



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE TECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

JULIO CESAR FRANCISCO

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL A PARTIR DE MATRIZ
AMNIÓTICA HUMANA

CURITIBA

2012

JULIO CESAR FRANCISCO

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL A PARTIR DE MATRIZ
AMNIÓTICA HUMANA

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde Humana e Animal, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial obtenção ao título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2012

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Processos biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná e Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.

Atenciosamente agradeço pela orientação da Prof^a Dr^a Katherine Athayde Teixeira de Carvalho e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, nas pessoas da Prof^a. Dr^a. Luciana Vandenberghe e do Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e científico.

Aos Professores Dr. Luiz Cesar Guarita Souza e Dr. Nelson Ityro Miyague pela amizade e incentivo.

Muito Obrigado a minha esposa Rossana Baggio Simeoni e meus filhos pelo companheirismo, minha mãe Maria e meu pai “in memorian” Joselino Otavio Francisco pela dedicação e ensinamentos.

A Prof^a Dr^a Célia Regina Cavichiolo Franco pelo incentivo e aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela imensa ajuda na utilização dos microscópios e técnicas de microscopia eletrônica.

Aos amigos do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Ricardo C. Cunha, Ana Carolina Irioda, Carolina Maria O. Souza pela dedicação e apoio nas pesquisas.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, e em especial, a Deus.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	XI
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1. BIOMATERIAIS.....	17
3.1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS	17
3.2 PLACENTA	20
3.3 MEMBRANA AMNIÓTICA.....	21
3.4 ANATOMIA E FISILOGIA DA MEMBRANA AMNIÓTICA	22
3.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA MA.....	23
3.5.1.PROPRIEDADES MECÂNICAS DA MA.....	26
3.5.2.PREPARAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA MA	26
3.5.3 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	29
3.5.4.USO TERAPÊUTICO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. TRIAGEM DAS DOADORAS	41
4.2. PROCESSAMENTO DAS MEMBRANAS AMNIÓTICAS	41
4.2.1.PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	42
4.3. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS MEMBRANAS AMNIÓTICAS.....	43
4.3.1 AVALIAÇÃO DE ENDOTOXINAS	43
4.4. CARACTERIZAÇÃO.....	44
4.4.1.MICROSCOPIA CONFOCAL	44
4.4.2.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	45
4.4.3.ESTUDO ANÁTOMO PATOLÓGICO DA MA	46
4.4.4.CORPOS DE PROVA PARA ANÁLISE DINÂMICO MECÂNICA (A.D.M.)	47

4.4.4.1. ANÁLISE DINÂMICO- MECÂNICA (A.D.M)	47
4.4.5. TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE “IN VIVO”	49
4.4.5.1. MODELO ANIMAL E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	49
4.4.5.2. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	51
4.4.5.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	52
4.6. ANÁLISE DA CAPACIDADE DE SERVIR COMO SUPORTE PARA O CULTIVO DE CÉLULAS.....	53
4.6.1. CULTURAS SECUNDÁRIAS DOS MIOBLASTOS SOBRE AS MEMBRANAS DESCELULARIZADAS.....	54
4.7. ANÁLISE ESTÁTÍSTICA	55
5 RESULTADOS	56
5.1. AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO DA MEMBRANA AMNIÓTICA APÓS DESCELULARIZAÇÃO E DESCONTAMINAÇÃO.....	57
5.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA VARREDURA (MEV)	58
5.3.1 TESTE DE ENDOTOXINAS	61
5.4. ENSAIOS MECÂNICOS.....	62
5.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA O TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE	65
5.5.1. ANÁLISE ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	65
5.5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOMÉTRICA	67
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	83
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
9 ANEXOS.....	97
9.1 CARTAS DE APROVAÇÃO DOS COMITÊS.....	98
9.2 ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DOS KITS PARA MICROBIOLÓGICO.	100

Silgas

ASTM - International - Standards Worldwide

b-FGF – fator de crescimento fibroblástico

DMA - Análise dinâmico- mecânica

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGF - fator de crescimento epidermal

EGTA - Etileno glicol ácido tetra-acético

GAGs – Glicosaminoglicanos

GATB – Grupo Antibiótico

GDIOX – Grupo dióxido de cloro

GN – Grupo Normal

HGF - fator de crescimento hepatócito

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HLA - antígenos dos leucócitos humanos

IL - Interleucina

KGF - fator de crescimento de ceratócitos

MA – Membrana Amniótica

MEC - matriz extracelular

MHC - complexo principal de histocompatibilidade.

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

mRNA – RNA mensageiro

PAA – Ácido peracético

PVPI - Iodopovidona

SD - desoxicolato de sódio

SDS - dodecil sulfato de sódio

TGF – fator transformador de crescimento

TIMPs – metaloproteinases

Lista de Figuras

Figura 1	Representação histológica da membrana amniótica: Epitélio, membrana Basal, camada compacta, camada de fibroblastos, camada esponjosa	11
Figura 2	Fluxograma do Processo	29
Figura 3	Manobra digitiforme de separação do âmnio do córion. (A), lavagem exaustiva do material para retirada de resíduos de sangue e córion. (B)	31
Figura 4 A e B	Processo de descclularização sob agitação (A), Membrana descclularizada.	32
Figura 5 A e B	A- Microscópio de varredura e B- metalizador Balsers	35
Figura 6	Corpo de prova	36
Figura 7	Analizador dinâmico mecânico mod. 242 netzsch	37
Figura 8 A e B	(A) Membrana e (b) punch, (c) e (d) exposição do coração para o procedimento de transplante da membrana.	39
Figura 9 –A e B	Microscopia optica, figuras A e B representa ma arquitetura normal preservada pós conservação em pbs a 4º c, HE 20x e 100 x.	45
Figura 10	Mev figuras A e B, representa ma intacta e C e D respectivamente descclularizada.	46
Figura 11 Ae B	Microscopia confocal, figura A representa ma intacta e B respectivamente descclularizada coloração para laminina.	48

Figura 12	Microscopia óptica, figura c, representa ma intacta e d respectivamente descelularizada coloração para HE 10x.	48
Figura 13	Amostras A e B apresentam resultados negativos em agar sangue (A) e caldo bhi (B) para ma em dióxido de cloro, amostra C resultados positivos para ma descontaminada com antibióticos.	49
Figura 14	Amostras em caldo sabouraud figuras A dil. 10-1ml e B, dil, 10-3ml.	51
Figura 15	Amostras em ágar triptona de soja (tsa).	51
Figura 16	Curva de análise dinâmico mecânica do material descelularizado.	50
Figura 17	Curva de análise dinâmico mecânica do material “in natura”.	53
Figura 18	Fotomicrografia grupo controle área focal com presença de fibras normais. (HE 20x)	54
Figura 19	Fotomicrografia grupo (diox) área focal com presença de fibras colágenas (seta) e pouca reação inflamatória. (HE 20x)	54
Figura 20	Fotomicrografia grupo (atb) área focal com presença de fio de sutura (seta) e intenso infiltrado inflamatório. (HE 20x)	52
Figura 21	Comparação entre o Grupo GATB e o DIOX	55
Figura 22	Comparação entre o Grupo normal e o DIOX	56
Figura 23	Comparação entre o Grupo normal e GATB	57
Figura 24	Cultura de mioblastos: a membrana sem células e b nota-se as colônias de mioblastos circundadas por alguns fibroblastos (seta) que desaparecerão com a evolução do cultivo (B)(aum: 200x e 400x)	58

RESUMO

A membrana amniótica tem sido estudada como possível biomaterial na Medicina Regenerativa, sobretudo de uso externo. Os protocolos são controversos entre os métodos de descclularização e manutenção da integridade de seus componentes. **Objetivo:** desenvolver um biomaterial a partir de matriz amniótica humana. **Material e Métodos:** Realizado protocolo modificado de placenta humana a base de detergentes iônicos para remoção de todos os componentes celulares da membrana amniótica. Placentas obtidas de parto cesáreo de gestantes saudáveis e concepto à termo (n = 12) foram divididas aleatoriamente em dois fragmentos cada e tratadas com dióxido de cloro estabilizado 8% (v/v) por 20 minutos. Posteriormente foi utilizado 0,01% (v/v) dodecil sulfato de sódio e deoxicolato de sódio a 37° C por 24 horas. Foram realizados testes microbiológicos e de endotoxinas. As propriedades biomecânicas da membrana foram determinadas utilizando ensaios de tração biaxial. As análises histológicas foram avaliadas por microscopia óptica: HE e imunofluorescência para laminina e por microscopia eletrônica de varredura. Testes de biocompatibilidade foram realizados; “*in vivo*”, através de implante no miocárdio de ratos e “*in vitro*” por semeadura de células e cultivo. Realizou-se a esterilização por irradiação gama. **Resultados:** A matriz celular foi descclularizada de modo eficiente e com a descontaminação satisfatória. Os componentes estruturais da matriz foram preservados, não houve redução significativa na resistência à tração, extensibilidade e elasticidade após a descontaminação e descclularização. Foi demonstrada a biocompatibilidade através de crescimento celular sobre a matriz amniótica e da ausência de reação inflamatória após implante no miocárdio. **Conclusão:** Matriz celular descclularizada padronizada para uso e testes de aplicação de Biomaterial como implante.

Descritores: Membrana Amniótica; Biomaterial; Descclularização; Implante.

ABSTRACT

The amniotic membrane has been studied as a potential biomaterial in regenerative medicine, mainly for external use. The protocols are controversial among the removal of all cells decellularization and maintaining the integrity of its components. **Purpose:** develop a biomaterial from human amniotic fluid matrix. **Material and methods:** the human placenta membrane detergent-based ionic protocol was modified to remove all cellular components of the amniotic membrane. Placenta membranes from childbirth of pregnant women healthy and elective by caesarian section, concepto to term (N= 12) were divided randomly into two fragments each and treated with stabilized chlorine dioxide 8 (v/v) for 20 minutes. It was later used 0.01 (v/v) sodium dodecyl sulfate and sodium deoxicolato at 37° C for 24 h. Microbiological tests were performed and endotoxins. The biomechanical properties of the membrane were determined using biaxial tensile tests. The histological analyses were evaluated by optical microscopy: HE and immunofluorescence to laminin and by scanning electron microscopy. Biocompatibility tests were conducted; in vivo through implant on myocardium of rats "*in vitro*" and "*in vivo*" by cell seeding and cultivation. Continue with gamma-irradiation sterilization **Results:** the cellular matrix decellularized was efficiently and with satisfactory decontamination. The structural components were preserved; there was no significant reduction in tensile strength, extensibility, and elasticity after the removal of cells decontamination and decellularization. It was demonstrated the biocompatibility with cell growth on the aminiotic array and the absence of inflammatory reaction after implant on the myocardium. **Conclusion:** Cellular matrix decellularizaded standardized tests for used and application of Biomaterial as implant.

Keywords: Amniotic Membrane; Biomaterial; Decellularized; Implant.

1 INTRODUÇÃO

1. Introdução

Nos últimos anos, a bioengenharia, vem desenvolvendo e manipulando moléculas, células, tecidos e órgãos cultivados em laboratório no intuito de substituir partes do corpo humano. A substituição de tecidos no organismo é um dos principais desafios da medicina regenerativa atual. Essa substituição é necessária quando ocorrem perdas de estrutura anatômica resultantes de defeitos congênitos, sequelas de trauma ou cirurgia oncológica. Muitos materiais foram utilizados para com este objetivo, sejam sintéticos ou biológicos, com a finalidade de se produzir novos dispositivos médicos denominados biomateriais que são usados em contato com tecidos vivos, no intuito de aumentar a qualidade de vida (1-3).

Para definir o biomaterial ideal é necessário analisar um conjunto de requisitos, tais como: não causar modificação física no tecido hospedeiro, ser quimicamente inerte, não ser carcinogênico, não causar reação alérgica ou de corpo estranho, ter capacidade de resistência a forças mecânicas, poder ser fabricado na forma desejada e ser esterelizável. O efeito do ambiente orgânico no material (degradação) e o efeito do material no organismo são fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado pois a eles está associada a chamada "biocompatibilidade" (4).

A interação dos tecidos vivos com o biomaterial associado ao tipo de resposta do organismo à presença do material é o ponto mais desafiador no desenvolvimento desta terapia. Os tipos de interação entre tecido-implante são fundamentalmente dependentes do tipo de material e podem ser reunidos nos seguintes grupos: tóxica ou não-tóxica (muitas vezes chamada de bioinerte), bioativa e biodegradável. Nos últimos tempos, o desenvolvimento de materiais considerados bioativos e biodegradáveis vêm sendo enfatizado já que, além de substituir tecidos traumatizados, estes materiais também podem propiciar a recuperação do tecido danificado atuando em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento (2, 4).

Um dos grandes objetivos da bioengenharia é a produção de biomateriais capazes de substituir tecidos danificados enquanto o processo de reparo natural da área afetada estaria sendo promovido. O material ideal para esta função, além de biodegradável, estimularia a regeneração da matriz extracelular e teria uma cinética de degradação das propriedades biomecânicas compatíveis com a cinética de reparo do tecido. Dessa forma, o novo biomaterial substituiria progressivamente, o tecido nas funções requeridas (18).

Uma análise da estrutura dos tecidos que constituem o corpo humano permite mostrar que os biomateriais são tipicamente heterogêneos. Assim sendo, tais materiais são formados por dois ou mais componentes que, em conjunto, são responsáveis pelas propriedades finais do tecido. Partindo-se desse princípio e levando-se em consideração a utilização biomédica da placenta, bem como das membranas amnióticas, sugere-se que a substituição de tecidos vivos por uma matriz descelularizada possa estar ligada ao desenvolvimento de mesclas especiais capazes de reproduzir as propriedades dos tecidos humanos (5, 6).

Em função do potencial da membrana amniótica, surge a necessidade de padronização de técnicas para o desenvolvimento de biomateriais a partir da membrana amniótica e testes para sua validação como produto biocompatível.

2 OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biomaterial a partir de matriz amniótica humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descontaminar a membrana amniótica
- Padronizar o método de descclularização.
- Avalilar os efeitos dinâmico mecânicos após a descclularização.
- Avaliar as alterações morfológicas da membrana após o processo de descclularização.
- Analisar “*in vivo*” a biocompatibilidade da membrana amniótica.
- Analisar “*in vitro*” a biocompatibilidade da membrana amniótica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3. Revisão da literatura

3.1. BIOMATERIAIS

3.1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

Biomaterial compreende uma substância pura ou composta, de natureza sintética ou natural, que pode ser utilizado temporariamente ou definitivamente com a finalidade de melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou totalmente, tecidos ou órgãos. O critério de escolha de um biomaterial passou a ser feito de acordo com a similaridade química e física com o tecido a ser substituído (1, 7).

São várias as razões clínicas para o desenvolvimento de biomateriais, principalmente quando se trata de matrizes normalmente feitas de materiais poliméricos para fornecer suporte estrutural para a fixação de células e posterior desenvolvimento de tecido. Contudo, hoje, biomateriais não se destinam somente a preencher espaços, mas também a estimular uma resposta biológica específica em função das propriedades, como distribuição eletrônica, conformação molecular, estado de agregação e outras propriedades físico-químicas (1, 2, 7).

Os biomateriais devem seguir alguns requisitos básicos para seu emprego como não causar danos locais ou sistêmicos, isto é, não ser tóxico, carcinogênico ou radioativo. A biocompatibilidade é de suma importância para o sucesso e pode ser definida da seguinte forma: um material é biocompatível quando provoca no organismo reações desejadas, controladas e toleradas fisiologicamente. Também deve existir compatibilidade mecânica semelhante, ou maior, proporcionada pelo material substituído (TABELA 1) (4, 8, 9).

O conceito básico de biomaterial com potencial baseado na engenharia de tecidos foi originalmente introduzido por Langer (2000). Entretanto, há vantagens e desvantagens, sendo uma opção de escolha de

terapia pelos médicos que certamente trará grandes benefícios para os pacientes que não foram capazes de obter regeneração por outros tratamentos. Assim, nos últimos anos vem ocorrendo um aumento das pesquisas de biomateriais para a área médica e odontológica no que se refere à reconstrução tecidual, envolvendo diretamente a engenharia de tecidos.

Com em relação a sua origem os biomateriais podem ser classificados em:

- Autógenos: quando são provenientes do próprio organismo. A sua principal vantagem é a possibilidade de manter a viabilidade celular que depende da rápida revascularização do enxerto e da espessura do mesmo. As desvantagens são a dificuldade de se obter material suficiente para o preenchimento total do defeito, a possibilidade de provocar danos ao tecido do doador, a inconveniência do ato cirúrgico na área doadora e a necessidade de anestesia geral além dos riscos de infecção associados à cirurgia (1, 10).
- Alógenos: quando são provenientes de outros indivíduos da mesma espécie. Podem ser obtidos de cadáveres que tiveram de morte encefálica, processados e armazenados em bancos específicos. Sua principal desvantagem é a transmissão de infecções virais, bacterianas e fúngicas. (10, 11).
- Xenógenos: quando são provenientes de indivíduos de outra espécie. Tem sido amplamente utilizado em substituição de valvas cardíacas, veias, cirurgias plásticas e ortopédicas de tendões. Normalmente são de origem bovina ou porcina (12-17).
- Aloplásticos: quando são substâncias exclusivamente sintéticas e biocompatíveis com os fabricados em laboratório. Estão no mercado em grande variedade de textura, tamanho, forma e composição. As cerâmicas bioativas compõem a maior família de aloplastos tais como: hidroxiapatita, sulfato de cálcio, polímeros à base de hidróxido de cálcio, entre outros (8).

Tabata *et.al* (2009), em sua revisão relata que a engenharia de tecidos “*in vitro, in vivo*” torna-se vantajosa porque induz a regeneração

tecidual. É provável que a maior parte da produção dos componentes biológicos necessários para a regeneração, como os fatores de crescimento, seja naturalmente do próprio organismo (18).

TABELA 1 - Parâmetros estruturais do Biomaterial para aplicação na engenharia tecidual.

FUNÇÃO DO BIOMATERIAL	CARACTERÍSTICA NECESSÁRIA PARA CADA FUNÇÃO DO BIOMATERIAL
Não provocar resposta inflamatória de toxicidade <i>in vivo</i>	Deve ser biocompatível, não-tóxico e não-carcinogênico
Ajudar o crescimento tridimensional de tecidos e órgãos	Forma específica tridimensional
Semear uniformemente alta quantidade de células	Apresentar alta porosidade e alta conectividade entre os poros
Permitir adesão, proliferação e diferenciação celular.	Possuir superfície química e topografias apropriadas
Permitir interações significativas entre a superfície celular e anexos	Relação área de superfície X volume
Promover proliferação e migração celular e conduzir a crescimento de tecido ao longo da matriz	Tamanho de poros apropriados para permitir a penetração de células e a interconectividade entre elas
Dirigir e orientar células da Matriz Extracelular para formação de novo tecido	Orientação correta das fibras dentro da matriz
Permitir o movimento de nutrientes dentro e fora da matriz	Alta porosidade e interconectividade entre os poros
Degradação da matriz para permanecer somente tecido natural	Taxa de degradação da matriz não devem ser tóxicos nem promover inflamação <i>in vivo</i>
Integridade estrutural suficiente para reter forma <i>in vivo</i> com tensão mecânica suficiente para apoiar o tecido em desenvolvimento e resistir em forças <i>in vivo</i> .	<i>Scaffold</i> deve igualar-se às propriedades mecânicas do tecido em desenvolvimento.

FONTE: Adaptado de PATEL et al. (2008) (2).

3.2 PLACENTA

A placenta promove trocas de nutrientes, gases e metabólitos entre os organismos fetal e materno e, em função disso, é constituída por uma parte fetal e uma parte materna. Possui forma discoidal com diâmetro oscilando entre 15 - 20 cm, e espessura aproximada de 1,5 a 2 cm. Pesa em torno de 500 gramas ou aproximadamente um sexto do peso do feto. A parte fetal é formada pelo córion que consta de uma placa corial de onde partem os vilos coriônicos. Os vilos formam a unidade denominada cotilédone fetal e são banhados pelo sangue dos espaços intervilosos da placenta, onde ocorrem as trocas de substâncias entre o sangue materno e fetal. A parte materna é a decídua basal, que fornece sangue arterial para as lacunas situadas entre os cotilédones e recebe o sangue que retorna venoso dessas lacunas. A zona marginal segue o contorno da placenta e proporciona a união da decídua basal e do córion (5).

Um estudo que avaliou os componentes da matriz extracelular da placenta a termo apontou a presença de colágeno IV, colágeno I, fibronectina, laminina e fibrilina no estroma e nos vasos (19, 20).

Hopper *et al.* (2003), expôs a placenta humana a um processo de descélularização química aplicando a técnica de perfusão de um cotilédone isolado. Esta técnica é dividida em quatro etapas e utilizou a vascularização do cotilédone para promover a perfusão e difusão química causando lise da membrana celular, degradação do conteúdo nuclear e remoção dos fragmentos celulares. As análises histológicas de imunohistoquímica demonstraram evidências de material celular preservando a integridade da matriz extracelular e da membrana basal (5).

Niknejad *et al.* (2008) revendo a literatura descreve as propriedades da placenta e da membrana amniótica com potencial utilização na engenharia de tecidos (21).

3.3 MEMBRANA AMNIÓTICA

A membrana amniótica (MA) humana tem sido utilizada como biomaterial para reconstruções cirúrgicas há quase 100 anos. A proposta de se estudar cada vez mais a MA tem constituído uma grande aposta, pela promessa de uma melhora significativa na qualidade de vida humana. Além disso, apresenta enorme potencial de absorção, elevada biocompatibilidade, capacidade regenerativa e facilidade de aplicação (22).

O uso da MA teve sua origem no começo do século, passado quando Davis, em 1910, a utilizou como material cirúrgico no tratamento de pequenos defeitos de pele em pacientes humanos. (23) Em 1940, De Roth descreve o transplante de MA pela primeira vez na reparação de sibiléfaro e defeitos conjuntivais (24). Posteriormente Sorby e Symons 1946 relataram bons resultados obtidos com o uso da MA no tratamento de queimadura química aguda (25).

O seu emprego tem se estendido a outras áreas da medicina como na criação de curativos biológicos, bem como na reconstrução da cavidade oral, bexiga, timpanoplastia; artroplastia, onfalocèle e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdome, pélve, vagina e laringe (25, 26).

Kim e Tseng reintroduziram o uso da MA na cirurgia oftalmológica em modelo experimental e descreveram a capacidade da membrana de reforçar a cicatrização e epitelização de feridas provocadas na córne de coelhos notando-se um aumento do uso da MA como um biomaterial em cirurgias nas últimas décadas.(26)

3.4 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA MEMBRANA AMNIÓTICA

A membrana fetal é composta por duas camadas principais: o córion, que é a camada externa da placenta que entra em contato com as células maternas, e a MA, camada mais interna que está em contato íntimo com o feto, e é separada dele apenas pelo líquido amniótico. Na espécie humana a MA surge 7 a 8 dias após a concepção. A sua espessura varia de acordo com a quantidade de líquido e mucina presentes em sua estrutura, podendo ser de 0,02mm a 0,5mm, não apresenta vascularização e nem suprimento sanguíneo direto (27, 28).

A MA humana ou âmnio é uma membrana translúcida composta por uma camada de epitélio simples com células colunares firmemente aderidas, e uma camada mais interna, chamada de camada mesenquimal que contém grande quantidade de colágeno tipo IV, V, laminina, camada basal espessa e uma matriz avascular.

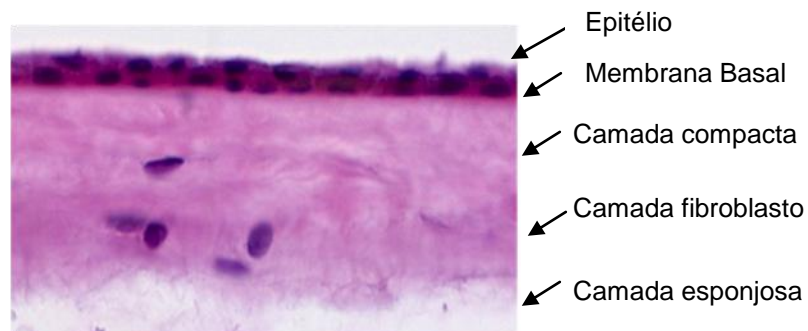


FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEMBRANA AMNIÓTICA: EPITÉLIO, MEMBRANA BASAL, CAMADA COMPACTA, CAMADA DE FIBROBLASTOS, CAMADA ESPONJOSA (29).

FONTE: John, (2003)

As células amnióticas possuem numerosos microvilos em sua face apical e processos celulares se estendendo a partir da membrana basal como podócitos. Estes processos celulares apresentam junções tipo hemidesmosomos aderidos à membrana basal com os tonofilamentos e a membrana basal subjacente e parcialmente amorfa e microfibrilar. A membrana basal da MA é uma das mais espessas encontradas nos tecidos humanos, composta por colágenos tipos I, III, IV, V e VII, elastina, fibronectina e várias outras integrinas. A membrana basal é conhecida pela capacidade de promover cicatrização, neovascularização e fibrose (28).

No citoplasma das células da MA são encontradas muitas vesículas de pinocitose, organelas em abundância, incluindo retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os núcleos celulares têm configuração irregular e indentações na membrana nuclear, com nucléolos sempre grandes e homogêneos, o que sugere atividade nucleolar. A ultra - estrutura do epitélio da MA tem muitas funções especializadas, entre elas destacam-se revestimento, como atividade epitelial secretória e intenso transporte transcelular e intercelular. Além disso, a MA ganhou importância devido à sua capacidade de reduzir a inflamação em cicatrizes, reforçar a cicatrização de feridas e servir como um arcabouço para proliferação e diferenciação celulares, além de apresentar propriedade antimicrobiana (30, 31).

3.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA MA

A MA possui várias propriedades biológicas como reduzir a carga bacteriana e promover a cura de feridas infectadas. Esta membrana faz parte de um importante grupo de peptídeos antimicrobianos, os β -defensins, os que são expressos em superfícies de mucosas por células epiteliais e leucócitos sendo parte integrante do sistema imunológico inato (32). O seu efeito bactericida é atribuído a sua capacidade de aderência na superfície de feridas, proteção da lesão e redução da dor. (33). O sistema imunológico inato tem evoluído para eliminar os micro-organismos a partir da entrada nos

tecidos, criando antígenos necessários para produzir uma resposta imune adaptativa (32).

A ausência de leucócitos no âmnion permite a prática de halo-transplante por não induzir rejeição. A matriz estromal da membrana amniótica possui vários inibidores de protease, podendo debelar células inflamatórias levando-as ao rápido processo de apoptose (6, 21).

Outros estudos demonstraram as propriedades antimicrobianas da MA e do líquido amniótico no processo de cicatrização. O efeito antimicrobiano do âmnion e do córion tem sido demonstrado contra grande número de bactérias, incluído *Streptococos Hemolíticos do grupo A*, *Estáfilococos aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (22).

Desde a década de 1960, há relatos do uso de membrana biológica como material de implante. Outros estudos demonstraram ainda que as membranas biológicas constituem-se em implantes de natureza orgânica, inertes sendo composta quase que exclusivamente por colágeno, apresentando assim baixa antigenicidade (34).

A MA quando preservada é considerada como um tecido inerte com células inviáveis. A habilidade das membranas preservadas influenciarem na reparação da lesão se dá através dos fatores de crescimento e citosinas que podem estar limitados ou inexistentes. Outros estudos utilizando a MA revelaram a presença de vários fatores de crescimento no epitélio da membrana, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator transformador de crescimento (TGF), B1, B2, B3, fator de crescimento de ceratócitos (KGF), fator de crescimento fibroblástico (b-FGF) e fator de crescimento hepatócito (HGF), que atua facilitando a migração celular (22).

Bigbie *et al.* (1991), demonstraram a boa capacidade da MA na supressão do tecido de granulação, além de reduzir a exsudação nas feridas tratadas com essa membrana. De acordo com Solomon *et al.* (2001), a MA suprime a expressão de sinais entre células pró-inflamatórias potentes como as citosinas, IL-1 α e IL-1 β . Outra propriedade única da membrana amniótica é a de não induzir a rejeição imunológica após o transplante pelo fato de não

expressar os antígenos de histocompatibilidade HLA-A, B ou DR, tornando-a excelente opção para enxerto (5, 35-37).

Hao *et.al.* (2000), demonstraram a ação antiangiogênica da membrana amniótica através da expressão de trombospondina-1, um potente antiangiogênico químico, em todas as células epiteliais e em 20% das células mesênquimais do âmnio. Estes mesmos autores identificaram a presença de mRNA para citosinas IL-1RA (receptor antagonista), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) -1,-2, -3, -4 e IL-10, que são potentes inibidores inflamatórios nas células mesenquimais e epiteliais (6, 38).

Quanto à baixa imunogenicidade, sinais clínicos de infecção aguda e rejeição não foram observados quando a membrana amniótica foi transplantada em voluntários (39). A expressão de antígenos MHC classe I ainda é controversa. Embora tenha sido relatado que o HLA-A, B, C e DR foram detectados em cultura de células do epitélio amniótico, a detecção de antígenos classe I, em quase todas as células da membrana amniótica tem sido relatada desde então. Além disso, a partir da observação de que células amnióticas desapareceram sem sinal de reação ou de rejeição, autores especulam que a curta existência destas células na superfície ocular pode está relacionada ao processo de apoptose (39, 40).

Azurra-Blanco (1999) e Dua *et al.*,(2004) descrevem que a membrana amniótica deve ser coletada por cesariana de doadora saudável, sem sinais de qualquer tipo de infecção. E o seu processamento deve ser realizado em condições estéreis (22, 41).

3.5.1. PROPRIEDADES MECÂNICAS DA MA

A MA possui grande resistência mecânica, o que a torna um atraente biomaterial a ser utilizado em cirurgias reconstrutivas. Esta membrana é capaz de suportar a carga de pressão do líquido amniótico e repetitivas cargas menores, como as de contrações de Braxton-Hicks, durante a gestação (42, 43). Na maioria das vezes, a MA é capaz de suportar cargas iguais ou próximas dos níveis fisiológicos logo após o transplante. A fim de assegurar a sua estabilidade.

Além disso, sinais mecânicos podem ser importantes mediadores de diferenciação para algumas células progenitoras, a MA cria um ambiente adequado em todo local do novo tecido transplantado, podendo aumentar a força do enxerto com altos níveis de rigidez para resistir ao estresse induzido durante o crescimento tecidual (44). Outras propriedades biomecânicas da matriz amniótica tais como: O tipo de colágeno, proteoglicanos e elastina presentes determinam importantes propriedades biomecânicas da MA como, elasticidade, rigidez e viscoelasticidade. A falta delas podem promover hiperplasia da camada íntima e oclusão das artérias (45).

Kim *et al.* (2008) realizaram um estudo com biopróteses de pericárdio porcino tratadas com glutaraldeído, etanol e dodecilsulfato de sódio e verificaram que o tratamento com essas três substâncias forneceu um material com maior espessura e resistência à tração.

3.5.2. PREPARAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA MA

Kim e Tseng, em 1995 e 1998 propuseram o método de preparação e preservação da MA que consiste na coleta da placenta por cesariana, em ambiente livre de contaminação, removendo os coágulos sanguíneos por meio de lavagem com solução salina, separando o âmnio do córion

manualmente e inserindo-a em papel de nitrocelulose com a superfície epitelial voltada para cima. A preservação da membrana segue, na maioria das publicações, o protocolo em que a membrana é preparada com antibióticos e antifúngicos e mantida em meio contendo antibióticos e glicerol a - 80° C (26, 46).

Há relatos na literatura sobre outros métodos de preservação e estocagem da MA, entre eles estão a liofilização, ar seco, o tratamento com glutaraldeído e irradiação gama. Dual *et al.* (2004) e Meja *et al.* em (2002), relataram que a MA pode ser usada preservada ou não preservada. A utilização do Dimetil Sulfóxido (DMSO) tem sido uma alternativa para preservação da MA, substituindo a lavagem com solução salina e antibióticos. Azuara-Blanco *et al* (1999) utilizaram DMSO a 4% e 8% e, em seguida 10%, enquanto Kubo *et al.* (2001) utilizou o mesmo produto à 0,5 M 0,1 M, 1,5 M para a lavagem da membrana. Podendo ser armazenadas em 10%, ou 1,5 M de DMSO a 80° C durante vários meses (22, 47).

Dentre os vários métodos de preservação destaca-se a trealose e recentemente, Nakamura *et al.* (2008), introduziram a sua utilização para estabilizar e preservar proteínas da membrana celular. A trealose é um dissacarídeo não redutor encontrado em altas concentrações em vários organismos sendo capazes de sobreviver a quase completa desidratação (48).

Existem alguns estudos que demonstraram a eficácia da combinação de liofilização e irradiação γ - da MA como técnica de esterilização (21). Contudo, a utilização de um produto químico da família dos peróxidos orgânicos o ácido peracético (PAA) vem sendo normalmente utilizado como agente esterilizante contra inúmeros vírus, bactérias e esporos devido ao seu potencial de alta oxidação e a não geração de resíduos tóxicos. Wilshaw *et al.* (2006), demonstrou que a utilização do PAA para esterilizar pele humana foi efetivo, pois preservou os componentes da matriz extracelular como: colágeno tipo IV, tipo V, fibronectina, elastina, laminina e glicosaminoglicanos. Além disso, não houve redução significativa na tensão, resistência e elasticidade após o tratamento da membrana amniótica com

ácido peracético. O tratamento da membrana amniótica com PAA foi relatado com sucesso na prática clínica, pois as membranas amnióticas tratadas apresentaram uma taxa de proliferação celular similares morfológicamente se comparadas com as membranas não esterilizadas com o PAA (49).

Souza *et al.* (2004), relata a contaminação de membranas amnióticas após parto cesárea e a contaminação do líquido amniótico tem sido descrita de 13 a 23% de pacientes com membranas intactas. Os mesmos autores sugeriram cuidados assépticos, antes do manuseio da membrana antes da sua utilização. Dual *et al.* (2004) afirmam que existe risco de infecção e que devem ser realizados procedimentos de anti-sepsia não apenas na preparação e estocagem, mas sim durante o seu uso clínico (22, 50).

O uso da membrana amniótica associada à bioengenharia tecidual será uma poderosa ferramenta para a reparação, proteção e reconstrução de vários órgãos e tecidos (43, 51).

3.5.3 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A constituição básica da MEC é de proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, e de glicoproteínas alongadas como a fibronectina e laminina que têm a função de proporcionar adesão célula-matriz, além de glicosaminoglicanas e proteoglicanas que formam um leito constituído por um gel onde se encontram imersos todos os constituintes da matriz (3, 52).

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrada em quase todo corpo humano, tendo como principal característica a formação de fibras insolúveis com alta força elástica. Os colágenos representam uma família de proteínas características com mais de 20 tipos conhecidos, presente em todos os animais multicelulares, sendo o componente de maior quantidade em todas as matrizes extracelulares. Essa família de colágenos ganhou importância e a sua aplicação na engenharia de tecidos devido a sua grande capacidade de formar novos tecidos tem sido bem estudada (28, 34). A elastina é outra proteína da MEC formada a partir de cadeias polipeptídicas frouxas e relativamente poucas estruturas, que são ligadas entre si covalentemente de modo a formar uma rede elástica (17, 20, 53).

A laminina é uma proteína associada à membrana basal que funciona como adesina, ligando as células basais do epitélio ao colágeno IV. Tem sido relacionada diretamente a estágios avançados de diferenciação celular, sendo pré-requisito para diferenciação terminal e execução de funções especializadas, por interagir com as integrinas e outros componentes da superfície celular assim como controlar a migração celular, polarização, proliferação e apoptose (17).

A fibronectina é considerada uma glicoproteína grande com, aproximadamente, 440 mil daltos que consiste de duas cadeias semelhantes dissulfeto ligado ao terminal carboxila. Elas são articuladas em numerosos domínios, através dos quais se ligam receptores da superfície

celular no colágeno, na fibrina e em diferentes proteoglicanos. Com isso possuem a propriedade de “cola molecular” (17).

A matriz extracelular derivada da matriz amniótica possui potencial para ser usada como armação para o desenvolvimento de biomateriais na engenharia tissular, pois apresenta matriz extracelular rica em colágeno e membrana basal, potencial de enxerto para futuras aplicações reconstrutivas dos mais diversos tratamentos cirúrgicos. Os tecidos descelularizados derivados de órgãos têm sido utilizados com sucesso em ambos os estudos pré-clínicos em animais e em humanos na aplicação clínica (1, 54, 55).

A MEC é constituída de uma mistura complexa de proteínas estruturais e funcionais e a remoção de células de um órgão ou tecido é um processo que exige o conhecimento sobre a origem e a espécie deste tecido. Os métodos de descelularização físicos, químicos e enzimáticos e de esterilização variam amplamente dependendo do material biológico. Cada uma dessas variáveis afeta a composição e a ultra-estrutura da MEC e, por conseguinte, afeta a resposta do tecido hospedeiro para a matriz (53).

Vários estudos dentro da engenharia de tecidos ocorreram com o objetivo de desenvolver um protocolo de descelularização eficiente para remover todo o material celular e nuclear minimizando qualquer efeito adverso sobre a composição, a atividade biológica e a integridade mecânica da MA. No entanto, os componentes da MEC são geralmente conservados entre as espécies e é bem tolerada mesmo por destinatários xenogênicos (21, 49).

Qualquer etapa de processamento que se destina a remover as células irá alterar a arquitetura da MEC. Os métodos mais comumente utilizados para descelularização de tecidos envolvem uma combinação de tratamentos físicos e químicos (56). Os tratamentos físicos podem incluir agitação, ou sonicação, massagem mecânica ou pressão, congelamento e descongelamento, pressão direta, tem sido utilizado freqüentemente para descelularização de tecido tendinoso e ligamentar (57). Estes métodos físicos rompem a membrana celular e ocorre a liberação de conteúdo celular para facilitar a posterior lavagem e remoção do conteúdo da célula da MEC.

Estes tratamentos físicos são geralmente insuficientes para atingir a descclularização completa e devem ser combinados com um tratamento químico.

Os tratamentos alcalino e ácido são usados em protocolos de descclularização para solubilizar o componente citoplasmático das células, bem como eliminar os ácidos nucléicos como o DNA e RNA. Por exemplo, os ácidos acético e peracético (PAA), ácido clorídrico, ácido sulfúrico e o hidróxido de amônio (NH₄OH) pode efetivamente romper membranas celulares e organelas intracelulares. No entanto, estas substâncias químicas também podem dissociar moléculas importantes, como glicosaminoglicanos (GAGs) e colágenos (58, 59).

Gamba *et al.* (2002), observaram que o tratamento enzimático, como a tripsina, e os tratamentos químicos, como detergentes e soluções iônicas, rompem as membranas celulares e as ligações responsáveis por conexões intercelulares e extracelulares (60). A MEC deve ser adequadamente rompida durante o processo de descclularização para permitir a adequada exposição de todas as células aos agentes químicos e para fornecer a remoção do material genético do tecido (11).

Um estudo realizado por Teebken *et al.* (2000) relata que a tripsina é uma das enzimas proteolíticas mais comumente utilizadas em protocolos de descclularização. A tripsina é uma enzima altamente específica que cliva as ligações peptídicas no lado da carboxila de arginina e lisina. A máxima atividade enzimática da tripsina ocorre a 37 °C e a um pH de 8,0 sendo efetiva para remover os componentes celulares, lipídeos, antígenos e para alguns glicosaminoglicanos solúveis quando utilizaram em aortas porcinas (11).

A eficácia de tratamentos enzimáticos para a remoção ou separação do material genético da MEC tem sido estudada em vários tecidos. Alguns estudos mostram a eficiente remoção do material genético em válvula pulmonar de suínos após o tratamento com 0,05% de tripsina associada com 0.02% EDTA em agitação por 24 horas (61).

A intenção da maioria dos processos descelularização é minimizar as alterações e, portanto, manter as propriedades mecânicas e biológicas da membrana (62). Ketchedjan *et al.* (2005), estudaram as proteínas de membrana e relataram que os tratamentos com detergentes não-iônicos têm sido amplamente utilizados em protocolos de descelularização devido aos seus efeitos relativamente suaves sobre a estrutura do tecido.

Os detergentes não-iônicos alteram a camada lipídica e as interações entre proteínas, deixando as interações proteína-proteína intactas. O Triton X-100 não é o detergente iônico mais estudado para os protocolos de descelularização. No entanto os tecidos que utilizaram Triton X-100 tem mostrado resultados mistos. Quando Triton X-100 foi usado para descelularizar válvulas do coração, a remoção completa de material nuclear foi observada com a manutenção da estrutura valvar após 24 h (63).

Outros estudos mostraram que Triton X-100 não foi eficiente na remoção completa do material genético de vasos sanguíneos, tendões, ligamentos após a exposição por até 4 dias. O material nuclear foi observado pela coloração histológica em todos os tecidos e por imuno-histoquímica onde se observou a presença da proteína vimentina do citoesqueeto no ligamento (64).

Estudos também demonstram que os detergentes iônicos são eficazes para solubilizar tanto o material citoplasmático quanto nuclear e membranas celulares, mas tendem a desnaturar proteínas interrompendo interações proteína-proteína (62). Os detergentes iônicos mais utilizados são o dodecil sulfato de sódio (SDS), o desoxicolato de sódio e o Triton X-200. O SDS é muito eficaz para a remoção de componentes celulares do tecido quando comparado com outros detergentes, pois promove a remoção do SDS é eficiente na remoção completa de restos nucleares e de proteínas citoplasmáticas, tais como vimentina. Este tende a provocar uma diminuição na concentração de (GAGs) e uma perda da integridade do colágeno (55, 63).

Hudson *et al* (2004), descrevem que o desoxicolato de sódio (SD) também é muito eficaz para a remoção de restos celulares, mas tende a

provocar uma maior ruptura na arquitetura estrutural do tecido quando comparado a SDS. Não há relatos de descelularização de tecido usando desoxicolato de sódio sozinho, por isso, é difícil dizer seus efeitos sobre a matriz. O uso do desoxicolato de sódio combinado com vários detergentes anfóteros para descelularizar tecido nervoso, no entanto, verificou-se que só uma combinação de Triton X-200 com os detergentes anfóteros resultou um nervo completamente descelularizado (13).

Segundo Dahl *et al.* (2003), os detergentes anfóteros reúnem a propriedades dos detergentes não-iônicos e iônicos. Detergentes anfóteros têm uma maior tendência para desnaturar proteínas do que detergentes não-iônicos. Exemplos de detergentes anfóteros incluem 3 - 3-dimethylammonio Cholamidopropyl-1-propanesulfonate (CHAPS) que tem sido estudado para descelularização de vasos sanguíneos (65).

Além dos processos clássicos, Woods e Gratzer (2005) descrevem que o choque osmótico com solução hipotônica ou hipertônica, como a água deionizada ou solução de baixa força iônica, é usado para lisar as células. Um estudo utilizou como tratamento uma solução hipotônica (10 mM Trizma HCL, 5 mM EDTA) por 11 h, seguido por um tratamento de 11 h em uma solução hipertônica (50 mM Trizma HCL, 1M NaCl, 10 mM EDTA) para causar a lise celular mas, geralmente este tipo de tratamento não remove os restos celulares e restos de DNA do tecido devido à sua "natureza pegajosa" e sua tendência a aderir a proteínas da matriz extracelular (16).

A utilização de agentes quelantes, como EDTA e EGTA, formam um anel em torno de um complexo molecular que se liga firmemente e isola um íon metálico central. Demonstrou-se que cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , são necessários para a montagem de fibras de colágeno e fibronectina. Ao ligar-se a cátions divalentes que estão presentes nas adesões celulares, esses agentes podem facilitar a remoção do material celular do tecido sendo que EDTA é normalmente usado em combinação com a tripsina em tratamentos enzimáticos (49).

Grauss *et al.* (2005), descreveram que a eficiência de um dado método descelularização depende do tecido de interesse. Quando os tecidos

são expostos a tempos idênticos à tripsina em concentrações de 0,5% e 0,05%, verificou-se que o protocolo utilizando a tripsina foi ineficaz para remover o material genético da valva aórtica e coração de ratos, por outro lado houve a completa remoção de células de válvula pulmonar porcina (61). A literatura descreve que a eficácia da descelularização e as alterações na MEC são dependente da origem do tecido bem como a sua composição, densidade e outros fatores. Portanto é necessário aperfeiçoar o protocolo de descelularização para se obter uma remoção celular aceitável (66).

3.5.4. USO TERAPÊUTICO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Davis em 1910 utilizou a MA como material cirúrgico no transplante de pele e, três anos depois, Sabella descreveu seu uso a fresco para tratamento de queimaduras e ulcerações de pele em pacientes humanos. (23) De Roth (1940), descreve o transplante da MA para correção em defeitos de simbléfaros e conjuntivais (24). Sorby e Symons (1946) descreveram seu uso no tratamento de queimadura química aguda. Desde então o seu emprego tem se estendido a outras áreas da medicina como na criação de curativos cirúrgicos, bem como a reconstrução da cavidade oral, bexiga, timpanoplastia; artroplastia, onfalocela e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdômen, pélvis, vagina e laringe (25, 26). Estes mesmos autores reintroduziram o uso da MA na cirurgia oftalmológica em modelo experimental e descreveram a sua capacidade da membrana em reforçar a cicatrização e epitelização de feridas, notando-se um aumento do uso da (MA) como um biomaterial em cirurgias nas últimas décadas.

Em 1954, Douglas descreveu a utilização da membrana em queimaduras temporárias e, desde então vem sendo relatado na literatura o seu uso como curativo temporário para o tratamento de queimaduras com resultados bem satisfatórios. Percebeu-se que as MA reduzem a dor e a taxa de infecção no local das lesões (67). Quando aplicada em áreas cruentas, a MA atua como matriz reparadora, regenerando e promovendo a

reepitelização, reduzindo a dor, aderindo bem à ferida, produzindo efeito anti-inflamatório e antiangiogênico além de formar uma barreira protetora conferida ao seu poder antimicrobiano. Seu baixo custo, por ser um material de descarte, a torna vantajosa pela disponibilidade de doação e facilidade de aceitação pelas gestantes (38, 39). Estudos realizados por Gajiwala *et al.*(2003), relatam que as membranas amnióticas utilizadas em feridas profundas deve ser trocadas várias vezes para evitar o acúmulo de secreções purulentas, sendo a transparência do material ideal para o controle da infecção (68).

Sua propriedade de redução da dor deve-se ao seu excelente efeito protetor das terminações nervosas, prevenindo a invasão bacteriana, reduzindo a inflamação local devido à redução do número de trocas de curativo e mantendo a hidratação da pele (33, 69).

Ravishanker *et al.*(2003), descreve que o uso da MA quando comparado com curativos convencionais, proporcionava em pacientes um significativo alívio da dor logo após aplicação da membrana no local lesado (69).

A MA pode ser aplicada em áreas irregulares como as mãos, face e outras regiões do corpo devido à sua capacidade de aderência quando deixada sobre a lesão. Forma-se uma cobertura seca que gradualmente se destaca quando o novo epitélio forma abaixo (68, 70).

As células amnióticas produzem vários fatores de crescimento, epidérmico; transformador; semelhantes ao da insulina; hepatócito; neural e vascular endotelial, conferindo a capacidade de agir como uma matriz de regeneração epitelial (22). Todas estas citocinas têm sido apontadas como mecanismos de influência positiva sobre o crescimento das células epiteliais (6).

Quinby *et al.* (1982), utilizou a MA em um estudo que comparava quatro grupos em situações distintas: (1) em curativos sobre áreas de doadoras de enxertos autólogos; (2) em queimaduras de segundo grau; (3) no preparo do leito receptor para posterior enxertia autóloga; (4) em feridas contaminadas. Com 95% de sucesso houve a integração da membrana com

processo de reepitelização e com acentuada redução da dor. Observaram também que nas feridas contaminadas houve uma redução da contagem bacteriana (71).

Outros estudos relatam a presença de infiltrado inflamatório nos transplantes alógenos conflitando com os achados de Douglas *et.al* com relação a antigenicidade, sugerindo que o córion seja uma estrutura antigênica que estimula a rejeição ao curativo. Entretanto, quando a aplicação incide com a face epitelial voltada à ferida, a invasão vascular deixa de ocorrer, o que sugere pouca antigenicidade da MA isolada (67).

Recentemente, descobriu-se que o âmnio pode servir como suporte para o cultivo de células humanas (72). Os primeiros cultivos foram utilizados no campo da oftalmologia, sendo descrito em 1999 por Schwab que utilizou células límbicas cultivadas sobre diferentes carreadores de células para aplicação em pacientes com lesão da córnea (73).

Seguindo os experimentos de Schwab (1999), outros pesquisadores obtiveram sucesso ao realizar cultivo de células límbicas sobre membranas frescas criopreservadas e liofilizadas na formação de epitélio (73, 74).

Em 2006, Ahn *et al.* descreveram o cultivo de células de queratinócitos bucais sobre membranas na reconstituição de mucosa oral em coelhos (75). Yang *et al.* (2006), propuseram a criação de um novo substituto dermoepidérmico no qual os queratinócitos eram cultivados sobre as membranas criopreservadas desnudadas de seu epitélio e, por sua vez, eram postas sobre matrizes de colágeno povoadas por fibroblastos e por isso, mais resistente aos traumas (76).

Wilshaw *et al.* em (2008), fizeram uso do PAA para esterilizar e demonstraram que a membrana amniótica era biocompatível com adesão e proliferação de queratinócitos e fibroblastos humanos (77).

Em 2009, Yang *et al.* relataram que a MA criopreservada servia como suporte para o cultivo celular tanto de queratinócitos como de fibroblastos sem a presença de matrizes colágenas e observaram que, quando a porção estromal do âmnio era cultivada com a face para o frasco, os fibroblastos

humanos migravam para o âmnio e três dias depois formavam um tipo equivalente cutâneo (78).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi realizado no laboratório do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP), aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do hospital pequeno príncipe sob protocolo N° 427652 com parecer nº 0948-11. (ANEXO 1)

Para a realização dos testes “*in vivo*”, delineou-se um estudo experimental com 30 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus. Rodentia mammalia*) aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA PUC PR- N° 596). (ANEXO 2)

As membranas amnióticas (MA) foram cedidas pelas gestantes do Hospital Victor Ferreira do Amaral, após o termo de livre esclarecimento concedido.

O processo esta em anexo no fluxograma. (FIGURA 2)

Declara-se a inexistência de qualquer tipo de conflito de interesses.

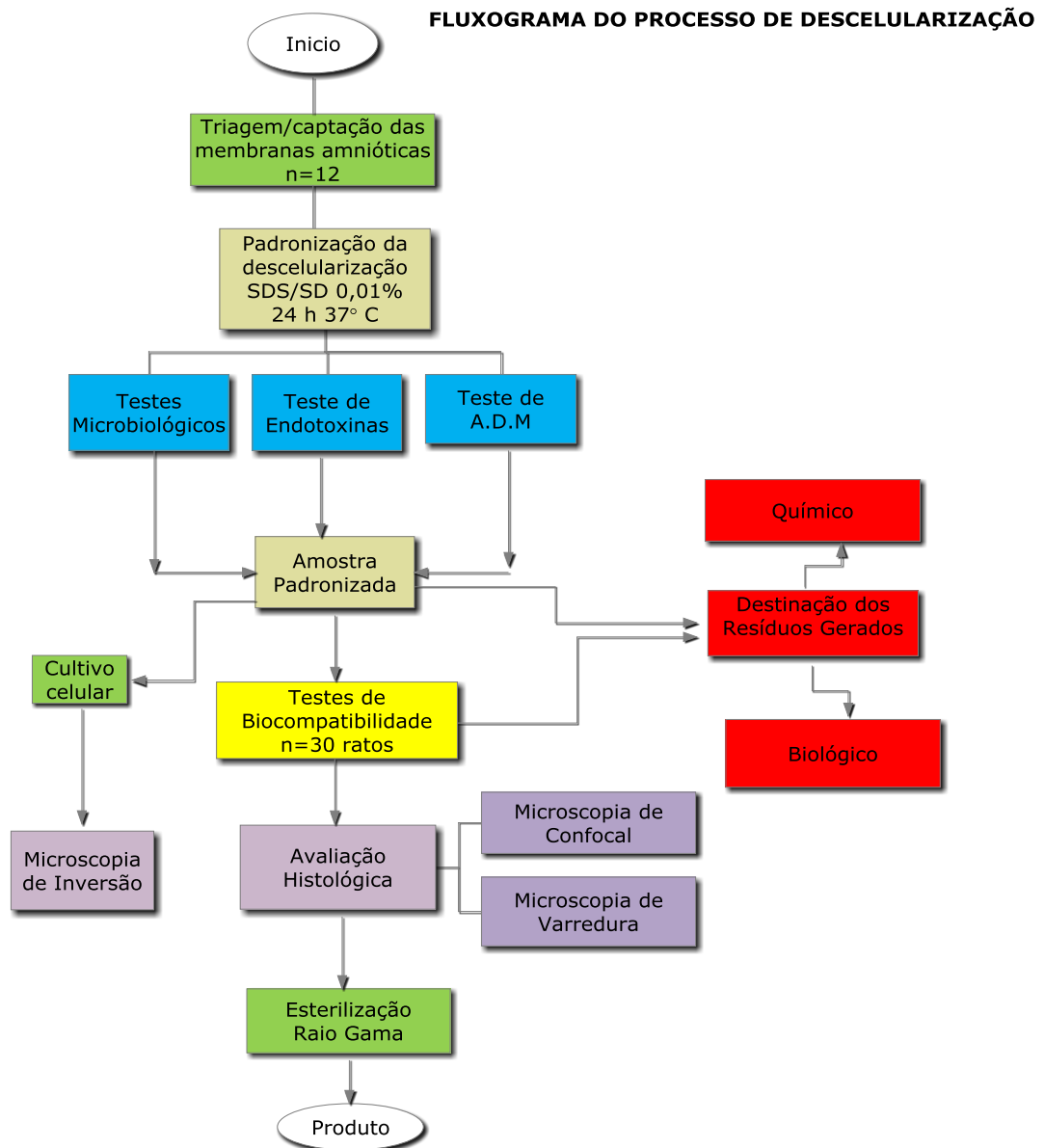


FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA ATÉ OBTENÇÃO DO PRODUTO

4.1. TRIAGEM DAS DOADORAS

A membrana amniótica foi obtida de placentas cedidas por gestantes jovens da Maternidade Victor Ferreira do Amaral (Curitiba, PR) com idade de 20 a 30 anos, após a assinatura do termo de livre esclarecimento. Sem antecedentes medico-sociais sem história de intercorrências clínicas e com exames sorológicos negativos para HIV, Vírus da hepatite B e C e sífilis.

4.2. PROCESSAMENTO DAS MEMBRANAS AMNIÓTICAS

As membranas foram coletadas de forma estéril, imediatamente após a dequitação placentária, ainda em ambiente cirúrgico. Com manobra digitiforme utilizado-se de tesoura e pinça estéreis, o âmnio foi separado do córion e, em seguida, foi estendido sobre um filtro de nitrocelulose estéril¹ com a face epitelial para cima. (FIGURA 3) Transportou-se o material para o laboratório do IPPPP onde todo o manuseio ocorreu dentro da proteção do fluxo laminar. Removidos os resíduos remanescentes de sangue e córion, as membranas foram acondicionadas em solução tampão fosfato contendo solução de dióxido de cloro (ClO₂) estabilizado em solução aquosa (8%) 80.000 ppm diluídos na concentração de 100 ppm, e mantidas sob agitação em temperatura de 25° C por 20 minutos. Transcorrido este intervalo, efetuou-se a troca da solução por outra de solução tampão PBS 7,2. Posteriormente, as membranas foram colocadas em papel filtro, com a porção epitelial voltada para cima e recortadas em fragmentos de aproximadamente 10x10 cm, seguido de coleta de amostras para análises em meio Mackonkey e meio Agar sangue, por 7 dias a 37⁰C, em condições de aerobiose e anaerobiose, para exames microbiológicos, (ANEXO 4)

¹ Millipore, Bedford, MA, EU)

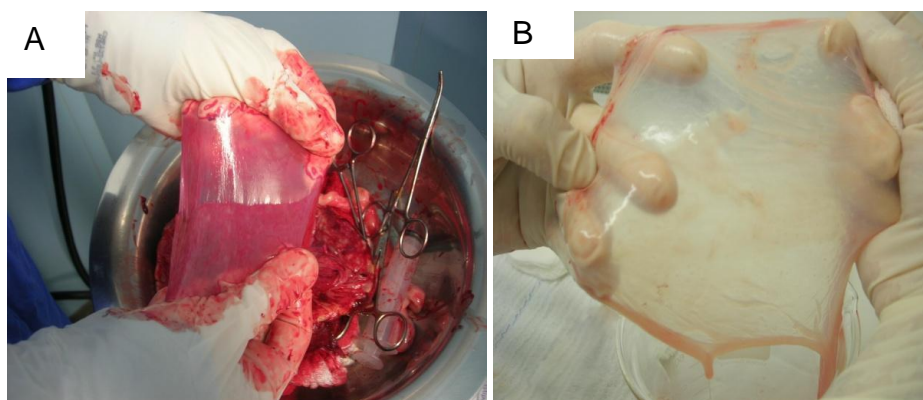


FIGURA 3. MANOBRA DIGITIFORME DE SEPARAÇÃO DO ÂMNIO DO CÓRION. (A), LAVAGEM DO MATERIAL PARA RETIRADA DE RESÍDUOS DE SANGUE E CÓRION. (B)

4.2.1. PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Os testes de descелularização foram realizados em uma cabina de segurança biológica classe II BioSAFE² (Veco®) e com técnica asséptica. Os fragmentos de membrana foram retiradas do meio (PBS)³ tampão fosfato pH 7.2 e tratados com solução de SDS (dodecil sulfato de sódio), a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio), a 0,01% por 24 horas a 37° C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109M)⁴. Em seguida foram conservadas em PBS a 4 °C.

A efetividade do processo de descелularização foi comprovada por amostragem em análise histológica com coloração HE e microscopia eletrônica de varredura. (MEV) (FIGURA 4)

i

² Veco® - Campinas – SP - Brasil

³ Gibco, Gaithersburg, MD

⁴ Nova Ética Ltda

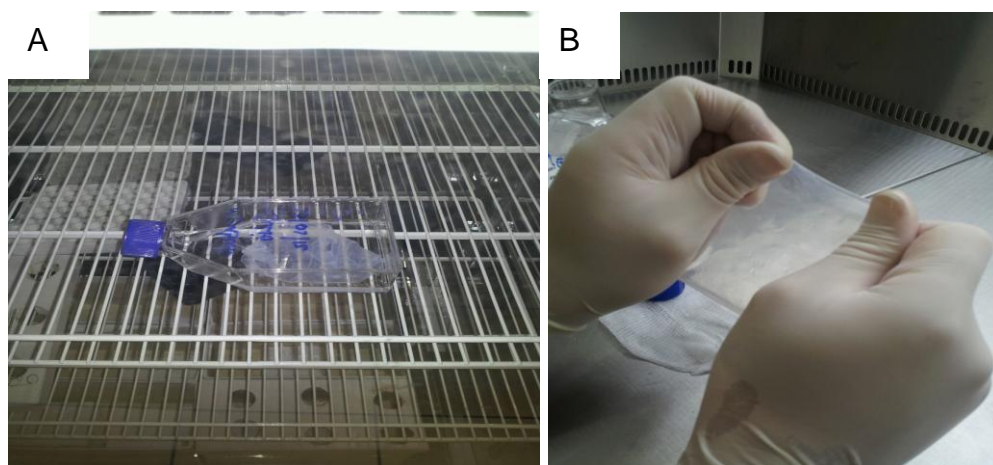


FIGURA 4. A E B: PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO SOB AGITAÇÃO (A), MEMBRANA DESCELULARIZADA (B) EXPOSIÇÃO PÓS DESCELULARIZAÇÃO.

4.3. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS MEMBRANAS AMNIÓTICAS

Em um total de 12 amostras, dois fragmentos aleatórios de cada membrana foram tratados com antimicrobianos contendo 1000 U/ml de penicilina, 20 µg/ml de estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B e outro com dióxido de cloro estabilizado a 100 ppm. Posteriormente estes fragmentos foram cultivados em 2 ml no caldo infusão de cérebro e coração de bezerro (BHI) e 4 ml de tioglicolato, em diferentes tempos.

Após a colocação em meio de cultivo líquido, as amostras foram incubadas em estufa a 37°C por até sete dias ou até crescimento de micro-organismo fosse observado.

4.3.1 AVALIAÇÃO DE ENDOTOXINAS

Para avaliação de endotoxinas testou-se a MA com reagente LAL (Endosafe, 0,125 UE/mL) e endotoxina padrão de controle (CSE Endosafe). As amostras e controles foram diluídos em água reagente para LAL. Uma porção de 0,1 mL das soluções contendo endotoxina bacteriana foram

misturadas com 0,1 mL de LAL em tubos apirogênicos (10 mm x 75 mm) e incubados a 37 ± 1 °C por 60 ± 2 minutos em banho-maria (Unique modelo: USC2800A). Todos os testes seguiram as recomendações da Farmacopéia Brasileira (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. United States Pharmacopeia, USP 33 – NF 28, 2010. FDA – Food and Drug Administration. Guideline for Validation of the LAL Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices, 1987 (79, 80).

4.4. CARACTERIZAÇÃO

O material obtido foi caracterizado após descclularização por análise histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície e da seção transversal, microscopia de confocal, avaliação da biocompatibilidade “*in vitro*”, análise dinâmico-mecânica (ADM).

4.4.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

Amostras de MA intacta e descclularizada foram inclusas em parafina, cortadas e preparadas em lâminas de microscopia. Posteriormente, foram desparafinizadas em xilol e lavadas em concentrações decrescentes de etanol. Para a exposição dos sítios imunogênicos, realizou-se o tratamento enzimático das amostras com tripsina EDTA (10.000/ unidades de tecido seco-UTD)⁵, em tampão ácido tris de HCL (pH = 2.2) (2 mg/mL) por 30 min a 37°C. Em seguida, foram lavadas por três vezes com solução salina fosfato tamponado (PBS)⁶ e incubadas com BSA a 1% em PBS pH=7,0. As lâminas foram incubadas por uma noite, a 4 °C com antilaminina humana em

⁵ Sigma Chemical Co, St Louis

⁶ Dako A/S Copenhagen, DK

concentração inicial de 1: 20, obtido de camundongo, diluídos em PBS nas concentrações de 1:125.

Na sequência, as lâminas foram lavadas com PBS contendo saponina a 0,01% por três vezes e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugados com streptavidina isoticianato (FITC)⁷ com concentração inicial de 1:20, diluídos 1: 50, lavadas cinco vezes em PBS com saponina a 0,01% e posicionadas as lamínulas com solução de glicerina tamponada. A reação foi avaliada em microscópio de fluorescência Olympus BX2, 400X. Para análise tridimensional por microscopia confocal, as amostras foram incubadas os anticorpos primários biotinizados. Como segundo passo, usou-se estreptavidina conjugada ao fluorocromo (FITC). A estreptavidina apresenta afinidade pela biotina presente nos anticorpos primários, funcionando como um revelador. O núcleo das células foi corado com DAPI (4,6 – diamidino – 2 – fenilindole, dihidroxicloride) na concentração de 300 nM. A reação foi observada em microscópio a Confocal Radiance 2001 (Bio-Rad) acoplado a uma câmera Eclipse E800⁸. A ficoeritrina foi excitada pelo laser de íon argônio a 488 nm e o DAPI pelo laser *blue diode* a 350 nm em aumento de 400X.

4.4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar a superfície das membranas antes e depois da descellularização, as amostras foram lavadas rapidamente em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4 a 4°C para remoção das possíveis impurezas. Após, foram fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4,0%, CaCl₂ 1mM em tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 1 hora, lavadas 3 vezes em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M com pH 7,4. A seguir foram desidratadas em

⁷ Becton Dickinson, USA

⁸ Nikon, Japão

concentrações crescentes de etanol⁹ (30%, 50%, 70%, 90% duas vezes, 100%), por um período de 10 minutos em cada concentração.

As amostras foram fixadas em porta-amostras de alumínio com fita adesiva de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro (20 nm) em um metalizador Balsers modelo SDC 050¹⁰, sendo, posteriormente, analisadas no microscópio eletrônico de varredura¹¹ Jeol JSM – 6360LV, (FIGURA 5 A e B)

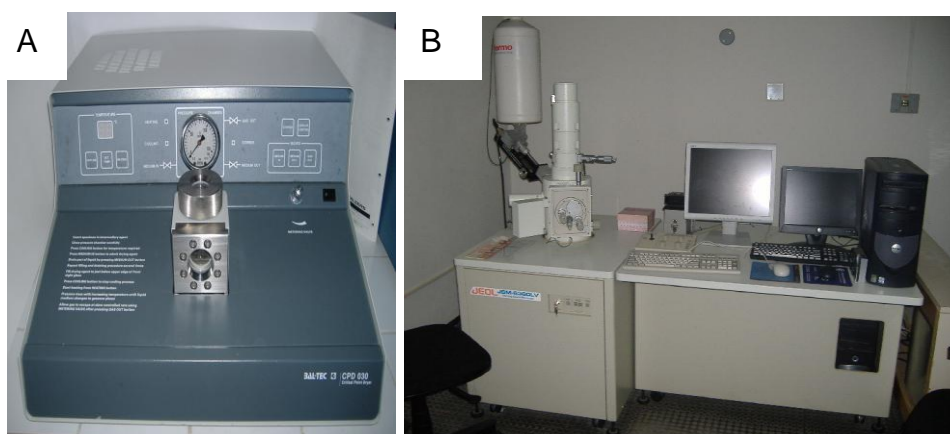


FIGURA 5 A - METALIZADOR BALSERS e B. MICROSCÓPIO DE VARREDURA

4.4.3. ESTUDO ANÁTOMOPATOLÓGICO DA MA

Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar a presença de células e a distribuição das fibras de colágeno nas membranas antes e depois da descclularização, por meio da coloração com hematoxilina: eosina HE.

Os fragmentos de membrana foram conservados em frascos contendo formol 10% durante 24 horas. Após este período, foram cortados em 4 partes iguais transversais no micrótomo¹² Leica modelo RM 2145 com

⁹ Merck & Co., Inc.

¹⁰ Balzers Union/ Baltec, Alemanha

¹¹ Jeol JSM, Japão

¹² Leica, Bentein, Alemanha

espessura de 5 μm . Foi realizada desidratação dos cortes, após banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90%, 3 banhos em álcool 100% no autotec¹³ modelo TP1020, durante 1 hora. A amostra foi impregnada com parafina líquida nos cortes através de 3 banhos a 65°C no mesmo aparelho. Os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de HE e Tricrômico de Gomori. De cada fragmento foram realizadas duas lâminas com os quatro cortes e com as colorações citadas.

4.4.4. CORPOS DE PROVA PARA ANÁLISE DINÂMICO MECÂNICA (ADM)

Os corpos de prova para a realização do ensaio de análise dinâmico-mecânica (A.D.M.) tinham o formato de “gravata borboleta” ou *dumb-bell*. Foram confeccionados com base na norma ASTM D 638- 03, seguindo as dimensões ali especificadas.

Para fazer os corpos de prova do material desenvolvido, foi preciso primeiramente desidratar a amostra de membrana amniótica em concentrações diferentes de álcool.

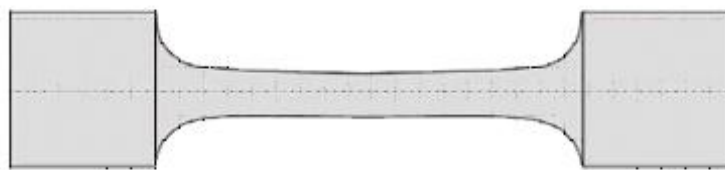


FIGURA 6. CORPO DE PROVA (81)

FONTE: Sinnott, (1989)

4.4.4.1. ANÁLISE DINÂMICO- MECÂNICA (A.D.M)

¹³ Leica, Bentein, Alemanha

Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar o comportamento das membranas quando submetidas a uma solitação dinâmica. O estudo das propriedades dinâmico-mecânicas das membranas é necessário uma vez que elas podem ser submetidas a tensões na forma dinâmica durante a sua aplicação.

As análises foram feitas em um equipamento (Netzsch, modelo 242, seguindo a ASTM D5026-01: Standard Test Method for Plastics: (Dynamic Mechanical Properties: *In Tension*, 2001 Instruments), acoplado a um termo-analisador. As garras utilizadas foram do tipo tension film, com as seguintes dimensões das amostras: 10 mm (comprimento/ largura/ espessura), sendo a frequência de 1 Hz, amplitude de oscilação de 4 μm , pré-carga de 0,15 N, razão de aquecimento de 3°C min em atmosfera estática de ar. As medidas foram feitas com o material desidratado e a faixa de temperatura de trabalho não excedeu 250°C pois as amostras começam a se decompor (82).

Esta análise é uma maneira rápida e simples de avaliar as propriedades mecânicas dos materiais através do tracionamento de um corpo de prova até a sua ruptura. Utilizou-se o equipamento DMA devido ao fato dele ser mais adequado para o ensaio de tração de materiais finos, já que em dispositivos convencionais de testes físicos a tensão aplicada por eles provoca a ruptura do material antes de avaliar seu desempenho tornando, assim, duvidosa a precisão dos resultados (FIGURA 7).

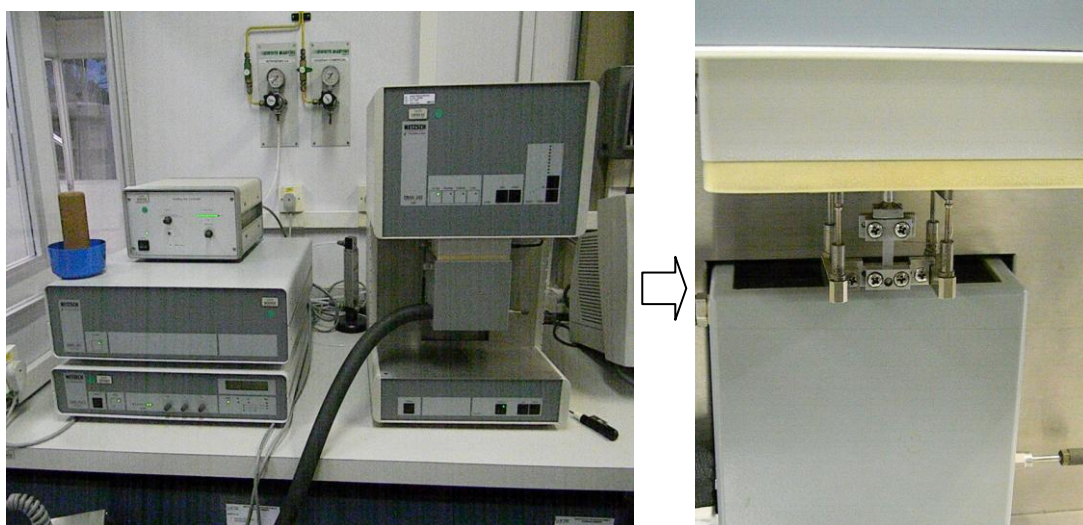


FIGURA 7. ANALISADOR DINÂMICO MECÂNICO MOD. 242 NETZSCH

4.4.5. TESTE DE BIOCAMPATIBILIDADE “IN VIVO”

Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar o comportamento da MA pós transplantada em modelo animal, analisando presença ou ausência de reação inflamatória.

O teste de efeitos locais após a implantação da MA, foi realizado com o implante do biomaterial sobre o miocárdio de ratos wistar e seguida de avaliação dos efeitos no tecido vivo adjacente. A análise considerou a ocorrência de reação celular local em resposta à presença do material e a caracterizando em a) quase inerte, com pouquíssima mobilização celular, b) com a resposta intensa inflamatória crônica, c) com necrose.

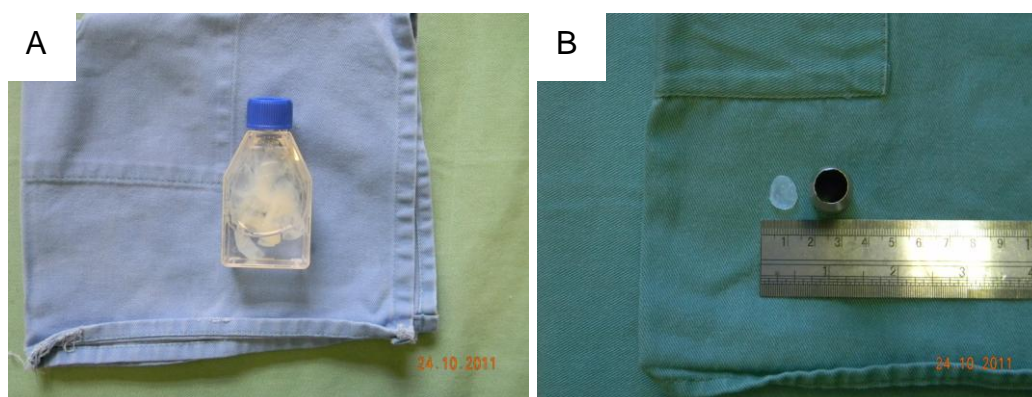
4.4.5.1. MODELO ANIMAL E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Delineou-se um estudo experimental com implantação da membrana amniótica sobre o coração de 30 ratos machos pesando $250,74 \pm 8,25$ gramas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*. *Rodentia mammalia*).

Os ratos foram divididos em três grupos de 10 animais: o primeiro, grupo GATB, onde foi implantada membrana tratada com antibióticos; o segundo, grupo GDIOX, com membrana descontaminada com dióxido de cloro estabilizado e descelularizada; e o terceiro, grupo GN ratos normais.

As cirurgias para implantação das membranas foram realizadas no laboratório de cirurgia experimental no bloco de técnicas operatórias do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Os animais foram anestesiados com uma dose de 0,6 ml de uma solução composta por quetamina (Ketalar®) 50 mg/kg e xilazina (Xylazina®) 10 mg/kg, administrada por via intramuscular de acordo com o manual de utilização de animais\FIOCRUZ 2008 (83). Foi realizada toracotomia lateral esquerda, por onde foi retirado o pericárdio e exposto o miocárdio (FIGURA 8 C e D). Em seguida, implantou-se um segmento de 7 x 7 mm da membrana amniótica obtido por um “*puncth*” e suturado as bordas da membrana no ventrículo esquerdo com fio polipropilene 7.0 (Ethicon®, Inc., Somerville, NJ) (FIGURA 8 B). Após ter sido verificada homeostasia, os arcos costais e a pele foram suturadas com fio mononylon 5.0 (Ethicon®, Inc., Somerville, NJ). Ao término foi realizada uma assepsia com Iodopovidona (PvPi).



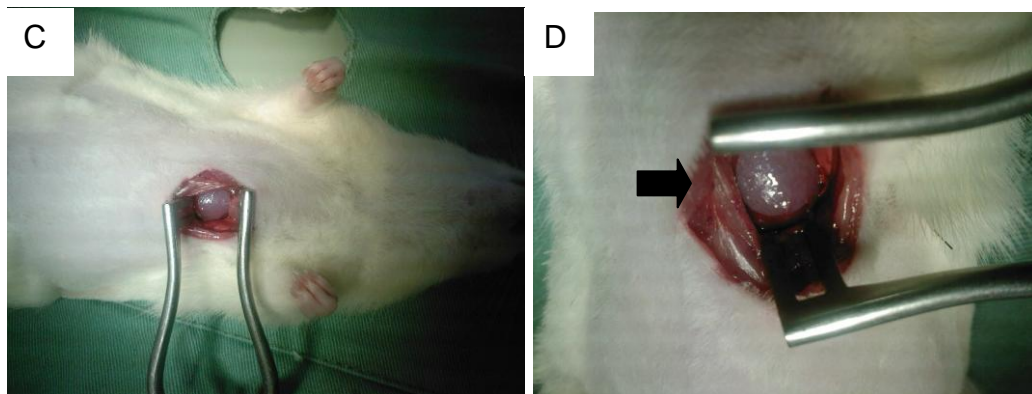


FIGURA 8. A e B (A) MEMBRANA E (B) PUNCH, (C) e (D) EXPOSIÇÃO DO CORAÇÃO PARA O PROCEDIMENTO DE TRANSPLANTE DA MEMBRANA.

Para analgesia foi utilizado anti-inflamatório não esteroidal (AINE), Ibuprofeno Sterile Injectable Solution 20 mg/kg Pfizer Animal Health, com duração de 8 a 12 horas, (Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine – (FDA CVM, 2009). Os animais foram mantidos no Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em gaiolas adequadas com máximo de cinco animais por gaiola, com temperatura ambiente entre 22-23°C, com ciclo luz/escuro natural, sendo alimentados com ração Nuvilab® e água “*ad libitum*”. A higiene das gaiolas foi realizada de acordo com os padrões estabelecidos pelo Biotério da PUCPR. A eutanásia foi realizada após 30 dias do procedimento com a dose letal (DL50) (148 mg/kg) do anestésico quetamina e xilasina (84).

4.4.5.2. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os corações foram preservados em frascos contendo solução de formol 10% durante 24 horas. Após este período os corações foram cortados em 4 partes iguais transversais no micrótomo (Leica modelo RM2145) com espessura de 5µm. Para a desidratação dos cortes foram realizado banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90% e três banhos em álcool 100% no

autotec¹⁴ modelo TP1020, durante uma hora. Logo após, impregnada parafina líquida nos cortes através de três banhos a 65°C no mesmo aparelho. No final os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de HE.

De cada fragmento foram realizadas duas lâminas com os quatro cortes. A análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Anatomopatológica Experimental do CCBS da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

4.4.5.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Fez-se a análise da área transplantada no coração corando-se os cortes histológicos pela técnica de HE e examinou-se em microscopia óptica. Examinaram-se as lâminas com conhecimento da identificação conhecida, em microscópio óptico¹⁵ (Olympus®BX40), aumento de 200 X, acoplado a uma câmera Sony® e a um computador. Utilizou-se um software um programa de análise de imagens digitais *Image Pro-plus®* for Windows. Capturaram-se as imagens das lâminas para o computador, e com auxílio do programa *Image Pro-plus®* mediam-se as áreas selecionadas e de interesse. Com a ferramenta “medidas de distância mediu-se a distância entre o pericárdio visceral até o parietal e o programa automaticamente gerou a medida”. Uma vez que a área total do exame era constante, selecionou-se a estatística do programa que fornecia o percentual da área ocupada pelo objeto do estudo, ou seja, espessamento do pericárdio.

Mediram-se dez campos por cortes histológicos em cada lâmina, na área do espessamento, próximo e longe da área transplantada, obtendo-se então, uma média da leitura daquees cortes.

¹⁴ Leica, Benstein, Germany

¹⁵ Olympus, Japan

4.6. ANÁLISE DA CAPACIDADE DE SERVIR COMO SUPORTE PARA O CULTIVO DE CÉLULAS

Os mioblastos esqueéticos foram isolados a partir de fragmentos do músculo tibial anterior obtido por biópsia com auxílio de sedação, uma mistura 1:1 de uma solução de 50- mg.kg de quetamina com 10 mg.kg de Xilazina, administrada por via intramuscular, em um animal do estudo de biocompatibilidade. Após antissepsia cirúrgica com solução degermante PVPi foi retirado um fragmento de músculo e foi lavado em solução salina a 0,9% para a remoção de resíduos grosseiros de sangue.

A seguir, foi transportado até o laboratório em frasco estéril com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)¹⁶.

A partir desse momento, toda a manipulação foi realizada no IPPPP em cabina de segurança biológica classe II BioSAFE¹⁷ (Veco®), empregando-se técnica asséptica.

Após a transferência para placa de Petri contendo meio de cultura DMEM com 1% de antibiótico: penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml e com auxílio de uma lupa, retiram-se os vasos e os tecidos conjuntivos: aponeuroses, tecidos gordurosos e cutâneos. Os fragmentos são colocados em outra placa de Petri em meio de cultura DMEM a 1% de antibiótico. Seguiu-se a limpeza do músculo, onde obteve-se um macerado a partir de pequenos fragmentos, triturados com o auxílio de uma tesoura. O macerado muscular foi lavado em aproximadamente 15 mL de meio de cultura DMEM, centrifugado a 1000 rpm por 6 minutos, após, o meio foi aspirado, desprezado e realizou-se a pesagem do material (cerca de 01g de músculo).

Para a digestão enzimática do músculo, o botão de células do músculo recuperado foi diluído em 10 ml de Colagenase tipo IA¹⁸, por 1

¹⁶ LGC Biotecnologia, Brasil

¹⁷ Veco®, Brasil,

¹⁸ Sigma Chemical CO, St. Louis

hora a 37 °C em estufa de CO₂, sendo agitado a cada 10 minutos. As células foram centrifugadas a 1.524 g durante 6 minutos. O botão de células do músculo foi recuperado em 10 ml de Tripsina-EDTA a 0,25% por 1 h a 37 °C em estufa de CO₂, por 20 minutos sendo agitado manualmente a cada 10 minutos. Interrompe-se a digestão enzimática com a adição de 10% volume de Soro Bovino Fetal (SBF)¹⁹. Para a filtração e semeadura do material utilizou-se filtros de 100 µm e 40 µm sucessivamente. Após centrifugação a 1829 g por 10 minutos, o botão de células foi recuperado e diluído em 4 ml de meio de cultura DMEM²⁰. Onde realizou-se a contagem das células com auxílio de Câmara de Neubauer (85).

4.6.1. CULTURAS SECUNDÁRIAS DOS MIOBLASTOS SOBRE AS MEMBRANAS DESCELULARIZADAS.

Foi adquirido um fragmento da MA aproximadamente 1,5 X 1,5 cm. Esta membrana foi cortada por um *punch* de 7 mm de diâmetro. Para a realização do cultivo de mioblastos sobre a membrana foi disposto a membrana em poço de cultura e sobre ela foi colocada uma gota de 50 µL (10⁶ cels) de meio DMEM F-12²⁰. Esta gotícula foi deixada por um período de 2 horas em incubadora com objetivo das células aderirem na membrana. Após este período foi acrescentado meio de cultura com soro bovino fetal (SBF), penicilina 100U/mL, estreptomicina 0,1 mg/mL e 10ng/ml de IGF-I (insuline growth factor)²¹ e 10⁻⁵ M de dexametasona¹⁴ na concentração de 0,6 mol a fim de completar o volume no poço. As culturas foram mantidas em incubadora com atmosfera de CO₂ a 5%, à temperatura constante de 37 °C, sendo o meio de cultivo trocado a cada dois dias até o 7º dia de estudo.

¹⁹ Sigma Chemical CO, St. Louis

²⁰ LGC Biotecnologia, Brasil

²¹ Gibcco BRL, Life Technologies, Inc, Rockville, Md)

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos por médias, medianas, valores máximos e mínimos e desvios padrões. Para a comparação das medidas das membranas, obtidas por meio da microscopia, foi utilizado o teste não paramétrico de "Mann Whitney". O mesmo teste foi utilizado na comparação das membranas amnióticas implantadas com o pericárdio parietal normal. Adotou-se o valor de $P < 0,05$ como nível de significância. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados no programa computacional Graphpad prisma v.5.0.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO DA MEMBRANA AMNIÓTICA APÓS DESCELULARIZAÇÃO E DESCONTAMINAÇÃO.

As MA foram submetidas ao processo de descontaminação e estocadas em PBS a 4°C. Em média, apresentavam um tamanho de 5 cm², perfazendo um total de aproximadamente 12 lotes de MA.

Após a reidratação da membrana, a análise em microscopia óptica na coloração em HE demonstrou uma arquitetura estrutural preservada. A monocamada de epitélio colunar estava aderida ao estroma, porém as células mostravam sinais de apoptose com um núcleo celular picnótico. Não foram observados intervalos entre as células epiteliais revelando a preservação das estruturas onde as células estavam aderidas (FIGURAS 9 A e B).

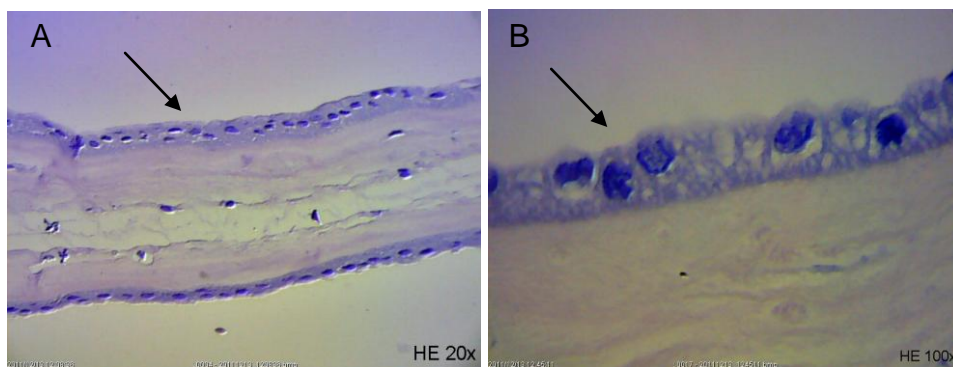


FIGURA. 9. A B MICROSCOPIA ÓPTICA, FIGURAS A e B, REPRESENTA MA ARQUITETURA NORMAL (SETAS) PRESERVADA APÓS CONSERVAÇÃO EM PBS A 4° C, HE 20X E 100 X.

5.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens da MEV demonstraram a presença de um epitélio intacto no grupo controle “In natura” e sua ausência nas membranas amnióticas descontaminadas e descelularizadas pelo SDS a 37°C por 24 horas. (FIGURAS 10 A, B, C e D).

O mesmo pode ser visualizado na microscopia de ópticas: por confocal (FIGURAS 11 e 12 C e D).

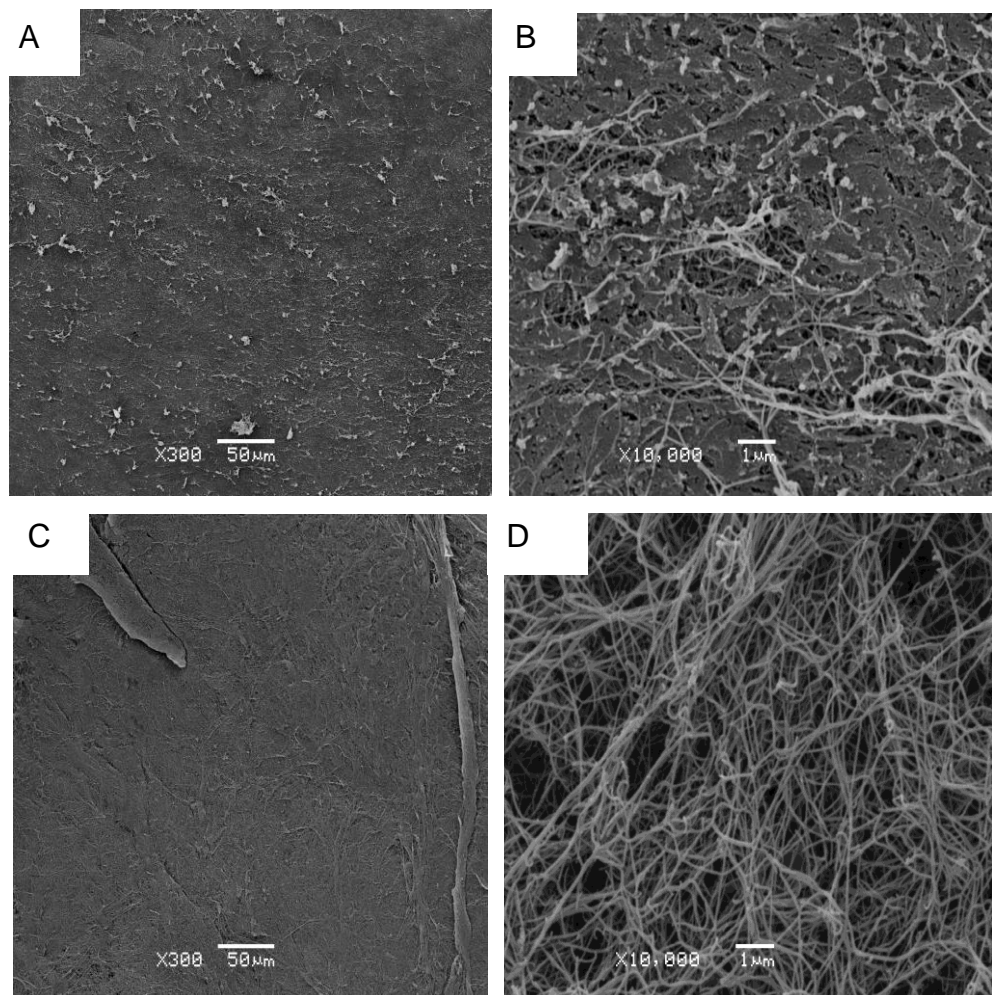


FIGURA. 10. (A e B) REPRESENTAM MA INTACTA (C e D) DESCELULARIZADA. (AUMENTOS DE 300 X e 10.000 X)

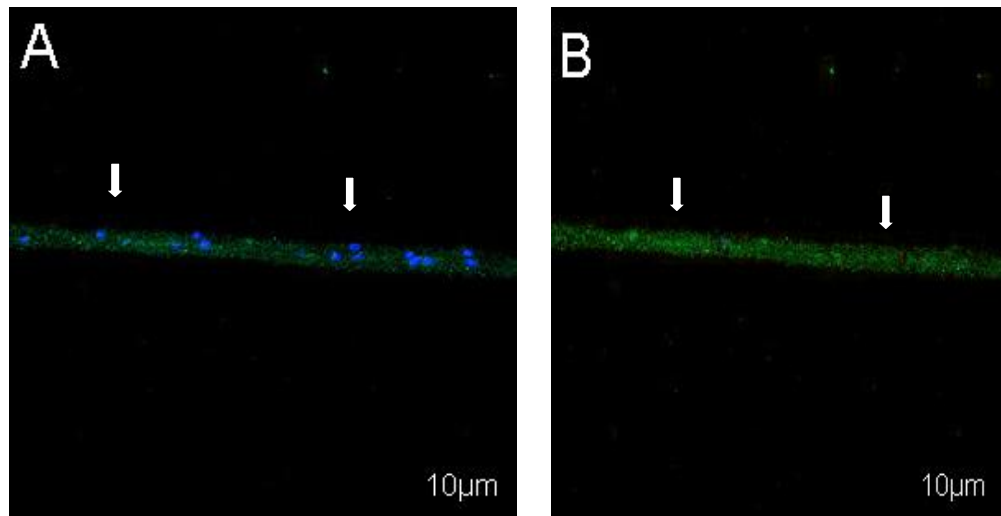


FIGURA. 11. MICROSCOPIA CONFOCAL, (A) REPRESENTA MA INTACTA COM NÚCLEOS CELULARES CORADOS COM DAPI (SETAS) (B) DESCELULARIZADA (SETAS) COLORAÇÃO PARA LAMININA.

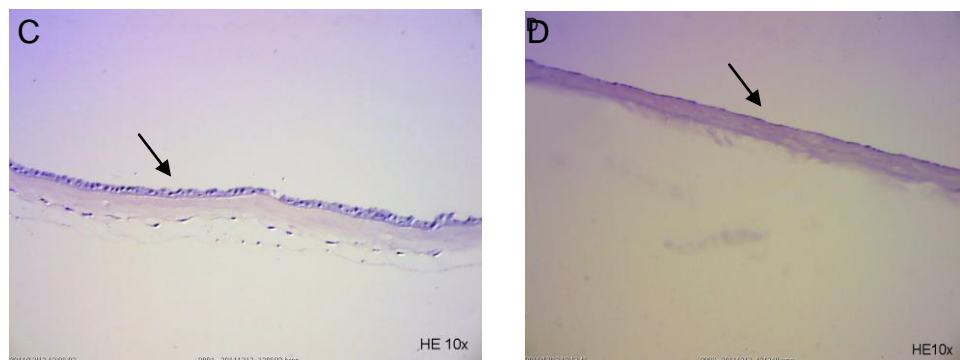


FIGURA. 12. MICROSCOPIA OPTICA, (C) REPRESENTA MA INTACTA. (D) DESCELULARIZADA. NOTA-SE A AUSÊNCIA COMPLETA DE CÉLULAS EPITELIAIS, PORÉM COM DESTRUIÇÃO DA ESTRUTURA COLÁGENA EM ALGUMAS CAMADAS. (COLORAÇÃO HE, AUMENTO 10X).

5.3. DESCONTAMINAÇÃO

Com relação ao processo de descontaminação foram realizados os testes microbiológicos. Após o procedimento, diferentes meios de cultivo (BHI e tioglicolato) foram utilizados para possibilitar a detecção de microorganismos aeróbios e anaeróbios.

A contaminação da MA neste estudo foi superior nas amostras descontaminadas com antibiótico em relação às descontaminadas com dióxido de cloro onde houve crescimento bacteriano em limites aceitáveis. Do total de 12 amostras de MA colhidas 6 apresentaram crescimento bacteriano. A bactéria mais prevalente foi o *Staphylococcus* coagulase negativo, seguido pelo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Enterobacter spp.* *Neisseria spp.*

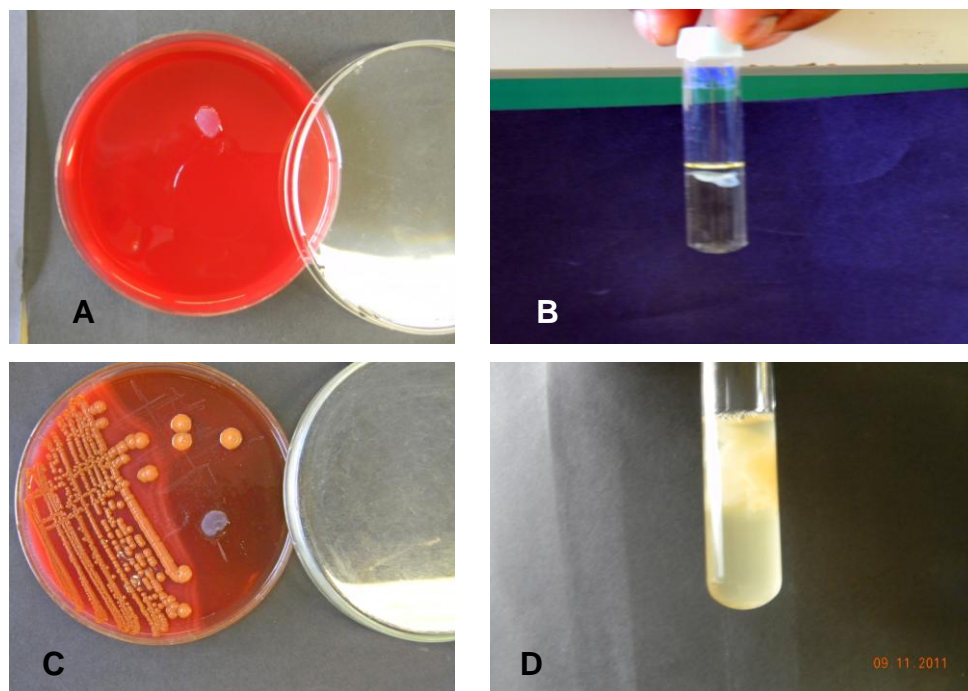


FIGURA 13. (A) APRESENTAM RESULTADOS NEGATIVOS EM AGAR SANGUE (A) E CALDO BHI (B) PARA MA EM DIÓXIDO DE CLORO, (C e D) RESULTADOS POSITIVOS PARA MA DESCONTAMINADA COM ANTIBIÓTICOS.

5.3.1 TESTE DE ENDOTOXINAS

Para evitar interferências devido às condições do teste e reduzir a probabilidade de se detectar níveis de endotoxina clinicamente insignificantes, podem ser feitas diluições do produto. São utilizados limites para se determinar a extensão da diluição (Máxima Diluição Válida - MDV) que pode ser aplicada para evitar um problema de interferência, e cujo resultado de concentração de endotoxina no produto não exceda a concentração limite de endotoxina. De acordo com a metodologia utilizada o limite de endotoxinas bacterianas é de 1,0 UE/mL, baseado nos padrões estabelecidos pela United States Pharmacopeia (USP 33 – NF 28, 2010) que recomenda o limite máximo como não mais que 20 UFC/produto médico estéril. A membrana amniótica descontaminada e descelularizada por dióxido de cloro apresentou resultados satisfatórios estando bem abaixo do que se preconizam na literatura, $> 1,0 * \text{UE/mL}$ para produtos estéreis. (80, 86, 87)

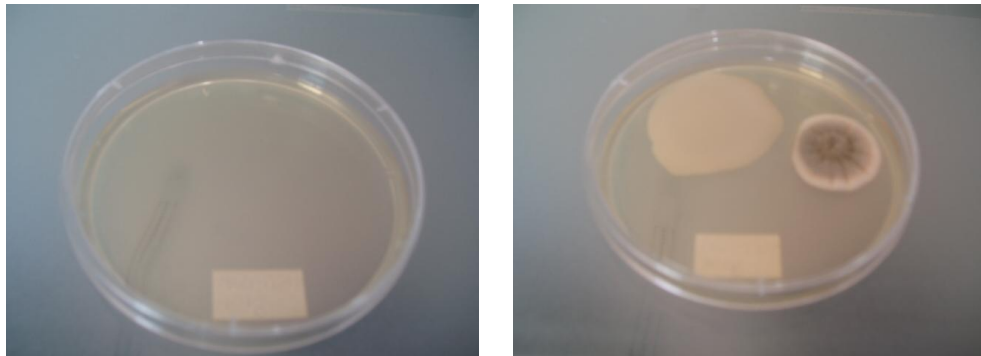


FIGURA 14 CALDO SABOURAUD, FIGURAS (A) DILUIÇÃO. 1-10 mL e (B), DILUIÇÃO, 3-10 mL.

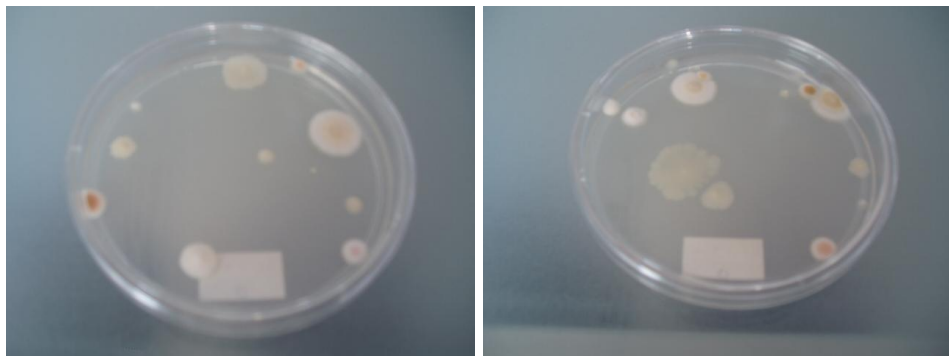


FIGURA 15 C, D AMOSTRAS EM ÁGAR TRIPTONA DE SOJA (TSA).

5.4. ENSAIOS MECÂNICOS

A análise térmica dinâmico-mecânica sobre os módulos de armazenamento (E'), de perda (E'') e amortecimento mecânico ou atrito interno ($\tan \delta = E''/E'$) de um material medindo-se a deformação sofrida por ele sob variação de temperatura quando sujeito a uma solitação dinâmica (88). O módulo de armazenamento (E') é a resposta elástica do material e está relacionado à habilidade em armazenar energia, sendo correspondente à energia completamente recuperável, enquanto o módulo de perda é a resposta viscosa, relacionado à habilidade do material em dissipar energia, correspondendo à energia perdida na forma de calor. O amortecimento mecânico ou atrito interno ($\tan \delta = E''/E'$), também conhecido como tangente de perda é a razão entre o módulo de perda e o módulo de armazenamento e apresenta valores menores para materiais mais rígidos, enquanto materiais mais flexíveis irão apresentar valores de $\tan \delta$ maiores (89).

Esses três parâmetros (E' , E'' e $\tan \delta$) são obtidos em função da temperatura ou frequência e estão correlacionados com propriedades como tenacidade, resistência ao impacto, tempo de vida sob fadiga, rigidez, entre outras propriedades (88). A análise dinâmico mecânica (ADM) foi realizada com amostras tanto do material descelularizado quanto do material "in natura". (FIGURA 16) No gráfico apresenta as curvas obtidas a partir do material descelularizado. (FIGURA 17)

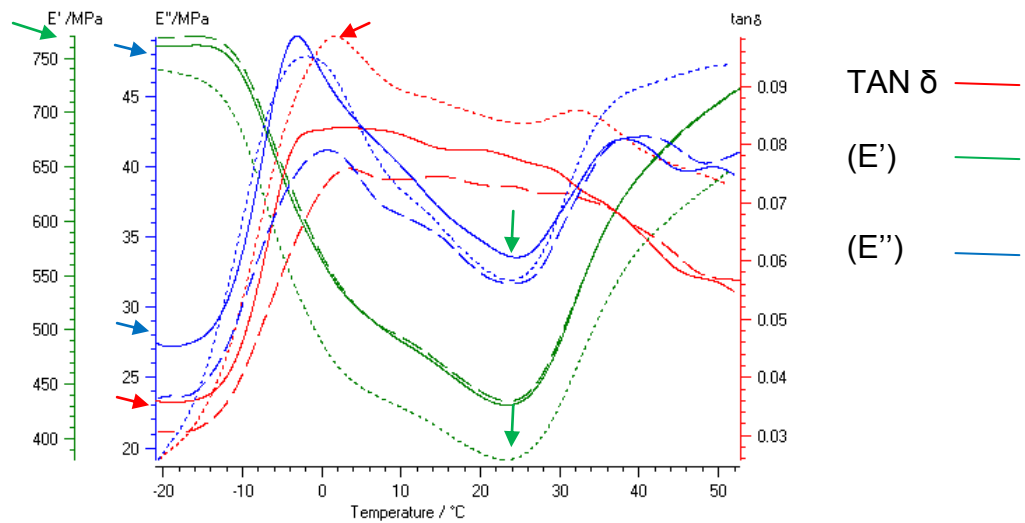


FIGURA 16. CURVA DE ANÁLISE DINÂMICO MECÂNICA DO MATERIAL DESCELULARIZADO. TAN δ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (E') EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E MÓDULO DE PERDA (E'') EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.

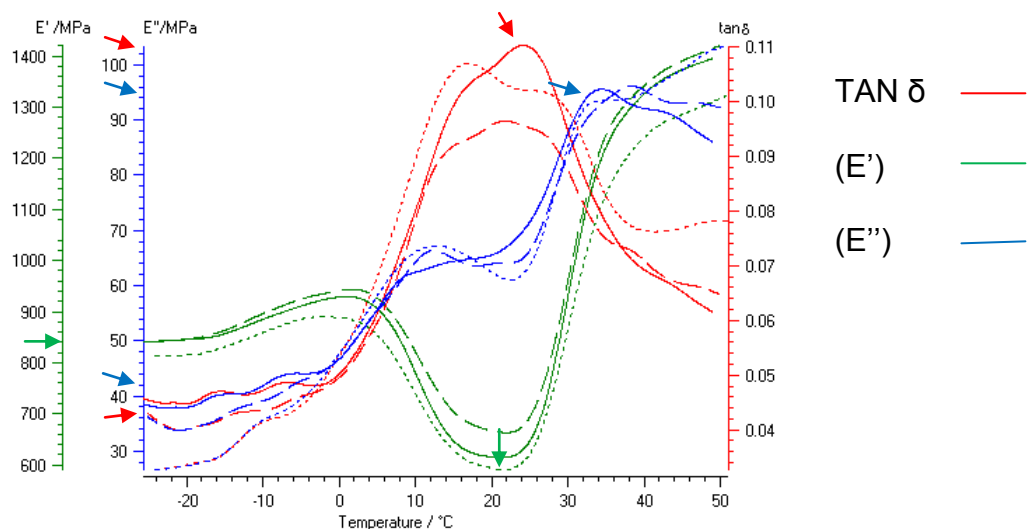


FIGURA 17. CURVA DE ANÁLISE DINÂMICO MECÂNICA DO MATERIAL "IN NATURA". TAN δ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (E') EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E MÓDULO DE PERDA (E'') EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.

Através da análise das curvas do DMA, observa-se pico da curva Tan Delta, a temperatura de transição vítrea do material, isto é, as temperaturas a partir de suas características físicas se alteram significativamente

passando de uma fase rígida para uma fase menos rígida predominantemente. Outra análise importante é a do módulo de elasticidade de armazenamento (E'), que, na prática, mostra a rigidez do material, o que, por sua vez, representa a facilidade de moldá-lo a partir de forças aplicadas sobre ele, o que é de suma importância para este estudo.

As Figuras 16 e 17 mostraram as curvas de $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas amnióticas. As membranas “in natura” apresentaram picos de decomposição com início em 42, 83, 97 e 110°C respectivamente, sendo estes picos referentes à decomposição térmica do colágeno onde, a decomposição do colágeno tem início aproximadamente em 110°C. A MA, após a descelularização a membrana começa a se decompor em temperaturas menores, ou seja, a descelularização diminuiu a estabilidade do material influenciando, assim, as propriedades viscoelásticas do colágeno presente na membrana amniótica.

Para as curvas do módulo de armazenamento (E') e do módulo de perda (E'') em função da temperatura para as MAs. A curva de E' para o material que não passou por tratamento tem as seguintes características: um valor inicial de 720 MPa a 47°C, aumentando ligeiramente até 780 MPa em 50°C e em seguida decresce continuamente até cerca de 23°C, com uma queda brusca chegando ao valor de 420 MPa. O pequeno aumento no módulo corresponde à perda de água naturalmente absorvida pelo material. Isso corresponde a um ligeiro aumento da rigidez da amostra, como já observado anteriormente por Nguyen, Vu e Wilkes (1974) em uma amostra de colágeno reconstituído obtido de tendão bovino (90). (FIGURAS 16 e 17)

5.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA O TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE

5.5.1. ANÁLISE ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Nos grupos pericárdio GN normal, pode-se observar presença de células normais com parede apresentando espessura normal. (FIGURAS 18 a 20)

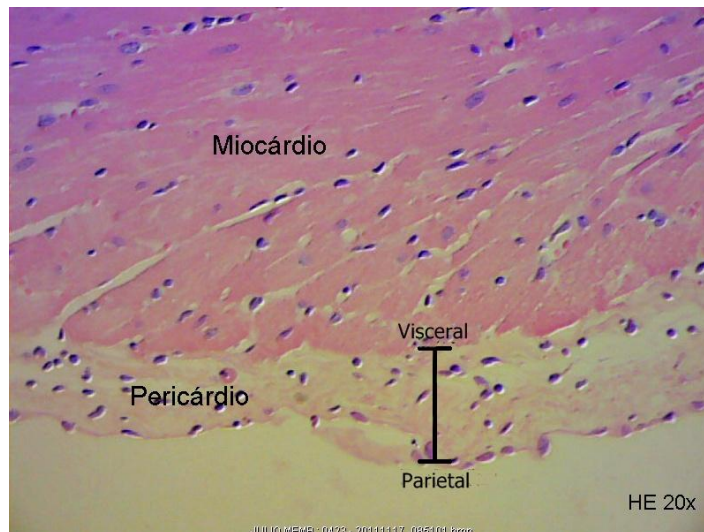


FIGURA 18. FOTOMICROGRAFIA GRUPO NORMAL ÁREA FOCAL COM PRESENÇA DE FIBRAS NORMAIS. (HE 20X)

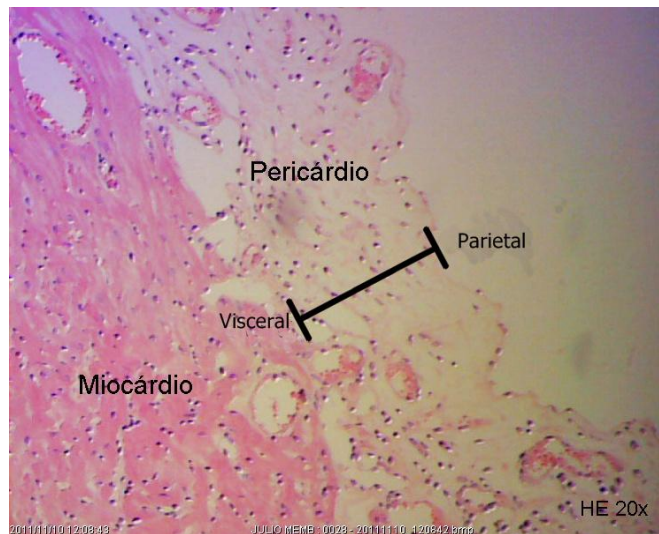


FIGURA 19. FOTOMICROGRAFIA DE MIOCÁRDIO DE RATO GRUPO (GDIOX) ÁREA FOCAL COM PRESENÇA DE FIBRAS COLÁGENAS (SETA) E POUCA REAÇÃO INFLAMATÓRIA. (HE 20X)

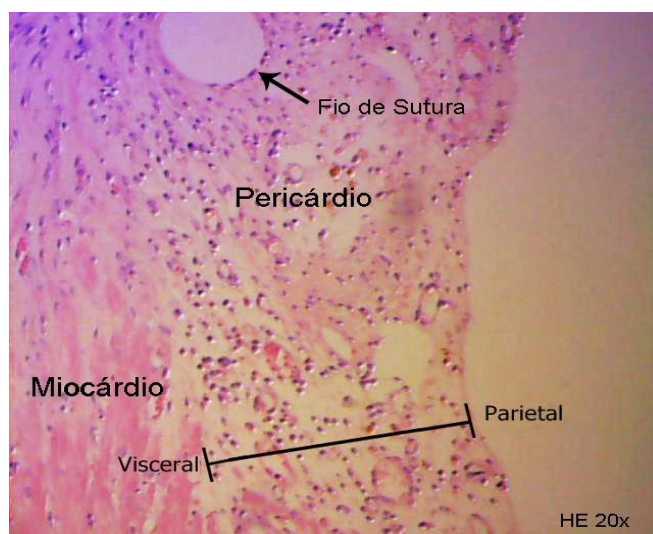


FIGURA 20. FOTOMICROGRAFIA DE MIOCÁRDIO DE RATO GRUPO (GATB) ÁREA FOCAL COM PRESENÇA DE FIO DE SUTURA (SETA) E INTENSO INFILTRADO INFLAMATÓRIO. (HE 20X)

5.5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOMÉTRICA

A média das medidas da distância entre o pericárdio visceral até o parietal transplantado com MA tratadas com antibiótico ($5,263 \pm 0,5552 \mu\text{m}$) mostrou-se significativamente maior que a da membrana tratada com dióxido de cloro e descelularizada ($3,589 \pm 0,7522 \mu\text{m}$), $P < 0,05$. (FIGURA 21)

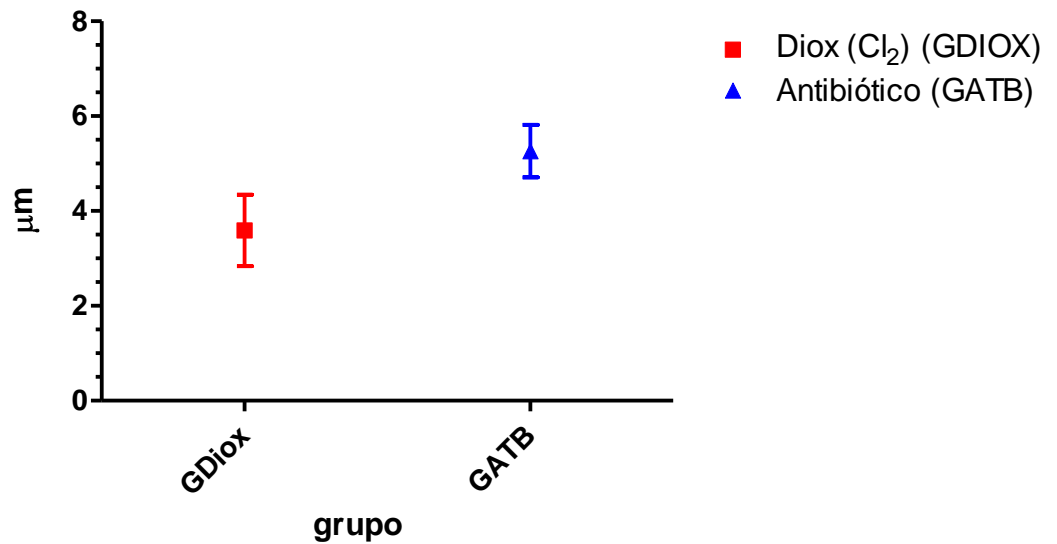


FIGURA 21. Comparação entre a distância do pericárdio nos Grupos GATB e o GDIOX

A média da MA descelularizada ($3,589 \pm 0,7522 \mu\text{m}$) não mostrou diferença significativa com a média do pericárdio normal ($3,415 \pm 0,4501 \mu\text{m}$), $P = 0,420$. (figura 22) Entretanto, a média da membrana tratada com antibiótico ($5,263 \pm 0,5552 \mu\text{m}$) foi significativamente mais espessa que o pericárdio normal, apresentando $P < 0,05$. (figura 23)

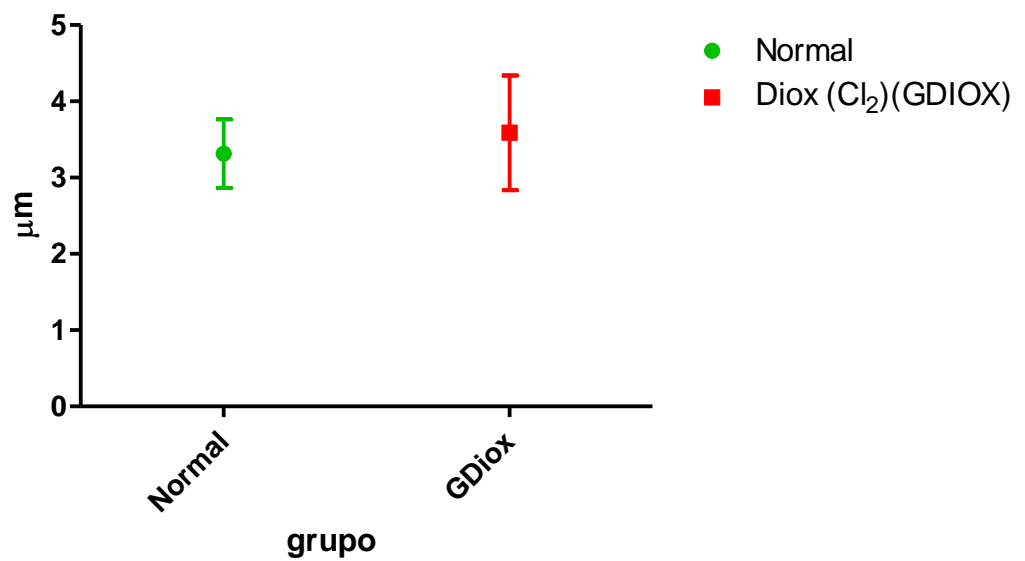


Figura 22. Comparação da espessura do pericárdio entre o Grupo normal e o GDIOX

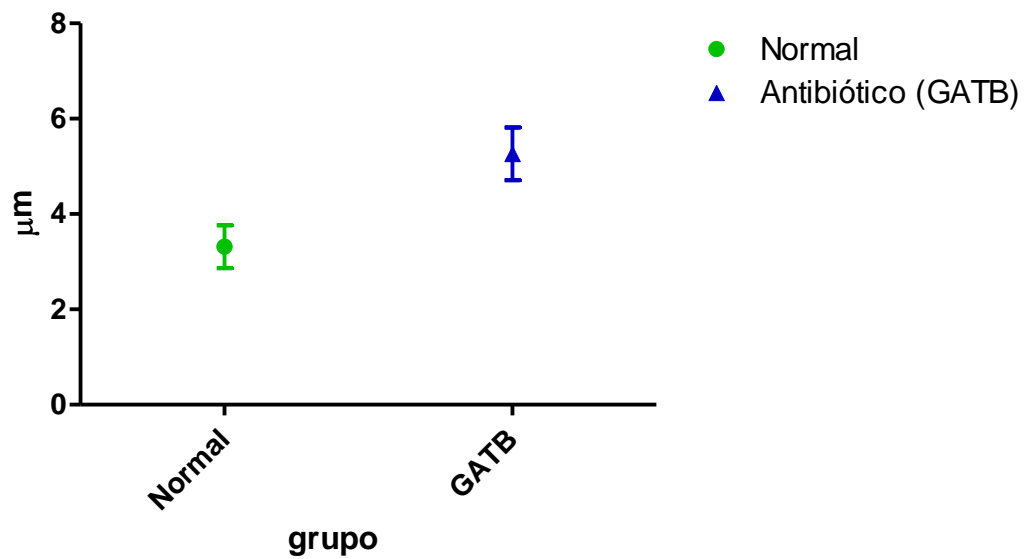


Figura 23. Comparação da espessura do pericárdio entre o Grupo normal e GATB

5.4.3. CULTURA PRIMÁRIA DE MIOBLASTOS

O método proposto para obtenção de mioblastos foi realizado com bom rendimento celular. Após os banhos seriados em solução enzimática de tripsina 0,05%/EDTA a 0,02% sob agitação contínua, obtivemos um resultado médio de 10^6 céls/cm² de músculo total inicial.

Com a densidade de semeadura proposta (10^6 céls), atingiu-se a confluência em torno de 70% das culturas ao redor do 4º dia de cultivo, o que permitiu a dissociação dessas células da placa de cultura e sua transferência para o cultivo secundário nas membranas amnióticas descelularizadas (FIGURA 24).

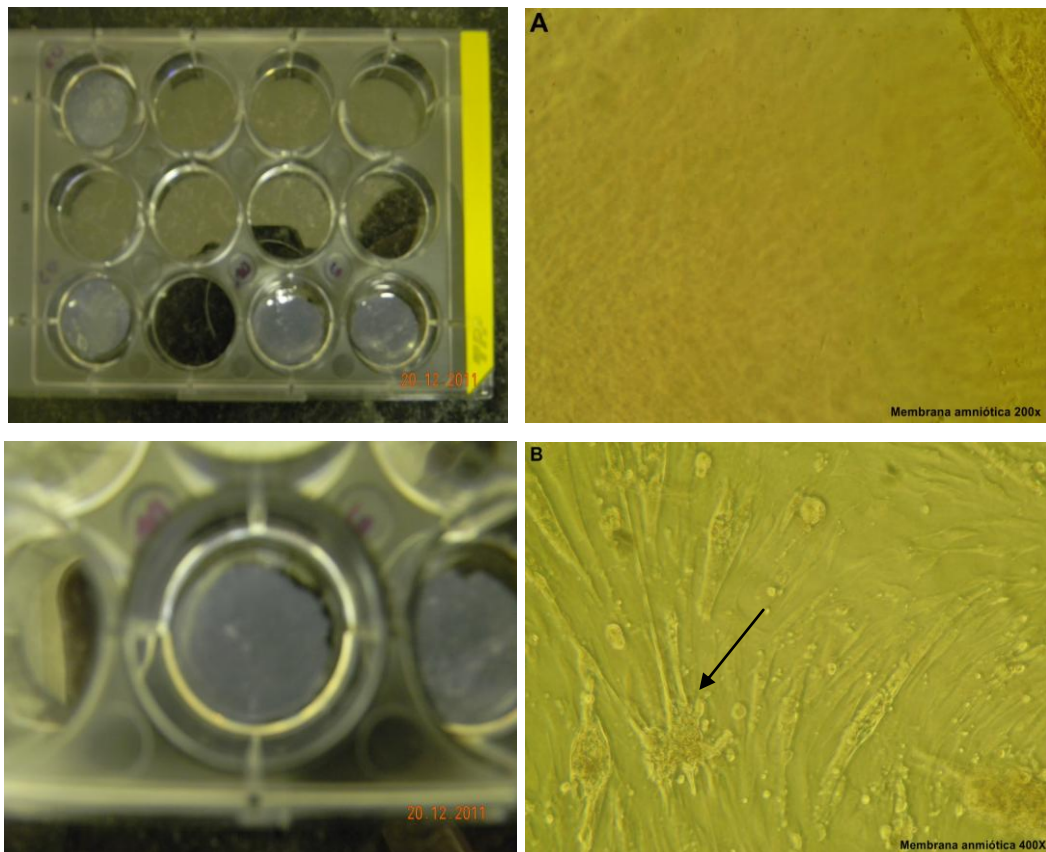


FIGURA 24 CULTURA DE MIOBLASTOS: A MEMBRANA SEM CÉLULAS E B NOTA-SE AS COLÔNIAS DE MIOBLASTOS CIRCUNDADAS POR ALGUNS FIBROBLASTOS (seta) QUE DESAPARECERÃO COM A EVOLUÇÃO DO CULTIVO (B).(AUMENTO INVERSÃO 200X E 400X)

Vale ressaltar que o acompanhamento visual da formação da camada de células musculares foi muito mais fácil e rápido (ao redor do 7^o ao 8^o dia) de ser visto nas culturas realizadas sobre membranas descelularizadas.

6. DISCUSSÃO

O reparo de órgão e tecidos vem de longa data sendo motivo de estudo com intuito de encontrar biomateriais que promovam resultados satisfatórios. A medicina regenerativa propicia o surgimento de alternativas terapêuticas com o objetivo de substituir os transplantes convencionais. Diante disso, a utilização da membrana amniótica (MA) para fins biomédicos apresenta grande potencial de reparação tecidual, servindo como substrato para cultivo de células autógenas e alógenas. Por está razão, decidiu-se estudar as potencialidades da membrana amniótica como possível biomaterial (21, 42).

A membrana amniótica vem sendo utilizada em oftalmologia no tratamento de afecções da superfície ocular devido à sua capacidade de beneficiar os processos de epitelização, angiogênese e cicatrização além de reduzir a inflamação. Suas principais aplicações ocorrem em defeitos corneanos persistentes ou recorrentes, perfurações corneanas, reconstruções conjuntivais como enxerto após a remoção cirúrgica de pterígeo e tumores simbléfaros graves. Atualmente, o seu uso tem se estendido a outras áreas da medicina como na criação de curativos cirúrgicos, na reconstrução da cavidade oral, da bexiga, do tímpano, do aparelho articular, na correção de onfalocele e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdomen, pélvis, vagina e laringe (91, 92).

Muitos estudos têm mostrado benefícios com a utilização deste tecido descelularizado. O presente estudo mostrou que a utilização de detergentes não iônicos como o SDS e o SD a 0,01% por 24 horas a 37° C promovem uma descelularização efetiva da camada epitelial. A descelularização é uma técnica atrativa para preparação de estruturas em engenharia tecidual, pois o material resultante pode manter a arquitetura do tecido original incluindo aspectos funcionais da microvasculatura ativa. As potenciais aplicações de matrizes descelularizadas em engenharia tecidual têm sido demonstradas em numerosos tecidos incluindo bexiga, artérias, esôfago, pele, traquéia e

fígado (27, 43, 93). Diferentes protocolos para descclularização têm sido usados e baseiam-se no uso de diferentes concentrações de enzimas com tempos variados de exposição utilizando tripsina e EDTA entre outras enzimas proteolíticas que clivam as ligações de hemidesmosomos das células epiteliais à membrana basal. (49, 77, 94).

Gamba *et.al* (2002), estudaram os tratamentos enzimáticos e concluíram que a tripsina e tratamentos químicos, como detergentes e soluções iônicas, rompem as membranas celulares e as ligações responsáveis por conexões intercelulares e extracelulares. (11). A tripsina é uma enzima altamente específica que cliva as ligações peptídicas no lado de carbono de arginina e lisina. A sua máxima atividade ocorre a 37°C e a um pH de 8,0.

Melo *et al* (2007), demonstram que quando diferentes enzimas como a tripsina e a dispase são associadas e utilizadas em diferentes tempos, há a desepitelização completa do âmnio e, ao mesmo tempo, retira a membrana basal. Assim, recomendam novos estudos, enfatizando a necessidade de reduzir o tempo de ação das enzimas, além de que estas enzimas de origem animal podem ser também fonte de contaminação (91).

Cartmell *et. al* (2000) utilizaram ratos em seus experimentos com tendões expostos ao Triton X-100 e concluíram que não era eficiente na remoção completa do material genético após a exposição por até 4 dias, evidenciando a presença de vimentina proteína do citoesqueeto nos ligamentos (64).

A despeito da falta de unanimidade na literatura sobre o melhor protocolo de descclularização, este estudo deu preferência pela descclularização completa. De maneiras similares, vários autores relatam uma melhor integração celular em membranas completamente desnudas em comparação àqueas com epitélio íntegro ou parcialmente retirado. Isso pode ser potencializado pelo uso de elementos clorados como dióxido de cloro, que pode lisar as células (54).

As análises histológicas das membranas descclularizadas neste estudo, evidencaram que sua arquitetura estava preservada, apresentando

alguns componentes celulares com sinais de inviabilidade, possivelmente pelo uso de detergentes iônicos como SDS, que pode provocar diminuição na concentração da GAG com uma possível perda da integridade do colágeno. (FIGURA 9 D). Estudo realizado por Ponce Marquez *et al.* (2009), com utilização de detergentes aniônicos para a descclularização de córneas bovinas, obteve resultados semelhantes a este trabalho (55).

Outros estudos também demonstram que os detergentes iônicos são eficazes para solubilizar tanto o material citoplasmático quanto o nuclear em membranas celulares, mas tendem a desnaturar proteínas interrompendo interações proteína-proteína (12, 13, 49, 62).

A utilização de detergentes não iônicos pode alterar a camada lipídica e as interações entre proteínas. Estudos com Triton X-100, que não é o detergente iônico mais estudado para os protocolos de descclularização, mostram resultados contraditórios. Quando Triton X-100 foi usado para descclularizar válvulas do coração, observou-se remoção completa de material nuclear após 24 h (49, 63).

Sabe-se que preservação da complexa composição de uma MEC é altamente desejável. Porém os métodos de descclularização resultam numa ruptura da arquitetura da membrana e potencial perda da estrutura da superfície e da composição. Métodos físicos e químicos, além de agentes biológicos são usados em combinação para lesar células, seguido pela lavagem para remover as células remanescentes. A metodologia de uma efetiva descclularização é ditada por fatores como a densidade do tecido e sua organização, propriedades biológicas e geométricas para o produto final e o alvo da aplicação clínica. A descclularização tecidual com preservação da integridade e da bioatividade da MEC pode ser otimizada pela escolha correta dos agentes e técnicas utilizadas durante o processo (95).

Com o intuito de estabelecer o ponto de clivagem de liberação epitelial, foram realizadas, neste estudo, análises em MEV. Essa avaliação foi conclusiva quanto à existência ou não de membrana basal após o processo de descclularização. Após a exposição ao SDS e ao SD a 0,01% por 24 horas, observou-se que as MAs apresentavam sua estrutura basal

preservada. Corroborando com os resultados da microscopia óptica e da imunofluorescência, a análise da MEV comprovou a presença da membrana basal no grupo não tratado. Esse achado foi considerado bastante favorável para o cultivo de células, o que determinou o próximo passo a ser dado. (Figura 21 A e B).

A análise histológica das MAs descontaminadas e descelularizadas, evidenciou ausência de elementos da membrana basal, sugerindo, portanto, que o protocolo de descelularização utilizado preservou a membrana basal permitindo atribuir um potencial de biocompatibilidade. A biocompatibilidade que foi testada a seguir com a semeadura de células aderentes, como os mioblastos que expressam M-Caderina (96).

Os resultados de imunofluorescência indireta mostraram-se positivos para laminina na superfície epitelial do lado sem células. A laminina é uma proteína associada à membrana basal que funciona como adesina, ligando as células basais do epitélio ao colágeno IV. Tem sido relacionada diretamente a estágios avançados de diferenciação celular, sendo pré-requisito para diferenciação terminal e execução de funções especializadas, por interagir com as integrinas e outros componentes da superfície celular assim como controlar a migração celular, a polarização, a proliferação e a apoptose (17) (FIGURA 11 A e-B).

Ao longo do período das análises não foram realizados testes de esterilização, mas sim de descontaminação das membranas, mas atualmente, a esterilização complementar de tecidos, tem sido recomendada como mecanismo fundamental de garantia de qualidade e segurança aos receptores dos enxertos alógeno (97).

Os resultados do presente estudo também revelaram que a descontaminação com dióxido de cloro estabilizado na concentração de 100 ppm por um período de 20 minutos levam a carga microbiana em níveis inferiores ao que preconizados pela legislação para produtos médicos. Salientando que este estudo é o primeiro que utiliza o dióxido de cloro para esta finalidade em biomateriais, e que este produto foi selecionado por suas

fortes propriedades antimicrobianas, a compatibilidade com o tecido vivo, a facilidade de uso e ampla disponibilidade.

Da mesma forma, uma avaliação microbiológica das membranas amnióticas utilizadas como biomaterial neste estudo, constatou ausência de fungos ou bactérias no material testado e armazenado em PBS e em geladeira por 30 dias após descontaminação com dióxido de cloro. Na avaliação microbiológica foram encontrados microrganismos em níveis aceitáveis, o que permitiu a utilização nos procedimentos cirúrgicos.

A literatura aponta a necessidade de esterilizar as estruturas biológicas da matriz extracelular antes da sua implantação ou do seu uso “*in vitro*”, com a finalidade de eliminar endotoxinas e DNA intacto de vírus e bactérias que possam estar presentes (95).

Os resultados dos testes de endotoxinas deste estudo mostraram valores bem abaixo do limite permitido para endotoxinas bacterianas que é de 1,0 UE/mL, de acordo com o preconizado pela vigilância sanitária. Esse limite é baseado nos padrões estabelecidos pela United States Pharmacopeia (USP 33 – NF 28, 2010) que recomenda o limite máximo como não mais que 20 UE/produto médico estéril (80) (FIGURAS 13 e 14).

Portanto, a descontaminação com dióxido de cloro estabilizado na concentração de 100 ppm por um período de 20 minutos, mostra-se efetiva, e justifica a sua escolha. O método foi de fácil execução, e permitiu que não houvesse contaminações depois das membranas estocadas e não apresentou rompimento das suas estruturas. Este achado está de acordo com os dados de Gomes *et al.* (2001), que demonstraram que a utilização de produtos clorados como o dióxido de cloro como desinfetante endodôntico em uma concentrações de 5,25% é efetiva como agente antimicrobiano (98).

O dióxido de cloro (ClO₂) que é um agente oxidante forte e na maioria das vezes, reage por meio do mecanismo de transferência de elétrons atacando a membrana celular, penetrando, desidratando, e por último, oxidando os componentes internos da célula microbiana sem, no entanto, causar ação tóxica como a maioria dos compostos de cloro. Apresenta,

também, a vantagem de ser eficaz contra os microrganismos gram negativos e gram positivos.

Atualmente, vem sendo utilizado como um purificador de água, desinfetante de superfície e foi recentemente considerado como um irrigante de canais radiculares por causa de sua atividade antibactericida e sua compatibilidade com tecido vivo (99).

Outro aspecto importante do dióxido de cloro é sua acentuada ação sanitizante e esporicida, que se dá em concentrações menores de cloro, e que é resultante do mesmo ser solúvel em óleos, graxas e substâncias de composição mista, como células de vírus e de bactérias, em cujas membranas penetram facilmente, ao contrário dos outros sanitizantes de natureza polar (100, 101).

A contaminação encontrada nas amostras deste estudo os resultados estão em concordância com o estudo publicado por Addis *et al* (2001), que mostraram contaminação bacteriana em todas as membranas estudadas provenientes de parto normal ou cesárea (102).

O desenvolvimento dessa padronização permite o estabelecimento de um protocolo de descontaminação, preservação e armazenamento da MA, e deve servir como modelo para a captação e distribuição de tecidos para vários centros de todo o país (FIGURA 4 A e B).

Neste estudo, com objetivo de reduzir a antigenicidade, houve a preocupação constante de retirar por completo os restos coriônicos, os resíduos de SDS, SD e o dióxido de cloro e, para isso, é fundamental a realização de lavagens exaustivas previamente ao início dos testes.

Sabe-se que os biomateriais de origem orgânica ou sintética quando inseridos no corpo humano, devem ser biocompatíveis e, conseqüentemente proporcionem uma resposta adequada com o mínimo de reações alérgicas ou tóxicas. Isso é uma tentativa de criar um substitutivo com as mesmas propriedades do tecido beneficiado (40, 92, 103).

Os achados de Akle *et.al.* (1981) demonstram que membranas criopreservadas apresentaram taxa quase nula nos seus receptores, provavelmente devido à propriedade única da membrana amniótica de não

induzir a rejeição imunológica após o transplante. Isso deve-se ao fato de não expressar os antígenos de histocompatibilidade HLA-A, B ou DR, o que a torna excelente opção para enxerto (5, 35-37).

Com o objetivo de demonstrar o potencial da descontaminação e o processo de descelularização, que transplantado a membrana “*in vivo*” no miocárdio de ratos. Neste estudo, onde se implantaram membranas amnióticas descontaminadas com antibiótico e com dióxido de cloro sobre o pericárdio parietal do ventrículo esquerdo, observou-se após 30 dias um infiltrado mononuclear mais intenso quando se utilizou antibióticos. Os dois tipos de tratamento para as membranas mostraram-se efetivas, pois houve a incorporação ao pericárdio parietal sem possibilidade de diferenciá-la. A morfometria mostrou um diâmetro significativamente menor na membrana descontaminada com dióxido de cloro, o que pode indicar a ocorrência de um processo inflamatório menos intenso neste grupo. Nossos resultados corroboram com os achados de Wishaw *et.al* onde testaram a MA descelularizada em murinos, verificando boa integração ao tecido e pouca ou rara reação imunológica (77).

A presença de angiogênese nas áreas de membranas descelularizadas transplantadas neste estudo reitera a idéia de alguns autores citam que inibidores químicos de angiogênese estariam presentes nas membranas frescas, deste modo estas seriam mais efetivas que as tratadas. Hao *et al.* (2000) demonstraram a ação antiangiogênica da membrana a fresco por meio da aplicação um potente antiangiogênico químico, em células epiteliais e em 20% das células mesenquimais do âmnion. Contudo estes mesmos autores afirmam que a propriedade antiinflamatória da membrana diminui o estímulo à angiogênese e conseqüentemente a neovascularização (22, 38).

Também foi observado no presente estudo que o número de células do tipo polimorfonucleares invadindo o pericárdio visceral foi maior no grupo onde as membranas foram tratadas com antibiótico, por isso, a reparação da lesão nos animais deste grupo se manifestou de forma mais lenta. Um dos papéis desenvolvidos pela membrana é de conter as células inflamatórias

vindas do endocárdio. Os polimorfonucleares foram encontrados em menor número nas membranas tratadas com dióxido e circundando o fio de sutura. De acordo com Cassatella *et al.*(1995) os leucócitos participam nos processo de reparação através de liberação de citocinas e fatores de crescimento (104).

Por outro lado, o implante pode provocar uma reação inflamatória conhecida como reação de corpo estranho após a implantação. A inflamação pode ser benéfica causando a cicatrização de uma lesão, mas também pode levar à falência do implante. Reação de corpo estranho provoca estimulação de células gigantes e macrófagos, que produzem citocinas e atraem fibroblastos levando à formação de fibroses. Por isso, baixo risco de imunogenicidade é um importante componente para um material biocompatível (21).

Courtman *et al.*(1994), afirmam que a descelularização é um processo que acarreta um decréscimo na carga antigênica do tecido, reduz a resposta imune do hospedeiro após o implante e facilita sua incorporação ao organismo (105). Entretanto, resíduos de cada produto pode permanecer no tecido descelularizado e induzir uma grave resposta inflamatória após a implantação em um receptor.

Os testes '*in vivo*' para avaliação da biocompatibilidade da MA mostrou que esse biomaterial é compatível com a arquitetura celular quando transplantado no miocárdio de ratos proporcionando potencial para o uso clínico no tratamento de queimaduras e feridas.

Para as amostras descelularizadas se pode observar que, com exceção, após o tratamento as membranas apresentaram valores menores de E' e, quanto menor o tempo de hidrólise, menor o aumento, ou seja, houve uma diminuição da elasticidade ou da capacidade de armazenar energia. As curvas para perda E'' mostraram que as membranas apresentaram maiores valores de E'' "*in natura*" e após a descelularização, ou seja, ocorreu uma diminuição da capacidade de dissipar energia. Em contrapartida, a temperatura mais elevada sem dúvida significa menor conforto tanto para quem manipula quanto para o paciente. (FIGURAS 16 e

17) A análise termomecânica foi importante para este estudo já que, por meio dela, é possível determinar parte do comportamento do material quando submetido ao resfriamento e a elevação de temperatura. Para a utilização dos biomateriais é imprescindível conhecer o comportamento deles quando expostos a diferentes temperaturas.

Indiscutivelmente, o processo de descelularização implicaria na remoção completa de componentes celulares e simultânea manutenção da MEC com mínima influência na matriz de montagem. Considerando que a matriz celular diminui a imunogenicidade do enxerto, é esperado que uma ótima preservação dos componentes da matriz extracelular resultaria na manutenção das propriedades biomecânicas da estrutura.

Contudo, estudos têm mostrado que alguns detergentes rompem o colágeno de certos tecidos diminuindo a sua força mecânica. Entretanto, o mesmo produto não altera o colágeno em tecidos bastante similares como tendões e ligamentos. Outra variável que pode afetar as propriedades mecânicas dos enxertos é a duração da exposição aos agentes descelularizantes (95).

É importante lembrar que biomateriais apresentam diferenças específicas e tal especificidade pode levar a exigência de materiais com diferentes propriedades mecânicas. Além disso, estruturas reabsorvíveis fornecem um perfil biomecânico temporário para a substituição tecidual até que as células produzam sua própria matriz. A matriz gerada acabará fornecendo integridade estrutural e força biomecânica para o novo tecido desenvolvido (61).

E necessário observar que novos testes são necessários para avaliar a capacidade de membranas amnióticas descontaminadas com dióxido de cloro e descelularizada de incorporar células em sua estrutura.

Esse estudo demonstrou também que a utilização de protocolos de descelularização em concentrações menores diminui o dano estrutural ao âmnio, e propicia um processo de descelularização sem que ocorra perda da membrana basal.

Com os cuidados na captação e no processamento das membranas, bem como a seleção rigorosa das doadoras, há uma redução natural da carga microbiana. Além disso, o dióxido de cloro em baixas concentrações possui o efeito de desinfecção e, portanto, somente há necessidade de se estabelecer um método adequado de esterilização. Todo esse processo permite a criação de uma membrana amniótica segura e estéril e, ao mesmo tempo, compatível ao cultivo de células humanas.

Com o cultivo das células musculares satélites, observou-se que os padrões de distribuição celular na membrana foram normais, como ilustrado nas imagens de microscopia óptica. As células cultivadas apresentaram formas alongadas, típicas de células satélites, e atingiram confluência em 7 dias (Figura 21b). Sabe-se que a morfologia celular é influenciada pela confluência ou densidade de células e, embora seja medida qualitativa e subjetiva, muitas informações quantitativas podem ser extraídas pela análise de imagem (1) (Figura 21).

Depois da semeadura dos mioblastos, praticamente todas as células aderiram à membrana amniótica, no qual se distribuíram completamente, mostrando-se agrupados em determinadas regiões, o que evidencia maior densidade celular. Os resultados obtidos demonstraram que a MA não é citotóxica e suporta tanto a adesão quanto a proliferação e a viabilidade celular. Recentemente, descobriu-se que o âmnio tem a capacidade de servir como suporte para o cultivo de células humanas. Nesse sentido, os primeiros usos do âmnio como base ao cultivo celular ocorreram no campo oftalmológico (72).

Em 2008, Wilshaw *et al.* demonstraram que o âmnio, decelularizado e esterilizado pela exposição ao ácido paracético, era biocompatível à adesão e à proliferação de queratinócitos e fibroblastos humanos (77).

Em 2009, experimentos de Yang *et al.* comprovaram que o uso de membranas amnióticas criopreservadas servindo como suporte ao cultivo celular tanto de queratinócitos como de fibroblastos sem a presença de matrizes colágenas. Primeiramente, as membranas eram desepitelizadas e, sobre o lado epitelial foram cultivados os queratinócitos. Após três dias, o

âmnio era posicionado com a porção estromal voltada ao fundo de um frasco, onde fibroblastos humanos eram cultivados. Essas células migraram para o âmnio e formavam um novo tipo de equivalente cutâneo (78).

Pesquisas interdisciplinares são necessárias, para explorar a versatilidade e a potencialidade da membrana amniótica como material biomédico, para fazer deste biomaterial um candidato com maiores benefícios para a medicina moderna e engenharia de tecidos.

7 CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados dos experimentos propostos, podemos chegar as seguintes conclusões:

- 1 A exposição de membranas amnióticas em solução de dióxido de cloro estabilizado para descontaminação foi efetiva.
- 2 Obteve-se completa desepitelização com manutenção da integridade das estruturas da matriz após exposição das MAs ao protocolo proposto.
- 3 O grupo de membranas descontaminadas com dióxido de cloro apresentou menor reação inflamatória e menor área de tecido cicatricial, do que as membranas que utilizaram o protocolo convencional com antibióticos.
- 4 As MAs descontaminadas e descelularizadas segundo protocolo proposto, promoveu a proliferação e adesão celular em sua superfície.

LIMITAÇÕES DO TRABALHO

As limitações deste estudo foram à impossibilidade de realizar uma análise das moléculas expressas na matriz após a utilização do protocolo proposto e a caracterização por imunofenotipagem as células cultivadas sobre a matriz.

No entanto, estas limitações não constituíram impedimento para validar os resultados do estudo efectuado e as conclusões que se retiraram a partir da análise dos mesmos.

SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

Cultivar sobre a membrana amniótica com diversos tipos celulares, para fins biomédicos, transferindo a metodologia da descelularização e descontaminação para escala industrial.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Langer R. Tissue engineering. *Mol Ther*2000 Jan;1(1):12-5.
2. Patel M, Fisher JP. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. *Pediatr Res*2008 May;63(5):497-501.
3. Nerem RM. Cell-based therapies: From basic biology to replacement, repair, and regeneration. *Biomaterials*2007 Dec;28(34):5074-7.
4. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*2008 Jul;29(20):2941-53.
5. Hopper RA, Woodhouse K, Semple JL. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. *Ann Plast Surg*2003 Dec;51(6):598-602.
6. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*2007 Nov;105(3):215-28.
7. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol*2000 Feb;18(1):2-9.
8. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*2005 Jan;23(1):47-55.
9. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*2008 Dec;17 Suppl 4:467-79.
10. Liang L, Li W, Ling S, Sheha H, Qiu W, Li C, et al. Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns. *Clin Experiment Ophthalmol*2009 Dec;37(9):855-63.
11. Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg*2000 Apr;19(4):381-6.

12. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng*2004 Sep-Oct;10(9-10):1346-58.
13. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng*2004 Nov-Dec;10(11-12):1641-51.
14. Karp JM, Langer R. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. *Curr Opin Biotechnol*2007 Oct;18(5):454-9.
15. Zimmermann WH, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering for replacement therapy. *Heart Fail Rev*2003 Jul;8(3):259-69.
16. Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs*2000 Mar;24(3):217-23.
17. O'Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol*2001 Sep;26(6):525-30.
18. Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*2009 Jun 6;6 Suppl 3:S311-24.
19. Chen CP, Aplin JD. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. *Placenta*2003 Apr;24(4):316-25.
20. Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation*2006 Jul 4;114(1 Suppl):I167-73.
21. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*2008;15:88-99.
22. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*2004 Jan-Feb;49(1):51-77.
23. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J*1910;15:307.

24. Roth AD. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol*1940;23:522-5.
25. Sorsby A, Symons HM. AMNIOTIC MEMBRANE GRAFTS IN CAUSTIC BURNS OF THE EYE: (Burns of the second degree). *Br J Ophthalmol*1946 Jun;30(6):337-45.
26. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*1995 Sep;14(5):473-84.
27. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*1999 Jun;83(6):748-52.
28. Friess W. Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*1998 Mar;45(2):113-36.
29. John T. Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future. *Ophthalmol Clin North Am*2003 Mar;16(1):43-65, vi.
30. Sachs BP, Stern CM. Activity and characterization of a low molecular fraction present in human amniotic fluid with broad spectrum antibacterial activity. *Br J Obstet Gynaecol*1979 Feb;86(2):81-6.
31. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol*1995 Jun;9(1):32-46.
32. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun*1998 Sep;66(9):4222-8.
33. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*1991 May-Jun;12(3):285-8.
34. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*2008 May;63(5):492-6.
35. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to

serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*2008 Nov 17.

36. Bigbie RB, Schumacher J, Swaim SF, Purohit RC, Wright JC. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. *Am J Vet Res*1991 Aug;52(8):1376-82.

37. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*2001 Apr;85(4):444-9.

38. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*2000 May;19(3):348-52.

39. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*1981 Nov 7;2(8254):1003-5.

40. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2001 Jun;42(7):1539-46.

41. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*1999 Apr;83(4):399-402.

42. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*2010 Jan;31(2):216-25.

43. Cargnoni A, Di Marcello M, Campagnol M, Nassuato C, Albertini A, Parolini O. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. *Cell Transplant*2009;18(10):1147-59.

44. Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. *J Pak Med Assoc*2003 Jan;53(1):29-32.

45. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials* Jan;31(2):216-25.

46. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*1998 Apr;116(4):431-41.
47. Mejia LF, Santamaria JP, Acosta C. Symptomatic management of postoperative bullous keratopathy with nonpreserved human amniotic membrane. *Cornea*2002 May;21(4):342-5.
48. Nakamura T, Sekiyama E, Takaoka M, Bentley AJ, Yokoi N, Fullwood NJ, et al. The use of trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*2008 Sep;29(27):3729-37.
49. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*2006 Aug;12(8):2117-29.
50. Souza CEB, Engel DP, Branco BC, Hofling-Lima AL, Freitas Dd, Gomes JÁP, et al. Evaluation of microbiological contamination of amniotic membrane and amniotic fluid. *Arq Bras Oftalmol*2004;67 (5):709-12.
51. Arumuganathar S, Jayasinghe SN. Living scaffolds (specialized and unspecialized) for regenerative and therapeutic medicine. *Biomacromolecules*2008 Mar;9(3):759-66.
52. Potts JR, Campbell ID. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol*1996 Nov;15(5):313-20; discussion 21.
53. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*2002 Oct;14(5):608-16.
54. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*2006 Jul;27(19):3675-83.
55. Ponce Marquez S, Martinez VS, McIntosh Ambrose W, Wang J, Gantxegui NG, Schein O, et al. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomater*2009 Jul;5(6):1839-47.
56. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*2004 Jun;25(13):2679-86.

57. Gulati AK. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg*1988 Jan;68(1):117-23.
58. Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology*1998 Feb;51(2):221-5.
59. Hodde J, Janis A, Hiles M. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part II. Bioactivity and matrix interaction. *J Mater Sci Mater Med*2007 Apr;18(4):545-50.
60. Gamba PG, Conconi MT, Lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int*2002 Sep;18(5-6):327-31.
61. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*2003 Sep;143(3):201-8.
62. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*2004 Nov 3;1666(1-2):105-17.
63. Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfenbarger L, Jr., et al. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg*2005 Mar;79(3):888-96; discussion 96.
64. Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*2000 Jan;49(1):134-40.
65. Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*2003;12(6):659-66.
66. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*2005 Apr;27(4):566-71.

67. Douglas B, Conway H, Stark RB, Joslin D, Nieto-Cano G. The fate of homologous and heterologous chorionic transplants as observed by the transparent tissue chamber technique in the mouse. *Plast Reconstr Surg* (1946)1954 Feb;13(2):125-9.
68. Gajiwala K, Lobo Gajiwala A. Use of banked tissue in plastic surgery. *Cell Tissue Bank*2003;4(2-4):141-6.
69. Ravishanker R, Bath AS, Roy R. "Amnion Bank"--the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns*2003 Jun;29(4):369-74.
70. Rejzek A, Weyer F, Eichberger R, Gebhart W. Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute. Light and electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank*2001;2(2):95-102.
71. Quinby WC, Jr., Hoover HC, Scheflan M, Walters PT, Slavin SA, Bondoc CC. Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care. *Plast Reconstr Surg*1982 Dec;70(6):711-17.
72. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*2009 Feb;30(6):1056-65.
73. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc*1999;97:891-986.
74. Meller D, Pires RT, Tseng SC. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*2002 Apr;86(4):463-71.
75. Ahn KM, Lee JH, Hwang SJ, Choung PH, Kim MJ, Park HJ, et al. Fabrication of myomucosal flap using tissue-engineered bioartificial mucosa constructed with oral keratinocytes cultured on amniotic membrane. *Artif Organs*2006 Jun;30(6):411-23.
76. Yang L, Shirakata Y, Shudou M, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, et al. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res*2006 Oct;326(1):69-77.

77. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Eng Part A*2008 Apr;14(4):463-72.
78. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, et al. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *J Dermatol Sci*2009 Dec;56(3):188-95.
79. FDA. Food and Drug Administration. Guideline for Validation of the LAL Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices,. 1987.
80. [Organic chemistry nomenclature for the new edition of the Farmacopeia Brasileira]. *Arq Cir Clin Exp*2010 Jan-Feb;37(311):6-10.
81. Sinnott MM, Hoepfner DW, Romney E, Dew PA. Effects of surface integrity on the fatigue life of thin flexing membranes. *ASAIO Trans*1989 Jul-Sep;35(3):687-90.
82. Canevarolo SV. Em *Técnicas de caracterização de polímeros*. Artliber Ed Ltda: São Paulo, 20042004:263.
83. FIOCRUZ. MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/FIOCRUZ. 2008.
84. Rebuelto M, Ambros L, Montoya L, Bonafine R. Treatment-time-dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. *Chronobiol Int*2002 Sep;19(5):937-45.
85. Delaporte C, Fardeau M. [The effect of serum from a patient with myeloma and diffuse muscular hypertrophy on the growth of human muscle cells in culture]. *C R Acad Sci III*1984;298(3):49-54.
86. Sanitária ANdV. United States Pharmacopeia. 2010;33:28.
87. Peruzzo AM, da Costa FD, Abrahao WM. Microbiologic control in human heart valves. *Arq Bras Cardiol*2006 Dec;87(6):778-82.
88. Indei T, Takimoto J. Linear viscoelastic properties of transient networks formed by associating polymers with multiple stickers. *J Chem Phys* Nov 21;133(19):194902.

89. Assor C, Placet V, Chabbert B, Habrant A, Lapierre C, Pollet B, et al. Concomitant changes in viscoelastic properties and amorphous polymers during the hydrothermal treatment of hardwood and softwood. *J Agric Food Chem* 2009 Aug 12;57(15):6830-7.
90. Nguyen AL, Vu BT, Wilkes GL. The dynamic mechanical, dielectric, and melting behavior of reconstituted collagen. *Biopolymers* 1974 May;13(5):1023-37.
91. de Melo GB, Gomes JA, da Gloria MA, Martins MC, Haapalainen EF. [Morphological assessment of different amniotic membrane epithelial denuding techniques]. *Arq Bras Oftalmol* 2007 May-Jun;70(3):407-11.
92. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Apr;Chapter 1:Unit 1E 6.
93. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005 Aug;24(6):643-53.
94. Ju X, Pan F, Bai S, Tian X, Tong H, Wang J. [An experimental study on repairing full-thickness skin wound by human acellular amniotic membrane loaded with adipose-derived stem cells in rats]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* Feb;24(2):143-9.
95. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* Apr;32(12):3233-43.
96. Vijayaraghavan R, Thompson BC, MacFarlane DR, Kumar R, Surianarayanan M, Aishwarya S, et al. Biocompatibility of choline salts as crosslinking agents for collagen based biomaterials. *Chem Commun (Camb)* Jan 14;46(2):294-6.
97. AATB. Agência Internacional de Energia Atômica. *Proyecto INT/6/049. Normas Generales para la Operación de Banco de Tejidos em la Region de America AIEA; 2002 Latina*. 2006.
98. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium

hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*2001 Sep;34(6):424-8.

99. Peruzzo DC, Jandiroba PF, Nogueira Filho Gda R. Use of 0.1% chlorine dioxide to inhibit the formation of morning volatile sulphur compounds (VSC). *Braz Oral Res*2007 Jan-Mar;21(1):70-4.

100. Farrell BL, Ronner AB, Wong AC. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. *J Food Prot*1998 Jul;61(7):817-22.

101. FARREL BLea. Attachment of *E. coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. . *Journal of Food Protection* 1998;61 n.7:817-22, .

102. Adds PJ, Hunt C, Hartley S. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol*2001 Feb;85(2):228-30.


103. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis*2007 Sep;16(5):567-73; discussion 74.

104. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*1995 Jan;16(1):21-6.

105. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*1994 Jun;28(6):655-66.

9. ANEXOS

9.1 CARTAS DE APROVAÇÃO DOS COMITÊS




Curitiba, 31 de agosto de 2011.

Julio Cesar Francisco
Pesquisador Responsável

Prezado Senhor,

Comunicamos que as pendências solicitadas por este Comitê referente ao projeto de pesquisa intitulado **Desenvolvimento de Biomaterial a partir de Matriz Amniótica Humana**, registro no CEP 0948-11, foram avaliadas em reunião plenária em 29 de agosto de 2011, chegou-se ao seguinte parecer: **foi aprovado**, mas por se tratar de um novo procedimento o mesmo será encaminhado para Comissão Nacional De Ética em Pesquisa - CONEP.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luiz Antonio Munhoz da Cunha
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa de Seres Humanos - HPP



ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR DE PROTEÇÃO À INFÂNCIA DR. RAUL CARNEIRO
Hospital Pequeno Príncipe / Hospital de Crianças César Pernetta / Faculdades Pequeno Príncipe / Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Rua Desembargador Motta, 1070 • Curitiba - PR, Brasil • CEP 80.250-060 • tel.: + 55 41 3310.1010 • fax: + 55 41 3225.2291 • info@hpp.org.br
www.pequenoprincipe.org.br • CNPJ: 76.591.569/0001-30 / Inscrição Estadual: isento / Inscrição Municipal: 5.002.035.943-2

Cód. 318 - BAG



Universidade Federal do Paraná

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa com título DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL A PARTIR DE MATRIZ AMNIÓTICA HUMANA que terá como objetivo maior analisar se este tecido pode ser utilizado como biomaterial para correção de várias anomalias e em correções cirúrgicas como o caso de pacientes com queimaduras severas dentre outras. Esta pesquisa se restringe a etapas "*in vitro* e *in vivo*" com animais de laboratório posteriormente. Utilizando a membrana amniótica retirada da placenta após o nascimento do seu filho, antes de ser descartado no lixo hospitalar. A membrana amniótica é a "pele" que recobre toda a parte interna da placenta, e é responsável pela formação do líquido que protege o seu filho dentro do útero. Portanto, esta membrana, como é parte da placenta será desligada de seu filho com o corte do cordão umbilical.

A sua autorização para utilizar a placenta, poderá beneficiar muitas crianças com cardiopatia congênita que morrem durante o período de tratamento.

O pesquisador responsável é o Dr. Julio Cesar Francisco, Farmacêutico, pesquisador da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e doutorando da Universidade Federal do Paraná, sob orientação da Prof^a. Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho.

À sua participação é voluntária e você não sofrerá qualquer punição ou perda caso venha desistir de participar da pesquisa. A sua identidade ficará guardado confidencialmente, sendo exposto por meio de código nas publicações.

A pesquisa está sendo realizado com a ajuda da Universidade Federal do Paraná e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela participação na pesquisa.

9.2 ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DOS KITS PARA MICROBIOLÓGICO.