em olhos de coelhos, enquanto o animal ainda está vivo, colocando a substância nos olhos dos animais e monitorando-o por um período de 3 semanas (TAYLOR, 2019), se o animal não morrer antes. Além do procedimento infringir dor ao animal, os resultados podem ser questionados quanto a capacidade do endotélio corneano de coelhos ter a capacidade proliferativa e regenerativa muito alta, sendo mais resistentes à dano que os olhos humanos (TAYLOR, 1986; ARNALICH-MONTIEL *et al.*, 2019).

O protocolo BCOP foi publicado em 1992, buscando um modo de avaliar a toxicidade com medidas de opacidade, visto que é a consequência mais nociva da irritação que causa impedimento visual (GAUTHERON *et al.*, 1992). O teste teve boa correlação como teste Draize (DRAIZE *et al.*, 1944), usado na época. O BCOP passou

pelo processo completo de aceitação como método alternativo em 2009, ano em que foi publicado protocolo da OECD que seria atualizado em 2017 para o teste padrão hoje vigente na norma 437 (OECD, 2017). Esse teste é amplamente usado para atestar a segurança de produtos cosméticos, como shampoo, rímel e cremes hidratantes.

Em 2013, foi aprovado o banimento dos testes em animais para produtos cosméticos em toda a Europa (EC–EUROPEAN COMMISSION *et al.*, 2013). Com a proibição iminente no Brasil e o estabelecimento dos 3Rs em nível nacional (BRASIL, 2015), o BCOP torna-se importante no contexto nacional e sua demanda aumenta. Porém, não é prático de se obter um fluxo grande de córneas bovinas, devido a aspectos logísticos e custos de coletas diárias de córneas frescas. Portanto, o prospecto de uma maneira de manter estoque dessas córneas para uso imediato é benéfico ao mercado.

4.2 CRIOPRESERVAÇÃO

O conhecimento da possibilidade de preservação de tecidos biológicos com baixas temperaturas já é disseminado na sociedade há séculos. Por volta do século 19, as técnicas de criopreservação foram melhoradas com o uso de temperaturas ultrabaixas por gases comprimidos, como o nitrogênio líquido, que chega a -196°C (STACEY & DAY, 2007). Os avanços na área da criobiologia, que busca a criopreservação de materiais biológicos mantendo a sua viabilidade, se baseiam nos CPAs, em curvas de congelamento e descongelamento e temperatura de armazenamento (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

4.2.1 Crioprotetores

Em 1949, o glicerol foi descoberto como CPA, que auxiliou no entendimento do processo de congelamento e na formação de cristais de gelo (POLGE & SMITH & PARKES, 1949). Os CPA aumentam a viscosidade da solução aumentando a

concentração total de soluto, reduzindo a formação de gelo durante o congelamento pois forçam o efluxo de água da célula. Porém, esses agentes precisam ter baixa toxicidade para serem capazes de ser usados em alta concentração, se necessário, além de ser solúvel em água mesmo em baixa temperatura e ser capaz de penetrar células e tecidos (PEGG, 2015).

Os CPAs podem ser diferenciados em duas classes: os permeáveis à membrana plasmática e os não permeáveis. Entre os mais usados estão o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, propanodiol e etilenoglicol (EG), todos sendo permeáveis (JANG *et al.*, 2017). Enquanto os não permeáveis são açúcares, proteínas e polímeros, como, por exemplo, a sacarose, albumina sérica bovina (BSA) e polivinilpirrolidona (PVP), respectivamente (DIAZ-JIMENEZ *et al.*, 2018; SUDAGAR & KEIVANLOO & HAJIBEGLOU, 2018). De forma geral, os CPAs têm osmolaridade de aproximadamente 1500 miliosmol (mOsm) e as células têm 300 mOsm, induzindo as células a eliminarem água e incorporarem CPA, para que haja equilíbrio osmótico, reduzindo volume celular (SZTEIN & TAKEO & NAKAGATA, 2018). Essas substâncias têm a capacidade de formar ligação com as moléculas de água, tornando-a osmoticamente inativa, não participando da formação de cristais de gelo (ELLIOT & WANG & FULLER, 2017).

O EG é uma substância usada para fins diversos como substância anticongelamento de radiadores de automóveis, asas de aviões, tintas, surfactantes e outros produtos (CARNEY & STICE, 2017). Esse CPA é amplamente usado por ter baixo peso molecular e baixo ponto de fusão, o que permite alta permeabilidade celular (CASTRO *et al.*, 2011; CETINKAYA & ARAT, 2011; ALVES ET AL., 2011). Apesar de poder ser tóxico para tecidos a partir da sua metabolização (CASTRO *et al.*, 2011), a concentração do CPA é determinante da toxicidade, e muitos trabalhos mostraram que o EG é eficiente sem efeitos tóxicos quando usado em concentração próximas à 1,5 molar (M) (MCGINNIS & DUPLANTIS JR & YOUNGS, 1993; CHI *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2018)

O DMSO é comumente usado como solvente, mas sua aplicação como CPA tem sido ampliada para a criopreservação de células e tecidos de diferentes

organismos (CASTRO *et al.*, 2011). O DMSO é capaz de atravessar a membrana por difusão e impedir a formação de cristais de gelo na criopreservação por ter a capacidade de formar ponte de hidrogênio estáveis com as moléculas de água (ARUTYUNYAN *et al.*, 2018). A capacidade de criopreservação do DMSO é limitada à concentração usada, visto que quando a concentração está acima de 20% ele pode destruir a integridade da bicamada lipídica (LEONEL *et al.*, 2018). Há décadas, o DMSO tem se mostrado o CPA preferencial para criopreservação de córneas, devido a sua baixa toxicidade para o endotélio corneano, crucial para a viabilidade desse tecido (WALCERZ & TAYLOR & BUSZA, 1995).

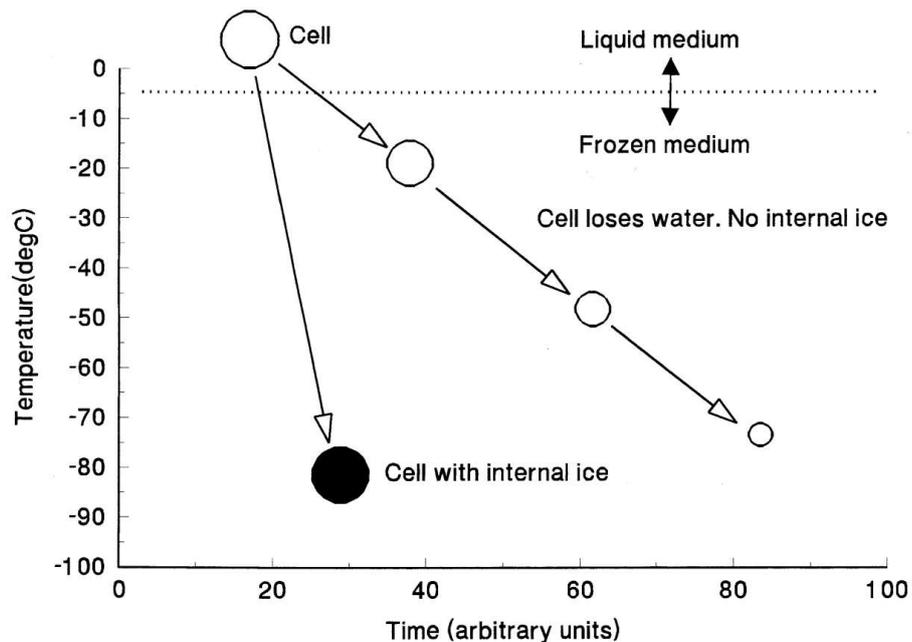
4.2.2 Técnicas de criopreservação

As técnicas de criopreservação mais utilizadas são o congelamento lento e a vitrificação. Na primeira, a taxa de resfriamento é gradual enquanto na segunda a velocidade de resfriamento é muito rápida. Nesse contexto, o controle das condições de resfriamento é importante por influenciar a desidratação da célula que deve ocorrer sem (ou com mínima) cristalização da água intracelular. Mazur (1963) descreveu a influência da curva de congelamento na formação dos cristais de gelos. A proporção da mudança da temperatura irá controlar o transporte de água através da membrana, controlando assim a formação de cristais de gelo intracelular (Gráfico 1). Quando as células congelam em uma proporção rápida, a água não deixa o interior da célula, causando a formação de gelo interno. Conforme o Gráfico 1, se a velocidade for regulada e gradual, há perda de água e conseqüentemente, não há gelo no interior da célula (PEGG, 2015).

O congelamento lento, conhecido também como congelamento convencional, se caracteriza pela curva de congelamento controlada por uso de máquinas ou não controlada, promovendo a desidratação do tecido ou célula aos poucos, para diminuir a formação de cristais de gelo intracelulares (FASANO *et al.*, 2010). Essa técnica permite que os tecidos sejam criopreservados em amostras maiores, ou até mesmo íntegros (CORRAL *et al.*, 2015). A concentração de CPA usada nesse tipo de congelamento é baixa (JANG *et al.*, 2017), tornando-a atrativa por causar baixa

toxicidade relacionada à CPAs e sendo considerado um processo mais simples por não requerer equipamento avançado (GURRUCHAGA *et al.*, 2018).

Gráfico 1 – Representação esquemática das células em processo de congelamento



Fonte: Pegg (2015).

A vitrificação é uma técnica de congelamento caracterizada por propiciar um estado de congelamento livre de cristais de gelo, que acontece quando a água passa do estado líquido para um estado vítreo por exposição direta ao nitrogênio líquido (WOWK, 2010). Nessa técnica, utiliza-se altas concentrações de CPA, aumentando o risco de toxicidade para a célula, pois é preciso alta viscosidade da solução para que o processo seja completo. Portanto, os tecidos precisam ser pequenos para garantir a efetividade do processo; além de ser uma técnica que necessita de pessoal especializado (JANG *et al.*, 2017).

Não só a curva de congelamento, mas também a curva de descongelamento é importante ao processo da criopreservação. Os cristais de gelo formados durante o processo de congelamento podem crescer de tamanho ou formar aglomerados de gelo no processo de descongelamento, o que vai causar danos na etapa final do

processo de criopreservação (PEGG, 2002). Mazur (1977) descreveu a capacidade do descongelamento rápido de resgatar células que tiveram a formação de gelo intracelular, obtendo uma maior taxa de sobrevivências das células ao final do processo de criopreservação.

4.2.3 Crioinjúria

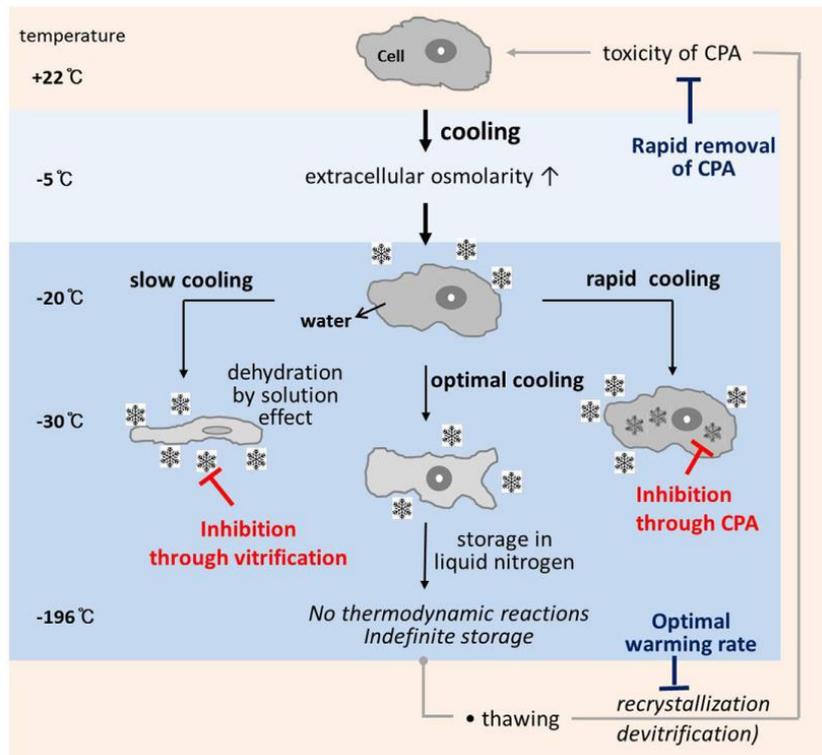
Durante o processo de congelamento, os danos que podem acontecer às células, tecidos ou órgãos são chamados de crioinjúria. Esses tipos de dano acontecem quando parâmetros como concentração de CPA e curva de congelamento e descongelamento não são ajustados (MAZUR, 1977; JANG *et al.*, 2017). Um exemplo é quando concentrações baixas de CPA são utilizadas no processo de congelamento, a osmolaridade não estará regulada para esse evento, formando cristais de gelo intracelular. Por outro lado, se a curva de descongelamento for inadequada, todo o processo anterior, mesmo que certo, pode ser comprometido pelo aumento dos cristais de gelo.

Para evitar a formação de cristais de gelo, os CPAs entram na célula, promovendo a saída de água sem que o volume celular seja muito alterado, pois a redução extrema do volume celular pode causar danos (RODRIGUES *et al.*, 2004). Porém, Pegg (2002) sugere que, além dos cristais de gelo, a concentração de solutos também pode causar danos à célula quando a solução é exposta ao CPA, há um desbalanceamento dos solutos, causando choque osmótico, mudando a curva de congelamento ideal para o tecido e causando danos. Este efeito é conhecido como efeito de solução (PEGG, 2015).

O processo de remoção do CPA após o congelamento é crítico para a viabilidade do tecido. Da mesma maneira que a adição do CPA deve ser coordenada e adequada, se a sua retirada não for gradual, as células podem absorver mais água do que deveriam e sofrer mudanças deletérias (RODRIGUES *et al.*, 2004). Ainda, fatores como pH e composição aniônica do meio, bem como a sensibilidade de cada tecido influenciam na sobrevivência pós descongelamento (TAYLOR *et al.*, 2004; VAJTA &

KUWAYAMA, 2006). A figura 2 demonstra alguns eventos físicos que podem ocorrer durante a criopreservação.

Figura 2 – Eventos físicos e crioinjúria durante congelamento e descongelamento



Fonte: Jang *et al.* (2017).

Devido a variação morfológica e fisiológica dos tecidos, para cada tipo deve ser usada uma combinação das curvas e concentrações de CPA para o congelamento, além da temperatura de armazenamento. A criopreservação de tecidos é um desafio, uma vez que, dependendo da organização existem vários tipos celulares que precisam ser mantidos viáveis após o congelamento (MA *et al.*, 2019). É, ainda, importante que nos tecidos não haja formação de grandes cristais de gelo na matriz extracelular, pois o rompimento de ligações entre as células pode afetar a viabilidade de todo o tecido (PEGG, 2010). Assim, a curva de congelamento deve ser lenta o suficiente para que não haja formação de gelo dentro da célula, mas rápida o bastante

para prevenir uma desidratação exagerada e formação de gelo na matriz (WENG & BEAUCHESNE, 2020).

4.3 PRESERVAÇÃO DE CÓRNEAS

As tentativas de preservação corneano sempre estiveram associadas com o transplante em humanos, pois esse procedimento devia ocorrer em poucas horas após o óbito do doador, o que limitava a possibilidade dessa alternativa para algumas pessoas por questões diversas (FARIA *et al.*, 2007). Porém, a própria disponibilidade de córneas humanas para a pesquisa sempre foi limitada, o que fez com que o coelho fosse escolhido como melhor modelo de testes antes de qualquer prospecto de testes em córneas humanas.

Em 1935, Filatov relatou o que seria mais tarde o princípio da câmara úmida: o armazenamento de bulbos oculares inteiros em frascos de vidro fechados deixados à 4°C, mantendo a córnea viável por até 56 horas após a morte (PINA, 2007; FARIA *et al.*, 2017). A partir de então, várias pesquisas foram feitas com o intuito de preservar as córneas humanas para transplantes, buscando ter um banco de córneas disponíveis para as cirurgias necessárias. Desse modo, a preservação de córneas hoje pode ser dividida em principalmente três tipos que serão descritos a seguir.

4.3.1 Preservação à frio (Hipotermia)

A preservação à frio segue a relação de Arrhenius, em que o frio irá reduzir a demanda celular de energia, a síntese de proteínas, os sistemas de transporte e a progressão do ciclo celular (ARMITAGE, 2011; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2019). A câmara úmida foi o método precursor, pois não dependia do uso de equipamentos ou substâncias, mas o tempo de armazenamento era extremamente limitado, no máximo por 48 horas (PINA, 2007). Depois de três décadas, em 1968, foi possível preservar o bulbo ocular durante 4 dias com o uso de meio líquido enriquecido e com antibióticos, sendo o primeiro meio de preservação em baixa temperatura (FARIA *et al.*, 2017). No entanto, o armazenamento do bulbo ocular inteiro era um fator limitante para a

preservação corneano, pois havia saturação de metabólitos no humor aquoso, tornando-se um ambiente tóxico para o tecido (ARMITAGE, 2011).

Assim, vários estudos foram realizados e, em 1974, o meio M-K foi desenvolvido (MCCAREY & KAUFMAN, 1974), preservando apenas o tecido corneano com um aro de esclera e alcançando 4 dias de preservação. Esse meio era suplementado com substâncias como sulfato de condroitina para manter a hidratação normal do tecido e antibióticos. Com o entendimento do comportamento da córnea isolada em preservação, e a necessidade de proteger o endotélio, novos meios foram criados, como o meio K-Sol, CSM, Dexsol (WALKENBACH & CORWIN & YE, 1991), Optisol (KAUFMAN *et al.*, 1991), Eusol (CAMPOSAMPIERO *et al.*, 2003b), e, mais recentemente, o Life4C (PHAM *et al.*, 2013), entre outros meios. Muitos desses foram passando por modificações que melhoraram seus tempos de preservação, como por exemplo, Eusol-C e Optisol-GS (PEREIRA, 2011). Este último é considerado, ainda hoje, o padrão ouro nesse tipo de preservação, podendo manter o tecido por até 14 dias à 4°C, permitindo que todos os procedimentos necessários aos transplantes sejam feitos com segurança (FONTES *et al.*, 2013; SUNDARESAN *et al.*, 2019; HO *et al.*, 2020).

4.3.2 Organocultura

A organocultura consiste em manter o tecido corneano em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino (SFB), além de substâncias como o sulfato de condroitina, mantendo em temperatura próxima à corporal, de 31 à 37°C. Esse método permite que as córneas sejam mantidas em cultura por cerca de 5 semanas (LINDSTROM *et al.*, 1976; PELS & SCHUCHARD, 1983; TAYLOR, 1986; PINA, 2007). Para que o tempo de armazenamento seja expandido, o meio de cultura deve ser trocado a cada 1 ou 2 semanas (FARIA, 2017). Com o intuito de aumentar o tempo de armazenamento, muitos bancos de olhos adotam esse método (ARMITAGE, 2011) além de ser possível a realização de exames de compatibilidades devido ao maior tempo de preservação do material.

A cultura de órgãos tem sido empregada na preservação de córneas a partir de meados da década de 70 (DOUGHMAN *et al.*, 1973), e desde então, muitas formulações foram feitas. No intervalo de 31 à 37°C, o dextrano e o sulfato de condroitina, usados para manter o equilíbrio osmótico na preservação a frio, se tornam tóxicos ao endotélio corneano, impossibilitando a utilização na organocultura, pois fazem com que a córnea aumente a sua espessura e precise passar por outro meio com esse agente antes de ser usada para que ela volte a espessura normal (FARIA, 2017). Os gastos com os meios de cultura bem como a necessidade de recursos humanos especializados tornam o método oneroso. A preocupação com o uso de SFB é outro fator limitante, pois a variação de composição desse suplemento e a possibilidade de contaminação com agentes biológicos é constante (PINA, 2007). A utilização de meios de cultura quimicamente definidos sem a presença de SFB tem sido apontado como o modo mais seguro para o uso dessa técnica (CAMPOSAMPIERO *et al.*, 2003a; PINA, 2007)

4.3.3 Criopreservação

O marco da criopreservação de córneas foi em 1965 quando Capella, Kaufman e Robbins conseguiram preservar córneas humanas (DMSO e albumina humana) e córneas de coelhos em (soro do próprio animal) em nitrogênio líquido com por até 2 meses. A sensibilidade do epitélio e principalmente do endotélio corneano são fatores limitantes para a criopreservação (CAPELLA & KAUFMAN & ROBBINS, 1965). Pela complexidade das técnicas de criopreservação, poucos trabalhos foram desenvolvidos depois deste, principalmente após o desenvolvimento do método de preservação a frio, que tem execução mais simples que a criopreservação (ARMITAGE, 2011; FARIA, 2017).

O diferencial da criopreservação é possibilidade do armazenamento a longo prazo, tornando-a interessante para bancos de olhos, que podem ter córneas disponíveis para transplantes a qualquer momento. Alguns trabalhos obtiveram sucesso na criopreservação com córneas de coelhos (CANALS *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2011) e humanas (TRIPATHI *et al.*, 2016). Esses trabalhos utilizaram DMSO,

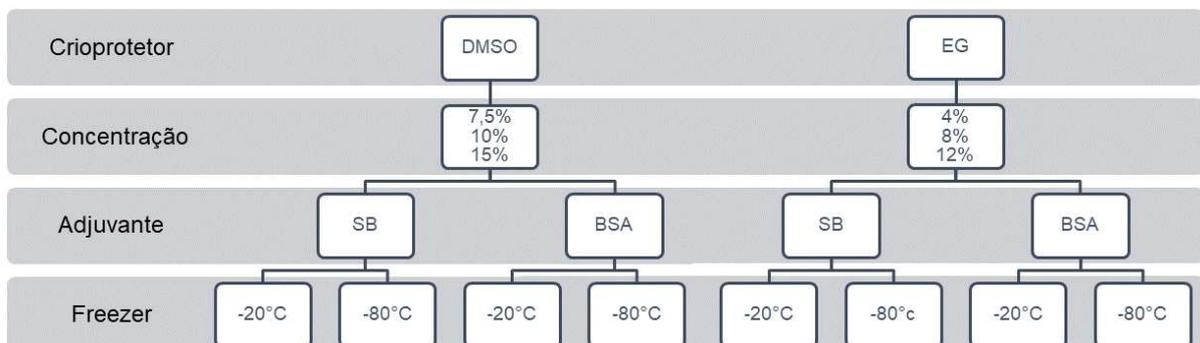
EG e glicerol como CPA, promovendo resistência do endotélio ao processo de congelamento, o que por muito tempo foi um fator desclassificante do método (ARMITAGE, 2011; PINA, 2007).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho está dividido em três etapas: (i) avaliação das concentrações de CPAs citocompatíveis e adjuvante mais adequado, (ii) realização de congelamento em freezer -20 e -80°C de acordo com Tripathi *et al.* (2016) e (iii) descongelamento das córneas de acordo com Liu *et al.*, (2020).

O método de criopreservação foi realizado de acordo com Capella-Kaufman-Robbins (1965) com adaptações, utilizando dois crioprotetores intracelulares: DMSO e EG. Adicionalmente, foi utilizado como crioprotetor externo o adjuvante soro bovino (SB) e BSA (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma experimental mostrando os crioprotetores e suas concentrações



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Após a criopreservação foram avaliados parâmetros como a integridade endotelial da córnea e sua viabilidade, assim como a transparência e manutenção das camadas celulares da córnea por meio de técnicas histológicas.

5.1 COLETA DAS CÓRNEAS BOVINAS

Globos oculares bovinos (n=54) foram coletados em abatedouro local da cidade de Juiz de Fora e mantidos sob refrigeração durante o transporte para o laboratório em solução *Phosphate-buffered saline* (PBS) 1x em garrafa térmica (10°C).

No laboratório, os globos oculares foram avaliados a partir de critérios pré-estabelecidos no teste de BCOP, na norma 437 da OECD (2017), sendo selecionados aqueles que não possuíam cortes na córnea, opacidade aumentada e neovascularização. As córneas foram obtidas através de protocolo adaptado de córneas humanas para córneas bovinas (PAREKH *et al.*, 2012). Os globos selecionados foram levados ao fluxo laminar onde foi executado o protocolo de esterilização do material biológico com o uso de iodopolividona (I-PVP), tiosulfato de sódio e PBS 1x. Os globos foram imersos em solução de I-PVP 0,5% (v/v) por 2 minutos para descontaminação, depois em solução de tiosulfato de sódio 0,1%(p/v) por 1 minuto e, então, transferidas para solução de PBS 1x até o momento da excisão. Usando uma gilete estéril, foi feita uma incisão no globo com cerca de 2 mm de esclera ao redor da córnea, e aberta com o uso de tesouras estéreis que mantiveram o aro de esclera necessário para proteção e manuseio da córnea. Todas as córneas foram congeladas dentro do tempo limite estabelecido para o teste de BCOP.

5.2 ENSAIO DE INTUMESCÊNCIA

O ensaio de intumescimento foi realizado para avaliar a variação de massa das córneas após exposição aos CPAs, bem como a tolerância (integridade) do endotélio a essas substâncias (Canals *et al.* 2000).

Após a excisão, as córneas foram separadas da íris e qualquer resquício do humor aquoso foi retirado com uso de papel-filtro estéril. As córneas foram pesadas com auxílio de uma balança analítica (SHIMADZU AUX 220), e posteriormente, elas foram expostas aos diferentes tratamentos de CPAs (Figura 3), em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) sem vermelho de fenol. Adicionalmente, foram avaliados os seguintes grupos controles: o meio base puro (DMEM), o meio base com os adjuvantes (DMEM+BSA e DMEM+SB), os adjuvantes puros (SB 5% e BSA 5%) para comprovar que possíveis alterações de peso seriam resultado da interação apenas do CPA; e um controle de BSA 10% para avaliar a possibilidade de aumentar a concentração dos adjuvantes em experimentos futuros.

As avaliações ocorreram nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após exposição aos CPAs. Os pesos das córneas foram padronizados na forma de porcentagem de modo que fosse considerado o peso inicial de cada córnea nos respectivos tratamentos e, desta forma, considerar somente a variação entre o peso inicial e final (*i.e.* ganho ou perda de peso) ao longo do ensaio. As concentrações em que as córneas tiveram resposta mais promissora no ensaio de intumescência foram selecionadas para dar continuidade ao teste.

5.3 CONGELAMENTO DAS CÓRNEAS

As concentrações escolhidas para a etapa de congelamento foram DMSO a 10% e EG a 8%, com 10% de SB, em meio DMEM, baseadas no resultado de intumescência. O congelamento foi realizado expondo córneas as soluções com CPA e à solução controle, contendo DMEM e 10% de SB. As córneas foram expostas à 3 concentrações crescentes dos CPA, assim como protocolos anteriores (CAPELLA & KAUFMAN & ROBBINS, 1965). As concentrações do DMSO foram 3% e 7% até a concentração de 10%. As concentrações de EG foram 3% e 6% até a concentração final de 8%. As córneas ficaram por 5 minutos em cada solução. Após exposição às soluções em temperatura ambiente, as amostras foram transferidas para um freezer -20°C e -80°C.

5.4 DESCONGELAMENTO DA CÓRNEA

As córneas criopreservadas foram descongeladas sob banho-maria aquecido (42°C), até a esclera ser descongelada. Então, as córneas foram colocadas em solução de descongelamento, composta por DMEM e 5% do CPA respectivo, à 37°C até terminar o descongelamento e dissociação do CPA, e então transferidas para outro frasco com DMEM a temperatura ambiente até as análises posteriores (CAPELLA & KAUFMAN & ROBBINS, 1965).

5.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após descongelamento foi realizada uma análise macroscópica das córneas bovinas (ALVES *et al.*, 2011; PINA, 2007). Foi observada a transparência ou opacidade do tecido. O grau de opacificação da córnea foi avaliado por um único observador e classificado de acordo Ashworth *et al.* (2006) com modificações como (i) baixa, (ii) moderado ou (iii) alta.

5.6 TESTE DE VIABILIDADE ENDOTELIAL

A integridade das membranas celulares e viabilidade das células do endotélio das córneas criopreservadas em freezer -20°C , com $n=9$ para cada tratamento, em freezer -80°C com $n=9$ para cada tratamento e córneas frescas ($n=9$) foi avaliada utilizando 0,25% (p/v) de Azul de Tripán (AT) e 0,2% (p/v) de Vermelho de Alizarina (VA) e quantificada por avaliação em microscópio de luz invertido (Zeiss Primo Vert, Oberkochen, Alemanha) (CAMPOSAMPIERO *et al.*, 2003a). Após análise macroscópica, o endotélio corneano foi exposto por 30 segundos ao AT, lavado em solução de NaCl 0,9%, exposto por 20 segundos ao VA, lavado novamente em NaCl 0,9% e posicionado em placa de petri com a camada endotelial tocando a placa. Foram feitas micrografias em microscópio de luz (magnificação de 400x) para avaliar a viabilidade endotelial pela média da contagem de três campos, em diferentes regiões do tecido, sem sobreposição através do software ImageJ, com a ferramenta *Multi-point*.

5.7 AVALIAÇÃO DA ÁREA E MORFOLOGIA CELULAR

A partir da coloração com AT e VA, foram calculadas a área celular média (μm^2) do endotélio (EWETE; ANI; ALABI, 2016), com $n=60$ para cada tratamento, com o programa Carl Zeiss Microscopy ZEN 2.3 (blue edition) e a morfologia celular foi avaliada de forma qualitativa.

5.8 HISTOLOGIA

As córneas foram processadas, seguindo protocolo de rotina, no Laboratório de Histologia e Patologia Veterinária da UFJF.

Os cortes histológicos foram feitos a fim de avaliar a integridade das camadas da córnea, como epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Após o descongelamento, as córneas foram fixadas em solução formol 10% salina tamponada. As córneas foram seccionadas com espessura de 4-5 micrômetros (μm) de blocos de parafina em cortes longitudinais para visualização das camadas celulares corneais, avaliando a histoarquitetura dos tecidos. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) (TRIPATHI *et al.*, 2016). Os parâmetros de integridade da córnea foram analisados semi qualitativamente adaptados de Ximenes *et al.* (2014) e Costa *et al.* (2019) e classificados como (i) ausente, (ii) mínimo, (iii) discreto, (iv) discreto a moderado, (v) moderado, (vi) moderado a acentuado e (vii) acentuado. Os dados de frequência foram apresentados na forma de porcentagem, com $n=9$ para cada tratamento.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do ensaio de intumescência e do teste de viabilidade foram analisados por meio de modelos lineares utilizando a fórmula lm do pacote stats (R CORE TEAM, 2019).

Antes da realização dos modelos, foi avaliada a relação entre as variáveis explicativas de modo a remover possíveis variáveis colineares e realizar os modelos. Os modelos foram selecionados com base no critério de informação de *Akaike Information Criterion*, corrigido para pequenas amostras (AICc) (BOLKER, 2008). Utilizamos como critério $\text{AICc} < 2$ para separar os modelos mais parcimoniosos e, dentre eles, foram considerados aqueles com menores valores de AICc.

Os dados da área celular foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis e, posteriormente, pelo teste de Wilcoxon.

Todos os testes foram feitos no programa R (R CORE TEAM, 2019). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas estatisticamente quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ENSAIO DE INTUMESCÊNCIA

As amostras analisadas (n=36) tiveram como variáveis explicativas o tratamento (Trat), a concentração do tratamento (Conc_t), os adjuvantes (Adj) utilizados e o tempo (T), para a variável resposta peso em porcentagem (Por). A escolha do melhor modelo seguiu o critério AICc. Rodamos quatro modelos alternativos com todas as variáveis (Tabela 1) e o melhor modelo que explicou a variação dos dados, mostrada pelo índice R² (R² = 1 – erro relativo), segue, por convenção, o menor valor de AIC obtido entre os quatro.

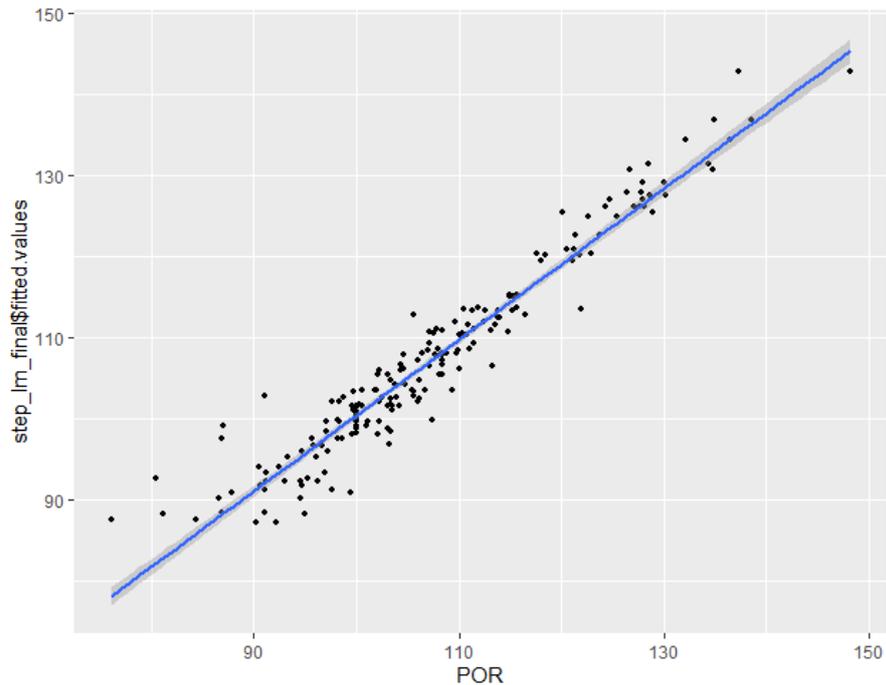
Tabela 1 – Modelos alternativos com valores de R² e AICc

Modelos lineares	R ²	AIC
Por = Trat + Conc_t + Adj + T + Conc_t:Adj + Trat:T + Adj:T	0.91	1260.22
Por = Trat*Conc_t * Adj * T	0.90	1372.32
Por = Trat + Adj + T	0.74	1415.43
Por = Trat+Conc_t+ Adj + T	0.73	1417.37

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Todas as variáveis sozinhas foram capazes de explicar uma parte da variabilidade dos dados, mas a combinação das variáveis foi capaz de explicar uma variabilidade maior. O melhor modelo incluiu todas as variáveis explicativas disponíveis (Figura 4). Esse modelo foi capaz de explicar cerca de 91% da variabilidade de peso das córneas, mostrando que a combinação desses fatores é determinante no peso das córneas.

Figura 4 – Modelo linear de tendência do peso de córneas bovinas ao longo do tempo após exposição à CPAs, mostrando em y os valores ajustados pelo modelo

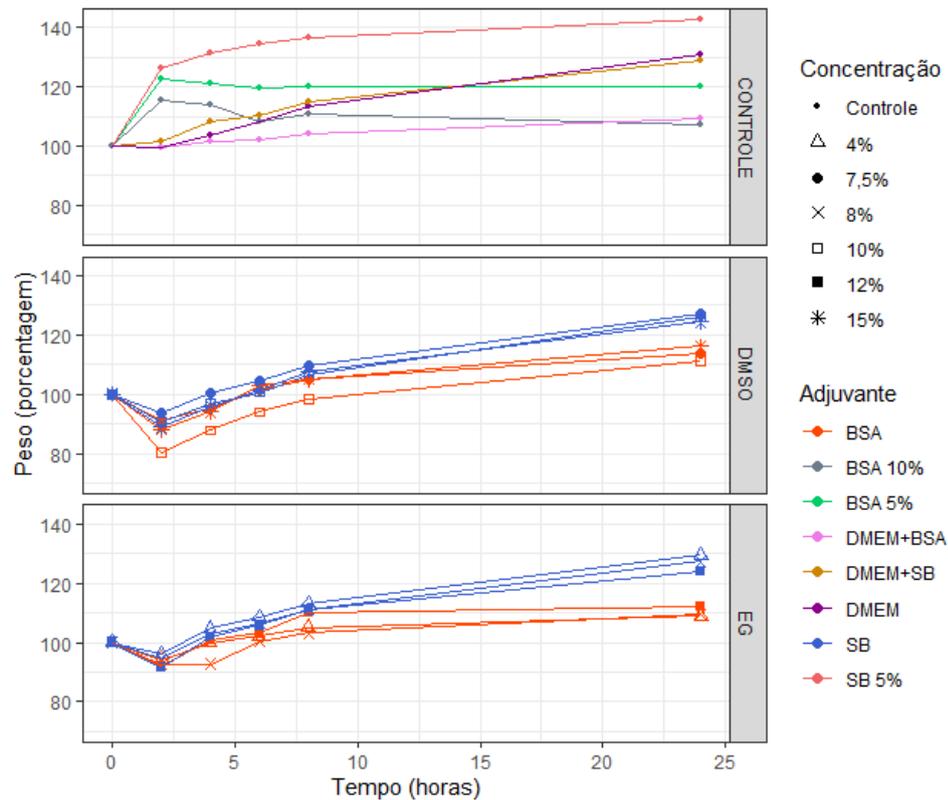


Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A curva de peso obtida ao longo do tempo das córneas é apresentada no Gráfico 2 em três seções: a primeira mostra as curvas referentes às córneas do tratamento controle; a segunda possui a curva do tratamento com DMSO; e, por fim, a terceira possui curvas do tratamento com EG. O ensaio de intumescência em todos os tratamentos com os CPAs, e com os adjuvantes SB e BSA apresentaram queda de peso nas duas primeiras horas de intumescimento (Gráfico 2). A partir desse momento, é possível observar que a curva sobe continuamente até o tempo final de 24 horas em ambos os CPAs. Os tratamentos com CPAs foram diferentes significativamente dos controles ($p < 0,05$). Os adjuvantes (SB e BSA) foram diferentes entre si ($p < 0,05$), explicando cerca de 32% das variações de peso das córneas ($R^2 = 0.32$). As curvas de peso dos tratamentos controles não apresentaram queda do peso após 2 horas, apresentando sempre o peso acima do peso inicial. As curvas dos tratamentos controles BSAs (5% e 10%) apresentaram ligeira queda de peso após as duas horas iniciais. Dentre os controles, apenas a curva DMEM+BSA não foi diferente

ao longo do tempo ($p = 0.43$). O tempo foi significativo, explicando sozinho cerca de 39% da variação de peso ($R^2 = 0.39$).

Gráfico 2 – Curvas de peso das córneas bovinas ao longo do tempo após exposição à CPAs

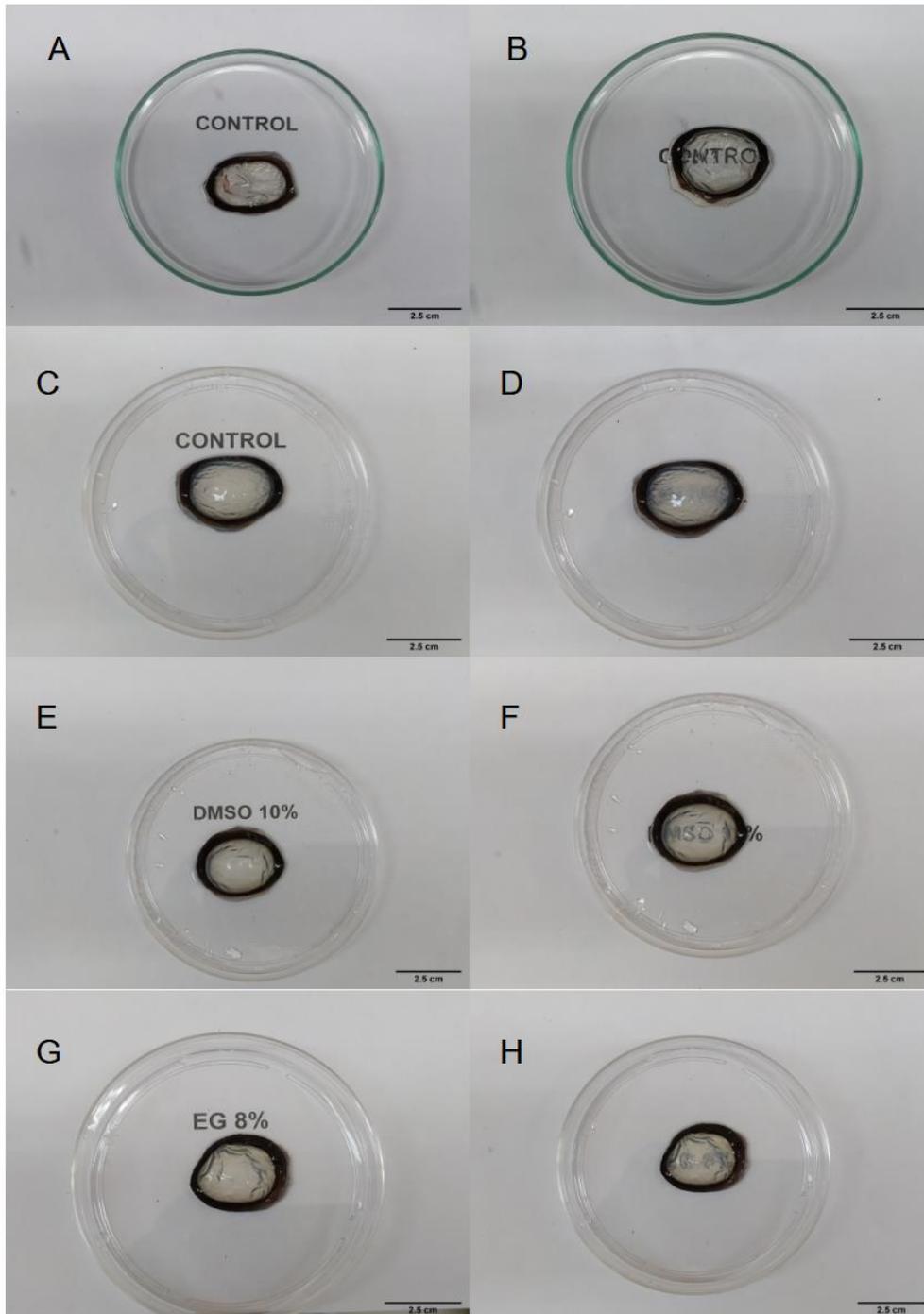


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

6.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA

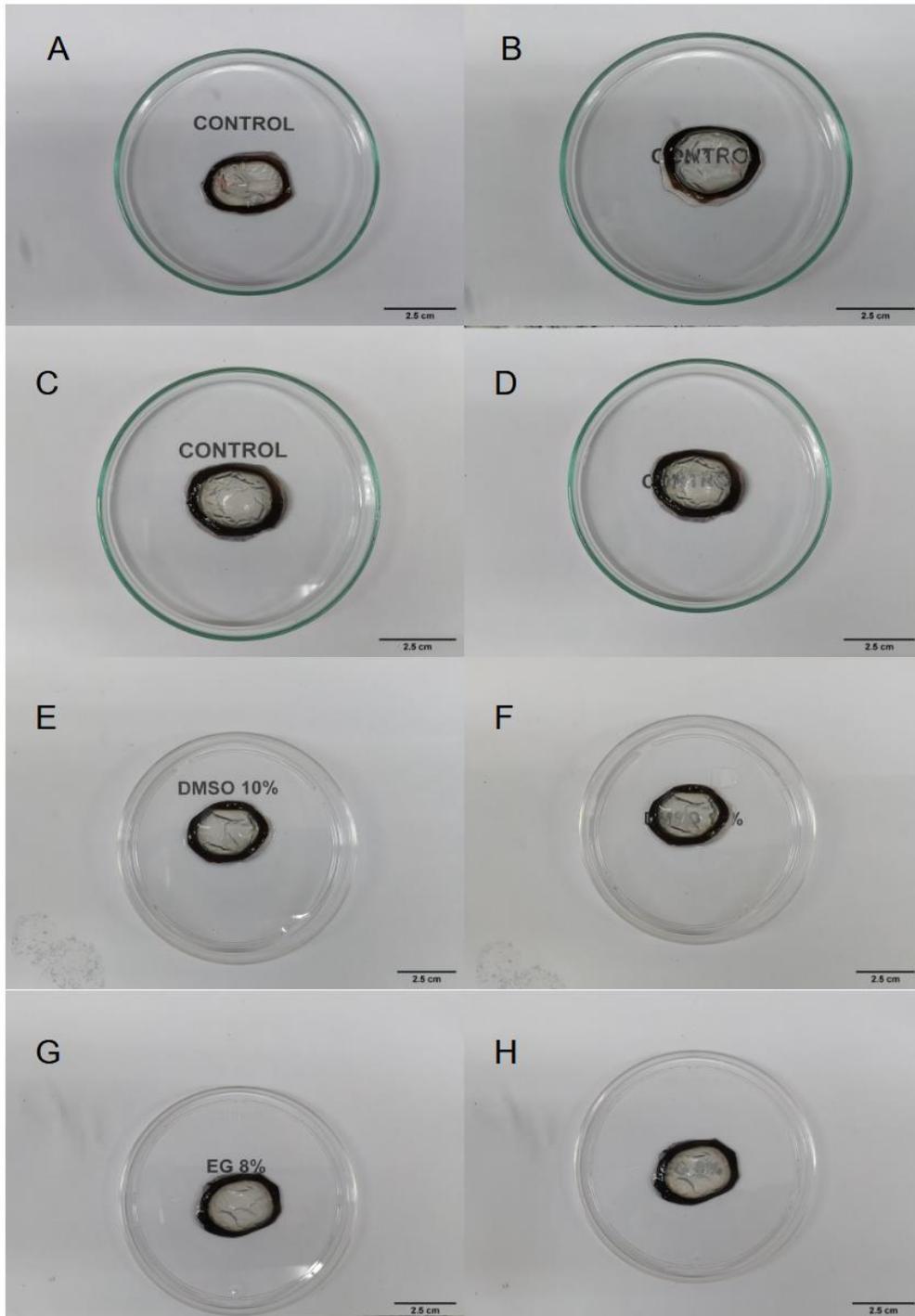
Após o processo de descongelamento, as córneas foram avaliadas e classificadas quanto a sua transparência (Figuras 5 e 6). Levando em consideração os resultados do ensaio de intumescência, uma concentração de cada CPA foi escolhida para prosseguimento do experimento. O congelamento foi feito com DMSO a 10%(v/v) e EG a 8%(v/v), com 10%(v/v) de SB. Todas as córneas apresentaram algum grau de opacidade após o processo de congelamento.

Figura 5 – Córneas frescas (A; B) e córneas após o processo de congelamento e descongelamento no freezer -20°C, mostrando os tratamentos controle positivo (C; D), DMSO (E; F) e EG (G; H).



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

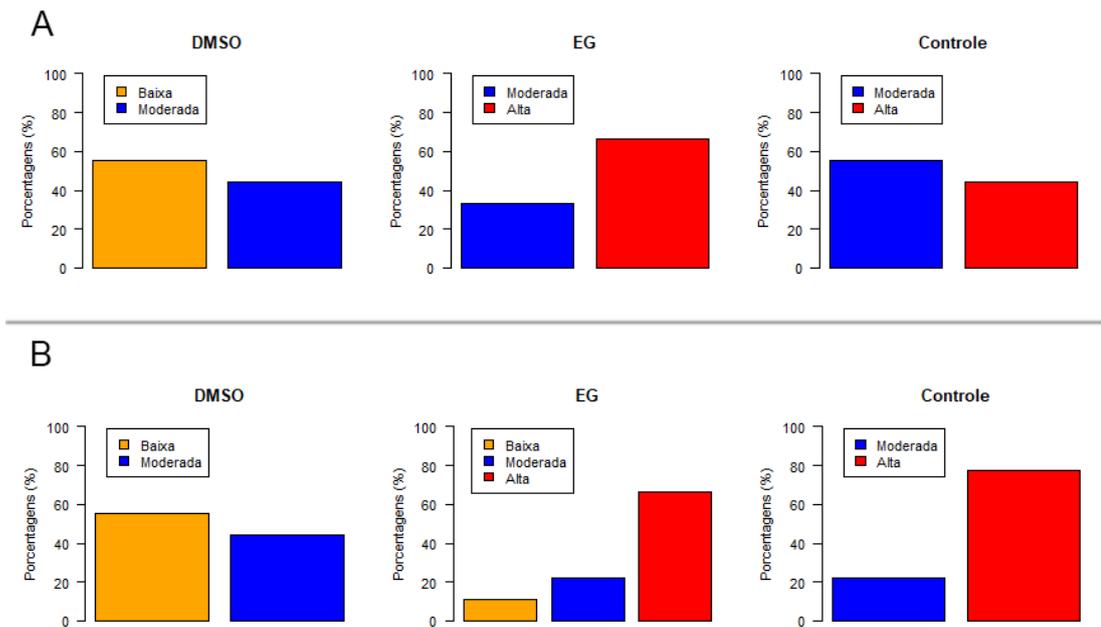
Figura 6 – Córneas frescas (A; B) e córneas após o processo de congelamento e descongelamento no freezer -80°C, mostrando os tratamentos controle positivo (C; D), DMSO (E; F) e EG (G; H).



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O tratamento DMSO, em ambas as temperaturas de congelamento apresentou baixo grau de opacidade em cerca de 55% das córneas avaliadas, e as outras córneas demonstraram grau moderado de opacidade (Gráfico 3). Em ambas as temperaturas de congelamentos, mais de 60% das córneas do tratamento EG apresentaram alto grau de opacidade (Gráfico 3). Dentre os tratamentos controle, as córneas do congelamento em -80°C tiveram maior porcentagem de alto grau de opacidade (Gráfico 3B) quando comparadas com o controle e ao congelamento em -20°C , que teve a maior parte das córneas com opacidade moderada (Gráfico 3A).

Gráfico 3 – Porcentagem do grau de opacidade das córneas de cada tratamento após congelamento. (A) Congelamento em freezer -20°C . (B) Congelamento em freezer -80°C



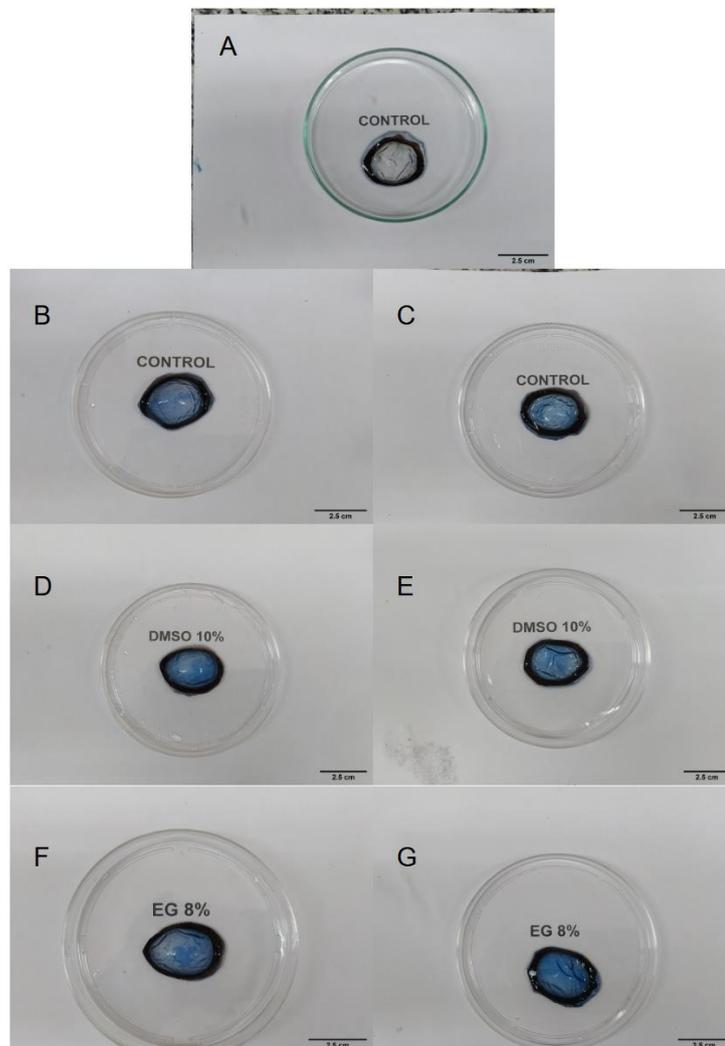
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

6.3 TESTE DE VIABILIDADE ENDOTELIAL

Após avaliação macroscópica da opacidade das córneas, elas foram coradas com AT e VA para avaliação da viabilidade do endotélio. Em uma análise

macroscópica da coloração de AT, foi possível observar que a córnea fresca (Figura 7A) não apresenta grandes pontos de coloração, enquanto as demais córneas que passaram pelo processo de congelamento e descongelamento, tanto no freezer -20°C (Figura 7B, 7D, 7F) quanto no freezer -80°C (Figura 7C, 7E, 7G), apresentou coloração azul, sinal de inclusão do corante nas células do endotélio corneano.

Figura 7 – Córnea fresca corada com AT (A) e córneas após o processo de congelamento e descongelamento coradas com o AT no freezer -20°C , com os tratamentos controle(B), DMSO (D) e EG (F), e freezer -80°C , com controle (C), DMSO (E) e EG (G).

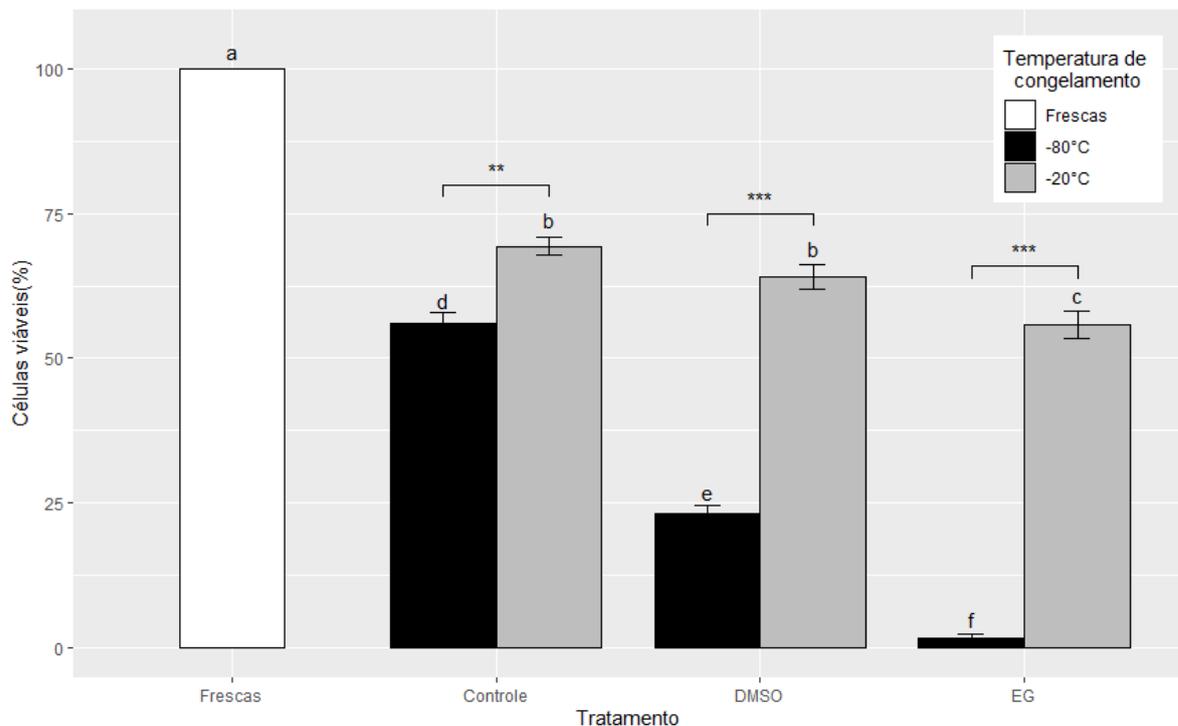


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A contagem das células viáveis em microscópio demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as córneas frescas e todos os tratamentos de congelamento (Gráfico 4). A interação entre as variáveis tratamento e exposição explica cerca de 93% da variação na viabilidade das células do endotélio ($R^2 = 0.9264$). Entre os dois tipos de congelamento, houve também diferença estatística significativa ($p < 0,01$). O congelamento em freezer -80°C apresentou um menor número de células viáveis quando comparado ao congelamento em -20°C . Dentre os tratamentos congelados em -80°C , todos foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$), sendo os tratamentos com os CPAs os que apresentaram o menor índice de células viáveis, com o tratamento EG obtendo menos de 10% de células viáveis ao final do processo de criopreservação. No congelamento em freezer -20°C , apenas o tratamento EG foi diferente significativamente dos outros ($p < 0,05$), apresentando o menor número de células viáveis dentro deste tipo de congelamento (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Médias de células viáveis após processo de criopreservação.

Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

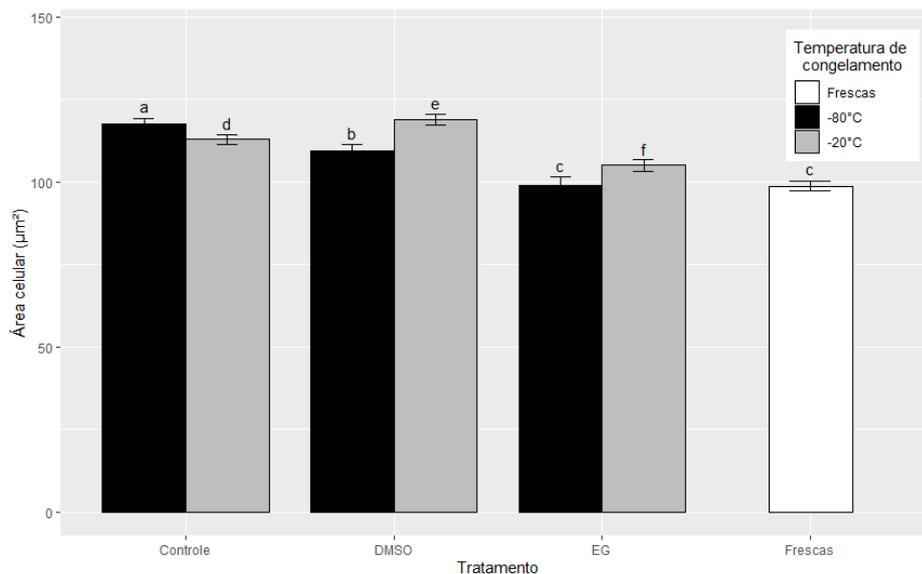


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

6.4 MORFOLOGIA CELULAR

A partir da contagem da avaliação da área celular, as córneas frescas mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) dos tratamentos, exceto o tratamento EG em congelamento em freezer -80°C (Gráfico 5). Não houve diferença estatística entre as duas temperaturas de congelamento ($p > 0,05$). Com exceção do tratamento EG em -20°C , todos os tratamentos apresentaram área celular média maior que a área celular do endotélio das córneas frescas.

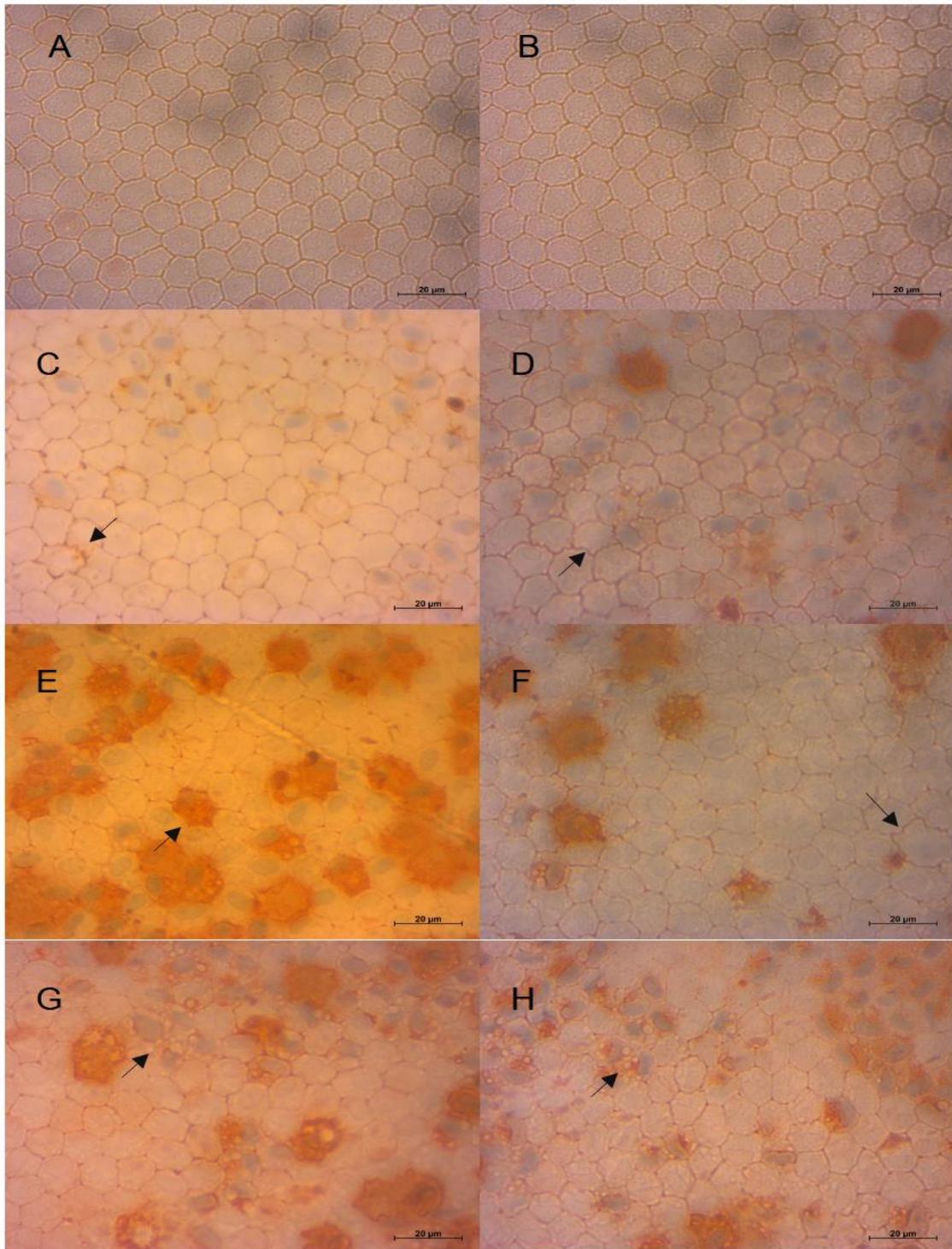
Gráfico 5 – Média de área celular do endotélio corneano após processo de criopreservação. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

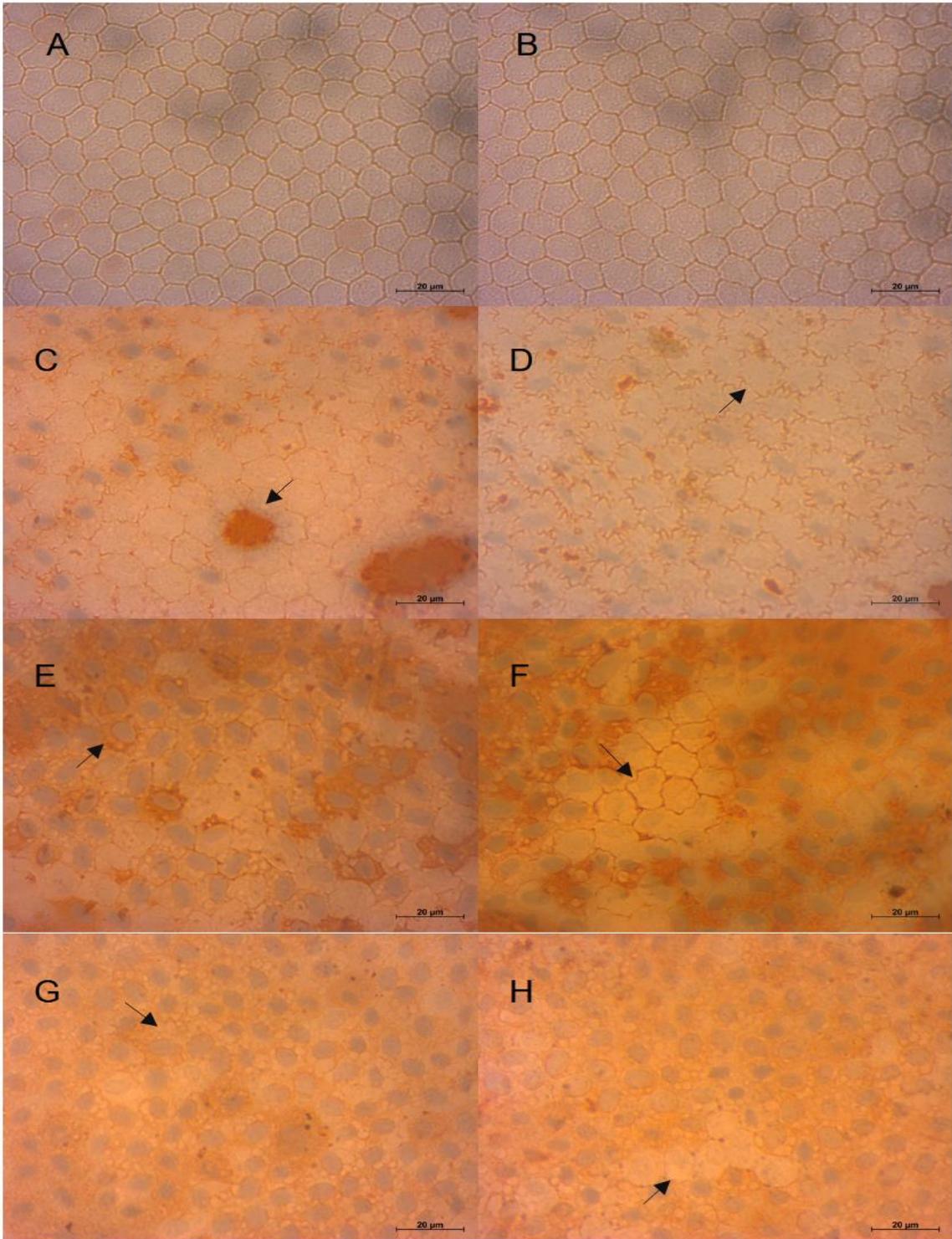
Através das micrografias, observa-se a morfologia característica do endotélio corneano com formato hexagonal em grande maioria. Todos os tratamentos em ambas as temperaturas de congelamentos demonstraram alteração da morfologia (Figura 8C; 8D; 8F; 9D; 9F; 9H), indicada pelas setas, com área de intensa coloração com VA (Figura 8E; 9C) e formação de vacúolos em áreas coradas com AT (Figura 8G; 8H; 9E; 9G).

Figura 8 – Micrografias do endotélio corneano corado com AT e VA após congelamento em freezer -20°C. (A-B) Córneas frescas; (C-D) Controle; (E-F) DMSO; (G-H) EG



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 9 – Micrografias do endotélio corneano corado com AT e VA após congelamento em freezer -80 °C. (A-B) Córneas frescas; (C-D) Controle; (E-F) DMSO; (G-H) EG



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

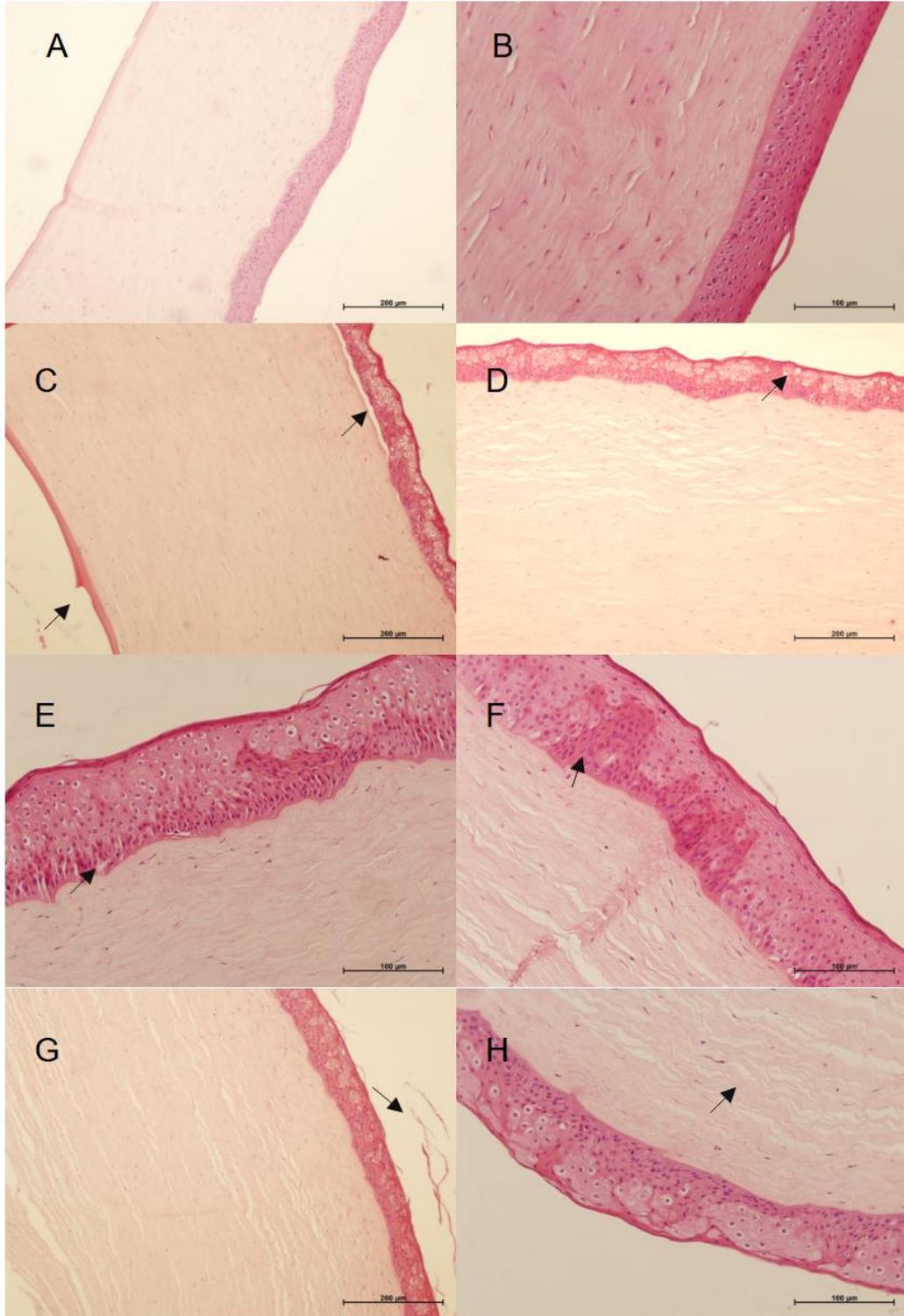
6.5 HISTOLOGIA

Através dos cortes histológicos é possível verificar a integridade de todas as camadas corneanas. O grupo controle do congelamento em freezer -20°C apresentou mínimo desprendimento do epitélio (Tabela 2 e Figura 10G), com mínima pseudo-paraqueratinização e moderado grau de vacuolização dos queratinócitos superficiais (Tabela 2 e Figura 10D), moderado grau de retração e deformidade citoplasmática e nuclear de queratinócitos basais (Tabela 3 e Figura 10E), e baixo grau de vacuolização dos queratinócitos basais (Tabela 3 e Figura 10F). O estroma corneano apresentou moderadamente a formação de fendas não coradas (Tabela 4 e Figura 10H). O endotélio apresentou moderado grau de descolamento da membrana de Descemet (Tabela 5 e Figura 10C).

O grupo controle do congelamento em freezer -80°C apresentou mínimo desprendimento do epitélio, com mínimo grau de vacuolização dos queratinócitos superficiais e mínima pseudo-paraqueratinização (Tabela 2), mínimo grau de retração e deformidade citoplasmática e nuclear de queratinócitos basais (Tabela 3 e Figura 11G), e baixo grau de vacuolização dos queratinócitos basais (Tabela 3 e Figuras 11F; 11D). O estroma corneano apresentou moderadamente a formação de fendas não coradas (Tabela 4 e Figura 11E). O endotélio apresentou moderado grau de descolamento da membrana de Descemet (Tabela 5 e Figura 11C).

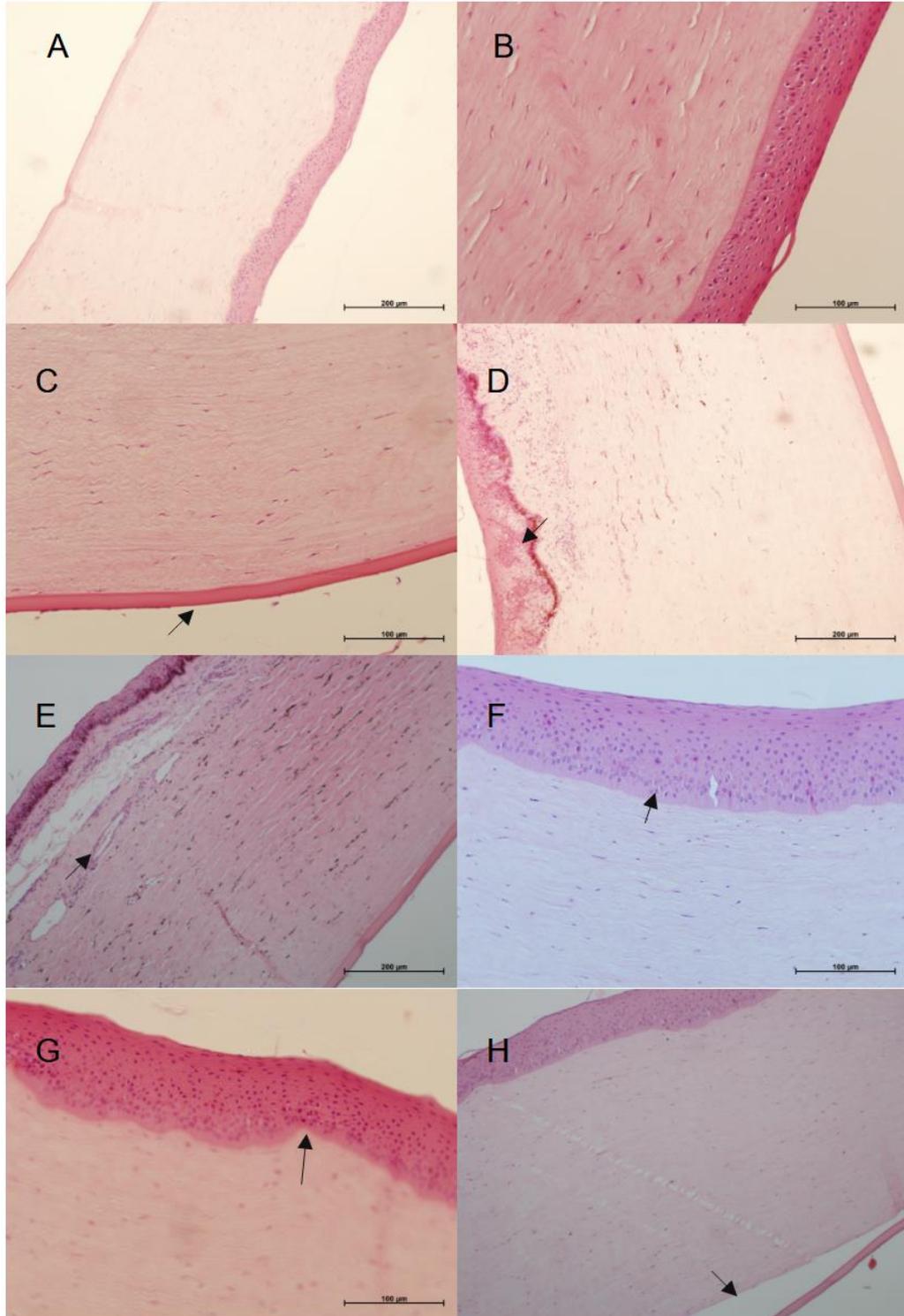
O grupo DMSO do congelamento em freezer -20°C apresentou mínimo desprendimento do epitélio (Tabela 2 e Figura 12F), com discreta vacuolização dos queratinócitos superficiais (Tabela 2 e Figura 12D) e discreta pseudo-paraqueratinização (Tabela 2 e Figura 12G), com discreta retração e deformidade citoplasmática e nuclear de queratinócitos basais (Tabela 3 e Figura 12E). O estroma corneano apresentou moderadamente a formação de fendas não coradas (Tabela 4 e Figura 12C). O endotélio apresentou discreto grau de descolamento da membrana de Descemet (Tabela 5 e Figura 12H).

Figura 10 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento controle do congelamento em freezer -20°C . (A-B) Córneas frescas; (C-H) Controle.



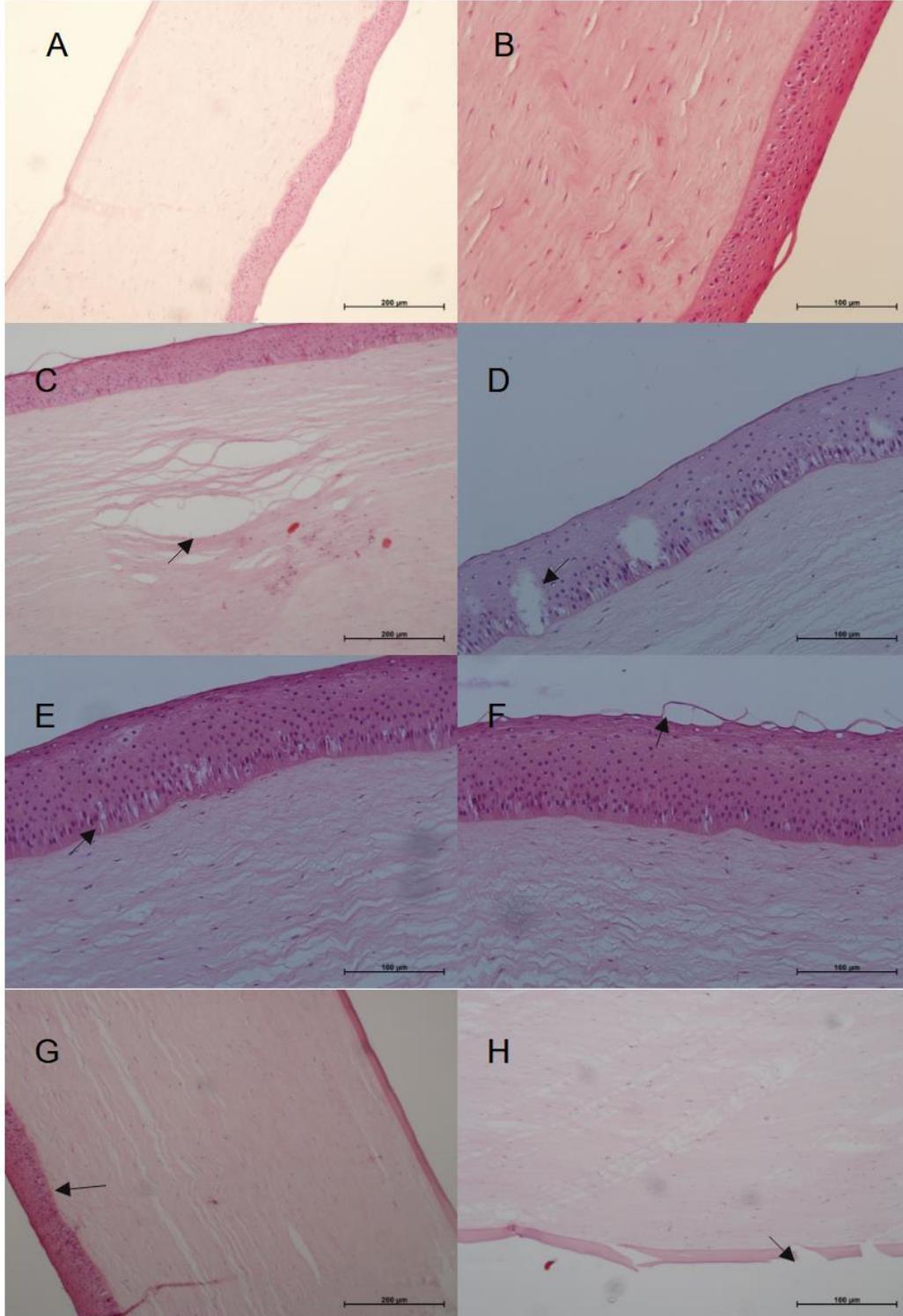
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 11 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento controle do congelamento em freezer -80 °C. (A-B) Córneas frescas; (C-H) Controle.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 12 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento DMSO do congelamento em freezer -20 °C. (A-B) Córneas frescas; (C-H) DMSO.



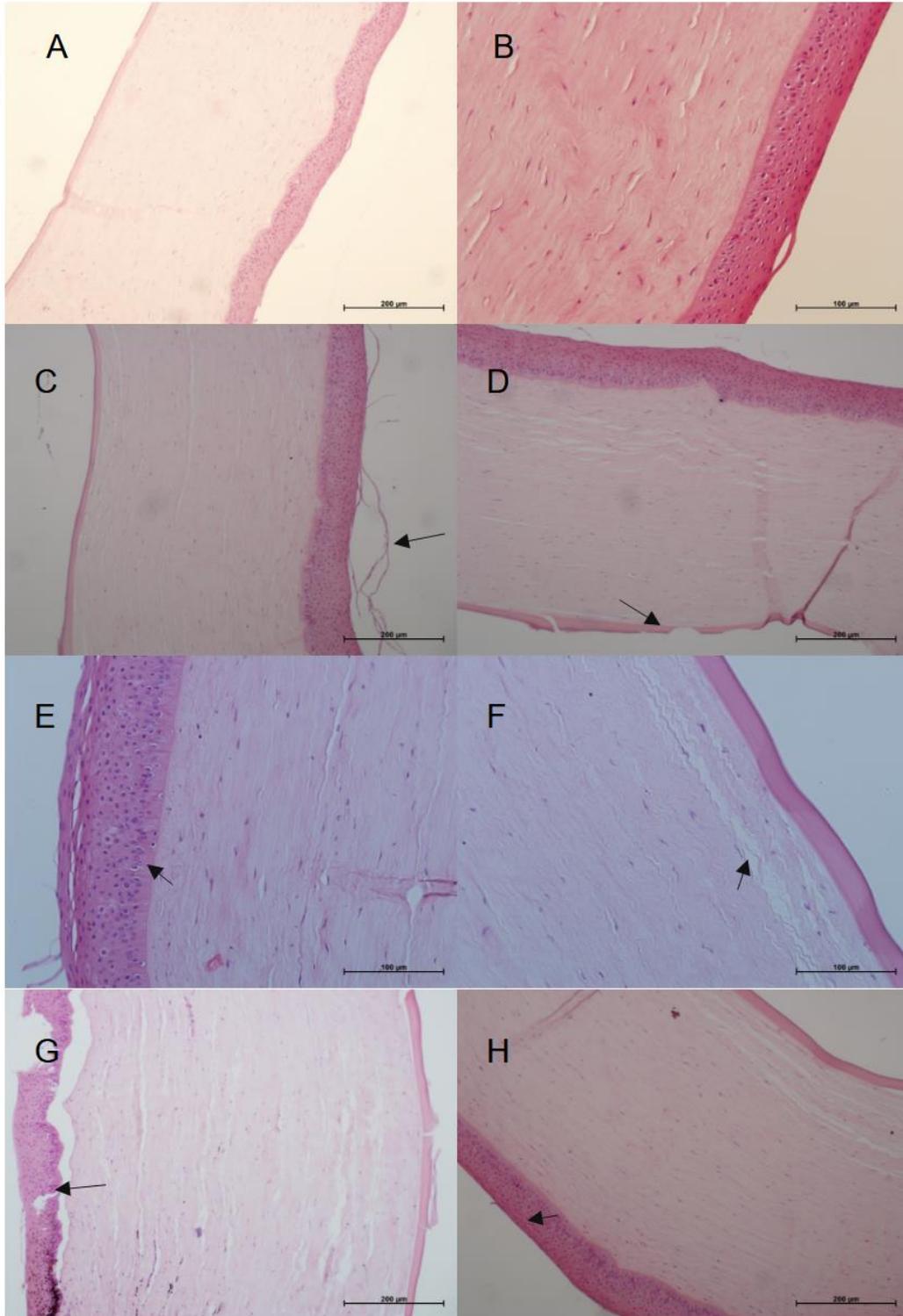
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O grupo DMSO do congelamento em freezer -80°C apresentou discreto desprendimento do epitélio (Tabela 2 e Figura 13C), com mínimo grau de vacuolização dos queratinócitos superficiais e mínima pseudo-paraqueratinização (Tabela 2 e Figura 13H), moderada retração e deformidade citoplasmática e nuclear de queratinócitos basais e moderada vacuolização dos queratinócitos basais (Tabela 3 e Figuras 13E; 13G). O estroma corneano apresentou discretamente a formação de fendas não coradas (Tabela 4 e Figura 13F). O endotélio apresentou discreto grau de descolamento da membrana de Descemet (Tabela 5 e Figura 13D).

O grupo EG do congelamento em freezer -20°C apresentou discreto desprendimento do epitélio com discreto a moderado grau de vacuolização dos queratinócitos superficiais (Tabela 2 e Figura 14D), discreto a moderado grau de retração e deformidade citoplasmática e nuclear de queratinócitos basais (Tabela 3 e Figuras 14E; 14F) e moderado a acentuado grau de vacuolização dos queratinócitos basais (Tabela 3 e Figuras 14C; 14G). O estroma corneano apresentou moderadamente a formação de fendas não coradas (Tabela 4 e Figura 14H). O endotélio apresentou moderado a acentuado grau de descolamento da membrana de Descemet (Tabela 5 e Figura 14C).

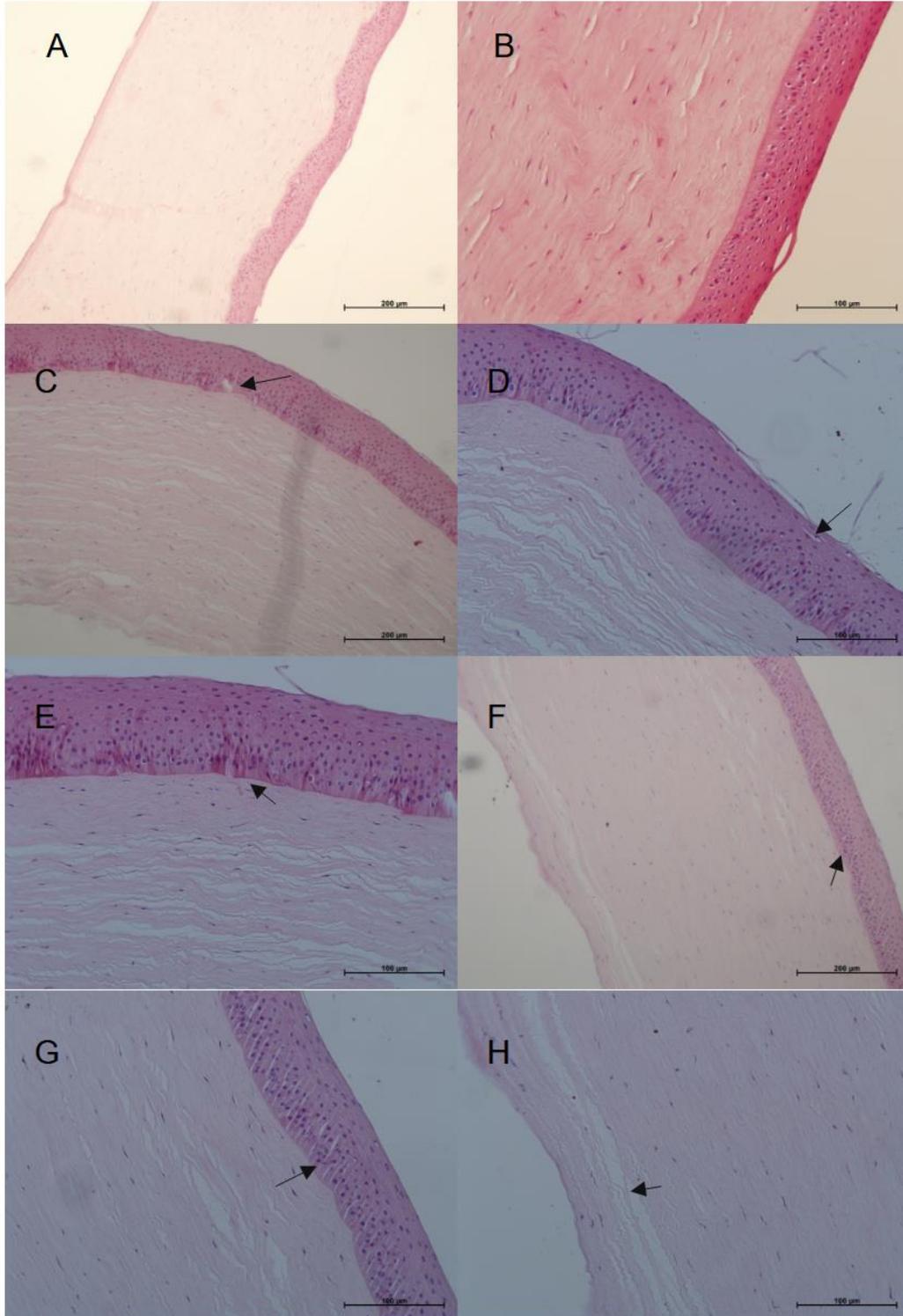
O grupo EG do congelamento em freezer -80°C apresentou discreto desprendimento do epitélio com discreto grau de vacuolização dos queratinócitos superficiais (Tabela 2 e Figura 15G), discreto grau de retração e deformidade citoplasmática e nuclear de queratinócitos basais (Tabela 3 e Figura 15E) e moderado grau de vacuolização dos queratinócitos basais (Tabela 3 e Figuras 15D; 15F). O estroma corneano apresentou moderadamente a formação de fendas não coradas (Tabela 4 e Figura 15C). O endotélio apresentou moderado grau de descolamento da membrana de Descemet (Tabela 5 e Figura 15H).

Figura 13 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento DMSO do congelamento em freezer -80 °C. (A-B) Córneas frescas; (C-H) DMSO.



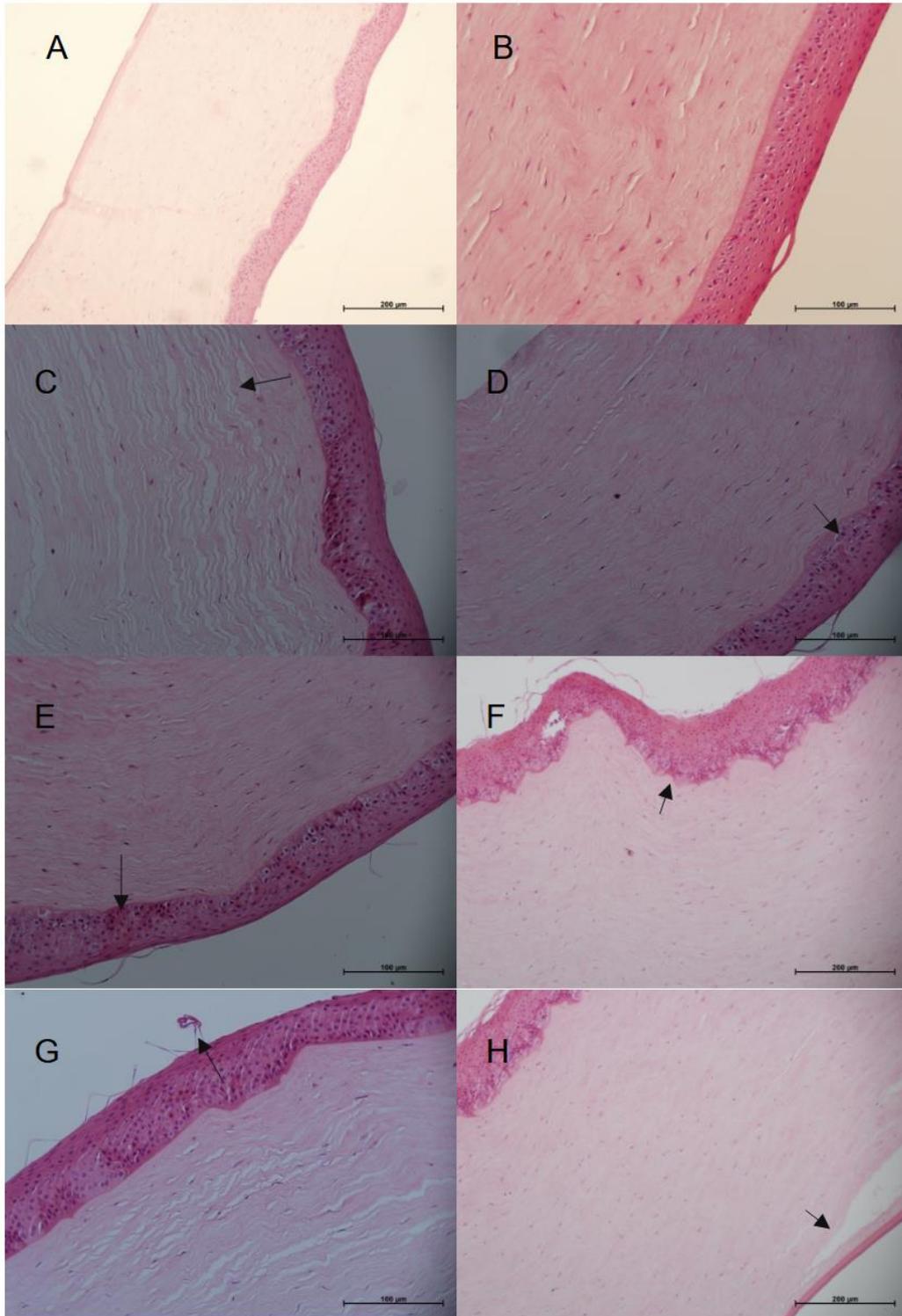
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 14 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento EG do congelamento em freezer -20°C. (A-B) Córneas frescas; (C-H) EG.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 15 – Cortes histológicos de córneas frescas e córneas do tratamento EG do congelamento em freezer -80°C. (A-B) Córneas frescas; (C-H) EG.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 2 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento nos extratos superficiais do epitélio corneano

Grau de desprendimento lamelar superficial do epitélio							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	22%	44%	33%	-	-	-	-
DMSO	11%	67%	22%	-	-	-	-
EG	-	-	78%	-	22%	-	-
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	44%	33%	22%	-	-	-	-
DMSO	25%	25%	50%	-	-	-	-
EG	-	-	78%	-	22%	-	-
Grau de vacuolização dos queratinócitos superficiais							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	11%	-	33%	-	22%	-	33%
DMSO	-	-	44%	44%	11%	-	-
EG	-	-	44%	11%	44%	-	-
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	67%	11%	22%	-	-	-	-
DMSO	-	38%	25%	25%	13%	-	-
EG	-	-	67%	-	11%	-	22%
Grau de pseudo paraqueratinização							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	-	100%	-	-	-	-	-
DMSO	-	11%	89%	-	-	-	-
EG	56%	-	44%	-	-	-	-
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	67%	33%	-	-	-	-	-
DMSO	75%	13%	13%	-	-	-	-
EG	100%	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 3 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento nos extratos basais do epitélio corneano

Grau de descolamento focal do epitélio/estroma							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	44%	-	22%	22%	11%	-	-
DMSO	89%	-	-	-	11%	-	-
EG	33%	-	22%	11%	-	-	33%
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	67%	-	11%	11%	11%	-	-
DMSO	38%	-	-	13%	38%	-	13%
EG	44%	-	11%	-	44%	-	-
Grau de retração e deformidade citoplasmática e nuclear de queratinócitos basais							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	-	-	-	-	67%	-	33%
DMSO	22%	33%	22%	22%	-	-	-
EG	-	33%	11%	22%	33%	-	-
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	-	67%	11%	22%	-	-	-
DMSO	-	25%	13%	13%	38%	-	13%
EG	-	-	78%	-	22%	-	-
Grau de vacuolização dos queratinócitos basais							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	56%	-	-	-	22%	-	22%
DMSO	78%	-	-	11%	11%	-	-
EG	-	-	11%	11%	22%	33%	22%
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	89%	-	-	11%	-	-	-
DMSO	-	-	38%	25%	38%	-	-
EG	-	-	33%	-	22%	22%	22%

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 4 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento no estroma corneano

Grau de formação de fendas não coradas dissociando o estroma							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	-	-	-	56%	33%	-	11%
DMSO	-	-	33%	11%	33%	-	22%
EG	-	-	11%	-	56%	33%	-
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	-	-	44%	33%	22%	-	-
DMSO	13%	25%	13%	25%	13%	-	13%
EG	-	-	33%	22%	11%	33%	-

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 5 - Distribuições de porcentagens dos graus de efeito do processo de congelamento no endotélio corneano

Grau de descolamento da membrana de Descemet							
Congelamento -20°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	-	-	-	11%	56%	-	33%
DMSO	-	44%	44%	-	11%	-	-
EG	-	11%	-	-	22%	56%	11%
Congelamento -80°C							
Tratamento	Ausente	Mínimo	Discreto	Discreto a moderado	Moderado	Moderado a acentuado	Acentuado
Controle	-	-	33%	11%	56%	-	-
DMSO	-	25%	50%	-	25%	-	-
EG	22%	-	11%	-	44%	-	22%

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou desenvolver um método de congelamento que mantivesse a viabilidade de córneas bovinas obtidas de abatedouro para aplicação em teste de BCOP. Inicialmente foi realizada a avaliação das propriedades de intumescência que estão relacionadas com a transferência de água (ou outro solvente) que pode ocorrer por difusão e/ou osmose. A queda de peso dentro das primeiras duas horas de exposição das córneas aos CPAs pode ser devido à permeabilidade dos CPAs no tecido, o que permitiu um equilíbrio osmótico, pela saída de água no tecido para entrada do CPA (PEGG, 2015), consequentemente reduzindo o peso da córnea e possível queda de volume. Newton (1999) observou uma diminuição no volume celular por restrição do influxo de água em oócitos humanos maduros expostos a concentração acima de 0,8M de DMSO, e Mullen *et al.* (2008) verificaram o mesmo com 1,0M de EG. A maior queda de peso no DMSO no teste de intumescência pode ser devido à alta permeabilidade desse CPA nesse tipo de tecido, como já encontrado em córneas humanas, sugerindo que o tecido poderia sobreviver a horas de exposição a esse composto com danos mínimos (WALCERZ & TAYLOR & BUSZA, 1995). Trabalhos anteriores observaram que em óocitos humanos maduros o coeficiente de permeabilidade do DMSO é maior quando comparado ao EG (MULLEN *et al.*, 2008), o que pode se repetir para outros tipos de células e tecidos. Outros trabalhos constataram a eficiência da criopreservação com EG, pois ele penetra rapidamente nas células (RODRIGUES *et al.*, 2004). Isso pode estar relacionado à queda de peso inicial quando o CPA é utilizado. No entanto, por penetrar rapidamente, o ponto de queda de peso mais acentuado pode estar entre o tempo 0 e tempo de 2 horas, visto que outros trabalhos encontraram índices de permeabilidade maior do EG em relação ao DMSO (VIAN & HIGGINS, 2014).

Adjuvantes como o SFB são usados por muitos anos na criopreservação como CPAs não permeáveis, atuando como estabilizadores de membrana (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2006; VOLBERS *et al.*, 2016; FUJISAWA *et al.*, 2019). Assim, o BSA, que possui propriedades biológicas similares ao SFB, tem sido amplamente

pesquisado e usado com o mesmo fim, principalmente para criopreservação de sêmen (CABRITA & ANEL & HERRAEZ, 2001; NANG *et al.*, 2012), mas também para embriões (BRUYÈRE *et al.*, 2012), células e tecidos de mamíferos (LI *et al.*, 2018). O BSA consegue estabilizar membranas e confere resistência ao choque osmótico mantendo a pressão osmótica regularizada (NANG *et al.*, 2012), o que pode explicar a maior contribuição desse adjuvante no peso das córneas em associação com os CPAs observada no presente estudo. Os tratamentos controles de BSA e DMEM+BSA ao final do ensaio foram aqueles com menor peso, mostrando uma capacidade do adjuvante sozinho de manter um pouco da estabilidade das córneas ao longo do tempo. A propriedade antioxidante do BSA é essencial para a criopreservação, visto que esse processo pode criar radicais livres em alguns tecidos quando em contato com os CPAs, e o BSA eliminaria esses radicais (CABRITA & ANEL & HERRAEZ, 2001; AMIDI & FARSHAD & KHOR, 2010).

O SB possui BSA na sua composição, mesmo que em uma concentração muito baixa dessa proteína, bem como de outros tipos de proteínas (PRATA & SGARBIERI, 2005). A capacidade das proteínas de adsorção na superfície da córnea e dos cristais de gelo, diminuindo seu crescimento, pode conferir uma vantagem no processo de criopreservação (BUCKLEY & LILLFORD, 2009). Proteínas transportadoras de ferro presentes no soro bovino em grande concentração (MOSER *et al.*, 1994) possuem carga negativa para atrair o ferro e se ligarem (BRINGHENTI, 2011), podendo ser atraída também pela carga positiva da superfície do tecido corneano, em especial do endotélio (GHINEA & HASU, 1986), formando uma camada de proteção durante o congelamento. Esses fatores justificam a escolha o SB para seguir o congelamento, visto que ele tem potencial para contribuir no processo de congelamento de várias maneiras. A análise macroscópica demonstrou uma alta opacidade do tecido exposto ao tratamento controle, esperado pela falta de CPA intracelular. Porém, ao avaliar a viabilidade celular endotelial, este foi o tratamento com maior número de células viáveis, atestando que o uso do SB foi eficiente para inibir efeitos negativos do congelamento, assim como em Alves *et al.* (2011) que usou soro de coelho para o processo de congelamento. Na avaliação morfológica, é possível observar células

com características do endotélio, mas também em formatos estrelados, que se assemelham aquelas já coradas com AT, sugerindo que essas células com morfologia irregular, mas não coradas, podem ter sofrido dano ou choque osmótico, mas sem total comprometimento da viabilidade celular.

O congelamento lento, com o uso de freezer, pode ser feito de maneira controlada ou não (ONOFRE *et al.*, 2016; HUNT, 2019). O uso da técnica de congelamento lento passivo, ou seja, sem controle da curva já está sendo usado para congelar tecidos ovarianos (LIERMAN *et al.*, 2021), sendo uma alternativa para os equipamentos caros de controle da curva de congelamento. Muitos trabalhos observaram uma maior eficiência de taxas de congelamento mais lentas em células animais, tecidos vegetais e tecidos animais (OGAWA *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013; CORRAL *et al.*, 2018). Ao comparar as temperaturas de armazenamento testadas no presente trabalho, os resultados da histologia indicam danos mais extensos no congelamento realizado a -80°C que a -20°C . A cada estágio de queda de temperatura, os processos celulares deixam de acontecer até a total inatividade celular na temperatura -196°C , em nitrogênio líquido (BAKHACH, 2009; YUAN *et al.*, 2016). Há um intervalo de temperatura crítica, entre -15°C e -60°C , em que acontece a transição de estado líquido para sólido, que é determinante na formação de cristais de gelo (MAZUR, 1977; KARLSSON & TONER, 1996; DJUWANTONO *et al.*, 2011). Tecidos criopreservados a -80°C devem passar por esse intervalo crítico no momento de congelamento e no momento de descongelamento, estando suscetível a formação de cristais de gelo durante um grande intervalo de tempo.

Entendendo que o endotélio é fundamental para a manutenção do transporte de eletrólitos para a camada estromal, influenciando na transparência da córnea, qualquer dano nessa camada celular causaria um desbalanceamento, permitindo uma entrada demasiada de água no tecido e um consequente aumento do peso das córneas (TAYLOR, 1986; PINA, 2007; ARMITAGE, 2011; FARIA *et al.*, 2017). O aumento gradual do peso após as 2 horas iniciais no ensaio de intumescência pode ser devido ao efeito tóxico do CPA que pode ter danificado o tecido, e consequentemente, aumentado a entrada de água. Nesse contexto, trabalhos prévios

observaram que quando o CPA é mantido por período prolongado em contato com o tecido à temperatura ambiente, efeitos tóxicos ocorrem (CANALS *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2011) visto que os tempos de equilíbrio do tecido com o CPA variam de 10 até 30 minutos. Nesse tempo mais curtos, os efeitos tóxicos são mínimos (VAJTA & KUWAYAMA, 2006). O ensaio de intumescência demonstrou que o tempo limite para equilíbrio do CPA no tecido é de no máximo 2 horas, onde o peso apresentado do tecido é o menor dos tempos avaliados, indicando uma possível perda de água do tecido. Esse resultado é importante pois com o maior tempo de penetração do CPA, mais água poderá ser retirada do tecido de forma gradual, para que não cause choque osmótico (PEGG, 2015) ou cause a formação de gelo intra e extracelular (WENG & BEAUCHESNE, 2020).

A viabilidade celular, a área e a morfologia do endotélio são fundamentais para a manutenção da transparência da córnea (EWETE; ANI; ALABI, 2016). Na análise macroscópica, destacou-se que os tratamentos com DMSO, um dos CPA mais usados para congelamento de tecidos e células (KAR *et al.*, 2019), apresentaram os menores níveis de opacidade visual, representando que as camadas celulares permaneceram em algum nível executando a função de manter a hidratação do estroma e, assim, mantendo a transparência da córnea (VAN DEN BOGERD *et al.*, 2019).

Entretanto, observou-se diferença significativa da viabilidade endotelial entre as duas temperaturas de congelamento com o DMSO, tendo o congelamento em freezer -80°C queda drástica no número de células viáveis (Gráfico 4). Apesar do DMSO ter alta citocompatibilidade com o endotélio corneano (WALCERZ & TAYLOR & BUSZA, 1995), os resultados do presente estudo corroboram com outros estudos que demonstraram maior eficiência do congelamento lento (SUKUMAR & KAR, 2019). A avaliação morfológica e histológica mostra dano no congelamento em -80°C, porém também há dano no congelamento em -20°C, indicando que a concentração do CPA pode estar alta para o congelamento do tecido corneado, pois altas concentrações de CPA são citotóxicas (BHATTACHARYA, 2018).

A histologia celular é essencial para compreender os efeitos do processo de congelamento no tecido corneano (FURUKAWA *et al.*, 2015). No presente estudo, foi

possível observar nas lâminas histológicas danos às camadas celulares no tratamento com DMSO em ambas as temperaturas de armazenamento. O congelamento em -20°C apresentou em geral danos que mostram a sensibilidade das camadas mais externas do tecido, enquanto o -80°C teve danos em todas as camadas do tecido, tornando essas combinações dos parâmetros não ideais para o congelamento da córnea bovina.

O EG teve alta opacidade da córnea e o menor índice de células viáveis no endotélio em ambas as temperaturas, porém o congelamento em -80°C teve apenas cerca de 5% de células viáveis, sendo significativamente diferente de todos os outros tratamentos nas duas temperaturas. Por ser um CPA com baixo peso molecular, o EG tem alta permeabilidade em células e tecidos (BORGES *et al.*, 2018) e por ser usado como um CPA que pode pular etapas de aumento gradual de concentração para o congelamento (PANTANO *et al.*, 2000), pode-se apontar possibilidades como: a alta concentração do CPA pode estar provocando choque osmótico nas células pela entrada rápida e aumentando o tempo de exposição do tecido; o modo de congelamento pode estar causando alta concentração do CPA no tecido, causando efeitos tóxicos às células do endotélio; ou no momento do descongelamento a saída do CPA está mais rápida do que a entrada de água, causando choque osmótico (TAKAHASHI *et al.*, 1985). É possível observar no congelamento a -80°C o alto índice de células coradas e muitas células em que não era possível distinguir os limites celulares, visto que o VA cora com maior intensidade regiões com morte celular (HÜNNING *et al.*, 2018). A avaliação histológica destacou danos em todas as camadas do tecido corneano nos tratamentos com os CPAs, corroborando com os resultados de viabilidade do endotélio e danos nas camadas epiteliais, sensíveis a possíveis efeitos de substância que entram em contato com essa camada (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Os parâmetros do congelamento devem ser ajustados a cada tipo de tecido que será congelado (DA CROCE, 2011). Em tal contexto, é possível constatar que os parâmetros essenciais para o sucesso do processo de criopreservação (*i.e.* CPA, concentração de CPA, temperatura de congelamento, etc) ajustados nesse trabalho devem sofrer adaptações para o tecido corneano.

8 CONCLUSÃO

O presente trabalho sinaliza resultados promissores de métodos de criopreservação de córnea bovina, indicando o DMSO como CPA e o congelamento em freezer -20°C como possibilidade de criopreservação de córneas destinados a bancos de córneas bovinas. Os resultados demonstraram integridade da córnea após congelamento, mesmo com danos em determinados tratamentos nas condições estabelecidas no presente trabalho. Assim, futuras avaliações deverão ser feitas para aprimorar os parâmetros de congelamento para estabelecer um método que mantenha a viabilidade corneana após o congelamento.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Lorena Borges *et al.* Avaliação morfológica de córneas de coelhos criopreservadas com etilenoglicol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 376-381, 2011.
- AMIDI, Fardin; FARSHAD, Abbas; KHOR, Abbas Koohi. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 94-99, 2010.
- ARMITAGE, John. Cryopreservation for Corneal Storage. **Developments in Ophthalmology** v. 43, p. 63–69, 2009.
- ARMITAGE, W. John. Preservation of human cornea. **Transfusion Medicine and Hemotherapy** v. 38, n. 2, p. 143–147, 2011.
- ARNALICH-MONTIEL, Francisco *et al.* Treatment of corneal endothelial damage in a rabbit model with a bioengineered graft using human decellularized corneal lamina and cultured human corneal endothelium. **PloS one**, v. 14, n. 11, 2019.
- ARUTYUNYAN, I. V. *et al.* DMSO-Free Cryopreservation of Human Umbilical Cord Tissue. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 166, n. 1, p. 155-162, 2018.
- ASHWORTH, J. L. *et al.* The ocular features of the mucopolysaccharidoses. **Eye**, v. 20, n. 5, p. 553-563, 2006.
- BAKHACH, Joseph. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 119-126, 2009.
- BEEKHUIJZEN, Manon. The era of 3Rs implementation in developmental and reproductive toxicity (DART) testing: current overview and future perspectives. **Reproductive Toxicology**, v. 72, p. 86-96, 2017.
- BHATTACHARYA, Sankha. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. **Cryopreserv. Biotechnol. Biomed Biol. Sci**, v. 7, 2018.
- BOLKER, Benjamin M. **Ecological models and data in R**. Princeton University Press, 2008.

BORGES, Alana A. et al. Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 350-356, 2018.

BRASIL. Resolução nº 35, de 07 de agosto de 2015. **Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo conselho nacional de controle de experimentação animal - CONCEA**. 151. ed. Seção 1, p. 44.

BRINGHENTI, Camila. Alterações nos níveis de ferritina e transferrina e sua relação com doença hepática. 2011.

BRUYÈRE, P. et al. Improved cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1294-1302, 2012.

BUCKLEY, Sarah L.; LILLFORD, Peter J. Antifreeze proteins: their structure, binding and use. In: **Modern Biopolymer Science**. Academic Press, p. 93-128, 2009.

CABRITA, E.; ANEL, L.; HERRAEZ, M. P. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 623-635, 2001.

CAMPOSAMPIERO, Davide *et al.* Cornea preservation in culture with bovine serum or chicken ovalbumin. **Cornea**, v. 22, n. 3, p. 254-258, 2003a.

CAMPOSAMPIERO, Davide *et al.* Improvement of human corneal endothelium in culture after prolonged hypothermic storage. **European Journal of Ophthalmology**, v. 13, n. 9, p. 745-751, 2003b.

CANALS, Marc *et al.* Optimization of a method for the cryopreservation of rabbit corneas: attempted application to human corneas. **Cell and tissue banking**, v. 1, n. 4, p. 271-278, 2000.

CAPELLA, J. A.; KAUFMAN, Herbert E.; ROBBINS, J. E. Preservation of Viable Corneal Tissue. **Archives of Ophthalmology** v. 74, n. 5, p. 669-673, 1965.

CARNEY, Edward W.; STICE, Szabina A. Ethylene Glycol. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. Academic Press, p. 797-809, 2017.

CASTRO, Simone Vieira *et al.* Intracellular cryoprotectant agents: characteristics and use of ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011.

CETINKAYA, Gaye; ARAT, Sezen. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, v. 63, n. 3, p. 292-297, 2011.

CHI, Hee-Jun et al. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. **Human Reproduction**, v. 17, n. 8, p. 2146-2151, 2002.

CORRAL, Ariadna et al. Assessment of the cryoprotectant concentration inside a bulky organ for cryopreservation using X-ray computed tomography. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 419-431, 2015.

CORRAL, Ariadna et al. An optimized controlled rate slow cooling protocol for bovine ovarian tissue cryopreservation by means of X-ray computed tomography. **Theriogenology**, v. 119, p. 183-188, 2018.

COSTA, Daniel et al. Cryopreservation (-20°C) of equine corneoscleral tissue: Microbiological, histological, and ultrastructural study. **Veterinary ophthalmology**, v. 22, n. 4, p. 493-501, 2019.

DA CROCE, Lilian. Criopreservação de tecidos de cordão umbilical. **Dissertação de mestrado**. 2011.

DIAZ-JIMENEZ, M. et al. Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. **Animal reproduction science**, v. 189, p. 103-109, 2018.

DJUWANTONO, Tono et al. A comparison of cryopreservation methods: Slow-cooling vs. rapid-cooling based on cell viability, oxidative stress, apoptosis, and CD34+ enumeration of human umbilical cord blood mononucleated cells. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2011.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

DOUGHMAN, Donald J. *et al.* Endothelium of the human organ cultured cornea: an electron microscopic study. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 71, p. 304, 1973.

DRAIZE, John H.; WOODARD, Geoffrey; CALVERY, Herbert O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 377-390, 1944.

EC–EUROPEAN COMMISSION *et al.* **Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics**. 2013.

ELLIOTT, Gloria D.; WANG, Shangping; FULLER, Barry J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p. 74-91, 2017.

EWETE, Temitope; ANI, Efeoghene Uchenna; ALABI, Adegboyega Sunday. Normal corneal endothelial cell density in Nigerians. **Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)**, v. 10, p. 497, 2016.

FARIA, Sidney Julio *et al.* Preservação de córneas: uma breve história. **e-Oftalmo. CBO: Revista Digital de Oftalmologia**, v. 3, n. 3, 2017.

FASANO, Giovanna *et al.* Cryopreservation of human failed maturation oocytes shows that vitrification gives superior outcomes to slow cooling. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 243-247, 2010.

FONSECA, J. F. *et al.* Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1489-1496, 2018.

FONTES, Bruno Machado *et al.* Conservação da Córnea para o Transplante. *In*: MOREIRA, Hamilton *et al.* **Banco de olhos, transplante de córneas**. 3^a. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2013. cap. 19, p. 57-58. ISBN 978-85-7006-620-6. Disponível em: https://issuu.com/computadorseguro/docs/02__banco_de_olhos/77. Acesso em: 18 jul. 2020.

FOX, James M. *et al.* Methodology for reliable and reproducible cryopreservation of human cervical tissue. **Cryobiology**, v. 77, p. 14-18, 2017.

FREITAS-RIBEIRO, Sara *et al.* Strategies for the hypothermic preservation of cell sheets of human adipose stem cells. **PloS one**, v. 14, n. 10, p. e0222597, 2019.

FUJISAWA, Ryota *et al.* Cryopreservation in 95% serum with 5% DMSO maintains colony formation and chondrogenic abilities in human synovial mesenchymal stem cells. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 20, n. 1, p. 316, 2019.

FURUKAWA, Masatoshi *et al.* Histopathological evaluation of the ocular-irritation potential of shampoos, make-up removers and cleansing foams in the bovine corneal opacity and permeability assay. **Journal of toxicologic pathology**, v. 28, n. 4, p. 243-248, 2015.

GAUTHERON, Pierre *et al.* Bovine corneal opacity and permeability test: an *in vitro* assay of ocular irritancy. **Toxicological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 442-449, 1992.

GERSH, Isidore. The Altmann technique for fixation by drying while freezing. **The Anatomical Record**, v. 53, n. 3, p. 309-337, 1932.

GHINEA, N.; HASU, M. Charge effect on binding, uptake and transport of ferritin through fenestrated endothelium. **Journal of submicroscopic cytology**, v. 18, n. 4, p. 647-659, 1986.

GUHAD, Faisal. Introduction to the 3Rs (refinement, reduction and replacement). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 58-59, 2005.

GURRUCHAGA, H. et al. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. **Journal of Controlled Release**, v. 281, p. 119-138, 2018.

HO, Joanne W. et al. Comparisons of Cornea Cold, a New Corneal Storage Medium, and Optisol-GS. **Cornea**, v. 39, n. 8, p. 1017-1019, 2020.

HÜNNING, Paula Stieven et al. Morphology of endothelial cells from different regions of the cornea of dogs. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

HUNT, Charles J. Technical considerations in the freezing, low-temperature storage and thawing of stem cells for cellular therapies. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 134-150, 2019.

JANG, Tae Hoon *et al.* Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative medicine research**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2017.

KAR, Mousumi et al. Current Developments in Excipient Science: Implication of Quantitative Selection of Each Excipient in Product Development. In: **Basic Fundamentals of Drug Delivery**. Academic Press, 2019. p. 29-83.

KARLSSON, Jens OM; TONER, Mehmet. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. **Biomaterials**, v. 17, n. 3, p. 243-256, 1996.

KATZIN, Herbert M. The preservation of corneal tissue by freezing and dehydration. **American journal of ophthalmology**, v. 30, n. 9, p. 1128-1134, 1947.

KAUFMAN, Herbert E. *et al.* Optisol Corneal Storage Medium. **Archives of Ophthalmology** v. 109, n. 6, p. 864-868, 1991.

LANE-PETTER, W. The Cruelty to Animals Act, 1876. **Medicine, Science and the Law**, v. 2, n. 2, p. 87-95, 1962.

LEONEL, Ellen Cristina Rivas *et al.* Cat ovarian follicle ultrastructure after cryopreservation with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 83, p. 9-14, 2018.

LI, Hao et al. Effects of five cryoprotectants on proliferation and differentiation-related gene expression of frozen-thawed bovine calf testicular tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 5, p. 1211-1218, 2018.

LIERMAN, Sylvie et al. Passive slow freezing is an efficacious and cost-effective alternative to controlled slow freezing for ovarian tissue cryopreservation. **Cryobiology**, v. 100, p. 164-172, 2021.

LINDSTROM, Richard L. *et al.* A metabolic and electron microscopic study of human organ-cultured cornea. **American Journal of Ophthalmology** v. 82, n. 1, p. 72–82, 1976.

LIU, Yibing *et al.* Development of a programmable freezing technique on larval cryopreservation in *Mytilus galloprovincialis*. **Aquaculture**, v. 516, p. 734554, 2020.

MA, X. *et al.* Cryopreservation: Organ preservation. In: MOO-YOUNG, M. B. T.-C. B. (THIRD E. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. Oxford: Pergamon, p. 689–708, 2019.

MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 53, n. 1, p. 51-57, 2006.

MAZUR, Peter. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **The Journal of general physiology**, v. 47, n. 2, p. 347-369, 1963.

MAZUR, Peter. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 14, n. 3, p. 251-272, 1977.

MCCAREY, Bernard E; KAUFMAN, Herbert E. Original Articles Improved corneal storage. **Investigative Ophthalmology** p. 165–173, 1968.

MCGINNIS, L. K.; DUPLANTIS JR, S. C.; YOUNGS, C. R. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. **Animal Reproduction Science**, v. 30, n. 4, p. 273-280, 1993.

MOSER, M. et al. Blood Serum Transferrin Concentration in Cattle in Various Physiological States, in Veal Calves Fed Different Amounts of Iron, and in Cattle Affected by Infectious and Non-Infectious Diseases. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 41, n. 1-10, p. 413-420, 1994.

MULLEN, Steven F. et al. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 6, p. 1812-1825, 2008.

- NANG, C. F. et al. Bovine serum albumin: survival and osmolarity effect in bovine spermatozoa stored above freezing point. **Andrologia**, v. 44, p. 447-453, 2012.
- NEWTON, H. *et al.* Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 27-33, 1999.
- NO, OECD Test. 437: Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section**, v. 4, 2017.
- OGAWA, Yoichi et al. High-throughput cryopreservation of plant cell cultures for functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 5, p. 943-952, 2012.
- OLIVEIRA, Gisele Augusto Rodrigues et al. Short Time Exposure (STE) test in conjunction with Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay including histopathology to evaluate correspondence with the Globally Harmonized System (GHS) eye irritation classification of textile dyes. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1283-1288, 2015.
- ONOFRE, J. et al. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. **Human reproduction update**, v. 22, n. 6, p. 744-761, 2016.
- PAREKH, Mohit *et al.* A simplified technique for in situ excision of cornea and evisceration of retinal tissue from human ocular globe. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 64, p. e3765, 2012.
- PEGG, David E. Principles of cryopreservation. In: **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Springer, New York, NY. p. 3-19, 2015.
- PEGG, David. E. The history and principles of cryopreservation. In: **Seminars in reproductive medicine**. Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662. p. 005-014, 2002.
- PEGG, David E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. **Cryobiology**, v. 60, n. 3, p. S36-S44, 2010.
- PELS, E.; SCHUCHARD, Y. Organ-culture preservation of human corneas. **Documenta Ophthalmologica** v. 56, n. 1-2, p. 147-153, 1983.
- PEREIRA, Leonardo Rodrigues. Preservação de córnea humana nos meios eusol-c® e optisol-gs®. 2011.

PHAM, Chau *et al.* Donor Endothelial Specular Image Quality in Optisol GS and Life4°C. **International Journal of Eye Banking** v. 1, n. 2, p. 1–8, 2013.

PINA, Fábio Luiz Silva. **Preservação de córneas de felinos domésticos (*Felis catus* - Linnaeus, 1758) em conservante utilizando a água de coco como meio nutritivo**. 2007. 54 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

POLGE, Christopher; SMITH, Audrey U.; PARKES, Alan Sterling. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666-666, 1949.

PRATA, Ana Silvia; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Obtenção e caracterização química e nutricional *in vitro* das proteínas do soro de sangue bovino. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 2, p. 327-332, 2005.

RAM, Rebecca. Extrapolation of animal research data to humans: an analysis of the evidence. **Animal Experimentation: Working Towards a Paradigm Change**. Brill, p. 341-375, 2019.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

ROBINSON, N. Bryce *et al.* The Current State of Animal Models in Research: A Review. **International Journal of Surgery**, 2019.

RODRIGUES, Ana Paula Ribeiro *et al.* Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1009-1024, 2004.

ROUTLEDGE, Caroline; ARMITAGE, W. John. Cryopreservation of cornea: a low cooling rate improves functional survival of endothelium after freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 277-283, 2003.

RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard; HUME, Charles Westley. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

SÃO PAULO (Estado). **Lei nº 15.316, de 23 de janeiro de 2014**. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. São Paulo, SP, 24 jan. 2014. Seção 1, p. 1. Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2014/lei-15316-23.01.2014.html>. Acesso em: 14 jul. 2019

STACEY, Glyn N.; DAY, John G. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Humana Press. p. 1-14, 2007.

SUDAGAR, Mohammad; KEIVANLOO, Saeide; HAJIBEGLOU, Abasali. Effect of different permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. **Aquaculture international**, v. 26, n. 1, p. 75-84, 2018.

SUKUMAR, S.; KAR, S. P. Numerical analysis of an enhanced cooling rate cryopreservation process in a biological tissue. **Journal of thermal biology**, v. 81, p. 146-153, 2019.

SUNDARESAN, Yogapriya et al. Comparison of structural integrity and functional status of corneal endothelium stored in Cornisol and Optisol-GS. **Indian journal of ophthalmology**, v. 67, n. 10, p. 1579, 2019.

SZTEIN, Jorge M.; TAKEO, Toru; NAKAGATA, Naomi. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 82, p. 57-63, 2018.

TAKAHASHI, Tsuneo et al. Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cells. **Cryobiology**, v. 22, n. 4, p. 336-350, 1985.

TAYLOR, Katy. Recent developments in alternatives to animal testing. **Animal experimentation: working towards a paradigm change**. Brill. p. 585-609, 2019.

TAYLOR, Michael J. Clinical cryobiology of tissues: Preservation of corneas. **Cryobiology** v. 23, n. 4, p. 323–353, 1986.

TAYLOR, Michael J. *et al.* 22 Vitrification in Tissue Preservation: New Developments. **Life in the Frozen State**, BJ Fuller, N. Lane, and EE Benson, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p. 604-641, 2004.

TRIPATHI, Himi *et al.* Long-term preservation of donor corneas in glycerol for keratoplasty: exploring new protocols. **British Journal of Ophthalmology**, v. 100, n. 2, p. 284-290, 2016.

VAJTA, Gábor; KUWAYAMA, Masashige. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006.

VAN NORMAN, Gail A. Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: is it time to rethink our current approach?. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 4, n. 7, p. 845-854, 2019.

VAN DEN BOGERD, Bert et al. Corneal endothelial cells over the past decade: are we missing the mark (er)? **Translational vision science & technology**, v. 8, n. 6, p. 13-13, 2019.

VIAN, Alex M.; HIGGINS, Adam Z. Membrane permeability of the human granulocyte to water, dimethyl sulfoxide, glycerol, propylene glycol and ethylene glycol. **Cryobiology**, v. 68, n. 1, p. 35-42, 2014.

VOLBERS, Jan-Cedric et al. Cryopreservation of cells using defined serum-free cryoprotective agents. **Current Directions in Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 315-318, 2016.

WALCERZ, D. B.; TAYLOR, M. J.; BUSZA, A. L. Determination of the kinetics of permeation of dimethyl sulfoxide in isolated corneas. **Cell biophysics**, v. 26, n. 2, p. 79-102, 1995.

WALKENBACH, R. J.; CORWIN, J. G.; YE, G. S. Corneal function after storage in commercial eye bank media. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** v. 32, n. 5, p. 1551–1557, 1991.

WENG, Lindong; BEAUCHESNE, Pascal R. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. **Cryobiology**, 2020.

WOWK, Brian. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, v. 60, n. 1, p. 11-22, 2010.

WUSTEMAN, Monica C.; BOYLAN, Serena; PEGG, David E. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 38, p. 1934-1943, 1997.

XIMENES, Karine Feitosa et al. The role of Descemet's membrane in the pathogeny of corneal edema following anterior segment surgery. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 73, p. 262-268, 2014.

YANG, Chiang-Yi et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant concentration on intracellular ice formation of small abalone (*Haliotis diversicolor*) eggs. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 7-16, 2013.

YUAN, Ye et al. Efficient long-term cryopreservation of pluripotent stem cells at– 80 C. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.