

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**VITÓRIA MARIA DE REZENDE**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL  
DE CÉLULAS-TRONCO ESTROMAIS DA CÓRNEA HUMANA PARA  
APLICAÇÕES EM ENGENHARIA TECIDUAL**

**GOIÂNIA**

**2026**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

### 1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): VITÓRIA MARIA DE REZENDE

Título do trabalho: Caracterização fenotípica e potencial de diferenciação neuronal de células-tronco estromais da córnea humana para aplicações em engenharia tecidual

### 2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a)(s) autor(a)(es)(as) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

#### Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

**Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Artur Christian Garcia Da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 16/06/2026, às 12:05, 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 **Vitória Maria De Rezende, Discente**, em 16/06/2026, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Termo de Ciência e de Autorização TCCG (RI) TECA 6267929 SEI 23070.025955/2026-99 / pg. 1



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **6267929** e o código CRC **667B20EB**.

**VITORIA MARIA DE REZENDE**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO  
NEURONAL DE CÉLULAS-TRONCO ESTROMAIS DA CÓRNEA HUMANA PARA  
APLICAÇÕES EM ENGENHARIA TECIDUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Goiás, como  
requisito para obtenção do título de  
bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Artur Christian Garcia  
da Silva

Co-Orientadora: Rafaela Campos de  
Menezes.

GOIÂNIA

2026

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rezende, Vitoria Maria de

Caracterização fenotípica e potencial de diferenciação neuronal de células-tronco estromais da córnea humana para aplicações em engenharia tecidual [Manuscrito] / Vitoria Maria de Rezende. - 2026.

LX, 60 f.: 2026

Orientador: Prof. Dr. Artur Christian Garcia da Silva ; co-orientadora: Esp. Rafaela Campos de Menezes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2026.

Anexo.

Apêndice.

1. Células-tronco Estromais da Córnea. 2. Diferenciação Neural. 3. Bioengenharia de Tecidos. 4. Córnea Humana.

I. Silva, Artur Christian Garcia da, orient. II. Menezes, Rafaela Campos de , co-orient. III. Título.

CDU 60



**UFG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

### ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos três dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte seis iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Caracterização fenotípica e potencial de diferenciação neuronal de células-tronco estromais da córnea humana para aplicações em engenharia tecidual", de autoria de Vitória Maria de Rezende, do curso de Farmácia, da Faculdade de Farmácia da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Prof. Dr. Artur Christian Garcia da Silva - orientador (FF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva (FF/UFG) e Prof. José Rodrigues do Carmo Neto (IPTSP/UFG). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de (10,0), tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Artur Christian Garcia Da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 03/06/2026, às 15:23, 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 **Luís Antonio Dantas Silva, Professor do Magistério Superior**, em 03/06/2026, às 15:24, 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 **Jose Rodrigues Do Carmo Neto, Professor do Magistério Superior**, em 15/06/2026, às 17:13, 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 site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **6217315** e o código CRC **1AEABFD4**.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Liliane e Uezanei, por todo o amor, apoio e dedicação ao longo da minha trajetória acadêmica. Desde os primeiros anos escolares até a conclusão desta graduação, vocês sempre fizeram o possível para que eu tivesse acesso à educação e às oportunidades necessárias para chegar até aqui. Sem o esforço contínuo, os incentivos diários e os inúmeros sacrifícios feitos por vocês, essa caminhada teria sido muito mais difícil. Esta conquista também pertence a vocês.

À minha irmã Gabriela e ao meu noivo Marcelo, agradeço por estarem ao meu lado durante toda a graduação, oferecendo apoio, compreensão, conselhos e carinho nos momentos mais desafiadores. Obrigada por acreditarem em mim, celebrarem minhas conquistas e tornarem essa jornada mais leve e especial.

Ao meu orientador, Artur, e à minha coorientadora, Rafaela, agradeço pela orientação, apoio e ensinamentos ao longo da escrita deste trabalho e durante o período de iniciação científica. Obrigada pela paciência, disponibilidade e contribuição para meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Aos meus amigos da faculdade, que compartilharam comigo desde os primeiros períodos até os momentos finais desta caminhada, deixo minha sincera gratidão. Foram anos dividindo aprendizados, seminários, provas, inseguranças, conquistas e muitas memórias que levarei para a vida. A presença e o companheirismo de vocês fizeram toda a diferença nessa trajetória.

Ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, agradeço pelas oportunidades, experiências e ensinamentos proporcionados ao longo desses cinco anos. Cada disciplina, estágio, projeto e desafio contribuiu não apenas para minha formação profissional, mas também para meu crescimento pessoal.

Por fim, encerro este ciclo com o coração cheio de gratidão e orgulho pela trajetória construída até aqui. Este trabalho representa não apenas a conclusão de uma etapa acadêmica, mas também o resultado de anos de dedicação, aprendizado e perseverança.

## RESUMO

Diante das restrições éticas e translacionais associadas aos modelos animais na pesquisa ocular, o emprego de células-tronco surge como uma alternativa valiosa. Essas células apresentam amplas vantagens em aplicações biotecnológicas, permitindo o desenvolvimento de modelos *in vitro* mais representativos da fisiologia humana. Este estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente células-tronco estromais da córnea humana (hCSCs) obtidas de córneas descartadas para transplante e investigar seu potencial de diferenciação neural *in vitro*. As hCSCs foram isoladas e submetidas à expansão celular, citometria de fluxo, ensaios de multipotência e protocolos de diferenciação neural. As células apresentaram perfil imunofenotípico compatível com linhagens mesenquimais (CD73+/CD90+/CD105+) e ausência de marcadores hematopoiéticos (CD34-/CD45-). Durante a diferenciação neural, observou-se redução progressiva da expressão dos marcadores progenitores Nestina e Pax6, associada ao aumento da expressão de  $\beta$ III-tubulina, indicando maturação neuronal. Além disso, as células demonstraram capacidade de organização tridimensional em esferoides. Os resultados indicam que córneas descartadas constituem uma fonte viável e de baixo custo para obtenção de hCSCs, destacando o potencial dessas células para aplicações em modelagem *in vitro* de neuropatias oculares e medicina regenerativa.

Palavras-chave: células-tronco estromais da córnea; diferenciação neural; bioengenharia de tecidos; córnea humana.

## **ABSTRACT**

Given the ethical and translational restrictions associated with animal models in ocular research, the use of stem cells emerges as a valuable alternative. These cells offer broad advantages in biotechnological applications, allowing the development of in vitro models that are more representative of human physiology. This study aimed to phenotypically characterize human corneal stromal stem cells (hCSSCs) obtained from corneas discarded for transplantation and to investigate their potential for neural differentiation in vitro. hCSSCs were isolated and subjected to cell expansion, flow cytometry, multipotency assays, and neural differentiation protocols. The cells presented an immunophenotypic profile compatible with mesenchymal lineages (CD73+/CD90+/CD105+) and an absence of hematopoietic markers (CD34-/CD45-). During neural differentiation, a progressive reduction in the expression of the progenitor markers Nestin and Pax6 was observed, associated with an increase in the expression of  $\beta$ III-tubulin, indicating neuronal maturation. Furthermore, the cells demonstrated the ability to organize into three-dimensional spheroids. The results indicate that discarded corneas constitute a viable and low-cost source for obtaining hCSSCs, highlighting the potential of these cells for applications in vitro modeling of ocular neuropathies and regenerative medicine.

**Keywords:** corneal stromal stem cells; neural differentiation; tissue bioengineering; human cornea.

## SUMÁRIO

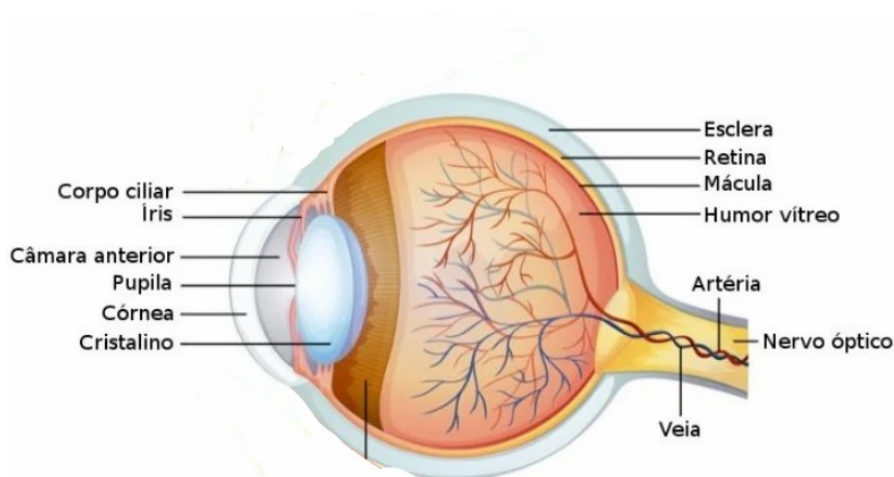
|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                       | <b>10</b> |
| 1.1 Sistema Fotorreceptor...                                                               | 10        |
| 1.2 Córnea: função e estrutura tecidual e celular.....                                     | 11        |
| 1.3 Células-Tronco Estromais da Córnea...                                                  | .13       |
| 1.4 Aplicações das hCSSC em Estudos Pré-Clínicos                                           | 14        |
| <b>2 OBJETIVOS...</b>                                                                      | <b>20</b> |
| 2.1 Objetivos Específicos...                                                               | 20        |
| <b>ARTIGO</b>                                                                              | <b>21</b> |
| <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                          | <b>23</b> |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS...</b>                                                            | <b>24</b> |
| 3.1 Isolamento e expansão das hCSSCs...                                                    | 24        |
| 3.2 Citometria de Fluxo...                                                                 | 25        |
| 3.3 Diferenciação trilinear                                                                | 26        |
| 3.3.1 Diferenciação adipogênica.....                                                       | 26        |
| 3.3.2 Diferenciação condrogênica...                                                        | 27        |
| 3.3.3 Diferenciação osteogênica...                                                         | 27        |
| 3.4 Diferenciação das hCSSCs em Células Neurais da Retina...                               | 28        |
| 3.4.1 Etapa 1 – Formação das Neuroesferas (Dia 0 ao Dia 3).                                | 28        |
| 3.4.2 Etapa 2 – Diferenciação em Substrato Revestido com Matrigel...                       | 29        |
| 3.4.3 Imunofluorescência para Neuroesferas...                                              | 29        |
| 3.4.4 Imunofluorescência após a migração das células a partir das neuroesferas (Dia 25)... | 30        |
| <b>4 RESULTADOS...</b>                                                                     | <b>31</b> |
| 4.1 Citometria de Fluxo...                                                                 | 31        |
| 4.2 Diferenciação trilinear...                                                             | 35        |
| 4.3 Diferenciação das hCSSCs em Células Neurais                                            | 39        |
| <b>5 DISCUSSÃO...</b>                                                                      | <b>44</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO...</b>                                                                      | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS...</b>                                                                      | <b>51</b> |
| <b>ANEXOS...</b>                                                                           | <b>57</b> |
| <b>APÊNDICES...</b>                                                                        | <b>60</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O sistema fotorreceptor

O globo ocular humano é uma estrutura altamente especializada do sistema nervoso sensorial, encarregada de captar e converter luz em impulsos nervosos que permitem a formação da visão (CIOFFI, 2020) (Figura 1). Em termos anatômicos, o globo ocular é composto por três principais túnicas: fibrosa, vascular e nervosa (CIOFFI, 2020). A túnica fibrosa, a camada mais externa, serve como uma cobertura protetora e é formada pela esclera na região posterior e pela córnea na parte anterior (CIOFFI, 2020; NG; OLIVER, 2018). A esclera desempenha funções cruciais, como fornecer suporte estrutural, proteção mecânica e garantir a rigidez do olho (FENG; YOU; YUAN, 2019; NG; OLIVER, 2018).

**Figura 1: Esquema da anatomia do globo ocular**



*Diagrama anatômico do olho humano em corte sagital, destacando as principais estruturas oculares internas e externas. Na região anterior, evidenciam-se a córnea, a câmara anterior, a pupila, a íris, o cristalino e o corpo ciliar. Na porção posterior, estão representadas as camadas e componentes da parede ocular (esclera, retina, mácula e humor vítreo), além da vascularização centralizada na artéria e veia que acompanham o nervo óptico. Fonte: Adaptado de RetinaPro (2023).*

No interior do globo ocular, encontram-se o humor aquoso, o cristalino e o humor vítreo, que colaboram no desempenho das funções ópticas (CIOFFI, 2020).

O humor aquoso é essencial para manter a pressão intraocular e oferecer nutrientes aos tecidos que não possuem vasos sanguíneos (KUMAR; KUMAR; ATTULURI, 2024). O cristalino funciona como uma lente biconvexa dinâmica, ajustando sua curvatura para acomodar a vista e assegurar o foco claro das imagens (KUMAR; KUMAR; ATTULURI, 2024). Já o humor vítreo, uma substância gelatinosa, mantém a forma esférica do globo ocular e garante que os raios de luz sejam transmitidos com precisão até a parte posterior do olho (CIOFFI, 2020).

A túnica vascular intermediária, também conhecida como úvea, inclui a íris, o corpo ciliar e a coroide (KUMAR; KUMAR; ATTULURI, 2024). A íris regula a quantidade de luz que entra nos olhos por meio da contração e dilatação da pupila. O corpo ciliar é responsável pela produção contínua do humor aquoso e pelo controle dos músculos que ajustam o cristalino. A coroide, por sua vez, é rica em vasos sanguíneos e desempenha um papel importante na nutrição dos tecidos adjacentes do olho (KUMAR; KUMAR; ATTULURI, 2024).

Por fim, a túnica nervosa interna é representada pela retina, um tecido neural complexo formado por várias camadas de células (CIOFFI, 2020). Essa estrutura se estende até o início do nervo óptico na parte posterior do olho (FENG; YOU; YUAN, 2019). A retina abriga células fotorreceptoras que dão início ao processo visual em colaboração com outras estruturas de suporte ocular (CIOFFI, 2020; KUMAR; KUMAR; ATTULURI, 2024). Os impulsos elétricos gerados pelas células da retina viajam através das vias neurais sob forma de potenciais de ação (CIOFFI, 2020) e são transmitidos pelo nervo óptico ao córtex cerebral, onde ocorre o processamento final das informações visuais (FENG; YOU; YUAN, 2019).

## **1.2 Córnea: função e estrutura tecidual e celular**

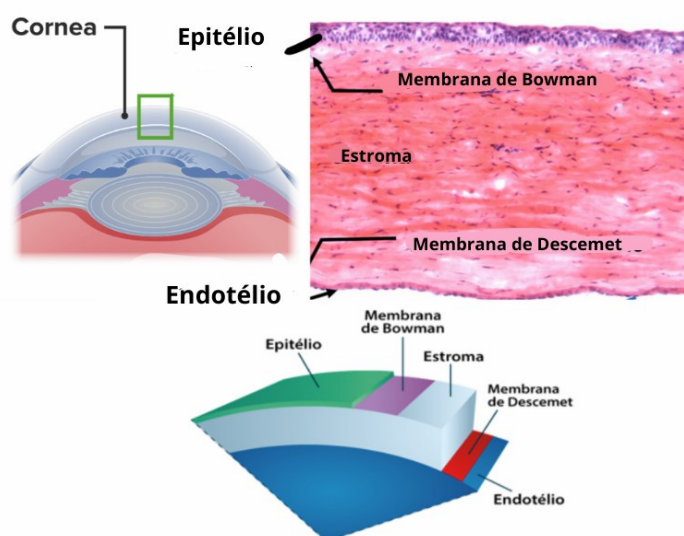
A córnea, posicionada como a porção anterior e transparente da túnica fibrosa, constitui o elemento inicial de contato com os estímulos luminosos do meio externo (CIOFFI, 2020; NG; OLIVER, 2018). Esse tecido ocular singular apresenta características morfológicas específicas que o tornam essencial para a manutenção da acuidade visual (FENG; YOU; YUAN, 2019). Anatomicamente, a estrutura corneal é definida por sua conformação convexa, esférica, completamente avascular

e densamente innervada por terminações nervosas sensoriais (ALLAN, 1999; HUANG; LI, 2007; WHITCHER *et al.*, 2001).

Sua função fisiológica primária consiste em transmitir a luz de forma limpa e fornecer aproximadamente dois terços do poder refrativo total do sistema ocular (FENG; YOU; YUAN, 2019). Além de sua atuação óptica essencial, este tecido desempenha um papel de barreira mecânica crucial na proteção das estruturas oculares internas contra agressões físicas, químicas e invasões microbianas (KAMIL; MOHAN, 2021).

Anatomicamente, o corte histológico da córnea humana revela que ela é constituída por três camadas celulares principais denominadas epitélio, estroma e endotélio (Figura 2) (MCNUTT; MOHAN, 2020). Esses estratos celulares encontram-se organizados e intercalados por duas membranas especializadas (MCNUTT; MOHAN, 2020). A primeira delas é a membrana de Bowman, cuja matriz separa o epitélio do estroma anterior (MCNUTT; MOHAN, 2020). Por sua vez, a segunda estrutura acelular é a membrana de Descemet, localizada estrategicamente entre o estroma posterior e a monocamada do endotélio (MCNUTT; MOHAN, 2020).

**Figura 2: Esquema da anatomia das camadas da córnea humana**



*Diagrama representando a anatomia. A córnea é avascular e consiste no epitélio externo composto por células superficiais e células basais. O epitélio forma 10% da córnea e protege o olho. Abaixo dele está a camada de Bowman - uma lâmina acelular que contribui para a resistência mecânica da superfície. O estroma tem um papel crucial na homeostase, reparo e manutenção da transparência da córnea. Já a membrana de Descemet é uma estrutura de repouso para as células endoteliais. O endotélio controla a hidratação da córnea e ajuda a manter a transparência. Fonte: Adaptado de Mohan et al. (2022, p. 43).*

O epitélio corneal representa a camada mais externa e está em contato direto com o meio externo. É um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, composto por três tipos celulares: células superficiais, células em asa (intermédias) e células basais (MCNUTT; MOHAN, 2020). A homeostasia e renovação contínua desse epitélio, que ocorre a cada 7 a 10 dias, são sustentadas por células-tronco localizadas na região limbar (KAMIL; MOHAN, 2021)

Abaixo das células basais, encontra-se a membrana basal epitelial (EBM), uma estrutura acelular composta por matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno, lamininas e proteoglicanos, que suporta a organização tecidual e influencia o reparo de feridas (TORRICELLI et al., 2013). A membrana de Bowman está posicionada imediatamente após a EBM em córneas humanas, sendo formada por fibras de colágeno orientadas aleatoriamente. Sua presença não é universal em todas as espécies e sua função fisiológica precisa ainda não está completamente elucidada (WILSON, 2020a).

O estroma é a camada mais espessa, correspondendo a aproximadamente 90% da espessura corneal. É majoritariamente composto por água (cerca de 80% do peso) e por uma MEC altamente organizada, com lamelas paralelas de fibras de colágeno (principalmente dos tipos I, V e VI) embebidas em uma matriz de proteoglicanos, como decorina, lumicano e queratocano (ESPANA; BIRK, 2020; KAMIL; MOHAN, 2021).

Nesse contexto, os fibroblastos do estroma, são células fusiformes e quiescentes em condições normais, desempenhando um papel central na homeostase, no reparo e na manutenção da transparência da córnea (CATALA et al., 2021; WILSON et al., 2001). Todavia, qualquer dano ao estroma — seja por trauma, infecção ou doença — pode romper esse equilíbrio. Quando os fibroblastos

são ativados por injúrias, ocorre uma redução na expressão de seus marcadores típicos e a progressiva diferenciação em fibroblastos ativados e, posteriormente, em miofibroblastos, através da aquisição de feixes de actina-miosina.

Esse processo de reparo, embora essencial, pode levar à perda irreversível da transparência e da visão devido à formação de cicatrizes opacas (ANDERSON et al., 2004; FULLWOOD, 2004; MOHAN et al., 2022). Adicionalmente, o estroma abriga uma população de células dendríticas com atividades fagocíticas e de apresentação de antígenos, sendo densamente innervado por fibras sensoriais do nervo trigêmeo, o que torna a córnea um dos tecidos mais sensíveis do corpo humano (HAMRAH; DANA, 2007; HE; BAZAN, 2016).

A membrana de Descemet é uma membrana basal espessa, secretada continuamente pelas células endoteliais, e é composta predominantemente por colágeno tipo IV. Ela serve como uma lâmina de suporte para o endotélio (MCNUTT; MOHAN, 2020). Por fim, o endotélio corneal consiste em uma monocamada de células cuboides ricos em mitocôndrias. Em humanos, essas células possuem capacidade de proliferação muito limitada. Sua função primordial é bombear ativamente o excesso de água do estroma para o humor aquoso, mantendo assim o estado de deturgescência que é fundamental para a transparência corneal (HE; BAZAN, 2016; MCNABB; MOHAN, 2020).

A transparência única da córnea é um atributo que depende criticamente da arquitetura ordenada das fibras de colágeno no estroma, da ausência de vasos sanguíneos e linfáticos, e de um rigoroso controle imunológico (MEEK; KNUPP, 2015). Qualquer alteração nessas organizações ultrastrutural, frequentemente resultante de injúrias, infecções ou doenças, pode levar à opacidade, formação de cicatrizes e comprometimento visual significativo (KAMIL; MOHAN, 2021).

### **1.3 Células-Tronco Estromais da Córnea**

Problemas e patologias relacionadas à córnea são a terceira maior causa de deficiência visual globalmente (ALLAN, 1999; Huang & Li, 2007; Whitcher et al., 2001), afetando cerca de 12,7 milhões de pessoas que aguardam por transplantes de córnea (GARCÍA-ACOSTA et al., 2017). Dentre as alterações corneanas mais

comuns estão o ceratocone, as distrofias da córnea, o olho seco crônico e casos de fibrose (MENDA et al., 2020).

O transplante de córnea, também conhecido como ceratoplastia, é reconhecido como o procedimento de transplante de órgão mais recorrente (DUAN et al., 2017). No entanto, essa prática enfrenta uma série de obstáculos, como a escassez global de córneas doadas, além das altas taxas de falha e rejeição do enxerto a longo prazo. Com o passar das décadas, a viabilidade dos enxertos diminui significativamente (WILKINS et al., 2003; WILLIAMS & MØLLER, 2016). A crescente demanda por córneas para transplante destaca a necessidade de aproveitar tecidos biológicos que, de outra forma, seriam descartados pelos bancos de olhos por não atenderem aos rigorosos critérios clínicos e biológicos exigidos para transplantes convencionais (WILSON et al., 2015).

Aproximadamente 44% das córneas captadas acabam sendo descartadas devido a triagens biológicas inadequadas, períodos prolongados de armazenamento ou baixa densidade de células endoteliais viáveis (WILSON et al., 2015). Entretanto, esses tecidos ainda preservam sua matriz extracelular estromal e podem servir como fontes valiosas de células primárias multipotentes (WILSON et al., 2015). Além disso, é possível isolar e expandir populações celulares viáveis desses tecidos *in vitro*, possibilitando seu uso em terapias celulares (PARIKUMAR et al., 2018). Mesmo amostras com baixa densidade celular endotelial pode fornecer precursores endoteliais humanos funcionais para aplicações terapêuticas (PARIKUMAR et al., 2018).

No contexto estromal, córneas humanas descartadas também se revelam uma alternativa viável e acessível para o isolamento e cultivo de fibroblastos primários maduros através de protocolos enzimáticos controlados (GHIASI et al., 2023). Esses fibroblastos oriundos de descartes cirúrgicos expressam elevados níveis de marcadores essenciais, como ceratocana, lumicano, ALDH3A1 e CD34, reforçando o uso desses resíduos biológicos como matéria-prima sustentável para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa ocular (GHIASI et al., 2023).

Situadas na periferia do estroma, próximo às células-tronco límbicas, encontra-se uma população celular especializada conhecida como células-tronco estromais da córnea humana (hCSCs) (DU et al., 2005; PINNAMANENI & FUNDERBURGH, 2012). Originárias da crista neural durante o desenvolvimento embrionário, essas células apresentam notáveis capacidades de autorrenovação e diferenciação multipotente (DU et al., 2005). O perfil imunofenotípico das hCSCs revela características mesenquimais, como a expressão dos marcadores CD73, CD90, CD105 e CD166, simultaneamente à ausência de marcadores hematopoiéticos como CD34 e CD45 (FUNDERBURGH et al., 2016; KUMAR et al., 2018b).

Nesse sentido, o que diferencia as hCSCs dos fibroblastos maduros é sua capacidade de manter a expressão de genes fundamentais relacionados ao desenvolvimento ocular e à pluripotência. Entre esses genes estão ABCG2, PAX6, SOX2 e NANOG. Essa característica proporciona maior plasticidade biológica e potencial proliferativo às hCSCs (FUNDERBURGH et al., 2016; Kumar et al., 2018b). No campo da medicina regenerativa, essas células despontam como uma alternativa promissora aos fibroblastos quiescentes devido à sua habilidade de gerar tecidos organizados e transparentes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WU ET AL., 2012; 2014; FUNDERBURGH et al., 2012).

Conforme apontado por Pinnamaneni e Funderburgh (2012), enquanto os fibroblastos tendem a perder seu fenótipo funcional durante a expansão *in vitro*, as hCSCs podem ser cultivadas sem comprometer sua capacidade de diferenciação e produção de matriz extracelular organizada. Assim, as córneas descartadas nos processos de triagem para transplantes convencionais emergem como uma fonte ética, sustentável e acessível para aplicações em engenharia de tecidos.

#### **1.4 Aplicações das hCSC em Estudos Pré-Clínicos**

Nesse contexto, novas investigações científicas têm sido conduzidas com o objetivo de desenvolver estratégias terapêuticas não invasivas mais eficazes para tratar defeitos estromais e restaurar plenamente a funcionalidade da córnea. As abordagens emergentes focadas na regeneração do estroma baseiam-se

predominantemente na terapia gênica e na nanomedicina, com o objetivo de modular a expressão de proteínas terapêuticas. Tais esforços buscam inibir o processo de fibrose e favorecer a recuperação da transparência corneana (MOHAN et al., 2021b).

Entre as tecnologias promissoras estão os vetores virais recombinantes baseados em adenovírus-associados (rAAV) e nanopartículas derivadas de polietilenimina conjugada a nanopartículas de ouro (PEI2-GNPs) tem demonstrado avanços. Estas tecnologias são direcionadas à entrega de genes como decorina, BMP7 e HGF, evidenciando êxito na mitigação de marcadores pró-fibróticos, além da aplicação da técnica CRISPR/Cas9 para corrigir alterações genéticas específicas (GUPTA et al., 2018; CHANG et al., 2018). Apesar do progresso, desafios importantes ainda devem ser superados, como a complexidade das manipulações genéticas, os altos custos de produção dos vetores e os riscos potenciais associados à imunogenicidade a longo prazo.

Historicamente, a investigação dos mecanismos fisiopatológicos de doenças oculares complexas tem se baseado no emprego de modelos animais, abrangendo desde roedores submetidos à indução química até primatas não humanos (QUIROZ; YAZDANYAR, 2021; LOISEAU et al., 2023). Embora esses modelos tenham gerado contribuições substanciais na elucidação dos processos inflamatórios e neurodegenerativos, também apresentam limitações importantes que restringem sua aplicabilidade translacional. A disparidade anatômica e fisiológica entre os olhos de animais e humanos, somada à baixa reprodutibilidade da progressão clínica observada nesses modelos, bem como os custos elevados e as rigorosas questões éticas envolvidas, têm estimulado esforços para o desenvolvimento de alternativas mais precisas e sustentáveis (TREVISANI et al., 2018; QUIROZ; YAZDANYAR, 2021).

Em âmbito pré-clínico, as aplicações das hCSSCs têm avançado significativamente através de sua validação em modelos animais de lesões oculares severas, demonstrando uma robusta capacidade de restaurar a homeostase do tecido estromal. Em camundongos com deficiência genética de lumicana, um proteoglicano estrutural essencial para a córnea, a administração intracorneana de

hCSCs possibilitou a colonização duradoura do estroma sem desencadear rejeições imunológicas mediadas por células T ou fusões celulares. Além disso, foi observada a deposição de uma matriz extracelular humana altamente organizada que restaurou com sucesso a transparência do tecido previamente opacificado (DU et al., 2009).

Resultados similares foram reproduzidos em estudos utilizando biópsias limbares humanas. Nessas investigações experimentais, as hCSCs, quando ancoradas em substratos nanofibrosos alinhados, recriaram a deposição paralela de colágeno e queratano sulfato. Após o transplante em feridas estromais abrasivas em camundongos, essas células demonstraram ser eficazes na prevenção do espessamento opaco da córnea e na formação de matriz fibrótica cicatricial (BASU et al., 2014).

Os processos biológicos e imunomoduladores que fundamentam a restauração da clareza óptica proporcionada pelas hCSCs estão associados a uma complexa regulação do microambiente inflamatório pós-lesão. Estudos pré-clínicos indicam que a aplicação tópica dessas células-tronco em ferimentos corneanos contribui para a redução do infiltrado inflamatório agudo, diminuindo de forma significativa a expressão de quimiocinas associadas a neutrófilos. Esse processo impede o influxo excessivo dessas células imunes, bloqueando, por consequência, a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos prejudiciais (HERTSENBERG et al., 2017).

Essa janela regenerativa mediada por hCSCs mostrou-se eficaz mesmo em cenários de lesões químicas severas provocadas por exposição ao nitrogênio líquido. O transplante dessas células em matrizes de fibrina sobre superfícies oculares lesionadas por crioterapia induziu a rápida reepitelização e reduziu drasticamente o neovascularismo e a opacidade estromal tardia, promovendo o remodelamento ultraestrutural por meio de interações parácrinas e mecânicas diretas com as células endoteliais e epiteliais remanescentes do hospedeiro (GHOUBAY et al., 2020).

Nesse cenário, as células-tronco estromais da córnea humana (hCSCs) destacam-se por sua marcante plasticidade biológica. Sendo classificadas como células multipotentes, elas exibem a propriedade primordial de se diferenciarem em fibroblastos estromais funcionais para o reparo da superfície ocular, mas também guardam a capacidade de transdiferenciação em linhagens neuro-retinianas devido

à sua origem embrionária associada à crista neural.

Como perspectiva de aplicação futura, projeta-se o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de Retinopatia Diabética (RD) a partir dessas linhagens para a triagem pré-clínica de substâncias ativas e medicamentos de terapia avançada. Adicionalmente, esse modelo poderá ser instrumentalizado em associação com a nanotecnologia, servindo como plataforma preliminar para testar a entrega direcionada de sistemas nanoestruturados e avaliar o controle do microambiente hostil da retina (PARK et al., 2015; LECHNER et al., 2022; TUEKPRAKHON et al., 2021). Portanto, a caracterização fenotípica e o estudo do potencial de diferenciação das hCSCs propostos neste trabalho constituem o alicerce indispensável para viabilizar essas futuras plataformas biotecnológicas.

## **2. OBJETIVOS**

Estabelecer o perfil fenotípico de hCSCs provenientes de córneas descartadas, por meio da análise de marcadores de superfície e de pluripotência, e investigar o seu potencial de diferenciação em progenitores neuronais *in vitro*.

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Isolar e estabelecer culturas primárias de hCSCs a partir de tecidos corneanos humanos descartados
2. Caracterizar o perfil imunofenotípico das hCSCs através da análise de marcadores de superfície mesenquimais e da ausência de marcadores hematopoiéticos por citometria de fluxo;
3. Confirmar a multipotência das células isoladas mediante protocolos de diferenciação nas linhagens: adipogênica, osteogênica e condrogênica;
4. Avaliar o potencial de diferenciação neuronal das hCSCs, analisando a cinética de expressão de marcadores de progenitores e de maturação neuronal durante o processo de indução.
5. Investigar o potencial de diferenciação neuronal das hCSCs.

## **ARTIGO**

**Caracterização fenotípica e potencial de diferenciação neuronal de células-tronco estromais da córnea humana para aplicações em engenharia tecidual**

## **AUTORES**

Vitoria Maria de Rezende<sup>1</sup>; Rafaela Campos de Menezes<sup>2</sup> ; Artur Christian Garcia da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, BR, CEP:74605-170

<sup>2</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia In Vitro (Tox In), Edifício LIFE Parque Tecnológico Samambaia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO,BR,CEP:74045-155

<sup>3</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia In Vitro (Tox In), Edifício LIFE Parque Tecnológico Samambaia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO,BR,CEP:74045-155

Correspondente:

Vitoria Maria de Rezende

vitoria\_maria@discente.ufg.br

## **REVISTA**

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

## **LINK PARA DIRETRIZES DA REVISTA**

**[https://revistas.usp.br/bjps/pt\\_BR/InstructionstoAuthors](https://revistas.usp.br/bjps/pt_BR/InstructionstoAuthors)**

## RESUMO

Diante das restrições éticas e translacionais associadas aos modelos animais na pesquisa ocular, o emprego de células-tronco surge como uma alternativa valiosa. Essas células apresentam amplas vantagens em aplicações biotecnológicas, permitindo o desenvolvimento de modelos *in vitro* mais representativos da fisiologia humana. Este estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente células-tronco estromais da córnea humana (hCSCs) obtidas de córneas descartadas para transplante e investigar seu potencial de diferenciação neural *in vitro*. As hCSCs foram isoladas e submetidas à expansão celular, citometria de fluxo, ensaios de multipotência e protocolos de diferenciação neural. As células apresentaram perfil imunofenotípico compatível com linhagens mesenquimais (CD73+/CD90+/CD105+) e ausência de marcadores hematopoiéticos (CD34-/CD45-). Durante a diferenciação neural, observou-se redução progressiva da expressão dos marcadores progenitores Nestina e Pax6, associada ao aumento da expressão de  $\beta$ III-tubulina, indicando maturação neuronal. Além disso, as células demonstraram capacidade de organização tridimensional em esferoides. Os resultados indicam que córneas descartadas constituem uma fonte viável e de baixo custo para obtenção de hCSCs, destacando o potencial dessas células para aplicações em modelagem *in vitro* de neuropatias oculares e medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** células-tronco estromais da córnea; diferenciação neural; retinopatia diabética; bioengenharia de tecidos; córnea humana.

## INTRODUÇÃO

O globo ocular humano é um órgão altamente especializado, responsável por captar a luz e convertê-la em impulsos nervosos que possibilitam a formação da visão (CIOFFI, 2020). Sua estrutura é formada por três camadas principais: fibrosa, vascular e nervosa. Na porção anterior da túnica fibrosa, encontra-se a córnea, um tecido transparente, avascular e ricamente innervado, que desempenha papel essencial tanto na refração da luz quanto na proteção das estruturas internas do olho (FENG; YOU; YUAN, 2019; NG; OLIVER, 2018). Sob o ponto de vista histológico, a córnea é composta por três camadas principais — epitélio, estroma e endotélio —, separadas pelas membranas de Bowman e Descemet. O estroma constitui a maior parte de sua espessura e abriga fibroblastos especializados que garantem a manutenção da matriz extracelular e a transparência do tecido (MCNUTT; MOHAN, 2020; ESPANA; BIRK, 2020).

Doenças e lesões corneanas estão entre as principais causas de deficiência visual no mundo, tornando o transplante de córnea o tratamento padrão para casos mais graves (DUAN et al., 2017). Entretanto, a escassez global de tecidos doadores e as limitações relacionadas à rejeição e falha tardia dos enxertos impulsionam o desenvolvimento de abordagens regenerativas alternativas (WILKINS et al., 2003; WILLIAMS; MØLLER, 2016). Nesse contexto, córneas humanas descartadas para transplante representam uma fonte viável e ética de células primárias para aplicações em engenharia tecidual e medicina regenerativa ocular (WILSON et al., 2015; GHIASI et al., 2023).

Dentre as células presentes no estroma da córnea humana, destacam-se as células-tronco estromais da córnea humana (hCSCs), derivadas da crista neural e caracterizadas por elevada capacidade proliferativa, autorrenovação e potencial multipotente (DU et al., 2005; PINNAMANENI; FUNDERBURGH, 2012). Essas células expressam marcadores mesenquimais, como CD73, CD90 e CD105, além de genes associados à pluripotência e ao desenvolvimento ocular, incluindo SOX2 e PAX6 (FUNDERBURGH et al., 2016; KUMAR et al., 2018b). Estudos recentes

demonstram que as hCSCCs apresentam importante potencial regenerativo e imunomodulador, sendo capazes de restaurar a transparência corneal e modular processos fibróticos em modelos pré-clínicos (DU et al., 2009; BASU et al., 2014).

Além das aplicações na regeneração do segmento anterior do olho, a capacidade biológica de adaptação das hCSCCs e sua origem neuroectodérmica indicam um potencial de diferenciação em linhagens neuronais sob condições específicas. Dessa forma, essas células se tornam promissoras em estudos experimentais voltados à neurotoxicidade, à modelagem de doenças neurodegenerativas e à análise de novas abordagens terapêuticas. Com base nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização fenotípica de hCSCCs extraídas de córneas humanas descartadas para transplantes e investigar seu potencial de diferenciação em células neuronais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento e expansão das hCSCCs**

O isolamento das hCSCCs foi realizado a partir de córneas humanas obtidas de doadores submetidos à cirurgia de evisceração ocular. A utilização do material biológico foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG), Número do Parecer: 6.904.699

Para o isolamento celular, empregou-se o método de cultura de explantes sem digestão enzimática. Fragmentos de tecido corneal foram cultivados diretamente em placas de cultura de 6 poços, contendo meio DMEM/F12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Os explantes foram mantidos em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo a migração e aderência das células a partir do tecido.

Após as células migrantes atingirem uma confluência de 80-90%, realizou-se um processo de tripsinização diferencial. As células que se desprenderam em um período de até 3 minutos de contato com solução de tripsina/EDTA a 0,25% foram

recolhidas. Este pool celular, enriquecido em hCSCs, foi subsequentemente semeado em frascos de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> a 175 cm<sup>2</sup> para expansão *in vitro* em passagens subsequentes.

### 3.2 Citometria de fluxo

A expressão de biomarcadores foi avaliada por citometria de fluxo. As células, com viabilidade acima de 90%, foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em DMEM/F-12 completo. Em seguida, realizou-se a contagem em câmara de Neubauer e preparou-se uma suspensão de  $2 \times 10^5$  células/mL, distribuída em tubos de citometria. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, todas as soluções foram mantidas em gelo. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1× gelado (1.500 rpm, 5 minutos).

Para a marcação de anticorpos de superfície (CD73, CD34, CD45, Stro-1, CD105, Nestina, Rodopsina e  $\beta$ 3-Tubulina, além dos controles), foram fixadas com 300  $\mu$ L de paraformaldeído a 4% e incubadas por 30 minutos, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Já para os anticorpos intracelulares (CD90, Nanog, Pax6, GFAP, NRL, Oct-3/4 e controles), utilizou-se 300  $\mu$ L de Cytotfix/Cytoperm para fixação e permeabilização, também por 30 minutos nas mesmas condições.

Após esse processo, as células foram lavadas duas vezes com tampão de marcação gelado, centrifugadas e incubadas com os anticorpos primários (conjugados ou não) por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, foram submetidas a duas novas lavagens no tampão de marcação. As amostras que não necessitaram anticorpos secundários foram lavadas em PBS 1× gelado, ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS e mantidas refrigeradas até a leitura. Quando necessário, adicionaram-se anticorpos secundários com incubação por 30 minutos, seguida de lavagens com tampão de marcação e PBS. Por fim, todas as amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS gelado e armazenadas sob refrigeração até a análise citométrica.

### **3.3 Diferenciação trilinear**

As células foram submetidas à diferenciação trilinear: adipogênica, condrogênica e osteogênica pelo cultivo em meios específicos

#### **3.3.1 Diferenciação adipogênica**

A diferenciação adipogênica foi conduzida utilizando o kit StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, as hCSCs foram expandidas e utilizadas quando atingiram confluência entre 60 a 80% e viabilidade superior a 90%.

As células foram tripsinizadas seguindo o protocolo do laboratório, e posteriormente foram contadas e semeadas em placas de cultivo (12 poços) na densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

Após um período inicial de adesão e estabilização (2 dias) em meio de crescimento, as culturas foram submetidas à indução adipogênica. O meio de diferenciação adipogênico completo foi preparado previamente, contendo: 90% do meio basal StemPro® Adipogenesis Differentiation Basal Medium, 10% do suplemento StemPro® Adipogenesis Supplement previamente descongelado e homogeneizado, e 1% de Penicilina/ Estreptomicina). O meio completo foi mantido sob refrigeração (2–8°C) e protegido da luz..

As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, durante 21 dias, sendo o meio de diferenciação trocado a cada 2–3 dias. Ao término do protocolo de indução, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e coradas com Oil Red O para análise morfológica da diferenciação adipogênica por microscopia óptica.

### 3.3.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada com o StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific). As hCSCs previamente expandidas em meio de crescimento foram utilizadas em confluência de 60–80% e viabilidade >90%. As células foram dissociadas com Tripsina/EDTA a 37°C por 3 minutos, centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e ressuspensas para obtenção de suspensão com  $1,6 \times 10^7$  células/mL. Para formação de micromassa, 5 µL dessa suspensão foram depositados no centro de cada poço de placa de cultura (96 poços) e mantidos sob alta umidade por 2 horas antes da adição do meio de diferenciação.

O meio de diferenciação condrogênico completo foi preparado com 90% do StemPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 10% do suplemento StemPro® Chondrogenesis Supplement e 1% de Penicilina/Estreptomicina), armazenado a 2–8°C e protegido da luz.

As culturas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, e o meio foi trocado a cada 2–3 dias, por 14 dias. Ao término, as amostras foram fixadas com paraformaldeído a 4% e transferidas para moldes contendo meio OCT Tissue-Tek (Sakura, Radnor, PA, USA), congelados em nitrogênio líquido e levados ao criostato (CM 1850, Leica Microsystems, EUA), onde realizou-se cortes de 5µm, os quais foram transferidos para lâminas de microscopia e corados com Alcian Blue 1% (pH 2,5) por 30 minutos.

### 3.3.3 Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica foi realizada utilizando o StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific). As hCSCs expandidas em meio de crescimento foram empregadas em confluência de 60–80% e viabilidade >90%. As células foram dissociadas com Tripsina/EDTA a 37°C por 3 minutos, centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e , ressuspensas e semeadas em placas de 24 poços, na densidade de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>.

O meio de diferenciação osteogênico completo foi preparado com 90 % do StemPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 10% do suplemento StemPro® Osteogenesis Supplement e 1% de Penicilina/Estreptomicina, armazenado a 2–8°C e protegido da luz.

As culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com trocas de meio a cada 2 - 3 dias, por 21 dias. Para análise da deposição mineral, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e coradas com Alizarin Red S 2% (pH 4,2) por 2–3 minutos. Após a coloração, foram lavadas com água destilada e analisadas em microscópio óptico.

### **3.4 Diferenciação das hCSCs em Células Neurais da Retina**

#### **3.4.1 Etapa 1 – Formação de Neuroesferas (Dia 0 a Dia 3)**

Células-tronco estromais da córnea (CSCs), previamente cultivadas até atingir confluência de 60–80% e viabilidade celular superior a 90%, foram submetidas à dissociação enzimática por tripsinização. A suspensão celular obtida foi transferida para tubo Falcon estéril e centrifugada a 1000–1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet celular ressuspensionado em meio DMEM/F-12. A concentração celular foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer, aplicando-se a fórmula:

$$\text{Concentração celular} = (\text{n}^\circ \text{ de células}) \times (\text{fator de diluição}) \times 10^4$$

A suspensão foi ajustada para uma densidade final de  $3 \times 10^5$  células/mL (equivalente a  $3 \times 10^4$  células/100 µL) em DMEM/F-12 sem soro e novamente centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O pellet foi ressuspensionado no Meio de Diferenciação 1 (IM1), no volume correspondente ao cálculo para plaqueamento.

O conteúdo foi distribuído em placas de 96 poços de fundo em “U” de baixa aderência (Nunclon Sphera-Treated), 100 µL por poço, homogeneizando-se a suspensão a cada pipetagem. As placas foram centrifugadas a 1600 rpm por 4 minutos e inspecionadas em microscópio invertido para confirmação da formação de

agregados celulares. As culturas foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, por três dias.

Composição do Meio IM1: DMEM/F-12 suplementado com B27 (1X), Noggin (1 ng/mL), Dkk-1 (1 ng/mL) e penicilina/estreptomicina (1%). O meio foi preparado imediatamente antes do uso.

### **3.4.2 Etapa 2 – Diferenciação em Substrato Revestido com Matrigel (Dia 3 a Dia 25)**

O revestimento com Matrigel foi preparado diluindo-se o reagente na proporção 1:50 em DMEM/F-12 (40 µL para 2 mL de solução), mantido em banho de gelo, e distribuído (100 µL/poço) no centro dos poços de placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. No momento do uso, o excesso foi removido e adicionado o Meio de Diferenciação 2 (IM2), evitando-se o ressecamento do revestimento. A composição do Meio IM2: DMEM/F-12 suplementado com B27 (1X), Noggin (10 ng/mL), Dkk-1 (10 ng/mL), N2 (1X) e penicilina/estreptomicina (1%). O meio foi preparado imediatamente antes do uso.

As neuroesferas formadas na Etapa 1 foram transferidas (2 a 3 esferas/poço) para as placas revestidas, contendo 200 µL de IM2, utilizando ponteiros de abertura larga (wide bore). As culturas foram mantidas por 22 dias adicionais, completando 25 dias de diferenciação, com trocas de meio a cada 2 - 3 dias.

### **3.4.3 Imunofluorescência para Neuroesferas**

As neuroesferas foram cuidadosamente lavadas duas vezes com PBS e transferidas para poços de placas de 96 poços-U contendo pelo menos cinco esferas por poço. Após a remoção do PBS, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos, à temperatura ambiente, e lavadas uma vez com PBS.

A permeabilização foi realizada com Triton-X 0,5% por 15 minutos, seguida de incubação em solução de bloqueio (BSA/Tween 20/PBS) por 1 hora, a 4°C, sob

agitação de 20 rpm. As amostras foram incubadas overnight com o anticorpo primário, a 4°C, sob agitação, protegidas da luz.

Após duas lavagens com solução de bloqueio gelada, foi adicionado o anticorpo secundário, com incubação de 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação e ausência de luz. As esferas foram lavadas novamente e montadas em lâminas de microscopia com meio de montagem Fluormount. As lâminas foram avaliadas em microscópio confocal, sob proteção da luz.

#### **3.4.4 Imunofluorescência após a migração das células a partir das neuroesferas (dia 25)**

Posteriormente, realizou-se a imunofluorescência da monocamada no dia 25. A monocamada foi cuidadosamente lavada duas vezes com PBS e transferida para poços de placas de 96 poços-U, contendo pelo menos cinco áreas por poço. Após a remoção do PBS, as amostras foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos, à temperatura ambiente, e lavadas uma vez com PBS. A permeabilização foi realizada com Triton-X 0,1% por 10 minutos, seguida de incubação em solução de bloqueio (BSA/Tween 20/PBS) por 30 minutos, a 4 °C, sem necessidade de agitação. As amostras foram então incubadas overnight com o anticorpo primário, a 4 °C, protegidas da luz.

Após duas lavagens com solução de bloqueio gelada, adicionou-se o anticorpo secundário, com incubação de 1 hora à temperatura ambiente, em ausência de luz. As células foram novamente lavadas e montadas em lâminas de microscopia com meio de montagem Fluormount. A leitura das amostras foi realizada no equipamento *High Content Analysis* (HCA, Thermo Fisher), sob proteção da

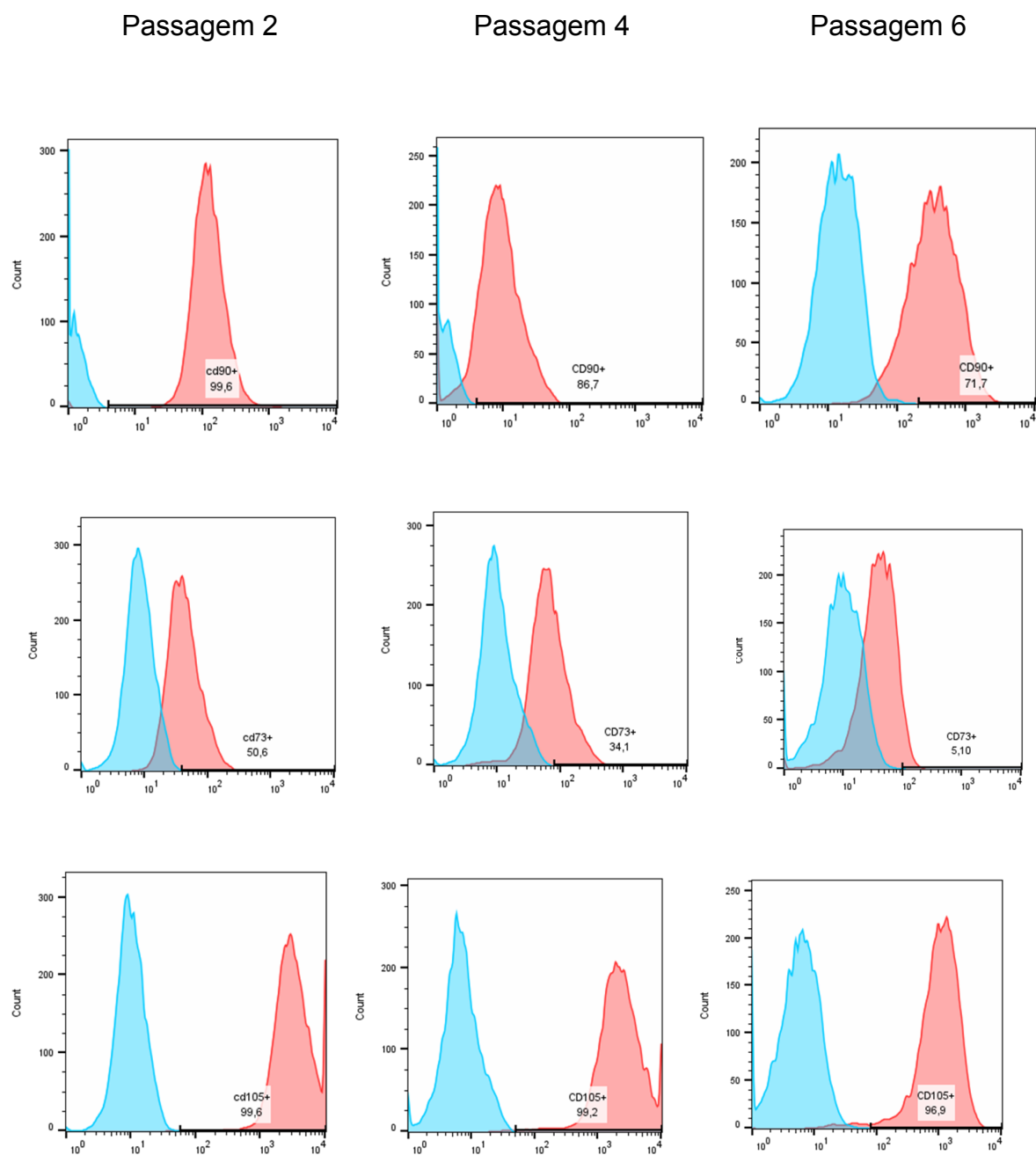
## 4. RESULTADOS

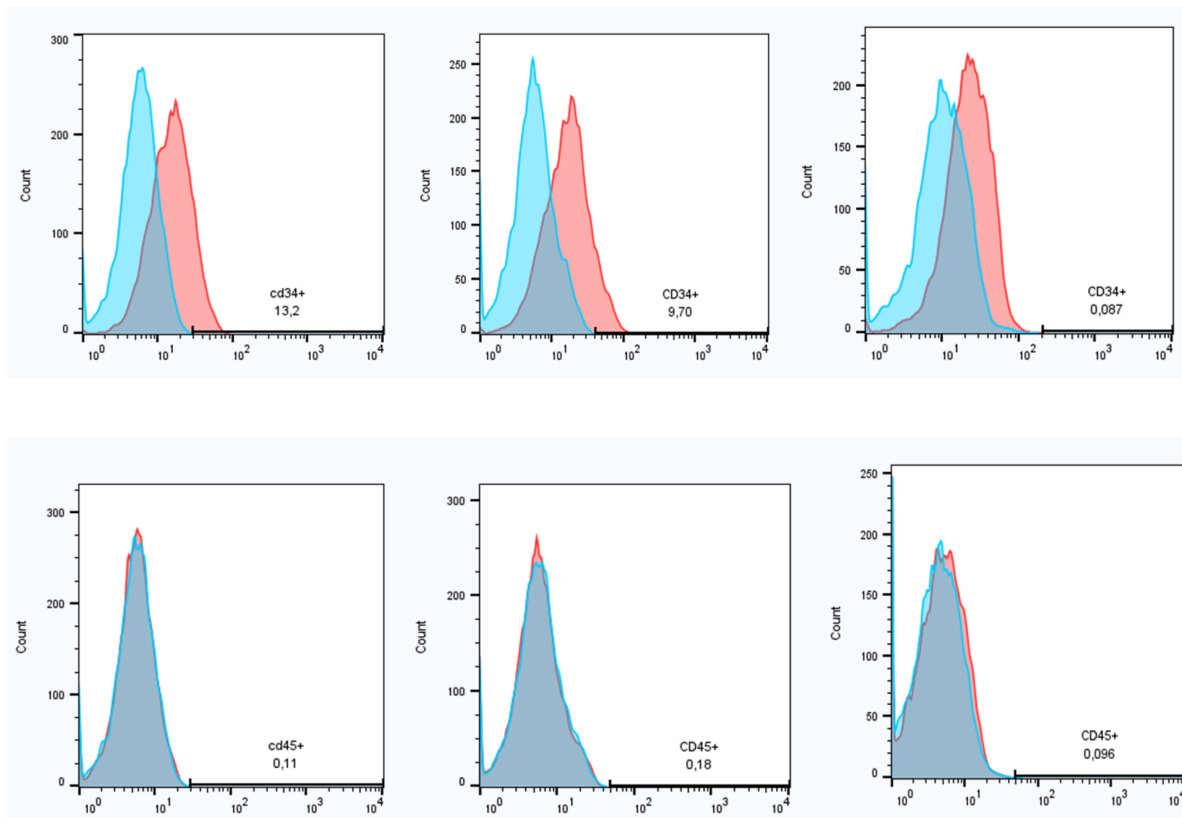
### 4.1 Citometria de fluxo

Os resultados obtidos na análise sequencial por citometria de fluxo demonstraram uma dinâmica de expressão molecular distinta ao longo de passagens sucessivas (P2 a P6), que correspondem aos ciclos cronológicos de subcultivo e expansão celular *in vitro* (Figura 3). O marcador estromal CD90 apresentou uma marcação fortemente positiva e homogênea logo na primeira passagem (P2), mantendo seus níveis de detecção altos até o final do cultivo. De forma coordenada, o receptor CD73 exibiu índices elevados de fluorescência desde o isolamento inicial e diminuiu ao longo das passagens. Por sua vez, o antígeno CD105 iniciou com níveis elevados em P2 e manteve o nível linear até atingir a última passagem.

Em contrapartida, o antígeno progenitor hematopoiético CD34 exibiu pequenas taxas de sinal residual em P2, as quais decaíram de forma acentuada a cada tripsinização até tornarem-se quase nulas na passagem P6. O marcador leucocitário comum CD45 demonstrou ausência estrita de sinal desde as fases iniciais, mantendo-se rigorosamente abaixo do limiar de 2% durante todo o período experimental.

**Figura 3: Perfil imunofenotípico por citometria de fluxo de hCSCCs expandidas *in vitro* dos marcadores CD90, CD73, CD105, CD34 e CD45**





Histogramas demonstrando a quantificação percentual de marcadores celulares de superfície avaliados por citometria de fluxo em passagens sequenciais (P2 a P6). A metodologia utilizou anticorpos conjugados a fluorocromos para avaliar a expressão positiva de painel mesenquimal (CD73, CD90, CD105) e a expressão negativa de linhagem hematopoiética (CD34, CD45), analisados no software FlowJo. Os resultados revelam um perfil imunofenotípico homogêneo, caracterizado por níveis de expressão superiores a 95% para os marcadores de linhagem mesenquimal e inferiores a 2% para os marcadores hematopoiéticos. Fonte: Autoria própria

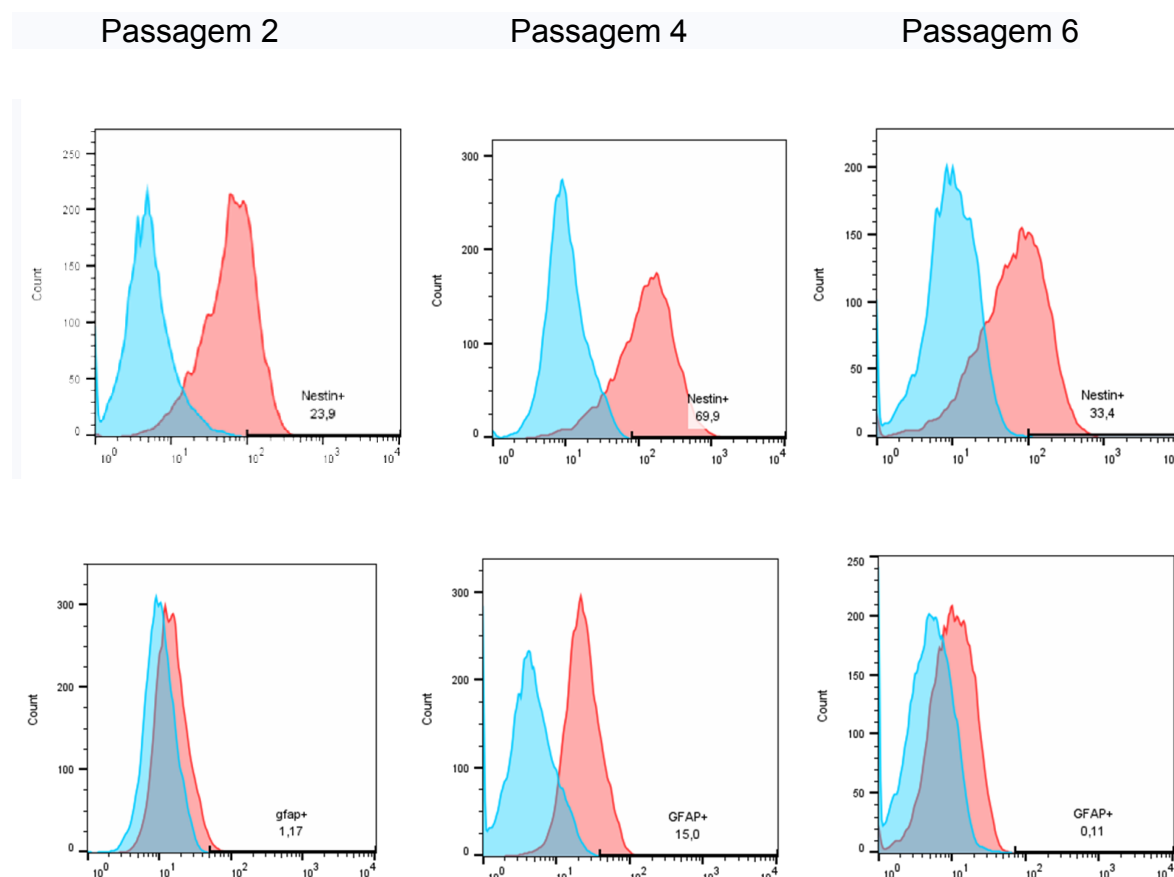
Por outro lado, as análises sequenciais por citometria de fluxo revelaram variações dinâmicas na cinética de expressão dos marcadores neurais ao longo dos subcultivos (Figura 4). O marcador Nestina apresentou níveis reduzidos de detecção na passagem P2, registrando seu ápice de expressão percentual na passagem subsequente, seguido por um declínio de aproximadamente 50% na passagem P6.

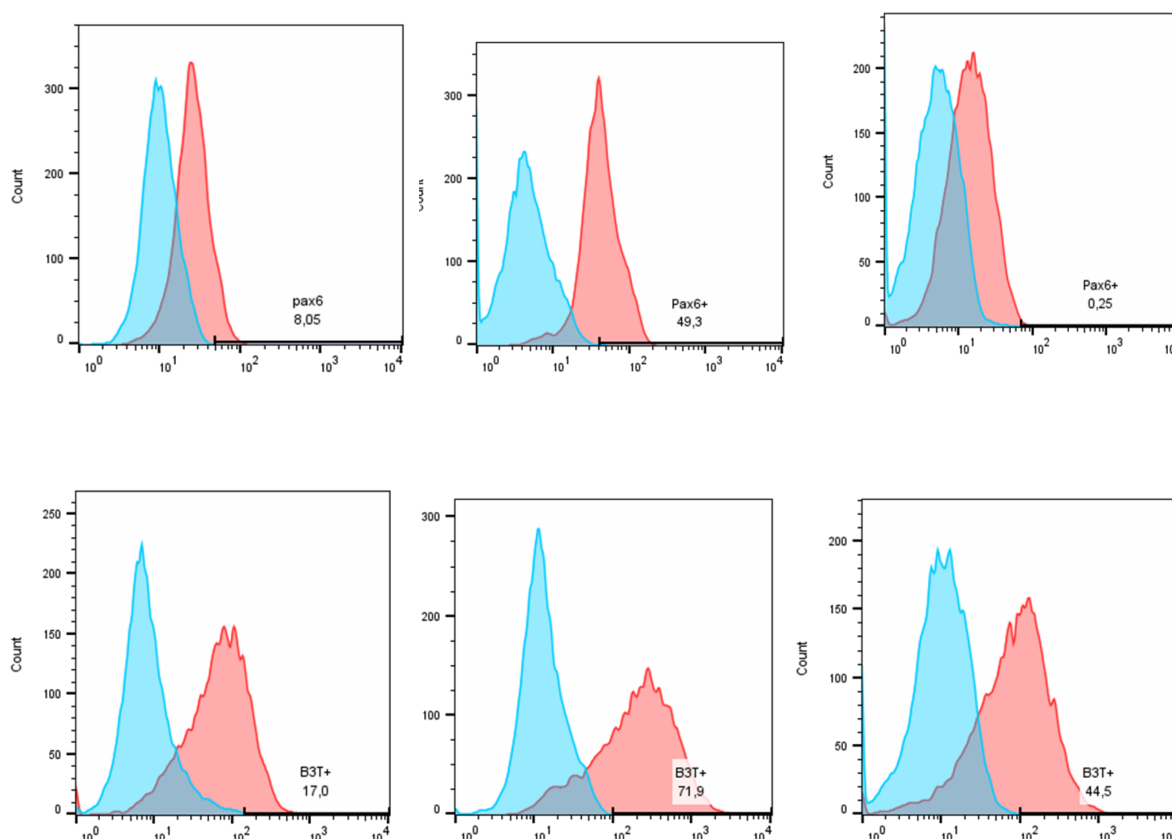
O marcador glial GFAP iniciou com índices inferiores a 2% e demonstrou um incremento discreto na passagem P4, estágio no qual atingiu seu valor máximo, seguido por um decréscimo substancial na última passagem avaliada, quando retornou a um nível próximo de zero. Comportamento análogo foi observado para o

fator de transcrição PAX6, que exibiu valores mínimos iniciais, uma elevação considerável especificamente na passagem P4 e uma redução abrupta ao término do período experimental.

Por fim, a Beta-3-Tubulina também evidenciou expressão máxima na passagem P4; contudo, diferentemente das duas proteínas anteriores, seu sinal reduziu-se pela metade na fase tardia de cultivo, mantendo uma detecção residual expressiva em vez de declinar para um valor próximo de zero.

**Figura 4: Perfil imunofenotípico por citometria de fluxo de hCSCCs expandidas *in vitro* dos marcadores Nestin, GFAP, Pax 6 e Beta-3-Tubulina.**





Histogramas demonstrando a quantificação percentual de marcadores celulares de superfície avaliados por citometria de fluxo em passagens sequenciais (P2 a P6). Observou-se um aumento progressivo que culminou no pico de expressão dos marcadores neuronais e oculares Nestina, GFAP, PAX6 e  $\beta$ III-tubulina especificamente na passagem P4. Esse incremento cinético tardio sugere que as hCSCs mantêm e refinam sua plasticidade para linhagens neurais. Fonte: Autoria própria.

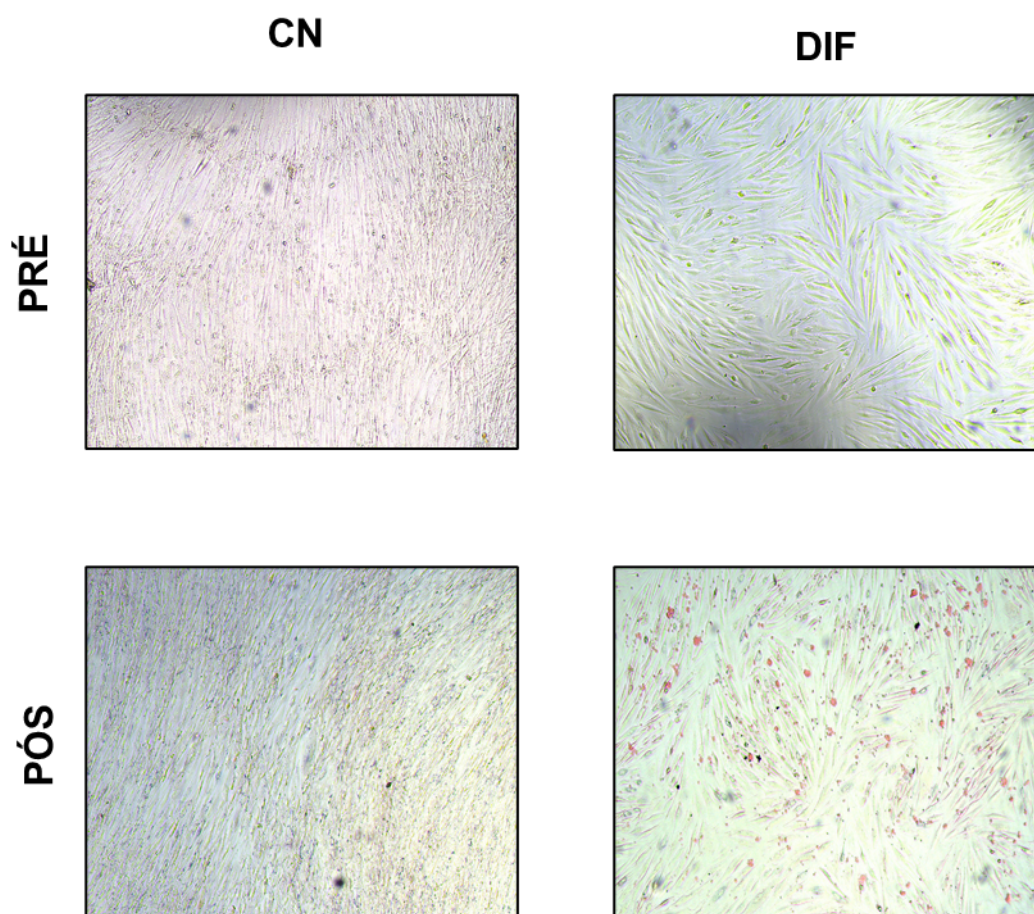
## 4.2 Diferenciação trilhaagem

### 4.2.1 Adipogênica

O potencial de diferenciação das hCSCs foi confirmado por meio de ensaios histoquímicos específicos após o período de indução *in vitro*. Para a linhagem adipogênica, as culturas submetidas ao meio indutor demonstraram alterações morfológicas características, com o surgimento de células vacuoladas e a progressiva deposição de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas. A presença e a especificidade dessas inclusões de gordura foram evidenciadas pela coloração com Oil Red O, que revelou agregados lipídicos intensamente corados em vermelho no

interior do citoplasma celular, confirmando a plasticidade para o fenótipo adipocitário.

**Figura 5: Potencial de diferenciação adipogênica *in vitro* de células-tronco estromais da córnea humana (hCSCCs).**

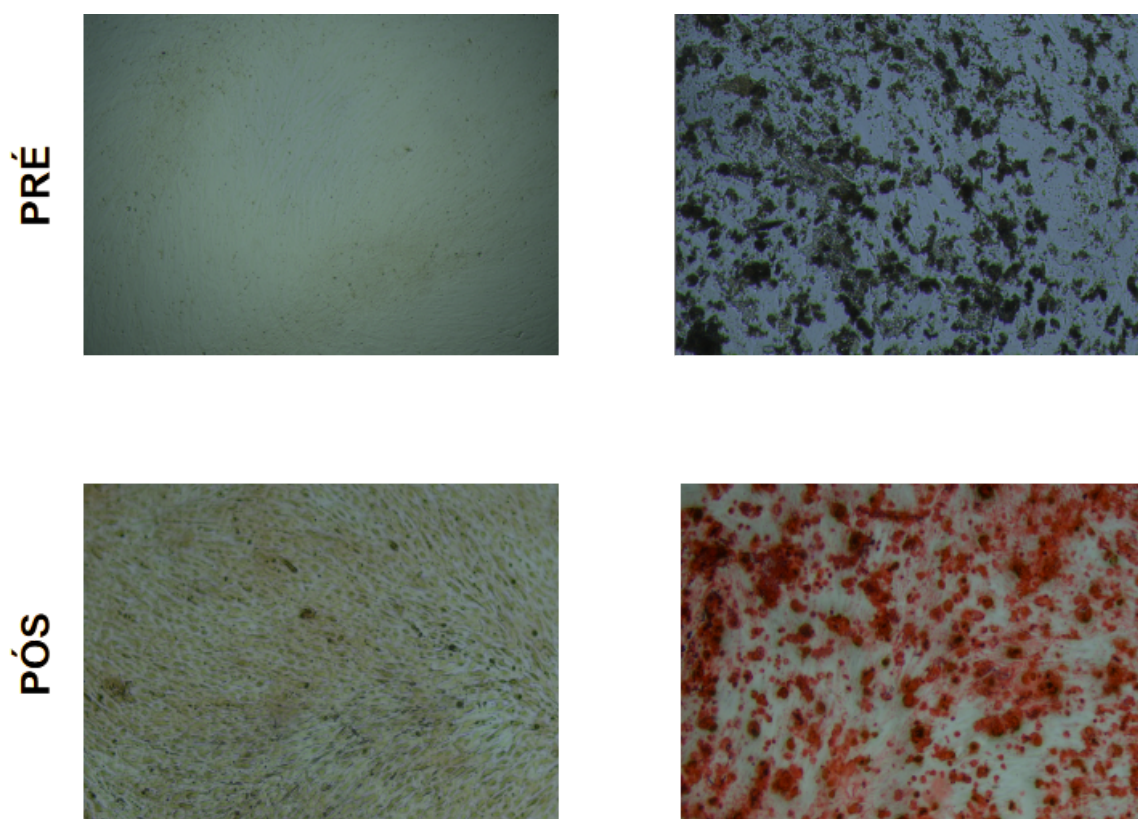


Imagens obtidas por microscopia óptica demonstrando a morfologia celular no grupo Controle Negativo (CN) — mantido em meio de crescimento basal DMEM/F12 — e no grupo Diferenciação (DIF), após 14 dias sob protocolo de indução utilizando o StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit. O ensaio avaliou o marcador funcional de acúmulo lipídico intracelular por meio da técnica histológica de coloração com Oil Red O. Os resultados demonstram o sucesso da diferenciação, evidenciado pelo surgimento visual de vacúolos lipídicos citoplasmáticos corados em vermelho brilhante apenas nas culturas induzidas (DIF) quando comparadas ao controle quiescente. Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.2 Osteogênica

A diferenciação osteogênica foi validada pela deposição de uma matriz extracelular mineralizada rica em cristais de cálcio e fósforo. Após o período de cultivo em meio osteogênico, as células demonstraram uma transição para uma morfologia semelhante a osteoblastos, organizando-se em monocamadas densas. A análise histológica realizada por meio da coloração de Alizarin Red S demonstrou uma forte reatividade positiva, caracterizada pela formação de nódulos de mineralização densamente corados em tons de vermelho-escuro e carmim, o que comprova o sucesso na biomineralização e maturação óssea.

**Figura 6: Potencial de diferenciação osteogênica in vitro de células-tronco estromais da córnea humana (hCSCCs)**



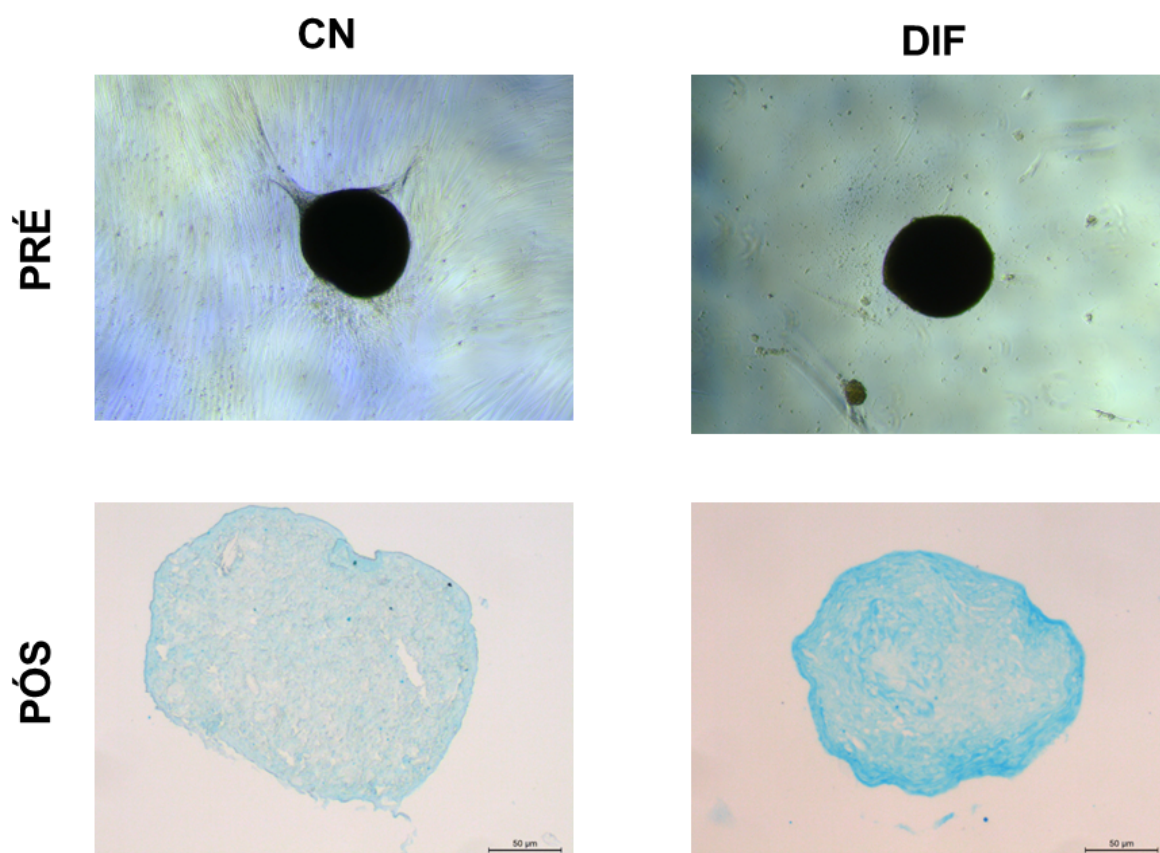
*Imagens obtidas por microscopia óptica exibindo a matriz extracelular tecidual no grupo Controle Negativo (CN) — sem indução mineral — e no grupo Diferenciação (DIF), após 14 dias de cultivo contínuo com o StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, antes e depois da marcação. O marcador avaliado consistiu na deposição de cálcio e mineralização da matriz óssea in vitro, analisada qualitativamente através do método citoquímico de coloração com Alizarin Red S (2%, pH 4,2). Os*

resultados comprovam a plasticidade mesenquimal através da detecção visual densa de agregados e nódulos de cálcio mineralizado corados em vermelho escuro/bordeaux fixados à placa na condição induzida (DIF). Fonte: Autoria própria.

### 4.3.3 Condrogênica

Por fim, o potencial condrogênico foi verificado através da indução em sistema de micromassa, resultando na formação de esferoides celulares tridimensionais compactos. A caracterização histológica evidenciou a síntese robusta de uma matriz extracelular cartilaginosa abundante, rica em proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados. A coloração com Alcian Blue confirmou a presença desses componentes estruturais ao exibir uma deposição densa e homogênea de matriz corada em azul-cianeto ao redor das lacunas celulares, ratificando a diferenciação bem-sucedida das hCSCCs em condrócitos funcionais.

**Figura 7: Potencial de diferenciação condrogênica in vitro de células-tronco estromais da córnea humana (hCSCCs)**



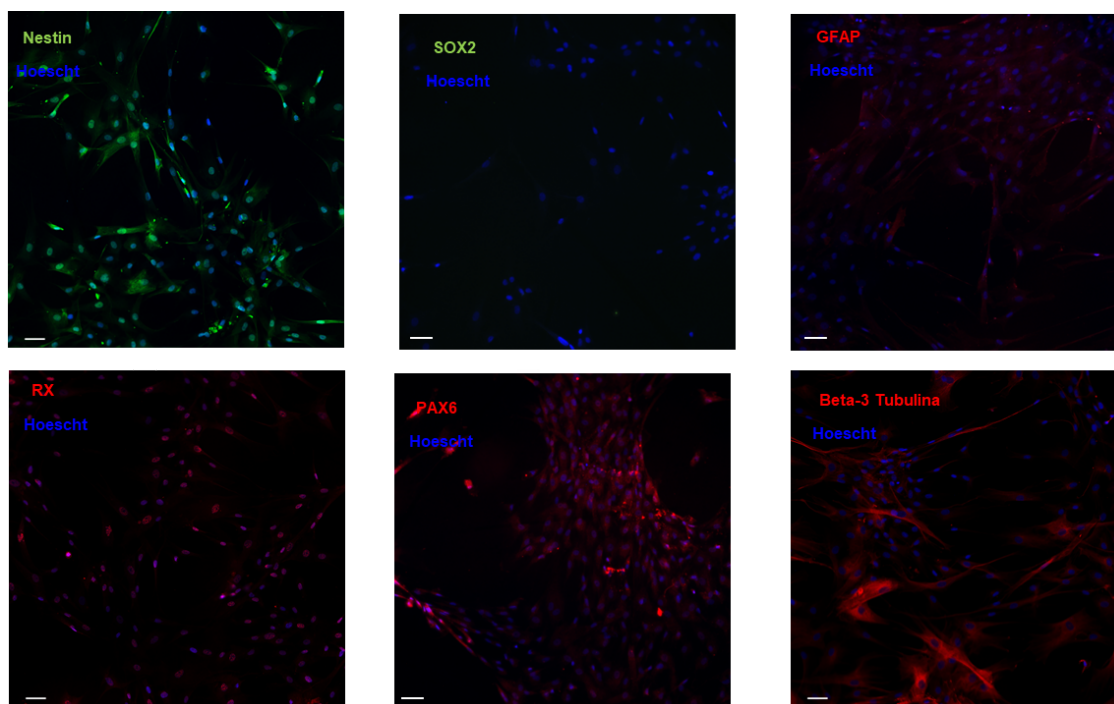
*Imagens de microscopia óptica revelando as secções histológicas da micromassa celular cultivada na forma de esferoide tridimensional por 14 dias. O painel compara a condição Controle Negativo (CN) e o grupo Diferenciação (DIF) submetido ao StemPro® Chondrogenesis Supplement. O ensaio histológico utilizou o corante Alcian Blue para avaliar como biomarcador a síntese e secreção de proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados, componentes típicos da matriz cartilaginosa. O resultado indica uma diferenciação bem-sucedida, marcada pela forte afinidade tintorial e coloração azul-esverdeada intensa na matriz extracelular tridimensional do grupo induzido (DIF). Fonte: Autoria própria.*

### **4.3 Diferenciação das hCSCs em Células Neuronais**

O perfil de marcação por imunofluorescência realizado ao longo do protocolo de diferenciação revelou modificações na intensidade do sinal e na distribuição espacial dos alvos estruturais e reguladores nos dias 0, 3 e 25.

No ponto inicial do ensaio, as populações de hCSCs cultivadas em monocamada exibiram morfologia alongada e padrão fibroblastóide característico. As análises qualitativas por imunofluorescência revelaram perfis distintos de expressão e distribuição subcelular para o painel de marcadores avaliados, iniciando pela Nestina, que demonstrou imunorreatividade acentuada com sinal fluorescente distribuído de forma homogênea por todo o compartimento citoplasmático, organizando-se em uma rede filamentar bem definida ao redor dos núcleos. Em paralelo, o fator de transcrição PAX6 apresentou marcação de forte intensidade. Em contrapartida a esse perfil de progenitura, os marcadores de maturação Beta-3-Tubulina e GFAP exibiram ausência de sinal estrutural organizado.

**Figura 8 : Perfil cinético de imunofluorescência das hCSCs no Dia 0 (D0)**

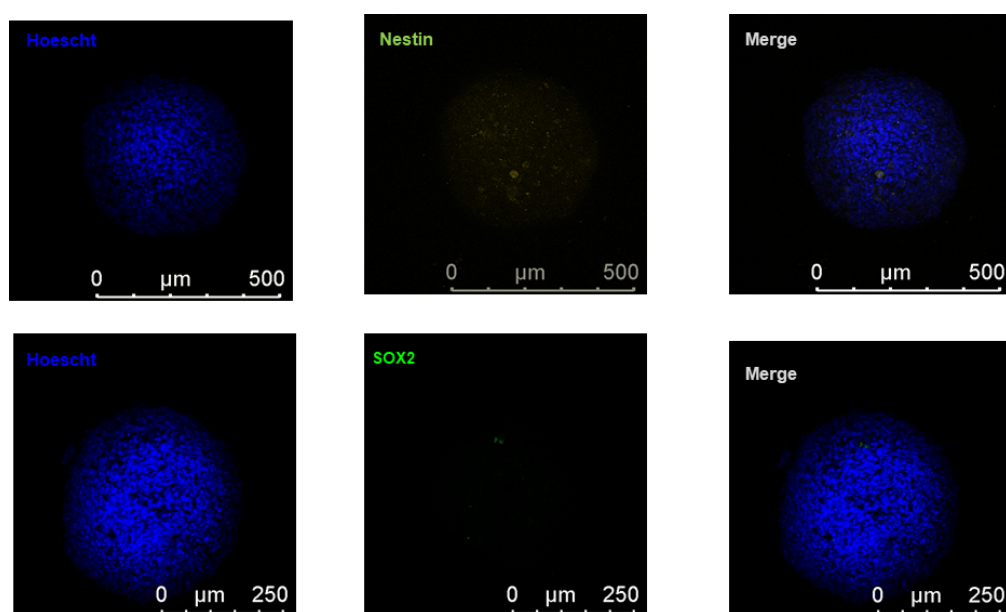


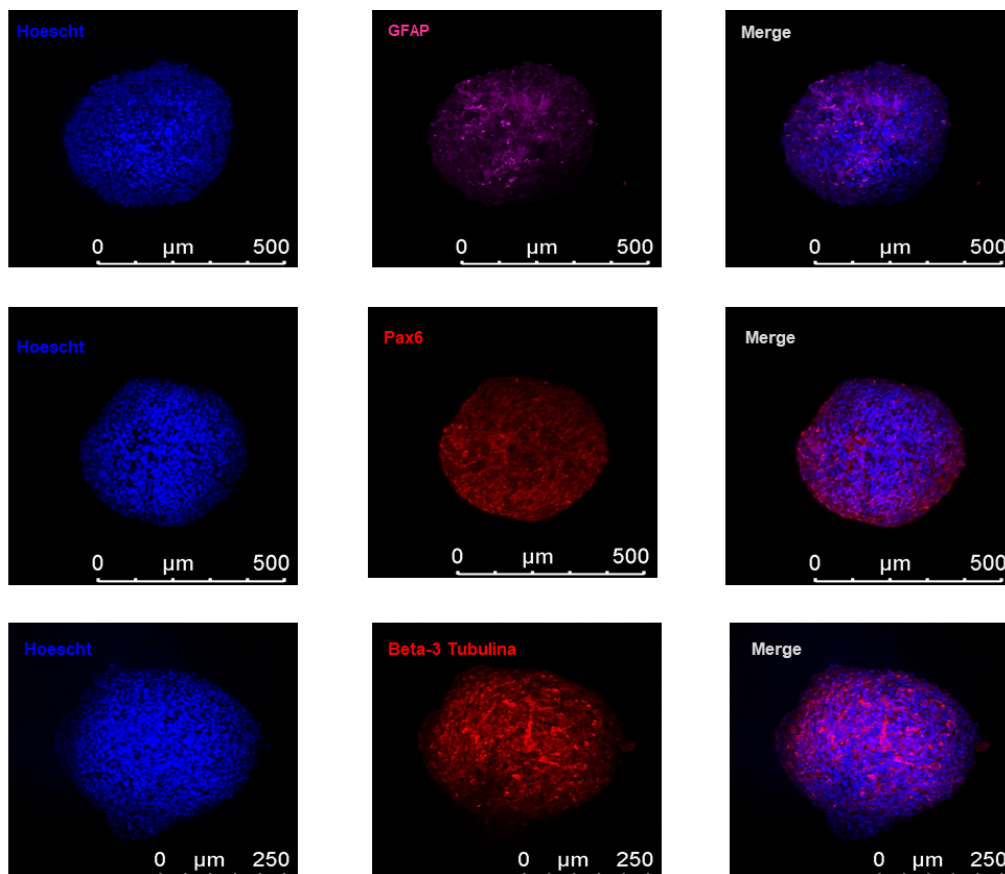
Imagens representativas obtidas por microscopia automatizada utilizando o sistema de High Content Analysis (HCA, Thermo Fisher), avaliando as hCSCs no dia 0. A metodologia aplicada baseou-se na fixação com paraformaldeído a 4%, permeabilização com Triton X-0,5% e marcação overnight com painel específico de anticorpos primários voltados a marcadores progenitores, gliais e fotorreceptores os quais foram revelados por anticorpos secundários conjugados a fluoróforos. O resultado demonstra que no estágio inicial (D0), as hCSCs apresentaram expressão basal de Nestin, Pax6, GFAP e  $\beta$ 3-Tubulina. Fonte: Autoria própria.

No terceiro dia de cultivo (D3), após a transferência das estruturas para o sistema aderente sob o estímulo do Meio de Diferenciação 2 (IM2), as análises qualitativas por imunofluorescência revelaram uma transição no perfil de expressão proteica das células. Verificou-se uma redução evidente na intensidade do sinal fluorescente para os marcadores de multipotência Nestina e SOX2 em comparação ao estágio basal (D0), caracterizando o início do processo de restrição de linhagem.

Em contrapartida, o fator de transcrição do desenvolvimento ocular PAX6 permaneceu fortemente positivo, mantendo sua localização predominantemente nuclear. Adicionalmente, os marcadores de maturação estrutural  $\beta$ 3-Tubulina e GFAP, antes basais, tornaram-se visivelmente positivos no compartimento citoplasmático, exibindo os primeiros indícios de organização filamentar ao redor da zona de migração celular.

**Figura 9: Perfil cinético de imunofluorescência de neuroesferas tridimensionais derivadas de hCSCs no Dia 3 (D3)**



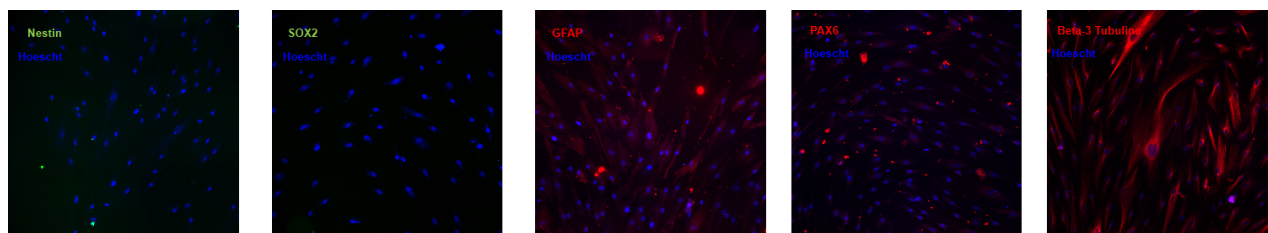


*Imagens representativas obtidas pelo sistema Confocal, avaliando as culturas no dia 3 de cultivo, após a transferência das neuroesferas para o sistema aderente revestido com Matrigel e estimulado com o Meio de Diferenciação 2 (IM2). O resultado demonstra que houve uma redução da expressão de Nestina e SOX2, enquanto Pax6, GFAP e  $\beta$ 3-Tubulina permaneceram positivos. Fonte: Autoria própria.*

Ao término do período de diferenciação (D25), as análises por imunofluorescência revelaram a consolidação do perfil de maturação neuronal, acompanhada por uma transição morfológica marcante. Devido à interação com o Matrigel, as neuroesferas perderam a arquitetura esférica tridimensional compacta e migraram radialmente, organizando-se em um sistema de monocamada aderente interconectada por todo o poço. Esse espalhamento celular coincidiu com o declínio quase completo dos marcadores de progenitura Nestina e SOX2, que exibiram apenas sinais residuais. Em contrapartida, o fator de

transcrição ocular PAX6 apresentou uma diminuição na intensidade da marcação, enquanto os marcadores maduros Beta-3-Tubulina e GFAP demonstraram forte imunorreatividade citoplasmática.

**Figura 10: Perfil cinético de imunofluorescência da monocamada derivadas de hCSCs no Dia 25 (D25)**



Imagens representativas obtidas pelo sistema High Content Analysis (HCA, Thermo Fisher), evidenciando a caracterização fenotípica final das estruturas celulares ao término do período experimental no D25. O resultado demonstra *uma elevada expressão de  $\beta$ 3-Tubulina, enquanto a Nestina tornou-se indetectável*. Fonte: Autoria própria.

Com o intuito de mapear de forma integrada a dinâmica temporal dos alvos avaliados, a Tabela 1 sumariza as flutuações na intensidade de sinal e o perfil cinético comparativo de todos os marcadores de imunofluorescência ao longo dos dias estratégicos do protocolo (D0, D3 e D25).

**Tabela 1: Perfil cinético comparativo da expressão dos marcadores de imunofluorescência durante a diferenciação neural de hCSCs.**

| Marcador | Função Biológica                                                 | Dia 0                    | Dia 3                | Dia 25                  |
|----------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|
| Nestina  | Filamento intermediário de progenitores neurais e multipotência. | Acentuada (+++)          | Reduzida (++)        | Residual (+/-)          |
| SOX 2    | Fator de transcrição associado à pluripotência e autorrenovação. | Fraca/Muito discreta (+) | Atenuada (+/ $\pm$ ) | Residual/ Ausente (-)   |
| Pax 6    | Fator de transcrição essencial do desenvolvimento ocular e       | Basal (+)                | Forte (+++)          | Moderada/Diminuída (++) |

|             |                                                             |           |               |                |
|-------------|-------------------------------------------------------------|-----------|---------------|----------------|
|             | neural.                                                     |           |               |                |
| GFAP        | Proteína estrutural glial (astrócitos / células de Müller). | Basal (+) | Positiva (++) | Forte (+++)    |
| β3-Tubulina | Proteína de microtúbulos associada à maturação neuronal.    | Basal (+) | Positiva (++) | Elevada (++++) |

Fonte: A autora (2026)

Legenda de intensidade: (++++ Imunorreatividade muito forte/predominante; (+++) Forte imunorreatividade; (++) Imunorreatividade moderada; (+) Expressão/sinal basal; (±) Sinal limiar/reduzido; (-) Indetectável.

## 5. DISCUSSÃO

Conforme os critérios mínimos definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular por Dominici et al. (2006), as células estromais mesenquimais humanas devem expressar positivamente os marcadores CD90, CD105 e CD73 ( $\geq 95\%$  da população), além de apresentar ausência de marcadores hematopoiéticos, como CD34 e CD45 ( $\leq 2\%$ ). Nesse sentido, verificou-se que as hCSCs atenderam a esses requisitos, exibindo elevada expressão de CD90 e CD105, bem como a manutenção da expressão de CD73 até a passagem 4 (P4). A ausência de CD45 em todas as passagens analisadas é condizente com o fato de a córnea ser um tecido avascular, uma vez que este marcador é característico de células hematopoiéticas.

Com relação ao CD34, observou-se uma expressão inicial que pode estar relacionada à presença de fibroblastos do estroma corneano, reconhecidamente positivos para esse marcador. Estudos indicam que fibroblastos humanos podem

expressar tanto CD34 quanto CD133, embora esta expressão tenda a diminuir ao longo do cultivo *in vitro*, restando apenas em pequenas subpopulações celulares durante algumas semanas (PERELLA et al., 2005). Assim, o decréscimo gradativo do CD34 observado ao longo das passagens no presente estudo sugere a progressiva eliminação dos fibroblastos e a predominância das hCSCs, que se destacam por seu perfil distintivo de expressão de marcadores.

Além disso, a variação parabólica observada na cinética celular, com pico de expressão dos marcadores Nestina, GFAP, PAX6 e  $\beta$ 3-Tubulina, na passagem 4 (P4), sugere uma resposta fisiológica adaptativa ao microambiente de cultivo *in vitro* (VOLATIER; CURSIEFEN; NOTARA, 2024). Nesse estágio intermediário, observou-se um aumento expressivo nos marcadores neuronais e oculares, como Nestina, GFAP, PAX6 e Beta-3-Tubulina. Estes dados reforçam que as hCSCs mantêm alta plasticidade biológica e aptidão para se diferenciar em linhagens neuro-retinianas. Durante o estágio inicial de isolamento, as populações celulares obtidas do estroma apresentam um ambiente originalmente heterogêneo (LATHROP et al., 2026). Com o avanço dos subcultivos e a exposição contínua a fatores externos de crescimento, ocorre uma transição fenotípica que intensifica a plasticidade biológica e ativa vias de sinalização associadas à multipotência (VOLATIER; CURSIEFEN; NOTARA, 2024). Esses achados indicam que a P4 representa o momento ideal de maior competência biológica das hCSCs para sua aplicação em contextos regenerativos específicos (VOLATIER; CURSIEFEN; NOTARA, 2024; LATHROP et al., 2026).

Outro critério essencial para a classificação das células estromais mesenquimais humanas (MSCs), estabelecido por Dominici et al. (2006), é sua capacidade de se diferenciar *in vitro* em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. No presente estudo, as hCSCs atenderam plenamente a esse critério ao apresentarem diferenciação bem-sucedida nas três linhagens do mesoderma. Os achados corroboram os resultados de Veréb et al. (2016), os quais demonstraram que células isoladas do estroma corneano mantêm propriedades de multipotência comparáveis às células-tronco derivadas da medula óssea.

A diferenciação adipogênica foi evidenciada pela formação de vacúolos lipídicos intracitoplasmáticos, evidenciados pela coloração com Oil Red O. Este resultado está em consonância com o trabalho de Matthyssen et al. (2017), que validou o potencial adipogênico de hCSCs cultivadas em condições controladas. Similarmente, Xie et al. (2021) observaram que, embora haja diferenças na eficiência de diferenciação entre diferentes doadores, a capacidade de linhagens de MSCs se converterem em fenótipos adipocíticos se mantém como uma característica funcional relevante para a sua classificação.

Quanto à diferenciação osteogênica, a detecção de depósitos de cálcio mineralizado por meio do Alizarin Red S reforça a identidade mesenquimal das células isoladas. Apesar de a córnea não ser um tecido naturalmente mineralizado, a capacidade das hCSCs de responder a estímulos osteogênicos *in vitro* reflete sua plasticidade biológica e estado progenitor (VERÉB et al., 2016).

Em continuidade à caracterização da multipotência, a diferenciação condrogênica das hCSCs, demonstrada pela síntese de proteoglicanos e visualizada pela coloração com Alcian Blue, completa o perfil de multipotência exigido. Para a avaliação precisa desse resultado, o seccionamento dos agregados celulares em criostato foi fundamental, pois preservou a integridade da matriz extracelular e permitiu a análise histológica interna da estrutura. Essa organização tridimensional (3D) mimetiza o microambiente cartilaginoso nativo, otimizando a deposição de macromoléculas estruturais de forma significativamente superior ao modelo tradicional em monocamada (SHAINER et al., 2010).

É importante ressaltar que, conforme discutido por Xie et al. (2021), as MSCs podem apresentar uma "heterogeneidade funcional", onde diferentes linhagens celulares exibem variações na intensidade da coloração histoquímica e na expressão gênica durante a diferenciação. No entanto, a manutenção deste potencial trilhagem em células obtidas de córneas descartadas valida a robustez biológica desta fonte e sua aplicabilidade em estratégias de medicina regenerativa e bioengenharia de tecidos (VOLATIER; CURSIEFEN; NOTARA, 2024).

A análise por imunofluorescência revelou que, no estágio inicial (D0), as hCSCs apresentaram marcação bem delimitada para o painel de marcadores avaliados, exibindo um perfil compatível com um fenótipo progenitor neural. A forte reatividade da Nestina, organizada em uma rede filamentar citoplasmática homogênea ao redor dos núcleos evidenciados pelo Hoechst, reflete a integridade de uma maquinaria citoesquelética imatura e plástica. Biologicamente, a Nestina atua como um filamento intermediário dinâmico do citoesqueleto de células jovens; sua função primária é fornecer suporte estrutural e flexibilidade mecânica ao citoplasma durante os processos de proliferação e remodelação morfológica pré-diferenciação (LEND AHL; ZIMMERMAN; MCKAY, 1990; MICHALCZYK; ZIMAN, 2005).

De acordo com Wislet-Gendebien et al. (2003), a expressão de Nestina é um pré-requisito essencial para a regulação de células estromais que iniciam o destino neural, sendo fundamental para a formação de agregados celulares semelhantes a neuroesferas. Esse comportamento foi observado em nosso estudo através da formação de esferoides espontâneos. Segundo Chun (2000), a capacidade de células estromais primárias de se agregarem em esferoides independentes de fixação é um indicativo de alta viabilidade e maturidade funcional, uma vez que essas estruturas tridimensionais (3D) expressam níveis mais elevados de genes específicos do que culturas em monocamada.

Os dados coletados no Dia 3 (D3) indicam o início da transição fenotípica das hCSCs, saindo do estado basal de multipotência e avançando para o começo da especificação celular. O cultivo sobre Matrigel favoreceu a fixação das neuroesferas, com a estrutura ainda visível como um núcleo central denso, evidenciando que os processos de diferenciação e migração acontecem de maneira progressiva e coordenada a partir dessa colônia-mãe. Além disso, a redução na expressão de Nestina e SOX2 sugere que o microambiente químico e físico foi eficaz em suprimir o programa de autorrenovação celular nas células que iniciam o processo de dispersão.

Por outro lado, a persistência da marcação positiva para o PAX6 confirma que, apesar da atenuação do perfil celular indiferenciado, as células mantêm o

direcionamento programado para a linhagem neuroectodérmica ocular. Conforme afirmam Gómez-López et al. (2011), a coexpressão de SOX2 e PAX6 é vital para manter o potencial de desenvolvimento de células-tronco neurais e gliogênicas nesse lote de progenitoras.

Ao final do período experimental (D25), foi observada uma completa transformação morfológica na cultura. A arquitetura inicial, caracterizada pela forma esférica, foi totalmente substituída por uma monocamada aderente, interligada por extensos prolongamentos celulares. Esse processo de espalhamento foi acompanhado pelo desaparecimento completo das proteínas Nestina e SOX2. Por outro lado, a manutenção da expressão de PAX6 nesse estágio avançado revelou-se um aspecto biológico essencial, demonstrando que as células preservaram esse fator regulador da linhagem ocular durante todo o cultivo tridimensional e bidimensional.

Segundo More et al. (2024), o PAX6 desempenha um papel crítico como fator de transcrição na determinação do destino celular de células-tronco neuroectodérmicas e oculares, sendo responsável por regular o equilíbrio entre proliferação, manutenção e diferenciação em linhagens neurais e retinianas. Entretanto, o declínio subsequente na intensidade desse marcador nuclear em parte da população celular sugere o avanço no processo de diferenciação terminal, reduzindo a necessidade de manutenção de um fenótipo progenitor rigidamente regulado. Essa dinâmica reflete os padrões clássicos de desenvolvimento retinal in vivo, conforme descrito por Panova et al. (2008).

Do ponto de vista molecular, esse cenário de maturação foi evidenciado por uma elevada expressão de  $\beta$ 3-Tubulina, cujos feixes microtubulares proeminentes desenharam redes filamentosas complexas no citoplasma. Segundo Panova et al. (2008), a  $\beta$ 3-Tubulina é um marcador de células neuronais precoces essencial na axonogênese e polarização durante o desenvolvimento do olho humano, participando ativamente da formação da retina até a 23ª semana pré-natal; de modo que sua abundância no D25 indica o amadurecimento estrutural de prolongamentos de morfologia predominantemente neuronal (neuritos).

Em paralelo, notou-se uma diminuição da intensidade do sinal de GFAP. Conforme apontado por Pekny e Lane (2007) e Bringmann et al. (2006), a GFAP é o elemento central dos filamentos intermediários que formam o citoesqueleto em células gliais maduras, como astrócitos e células de Müller na retina, desempenhando um papel crucial na integridade mecânica e no equilíbrio metabólico que sustentam os neurônios. Neste estudo, a queda contínua desse marcador no D25 sugere que o conjunto celular se afastou de uma trajetória de intensa gliogênese ou de uma diferenciação puramente astrocitária. Essa diminuição implica que o ambiente indutor estimulou a progressão e o amadurecimento do citoesqueleto rumo à linhagem neuronal, limitando a expressão da GFAP apenas aos níveis essenciais para o suporte estrutural na cultura mista.

Por outro lado, a  $\beta$ 3-Tubulina não é encontrada somente em neurônios isolados. Dráberová et al. (2008) demonstraram que ela pode ser coexpressa com GFAP e Nestina em astrócitos fetais humanos, o que exige cautela na análise dos resultados. No contexto deste estudo, a observação da cinética de fluorescência revelou uma coexpressão inicial de  $\beta$ 3-Tubulina e GFAP no D3, seguida por uma redução progressiva de GFAP e um aumento notável de  $\beta$ 3-Tubulina no D25. Esse padrão temporal indica uma mudança fenotípica clara, ligada à adaptabilidade neural das hCSCs, evidenciando que os estímulos químicos e a matriz extracelular foram eficazes em direcionar as células além de um fenótipo exclusivamente glial.

Em conjunto, os dados obtidos fortalecem o uso das hCSCs como uma plataforma biotecnológica altamente vantajosa e promissora para estudos pré-clínicos relacionados à neurotoxicidade e avaliação de eficácia terapêutica. Ao demonstrar que tecidos oculares humanos descartados podem ser direcionados a um perfil neuronal este trabalho propõe uma alternativa às severas limitações éticas e translacionais dos modelos animais tradicionais. A relevância desses resultados reside, portanto, na consolidação de um modelo *in vitro* de alta fidelidade biológica à fisiologia humana, permitindo a obtenção de células neuronais potencialmente aplicáveis em modelos experimentais mais representativos, sustentáveis e translacionalmente relevantes para a engenharia tecidual e a medicina regenerativa.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as células-tronco estromais da córnea humana (hCSSCs) podem ser isoladas com elevado rendimento a partir de tecidos descartados para transplante, consolidando-se como uma fonte celular ética, acessível e sustentável para a medicina regenerativa. As células obtidas apresentaram perfil imunofenotípico compatível com os critérios estabelecidos para células-tronco mesenquimais, evidenciando a eficiência e a reprodutibilidade do protocolo de isolamento e expansão celular empregado.

Além da caracterização fenotípica, os resultados comprovaram a expressiva plasticidade biológica das hCSSCs por meio da sua diferenciação bem-sucedida nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Sobretudo, o protocolo de indução neural demonstrou a aquisição progressiva de características morfológicas típicas da linhagem neuronal madura, ratificando a capacidade dessas células de recapitular eventos do neurodesenvolvimento *in vitro*.

Em conjunto, as evidências experimentais reunidas consolidam o uso das hCSSCs como uma plataforma biotecnológica promissora para a triagem de substâncias neurotóxicas, ensaios de eficácia terapêutica e modelagem de neuropatias. A relevância desta pesquisa reside, portanto, em fornecer o alicerce celular indispensável para o desenvolvimento de modelos experimentais humanos tridimensionais e preditivos, mostrando potencial como uma alternativa translacionalmente relevante e com fidelidade biológica para aplicações em engenharia tecidual ocular.

## REFERÊNCIAS

ALLAN, B. D. S. The worldwide epidemic of corneal blindness. **Eye**, v. 13, n. 3, p. 415-419, 1999.

ANDERSON, J. A. et al. Keratocyte loss and nerve regeneration after photorefractive keratectomy. **Cornea**, v. 23, n. 7, p. 696-702, 2004.

BASU, S. et al. Human limbal biopsy-derived stromal stem cells prevent corneal scarring. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 266, 2014.

CATALA, M. et al. The corneal stroma: a view of its role from a developmental biology perspective. **Cell Biology International**, 2021.

CHANG, Y. K.; HWANG, J. S.; CHUNG, T. Y.; SHIN, Y. J. SOX2 activation using CRISPR/dCas9 promotes wound healing in corneal endothelial cells. **Stem Cell**, v. 36, p. 1851–1862, 2018.

CHUN, M. H. Serum signaling factors and spheroids. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 36, n. 2-3, p. 89-98, nov./dez. 2000.

CIOFFI, Christopher L. Introduction: Overview of the Human Eye, Mammalian Retina, and the Retinoid Visual Cycle. In: **Topical Medicinal Chemistry**. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DRÁBEROVÁ, E. et al. Class III  $\beta$ -Tubulin Is Constitutively Coexpressed With Glial Fibrillary Acidic Protein and Nestin in Midgestational Human Fetal Astrocytes: Implications for Phenotypic Identity. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 67, n. 4, p. 341-354, 2008.

DRÁBEROVÁ, E. et al. Expression of class III  $\beta$ -tubulin in normal and neoplastic human astrocytes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 1, p. 81-94, 2008.

DU, Y. et al. Stem Cell Therapy Restores Transparency to Defective Murine Corneas. **Stem Cells**, v. 27, n. 7, p. 1635–1642, 2009.

DUAN, X. et al. Corneal allograft rejection and immunosuppressive strategies: a review. **Transplantation Proceedings**, v. 49, n. 4, p. 773-780, 2017.

ESPANA, E. M.; BIRK, D. E. Composition, structure and function of the corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 198, p. 108137, 2020.

FENG, Kang; YOU, Caiyun; YUAN, Ling. General Anatomy. In: YAN, H. (ed.). **Anatomy and Examination in Ocular Trauma**. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. p. 3-28.

FULLWOOD, N. J. Corneal collagen and its relationship to the Bowman's layer. **Cornea**, v. 23, n. 5, p. 433-437, 2004.

GARCÍA-ACOSTA, S. et al. A 25-year study of corneal transplantation in a single center. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v. 92, n. 8, p. 388-393, 2017.

GHIASI, Mohsen et al. Isolation, Culture, Optimization and Validation of Human Corneal Stromal Keratocytes from Discarded Corneal Tissue. **Journal of Ophthalmic and Vision Research**, v. 18, n. 2, p. 145-154, 2023.

GHOUBAY, D. et al. Corneal stromal stem cells restore transparency after N2 injury in mice. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 9, n. 8, p. 917–935, 2020.

GÓMEZ-LÓPEZ, S. et al. Sox2 and Pax6 Maintain the Proliferative and Developmental Potential of Gliogenic Neural Stem Cells In Vitro. **Glia**, v. 59, n. 10, p. 1588-1599, 2011.

GUPTA, S. et al. Novel combination BMP7 and HGF gene therapy instigates selective myofibroblast apoptosis and reduces corneal haze in vivo. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 59, p. 1045–1057, 2018.

HAMRAH, P.; DANA, R. Corneal antigen-presenting cells. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 92, p. 58-70, 2007.

HE, J.; BAZAN, H. E. Neuroanatomy and neurochemistry of mouse cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 57, n. 2, p. 664-674, 2016.

HERTSENBERG, A. et al. Corneal stromal stem cells reduce corneal scarring by mediating neutrophil infiltration after wounding. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.

HUANG, J.; LI, Z. Corneal blindness and its management. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 18, n. 4, p. 288-294, 2007.

KAMIL, S.; MOHAN, R. R. Corneal stromal wound healing: major regulators and therapeutic targets. **The Ocular Surface**, v. 19, p. 290-306, 2021.

KUMAR, A. et al. Human corneal stromal stem cells exhibit survival and maintenance of phenotype after long-term cryopreservation. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 7, n. 6, p. 479-488, 2018b.

KUMAR, Raj; KUMAR, Sunil; ATTULURI, Vamsi Kumar. Anatomy and Physiology of the Uveal Tract: Maintaining the Eye's Internal Balance. In: **Uveitis – Basics, Diagnosis, and Treatment**. London: IntechOpen, 2024.

LATHROP, Kira L. et al. Human Corneal Stromal Stem Cell Treatment Reduces Established Opacities in Chronic Corneal Scarring. **Cells**, v. 15, n. 7, p. 615, 2026.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L. B.; MCKAY, R. D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 585-595, 1990.

MATTHYSSEN, S.; DHUBHGHAILL, S. N.; GERWEN, V. V.; ZAKARIA, N. Xeno-Free Cultivation of Mesenchymal Stem Cells From the Corneal Stroma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 5, p. 2659–2665, 2017.

MCNABB, P. M.; MOHAN, R. R. The need for improved therapeutic approaches to protect the cornea against chemotoxic injuries. **Translational Vision Science & Technology**, v. 9, n. 8, p. 2, 2020.

MEEK, K. M.; KNUPP, C. Corneal structure and transparency. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 49, p. 1-16, 2015.

MENDA, K. A. et al. Corneal wound healing and regeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 61, n. 9, p. 43-43, 2020.

MICHALCZYK, K.; ZIMAN, M. Nestin: more than a biomarker of progenitor cells. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 10, n. 4, p. 693-702, 2005.

MOHAN, R. R.; MARTIN, L. M.; SINHA, N. R. Novel insights into gene therapy in the cornea. **Experimental Eye Research**, v. 202, p. 108361, 2021b.

MORE, S.; MALLICK, S.; SHENOY, P. S.; BOSE, B. Pax6 expressing neuroectodermal and ocular stem cells: Its role from a developmental biology perspective. **Cell Biology International**, 2024.

NG, Patrick C.; OLIVER, Joshua J. Anatomy of the eye. In: Handbook of Emergency Ophthalmology. Cham: **Springer International Publishing**, 2018. p. 1-12.

PANOVA, I. G. et al. Study of  $\beta$ -III tubulin expression in human eye tissues during prenatal development. **Biology Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 121-125, 2008.

PARIKUMAR, Periasamy et al. Human corneal endothelial cell transplantation using nanocomposite gel sheet in bullous keratopathy. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 11, n. 2, p. 1246-1253, 2018.

PERRELLA, G. et al. Expression of hematopoietic stem cell markers, CD133 and CD34, in human corneal keratocytes. **British Journal of Ophthalmology**, v. 91, n. 1, p. 94-99, 2007.

PINNAMANENI, N.; FUNDERBURGH, J. L. Concise review: Stem cells in the corneal stroma. **Stem Cells**, v. 30, n. 6, p. 1059-1063, 2012.

QUIROZ, J.; YAZDANYAR, A. Animal models of diabetic retinopathy. **Annals of Translational Medicine**, v. 9, n. 15, p. 1272, 2021.

RETINAPRO. **Principais partes do olho**. Disponível em: <https://retinapro.com.br/blog/principais-partes-do-olho>. Acesso em: 30 mai. 2026.

SHAINER, R. et al., “Efficient isolation and chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells with fibrin microbeads and micronized collagen sponges.,” **Regenerative Medicine**, vol. 5, no. 2, pp. 255–265, Mar. 2010

THERMO FISHER SCIENTIFIC. *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit: manual do usuário*. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2014.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit: manual do usuário*. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2014.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. *StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit: manual do usuário*. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2014.

TORRICELLI, A. A. et al. The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, n. 9, p. 6390-6400, 2013.

TREVISANI, M. T. et al. Isolation and Characterization of Human Corneal Stromal Stem Cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 1777, p. 177-190, 2018.

VERÉB, Z. et al. Role of Human Corneal Stroma-Derived Mesenchymal-Like Stem Cells in Corneal Immunity and Wound Healing. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26227, 2016.

VOLATIER, T.; CURSIEFEN, C.; NOTARA, M. Current advances in corneal stromal stem cell biology and therapeutic applications. **Cells**, v. 13, n. 2, p. 163, 2024.

WHITCHER, J. P. et al. Corneal blindness: a global perspective. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 3, p. 214-221, 2001.

WILKINS, M. R. et al. Long-term survival of penetrating keratoplasty for keratoconus. **British Journal of Ophthalmology**, v. 87, n. 4, p. 419-422, 2003.

WILLIAMS, K. A.; MØLLER, H. J. The impact of age on corneal graft survival: a systematic review and meta-analysis. **Transplant International**, v. 29, n. 7, p. 817-827, 2016.

WILSON, Samantha L. et al. Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation? **Current Eye Research**, 2015.

WILSON, S. E. Bowman's layer in the cornea: structure, function, and regeneration. **Experimental Eye Research**, v. 195, p. 108033, 2020a.

WILSON, S. E. et al. Corneal keratocytes: structure and function. **Experimental Eye Research**, v. 73, n. 5, p. 615-626, 2001.

WISLET-GENDEBIEN, S. et al. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 16, p. 3295-3302, 2003.

XIE, Y. et al. Individual heterogeneity screened umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells with high Treg promotion demonstrate improved recovery of mouse liver fibrosis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 359, 2021.

YAM, G. H. F. et al. Keratocyte biology. **Experimental Eye Research**, v. 196, p. 108062, 2020.

## **ANEXO A - NORMAS DA BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE**

### **PÁGINA DE TÍTULO**

#### **Título**

O título deve ser o mais curto e informativo possível, não deve conter siglas ou abreviações não padronizadas e não deve exceder duas linhas impressas. O título deve ser centralizado e escrito em negrito, como no exemplo abaixo:

**LIOFILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LIPÍDIOS SÓLIDOS DE AMPICILINA USANDO MANITOL COMO CRIOPROTETOR**

#### **Título abreviado:**

Este título curto, a ser usado como cabeçalho de página, não deve exceder 60 caracteres.

#### **Autores e Afiliações:**

O nome completo (seguido de números sobrescritos que identificam a afiliação) deve ser escrito em negrito e centralizado. A(s) instituição(ões) (Departamento, Faculdade/Escola, Universidade, Cidade, Estado, País) de cada autor (em inglês) deve(m) ser centralizada(s) e escrita(s) em itálico.

Exemplo:

Hongmei Xia<sup>1\*</sup>, Yongfeng Cheng<sup>2</sup>, Yinxiang Xu<sup>3</sup>, Zhiqing Cheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade de Medicina Tradicional Chinesa de Anhui, Hefei, República Popular da China, <sup>2</sup>Escola de Ciências da Vida, Universidade de Ciência e Tecnologia da China, Hefei, República Popular da China, <sup>3</sup>Zhaoke (Hefei) Pharmaceutical Co. Ltd., Hefei, República Popular da China

#### **Autor correspondente:**

Um dos autores deve ser designado como autor correspondente. É responsabilidade do autor correspondente garantir que a lista de autores esteja

correta e completa. Se o artigo foi submetido em nome de um consórcio, todos os membros e suas afiliações devem ser listados na seção de Agradecimentos. Forneça o nome, endereço completo, endereço de e-mail e número ORCID do autor para quem a correspondência deve ser enviada, identificado com um asterisco.

**Resumo:**

Como os resumos são publicados separadamente pelo Serviço de Informação, devem conter dados suficientes para serem compreendidos pelo leitor. O resumo não deve exceder 200 palavras (250 para artigos de revisão) e deve ser preparado em um único parágrafo, sem divisões por tópicos ou margens. O resumo deve apresentar de forma breve e clara o objetivo, a abordagem experimental, os novos resultados como dados quantitativos, se possível, e as conclusões. Deve mencionar as técnicas utilizadas sem entrar em detalhes metodológicos e destacar os resultados mais importantes. As abreviações devem ser mantidas ao mínimo e definidas tanto no resumo quanto no texto. Por favor, não inclua citações de referências no resumo. Caso o uso de uma referência seja inevitável, a citação completa deve ser fornecida no resumo.

**Palavras-chave:**

Uma lista de palavras-chave ou termos de indexação (no máximo 6) deve ser incluída, evitando termos genéricos. As palavras-chave devem ser separadas por pontos, com apenas a primeira letra da primeira palavra em maiúscula.

Exemplo: Apoptose, farmacocinética. Toxicologia.

**INTRODUÇÃO**

A Introdução deve situar o foco do manuscrito num contexto mais amplo e refletir o estado atual da arte no assunto. Deve apresentar, de forma breve e clara, os objetivos da investigação, com referência a trabalhos anteriores. A Introdução deve justificar a hipótese do estudo. Deve-se evitar uma revisão bibliográfica extensa e, sempre que possível, substituí-la por revisões recentes sobre o tema.

**MATERIAL E MÉTODOS:**

Estes devem ser descritos com detalhes suficientes para que o trabalho possa ser

reproduzido. Procedimentos e técnicas bem estabelecidos requerem apenas a citação da fonte original, exceto quando forem substancialmente modificados. Relatórios de estudos experimentais em humanos e animais devem certificar (incluindo o número de protocolos) que a pesquisa recebeu aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa institucional competente.

## **RESULTADOS**

Os resultados devem ser apresentados de forma clara, concisa e em ordem lógica. Esta seção deve fornecer os resultados de todos os experimentos necessários para sustentar as conclusões do artigo. Sempre que possível, utilize figuras ou tabelas para apresentar os dados em vez de texto. Grandes conjuntos de dados, incluindo dados brutos, devem ser submetidos como arquivos suplementares; estes são publicados online e vinculados ao artigo.

## **DISCUSSÃO**

A discussão deve interpretar os resultados e avaliar sua relevância em relação ao conhecimento existente. Devem ser evitadas especulações não fundamentadas em dados concretos.

A discussão deve explicitar as principais conclusões e interpretações do trabalho, incluindo uma explicação da importância dessas conclusões.

## **AGRADECIMENTOS**

Quando apropriado, agradeça brevemente a assistência técnica, os conselhos e as contribuições de colegas. As pessoas que contribuíram para o trabalho, mas que não se enquadram nos critérios de autoria, devem ser listadas na seção de Agradecimentos, juntamente com suas contribuições. Doações de animais, células ou reagentes também devem ser reconhecidas. Os autores devem garantir que todos os nomes mencionados nos Agradecimentos concordem com a inclusão de seus nomes. O apoio financeiro para a pesquisa e as bolsas de estudo devem ser reconhecidos nesta seção (agência e número da bolsa)

**APÊNDICE A – Declaração de Uso de Ferramentas de Inteligência Artificial**

“Durante a preparação deste trabalho, a autora utilizou a ferramenta Gemini versão 3.5 Flash para organizar a clareza e a fluidez do texto, permitindo uma melhor articulação dos argumentos durante a etapa de Introdução e Discussão. Após o uso desta ferramenta, a autora revisou e editou o conteúdo em conformidade com o método científico e assume total responsabilidade pelo conteúdo da publicação”