ANDRÉ OLIVEIRA PAGGIARO

**Efeitos da radiação ionizante em membranas
amnióticas gliceroladas empregadas como substrato
ao cultivo de epitélio humano**

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

Programa de Cirurgia Plástica
Orientadora: Profa. Dra. Mônica Beatriz
Mathor

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Paggiaro, André Oliveira

Efeitos da radiação ionizante em membranas amnióticas gliceroladas empregadas como substrato ao cultivo de epitélio humano / André Oliveira Paggiaro. -- São Paulo, 2011.

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

Orientadora: Mônica Beatriz Mathor.

Descritores: 1.Âmnio 2.Radiação ionizante 3.Glicerol 4.Queratinócitos 5.Pele artificial 6.Membrana basal 7.Células cultivadas

USP/FM/DBD-014/11

Dedicatória

- À minha esposa Patrícia: sempre companheira, eterno amor, escolha certa, presença constante, fonte de inspiração, palavra reconfortante, olhar carinhoso e, agora também, co-orientadora paciente.
- Ao meus pais: pelo desprendimento em sempre priorizar a felicidade dos filhos. Pelos sacrifícios, palavras de apoio, incentivo ao estudo, amor incondicional e valores que moldaram a formação da pessoa que hoje sou.
- A minha irmã Cláudia pelo amor e carinho oferecido sempre.
- À minha Vó Cida que com certeza está ao meu lado, vibrando com este novo troféu, sorrindo orgulhosa e recompensada.

Agradecimentos

À Dra. Mônica Beatriz Mathor, orientadora deste trabalho e com postura científica impecável, a minha gratidão pela paciência, sinceridade e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira, pelo estímulo ao desenvolvimento da pesquisa, oportunidades oferecidas e confiança depositada.

À Dra. Walcy Rosólia Teodoro, pelo auxílio na realização deste trabalho e por oferecer o seu conhecimento sempre com um largo sorriso e palavras de apoio incondicional, essenciais ao meu crescimento científico e pessoal.

Ao Dr. César Isaac, grande amigo, sempre disposto a ajudar, se desdobrando para proporcionar condições ideais para a realização deste trabalho.

À Dra. Vera Luiza Capellozi, pela presteza em cooperar e ensinar sempre com muita atenção e simpatia.

À Silvana Altran e Renata Oliveira da Conceição, pela ajuda essencial na difícil “arte” do cultivo de células.

Ao Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas e seus funcionários: Eugênio Polo, Isabel Lopes Exposito e Catarina Viale, por fornecer matéria-prima à pesquisa e, o apoio e incentivo, ao autor dela.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) pela irradiação das membranas amnióticas.

À Agência Internacional de Energia Atômica pelo aporte financeiro para a realização dos estudos em microscopia eletrônica.

À Marilu Tasseto, pela revisão do vernáculo.

Aos funcionários do Laboratório de Investigação Médica (LIM 04) pelo empenho e atenção dispensados a mim.

À amiga Diana Pinheiro Cruz, pela amizade, companheirismo e paciência para me suportar nos últimos meses.

À amiga Viviane Fernandes de Carvalho, companheira em muitos projetos e fundamental para o meu aprimoramento científico, emprestando um pouco do seu conhecimento e clareza de idéias.

Às funcionárias Júlia L. Silvestre (Microscopia Eletrônica- INCOR) e Ana Lúcia Garippo (Microscopia Confocal- INCOR) pela solicitude e empenho para elaboração dos estudos histológicos em microscopia eletrônica.

Às funcionárias do setor de microscopia eletrônica, pelo empenho em garantir a melhor qualidade no preparo do material de estudo.

À funcionária da Pós-Graduação Gorette Steca Duarte, pela atenção dispensada.

À Cássia Arruda e às funcionárias do Laboratório de Patologia Clínica, grandes amigas, proporcionando sempre grandes risadas e momentos alegres em nossa convivência. Em especial, a excelente profissional Kelly Cristina Soares Bispo, pela imensaaaaa paciência com o material de análise e comigo, buscando sempre a melhor alternativa para garantir a qualidade do material para estudos histológicos.

Aos médicos assistentes, residentes, psicólogas, enfermagem e funcionários da Divisão de Cirurgia Plástica e Queimaduras do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela acolhida, amizade e estímulo.

À minha família, pelo apoio e paciência em minhas ausências.

À todos aqueles que foram importantes em minha formação para que hoje conseguisse atingir este objetivo.

As doadoras de tecidos (pele e âmnio), que com generosidade contribuíram para o desenvolvimento científico.

E finalmente, e mais importante, à Deus por permitir mais esta vitória.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. Revisão da literatura	10
3.1 Histologia e fisiologia do âmnio	10
3.2 Uso clínico do âmnio	14
3.3 Preservação amniótica: glicerolização	17
3.4 Esterilização amniótica	22
3.5 Substitutos cutâneos	27
4. Método	38
4.1 Triagem das doadoras	40
4.2 Processamento das membranas amnióticas	40
4.3 Padronização do método de desepitelização	42
4.3.1 Análise por microscopia óptica	43
4.3.2 Avaliação do método de desepitelização por microscopia eletrônica de transmissão	44
4.4 Padronização do método de irradiação	45
4.5 Estabelecimento dos grupos de estudo	47
4.6 Estudos comparativos entre as MA-ni e as MA-i	48
4.6.1 Avaliação qualitativa das características físicas	48
4.6.2 Estudos histológicos da membrana basal das MA-ni e MA-i após a desepitelização	48
4.6.2.1 Microscopia óptica	49
4.6.2.2 Imunofluorescência e microscopia confocal	49
4.6.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão	50
4.6.3 Capacidade de servir como suporte para a formação de epitélios humanos cultivados	51
4.6.3.1 Cultura primárias de queratinócitos	51
4.6.3.2 Culturas secundárias dos queratinócitos sobre as MA-ni e MA-i desepitelizadas – sistema imerso e interface ar-líquido	54
4.6.3.3 Microscopia óptica do composto dermoepidérmico	56
4.6.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão do composto dermoepidérmico	57
5. Resultados	59
5.1 Avaliação do processamento das membranas amnióticas em altas concentrações de glicerol (> 85%)	59
5.2 Padronização da desepitelização das MA-ni	61
5.2.1 Avaliação do método de desepitelização por microscopia eletrônica de transmissão	66
5.3 Padronização do método de irradiação	67
5.4 Estudos comparativos entre as MA-ni e as MA-i	74
5.4.1 Avaliação qualitativa das características físicas	74
5.4.2 Estudos da membrana basal das MA-ni e MA-i após a desepitelização	75
5.4.2.1 Microscopia óptica: hematoxilina-eosina	76
5.4.2.2 Imunofluorescência para colágeno IV e laminina	78
5.4.2.3 Microscopia confocal	80
5.4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão	81
5.4.3 Capacidade de servir como suporte para a proliferação de queratinócitos humanos	83
5.4.3.1 Cultura primárias de queratinócitos	83
5.4.3.2 Culturas secundárias dos queratinócitos sobre as membranas amnióticas irradiadas e não irradiadas desepitelizadas – sistema imerso e interface ar-líquido	84
5.4.3.3 Microscopia óptica dos compostos dermoepidérmicos	85
5.4.3.4 Microscopia eletrônica dos compostos dermoepidérmicos	93

6. Discussão.....	97
7. Conclusões	118
Anexos.....	121
Referências	124
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Representação histológica da membrana amniótica.....	11
Figura 2. Representação esquemática da membrana basal.....	12
Figura 3. Relação entre carga microbiológica x dose aplicada (kGy).	24
Figura 4. Captação da membrana amniótica	41
Figura 5. Processamento das membranas.....	42
Figura 6. Fontes de Cobalto-60.....	46
Figura 7. Aceleradores de elétrons	46
Figura 8. Isolamento enzimático de queratinócitos	52
Figura 9. Cultura de queratinócitos	53
Figura 10. Culturas secundárias de queratinócitos em bases amnióticas.....	56
Figura 11. Glicerolização e reidratação das membranas amnióticas.....	59
Figura 12. Membrana amniótica preservada em glicerol – microscopia óptica.....	60
Figura 13. Dispase a 0,04% por 45 minutos	61
Figura 14. Dispase a 0,04% por 30 minutos, seguida por tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos.....	62
Figura 15. EDTA 0,02% por 30 minutos seguido de fricção mecânica	63
Figura 16. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 45 minutos.....	64
Figura 17. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 30 minutos.....	64
Figura 18. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos.....	65
Figura 19. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos.....	65
Figura 20. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos- microscopia eletrônica	66
Figura 21. Membranas amnióticas irradiadas em acelerador de elétrons.....	68
Figura 22. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de cobalto 60	68
Figura 23. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de cobalto 60 desepitelizadas – microscopia óptica	69
Figura 24. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de aceleradores de elétrons desepitelizadas em 20 minutos- microscopia óptica	70
Figura 25. Desepitelização das MA-iAE por 28 minutos em solução enzimática	70
Figura 26. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de cobalto 60 desepitelizadas- microscopia eletrônica.....	71
Figura 27. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de aceleradores de elétrons desepitelizadas- microscopia eletrônica.....	73
Figura 28. Comparação macroscópica entre MA-ni e MA-i.....	75
Figura 29. MA-ni e MA-i desepitelizadas – microscopia óptica hematoxilina-eosina	76

Figura 30. Ma-ni e Ma-i desepitelizadas – microscopia óptica de luz polarizada (coloração Picrossirius).....	78
Figura 31. Imunofluorescência de MA-ni e MA-i para colágeno IV e laminina	80
Figura 32. Microscopia confocal das MA-ni e MA-i para colágeno IV e laminina:	81
Figura 33. MA-ni e MA-i desepitelizadas- microscopia eletrônica.	82
Figura 34. Cultura de queratinócitos.	84
Figura 35. 14 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-ni imerso	86
Figura 36. 14 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-ni interface ar-líquido	87
Figura 37. 21 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-ni imerso	87
Figura 38. 21 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-ni interface ar-líquido	88
Figura 39. 14 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i imerso	89
Figura 40. 14 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i interface ar-líquido	90
Figura 41. 21 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i imerso	90
Figura 42. 21 ^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i interface ar-líquido	91
Figura 43. Quadro comparativo entre as culturas de queratinócitos sobre os dois grupos de estudo nas situações imersa e na interface ar-líquido	92
Figura 44. 21 ^o dia de cultivo de queratinócitos sobre MA-ni em interface ar-líquido microscopia eletrônica	94
Figura 45. 21 ^o dia de cultivo de queratinócitos sobre MA-i em interface ar-líquido. microscopia eletrônica.....	95

Lista de abreviaturas

MA	membranas amnióticas
MA-ni	membranas amnióticas não irradiadas
MA-i	membranas amnióticas irradiadas.
et al.	e outros
DMSO	dimetilsulfóxido
ME	microscopia eletrônica
Ex	exemplo
SAL	nível de confiabilidade de esterilidade – sterilized assurance level
Log 10	logaritmo 10
D10	dose de esterilização para queda de 90% de patógenos
^{60}Co	cobalto 60
3T3	<i>feeder layer</i>
HE	hematoxilina-eosina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
MA-iC60	membranas amnióticas irradiadas em fontes de cobalto 60
MA-iAE	membranas amnióticas irradiadas em aceleradores de elétrons
UTD	unidade de tecido seco
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> – solução salina fosfato tamponado
FITC	fluoresceína isoticianato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
aum	aumento
V	volume
ed.	edição
suppl	suplemento
D14 i	14 ^o dia de cultivo situação imersa
D14 e	14 ^o dia de cultivo situação interface ar líquido
D21 i	21 ^o dia de cultivo situação imersa
D21 e	21 ^o dia de cultivo situação interface ar-líquido

Lista de símbolos

%	por cento
kGy	quilogray
μm	micrômetro
>	maior que
cm^2	centímetro quadrado
m^2	metro quadrado
U/L	unidades por litro
g/L	gramas por litro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
X	vezes
cm	centímetro
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mm^2	milímetro quadrado
céls/mL	células por mililitro
mM	milimolar
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
nM	nanomolar
ng/mL	nanograma por mililitro
UI/mL	unidade por mililitro
Gr/s	grays por segundo

Lista de siglas

BT-ICHC	Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EUA	Estados Unidos da América
LIM	Laboratório de Investigação Médica
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
AATB	American Association of Tissue Banking
EATB	European Association of Tissue Banking
ISO	International Standardization Organization
OMS	Organização Mundial da Saúde
Euro Skin Bank	Banco Nacional da Holanda

Resumo

Paggiaro AO. Efeitos da radiação ionizante em membranas amnióticas gliceroladas empregadas como substrato ao cultivo de epitélio humano [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 161p.

A membrana amniótica (MA) é considerada um biomaterial com propriedades biológicas benéficas ao processo de reparação tecidual, servindo ao tratamento de feridas e queimaduras. Recentemente, tem sido usada como substrato para a construção de substitutos cutâneos, possibilitando o cultivo de queratinócitos humanos. Contudo, por se tratar de um material biológico, com risco de transmissão de doenças infectocontagiosas, necessita ser conservado e esterilizado antes de seu uso clínico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da radiação ionizante sobre membranas amnióticas gliceroladas, com ênfase em sua compatibilidade ao cultivo de queratinócitos humanos. Quatro MA foram conservadas em altas concentrações de glicerol (>85%), sendo metade delas enviadas para radioesterilização a 25 kGy. Constituíram-se dois grupos de estudo: MA não irradiadas (MA-ni) e MA irradiadas (MA-i). Ambos os grupos foram submetidos a protocolo padronizado de desepitelização e avaliados por microscopia óptica (Hematoxilina-eosina e Picrossirius), imunofluorescência para colágeno IV e laminina e microscopia eletrônica. Posteriormente, foram cultivados queratinócitos humanos sobre as superfícies desepitelizadas das bases de MA-ni e MA-i em situação imersa e em interface ar-líquido. Foram comparados os resultados nos instantes 14 e 21 dias de cultivo, por microscopia óptica e eletrônica. As análises microscópicas, após a denudação epitelial, demonstraram que no grupo não irradiado a continuidade da membrana basal encontrava-se preservada, enquanto no grupo irradiado não existia nenhum indício de resquício da presença da membrana basal na superfície do material. O resultado das culturas de queratinócitos mostrou que no grupo não irradiado houve crescimento de um epitélio multiestratificado e diferenciado, inclusive com a formação de estrato córneo na situação de interface ar-líquido. No grupo irradiado, o epitélio formado era composto por duas a três camadas de estratificação e discreta diferenciação celular, com semelhanças entre o cultivo imerso ou em exposição ao ar. A MA glicerolada foi compatível ao crescimento de epitélios cultivados, demonstrando potencial ao uso como um possível substituto dermoepidérmico. A irradiação a 25 kGy provocou danos estruturais às MA, levando a alterações na membrana basal e facilitando a sua perda quando exposta ao protocolo de desepitelização. Esta perda pode explicar a diferença nos resultados do cultivo de queratinócitos em MA-i em relação ao MA-ni.

Descritores: âmnio, radiação ionizante, glicerol, queratinócitos, pele artificial, membrana basal, células cultivadas.

Summary

Paggiaro AO. Effects of ionizing radiation on glycerolated amniotic membranes as a substract for cultured human epithelium [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 161p.

The amniotic membrane (AM) is a biomaterial with biological properties that are beneficial to tissue repair. It has been used as a temporary coverage to threat burns and chronic wounds. Recently, it has been served as a substrate for keratinocytes culture to construct a living skin equivalent. However, MA is a biological material, and its transplantation could cause infectious disease for receptors. So, it must be preserved and sterilized before clinical use. The aim of this study was to evaluate the radiation effects on glycerol-preserved MA, considering its compatibility to support human keratinocytes culture. Four MA were stored in high concentrations of glycerol (> 85%) and half of them were radio sterilized with a dose of 25 kGy. Then, we established two groups: non-irradiated MA (MA-ni) and irradiated MA (MA-i). Both groups was de-epithelialized by a standardized protocol and was investigated morphologically, immunohistochemical and ultraestructural. Subsequently human keratinocytes were cultivated immersed and in air-liquid interface on denuded surface of MA-i and MA-ni. The results were compared at 14 and 21 days of culture by light and electron microscopy. After epithelial denudation, analyses demonstrated the continuity of the basement membrane in MA-ni group, whereas in the irradiated group, there was no indication of the basement membrane's presence on the surface of MA. The cell cultures showed that in the non-irradiated group, there was growth of a multi-layered and differentiated epithelium, with a stratum corneum's formation in air-liquid interface. In the irradiated group, the epithelium had only two or three layer, little cell differentiation, with the same results immersed or air-liquid interface system. Glycerol-preserved MA was biocompatible with the growth of a cultivated epithelium, showing its potential as a skin substitute. Irradiation at 25 kGy cause structural damage to the tissue, making changes in basement membrane, that facilitates its loss when exposed to the de-epithelialized protocol. The basement membrane's loss may explain the difference between the keratinocytes cultivation on MA-I and MA-ni.

Descriptors: amnion, ionizing radiation, glycerol, keratinocytes, skin artificial, basement membrane, cells cultured.

1. INTRODUÇÃO

---

1. Introdução

A perda extensa do revestimento cutâneo perdura como um grande desafio à Cirurgia Plástica Reconstructora. Em especial, os grandes queimados sofrem profundas alterações em sua homeostase devido a interrupção da continuidade da pele, fator que predispõe a infecções e perdas volêmicas importantes.

Os enxertos autógenos persistem como alternativa de escolha para o fechamento definitivo dessas áreas cruentas¹. Entretanto, se a área queimada acometer mais de 40% da superfície corpórea, depara-se com o problema da escassez de áreas doadoras de pele².

O desenvolvimento da expansão de enxertos autógenos sob a forma de malha (*mesh graft*), proposta por Tanner et al.³, solucionou parte dessa dificuldade. Todavia, além das críticas aos seus maus resultados estéticos, não soluciona casos em que as áreas cruentas são demasiadamente extensas.

NOTA: Esta tese foi revisada de acordo com os padrões ortográficos e gramaticais estabelecidos, respectivamente, pelo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de 1990, aprovado em 2008, conforme Decreto presidencial n. 6.584, de 29/09/2008, pelo *Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa*, 2009, e pela *Nova gramática do português contemporâneo*, de Celso Cunha e Lindley Cintra, edição de 2008.

O consenso sobre a importância do debridamento das escaras e oclusão precoce das feridas^{4, 5} no tratamento do grande queimado motivou o interesse científico pelo desenvolvimento de substitutos cutâneos temporários ou definitivos, tanto de origem biológica como sintética.

O incremento do conhecimento em Imunologia propiciou o desenvolvimento dos transplantes de tecidos alógenos, entre os quais destacam-se os enxertos de membranas amnióticas (MA), também conhecidas como âmnio, usados na forma de curativos biológicos para cobertura de queimaduras.

A MA é histologicamente muito semelhante ao tecido cutâneo, também se originando do ectoderma embrionário⁶. Quando aplicada à ferida, forma uma barreira contra a invasão bacteriana, reduz a perda de fluidos corpóreos e proteínas, diminui a dor e aporta fatores de crescimento e moduladores da cicatrização ao leito. Por conseguinte, restabelece condições ideais para que os processos de cicatrização endógenos progridam satisfatoriamente^{7, 8, 9}.

Os curativos de âmnio podem funcionar como verdadeiras matrizes de regeneração epitelial. As células do tecido produzem e liberam fatores de crescimento, que influenciam positivamente a proliferação e a migração de queratinócitos. Mesmo se a celularidade não estiver viável, a preservação da arquitetura proteica tridimensional parece servir como uma espécie de andaime à migração celular⁹.

Com a evolução das técnicas de cultivo celular associadas aos conceitos de bioengenharia de tecidos, Schwab (1999)¹⁰ descreveu o uso das MA como

um substrato ao cultivo de células límbicas, com o intuito de construir uma espécie de córnea artificial. O uso do âmnio como um biomaterial de suporte ao cultivo dessas células começou a ser utilizado para o tratamento de algumas patologias oftálmicas, como simbléfaro e pterígio, apresentando resultados clínicos favoráveis^{11, 12, 13}.

No que concerne ao revestimento cutâneo, os avanços biotecnológicos também estimularam o surgimento de substitutos biocompatíveis, associando o cultivo de queratinócitos sobre substratos dérmicos. Embora o cultivo das células esteja bem estabelecido com os protocolos descritos por Rheinwad e Green¹⁴, ainda não existe consenso sobre a matriz dérmica ideal de suporte.

Na literatura, existem relatos de diferentes tipos de biomateriais, tais como: colágeno, derme alógena, polímeros, etc^{15, 16, 17, 18}. Em virtude de todos os efeitos positivos da membrana amniótica no leito da ferida, esse tecido pode ser usado como derme símile, criando um novo tipo de composto dermoepidérmico. Em 2006, Yang et al.¹⁹ descreveram um equivalente cutâneo baseado na cultura de queratinócitos sobre membranas amnióticas criopreservadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 12%, dispostas sobre gel de colágeno tipo I povoado por fibroblastos. Em 2009, Yang et al.²⁰ aplicaram esse equivalente sem as bases colágenas em ratos atímicos, com boa integração dos enxertos.

Embora as possibilidades de uso das membranas amnióticas sejam profícuas, não se pode ignorar seus riscos. Sua principal desvantagem reside no fato de ser um material biológico, de origem humana, e consequentemente,

um potencial veículo transmissor de doenças infectocontagiosas. Para redução desse risco, foram criadas instituições denominadas Bancos de Tecidos²¹, que abrangem desde a captação até a distribuição dos tecidos, seguindo protocolos rígidos que asseguram qualidade e segurança ao receptor.

Rotineiramente, realiza-se uma triagem das doadoras com a investigação do histórico médico-social, de testes microbiológicos do tecido e de testes sorológicos para HIV, Hepatites B e C, HTLV, Sífilis e, em nosso meio, Doença de Chagas. Essas sorologias devem ser repetidas após 6 meses da doação, com o intuito de eliminar possíveis resultados falsos negativos pelas janelas biológicas^{22, 23, 24}.

O tempo necessário para cumprir todo esse protocolo limita o uso do âmnio em sua forma fresca, exigindo que o material seja submetido a algum processo de conservação para garantir sua viabilidade biológica, enquanto se aguardam os resultados finais de culturas e sorologias.

Diferentes métodos de preservação tecidual já foram descritos com sucesso^{25, 26}. No Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas (BT-ICHC) é adotada a técnica de preservação baseada em banhos seriados em altas concentrações de glicerol (>85%). Comparado a outros métodos, esse apresenta baixo custo, simplicidade técnica e, embora altamente tóxico às células, preserva a estrutura da matriz proteica²⁷.

Além disso, a glicerolação provoca um efeito sinérgico de descontaminação. As altas concentrações de glicerol são extremamente citotóxicas, provocando a inativação de alguns vírus e bactérias. Todavia, não

pode ser considerado um meio de esterilização, pois cepas bacterianas e virais já foram isoladas em tecidos mantidos por longo tempo em glicerol^{28, 29, 30, 31}.

Com o intuito de reduzir riscos, alguns Bancos de Tecido recomendam o uso de protocolos de irradiação complementar dos tecidos como forma de garantir a esterilidade do material^{32, 33}. A radiação ionizante apresenta grandes vantagens como alta penetrabilidade, grande eficiência de inativação de micro-organismos, quase não gera calor e possibilita a esterilização já em embalagem final, evitando a chance de recontaminação³³.

Contudo, a exposição à radiação não é completamente inerte aos tecidos biológicos. Algum tipo de alteração físico-química estrutural sempre pode ser identificada, principalmente quando se usam altas doses de radiação. Em 2004, Von Versen-Hoynck et al.²⁵ mostraram que a irradiação amniótica com dose de 32 kGy provoca degeneração vacuolar das células epiteliais e dissolução do tecido conectivo em camadas.

Apesar dessas alterações histológicas, o uso clínico das membranas irradiadas para tratamento de queimaduras e feridas mostra resultados semelhantes aos obtidos com as formas não irradiadas, promovendo a reepitelização das lesões^{34, 35}. Em relação à capacidade de servir como substrato ao cultivo celular pouco se conhece, já que a maior parte dos estudos nesse sentido foi realizada sobre o material apenas criopreservado.

Diante da necessidade do desenvolvimento de novos substitutos cutâneos para o tratamento de grandes perdas de tecido, propõe-se neste estudo a criação *in vitro* de um composto dermoepidérmico formado por queratinócitos

humanos cultivados sobre membranas amnióticas desepitelizadas e preservadas em altas concentrações de glicerol, sendo esse material radioesterilizado ou não.

Esta proposta põe em foco um material biocompatível (âmnio) de alta disponibilidade, baixo custo, pouca antigenicidade e com propriedades biológicas favoráveis à restauração tecidual⁹, preservado em um método simples, que permitiria o crescimento de epitélios cultivados tanto na forma imersa, quanto sobre a influência da interface ar-líquido.

Evidenciando uma preocupação cada vez mais premente de assegurar o fornecimento de biomateriais de alta qualidade e baixo risco, também se estudariam os efeitos da radioesterilização nas membranas amnióticas preservadas em glicerol, com ênfase na avaliação da sua capacidade de suporte ao crescimento celular, comparando a estratificação desses epitélios aos obtidos sobre âmnio não irradiado.

2. OBJETIVOS

---

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Comparar membranas amnióticas, preservadas em altas concentrações de glicerol, irradiadas (MA-i) e não irradiadas (MA-ni) quanto à capacidade de servir como suporte ao cultivo de epitélios humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o método de desepitelização das MA.
- Padronizar o processo de irradiação das MA.
- Avaliar qualitativamente as características físicas das membranas amnióticas irradiadas ou não.
- Avaliar as alterações microscópicas da membrana basal após a desepitelização das MA-ni e MA-i.
- Comparar a capacidade das Ma-ni e MA-i em sustentar a proliferação de queratinócitos humanos.
- Avaliar a influência da interface ar-líquido em ambos os grupos de estudo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

---

3. Revisão da literatura

3.1 Histologia e fisiologia do âmnio

O âmnio é a mais interna das membranas fetais, originando-se do citotrofoblasto subjacente à face dorsal do disco germinativo. Ao redor do sétimo ao oitavo dia de gestação, parte das células do trofoblasto se diferencia em células amniogênicas que darão origem à cavidade amnion. No início, essa cavidade é uma minúscula fenda entre o ectoderma e o trofoblasto, porém, pouco a pouco, ela se expande, de modo a conter o embrião em crescimento e revestir o cordão umbilical. Ao redor do segundo mês, o saco amniótico ocupa por inteiro a vesícula coriônica e, desse modo, o âmnio entra em contato direto com o cêion³⁶.

A espessura das MA varia entre 20 a 50 μm dependendo da quantidade de mucina e líquido presentes em sua estrutura. Histologicamente, a membrana (Figura 1) apresenta em sua arquitetura cinco camadas distintas^{37, 26}:

- a. Camada epitelial
- b. Membrana basal
- c. Camada compacta
- d. Camada de fibroblastos
- e. Camada esponjosa

Figura 1. Representação histológica da membrana amniótica: epitélio, membrana basal, camada compacta, camada de fibroblastos e camada esponjosa³⁸.

A camada epitelial é formada por uma monocamada composta por células cúbicas, citoplasma com abundantes vacúolos e núcleo bem nítido. Em microscopia eletrônica, pode-se observar na borda livre das células a existência de microvilosidades. Na base, existem extensões em pedículos em direção à membrana basal, formando os chamados podócitos. A ligação dessas células à membrana basal é realizada pelos hemidesmossomos e entre si pelos desmossomos³⁹.

A membrana basal apresenta ultraestrutura e bioquímica semelhante a outros epitélios, como a pele^{39,40}. Consiste em uma rede de fibras reticulares dos mais variados tamanhos, que se ligam às células através dos hemidesmossomos. Entre as fibras constituintes, temos a laminina, a fibronectina e o colágeno IV, VII e XVII⁴⁰.

Quando observamos a transição epitélio conjuntival em microscopia óptica, podemos afirmar que a membrana basal engloba a lâmina basal e as fibras de ancoragem de tecido conjuntivo. A lâmina basal (Figura 2) é uma estrutura visualizada apenas em microscopia eletrônica (ME), que compreende a lâmina lúcida e a lâmina densa⁴¹.

A lâmina lúcida está acima da lâmina densa e abaixo da membrana plasmática das células epiteliais. Apresenta aparência eletroluminescente em ME e caracteriza-se por numerosas estruturas finas que a atravessam perpendicularmente, ligando a região dos hemidesmossomos dos queratinócitos à lâmina densa. Essas estruturas são chamadas de filamentos de ancoragem, compostos principalmente por laminina, fibronectina e colágeno do tipo VII⁴².

Figura 2. Representação esquemática da membrana basal: observa-se na figura a relação entre as células epiteliais e a membrana basal. A membrana basal visualizada em microscopia eletrônica divide-se em lâmina lúcida e densa⁴³.

A lâmina densa (Figura 2) está entre a lâmina lúcida e as fibrilas de ancoragem do tecido conjuntivo e caracteriza-se pela aparência eletrodensa em ME. Apresenta-se como uma homogênea camada fina granular, onde são fixados os hemidesmossomos em toda a sua extensão. É composta em sua maioria por colágeno do tipo IV⁴². Abaixo da lâmina densa existem as chamadas fibrilas de ancoragem, principalmente representada pelo colágeno do tipo VII, que tem como principal função o reforço da fixação das células epiteliais ao tecido conjuntivo subjacente⁴¹.

A porção compacta é a mais densa e forte de todas as camadas amnióticas, sendo completamente despida de células e fortemente aderida à membrana basal³⁹. Abaixo dela, temos os fibroblastos, que, junto de raros macrófagos, ficam dispersos em uma rede de colágeno, sendo a mais fina de todas as camadas. Malak et al.⁴⁴ mostram que nessas duas camadas temos predomínio de colágeno do tipo I e III.

A mais externa das camadas é a esponjosa, responsável pela conexão do âmnio ao córion. É rica em mucina, podendo dobrar de tamanho pelo acúmulo de água e tornando possível a mobilidade entre âmnio e córion³⁶.

Durante o desenvolvimento do feto, a MA produz o líquido amniótico, que apresenta diversas funções para o desenvolvimento do embrião. A primeira delas é proteger o feto dos traumas e das alterações de pressão e temperatura. Além disso, permite também os movimentos ativos do feto, impede a formação de aderências, apresenta atividade antimicrobiana e, durante o parto, lubrifica o canal vaginal³⁶.

3.2 Uso clínico do âmnio

Os benefícios das MA não se restringem ao desenvolvimento fetal. Atualmente, esse tecido também tem sido encarado como um biomaterial com aplicação cirúrgica e considerado uma promissora alternativa para o reparo de lesões cutâneas, de mucosa ou da córnea⁴⁵.

Em 1910, Davis⁴⁶ relatou o primeiro uso de membranas fetais associado ao transplante de pele. Três anos depois, Sabella⁴⁷ descreveu o transplante de âmnio fresco, aderido ao córion, para cobertura de queimaduras e ulcerações. Naquele momento, buscava-se a descoberta de uma cobertura definitiva para a ferida, porém o material fresco e acompanhado do córion costumava ser rejeitado pelo organismo.

À parte a rejeição, percebeu-se que as MA provocavam uma redução da dor e da taxa de infecção das lesões. Em 1954, Douglas⁴⁸ descreveu o seu aproveitamento como uma cobertura temporária de queimaduras. Desde então, inúmeros são os relatos da sua utilização como curativo temporário para tratamento de queimaduras, com resultados bastante satisfatórios^{49, 50, 51}.

O âmnio possui a capacidade de promover diversos efeitos biológicos benéficos quando aplicado às áreas cruentas. Parece atuar como uma matriz regeneradora promovendo a reepitelização, reduzindo a dor, aderindo bem à ferida, produzindo efeito anti-inflamatório e antiangiogênico, além de apresentar propriedades antimicrobianas por formar uma barreira protetora. Outras

vantagens são sua alta disponibilidade e a facilidade de aceitação da doação pelas gestantes, podendo ser processado com baixos custos⁴⁵.

Os curativos de MA formam uma barreira protetora contra as bactérias ambientais. Embora o líquido amniótico contenha fatores com atividade antimicrobiana, como lisozina, transferrina, 7S-imunoglobulina, peroxidase e alantoína, não foram isoladas nenhuma dessas substâncias na membrana propriamente dita. Na realidade, o efeito antimicrobiano parece ocorrer devido ao íntimo contato com o leito, promovendo uma inibição bacteriana por contato. Ou ainda, por uma possível restauração da microcirculação, permitindo uma renovação acentuada de fagócitos e de fatores bacteriostáticos séricos⁹. Gajiwala et al.⁷ relatam que, em queimaduras profundas infectadas, o âmnio deve ser trocado repetidas vezes para evitar o acúmulo de coleções purulentas, sendo a transparência do material ideal para o controle da infecção.

Ao proteger as terminações nervosas, prevenir a invasão bacteriana, reduzir a inflamação local, manter a hidratação e, principalmente, reduzir o número de trocas de curativo, o âmnio proporciona uma ferida menos dolorosa. Ravishanker et al.⁵⁰ descrevem que as crianças acalmam-se logo em seguida à aplicação da membrana e os adultos afirmam que o alívio é significativo comparado aos curativos convencionais.

O âmnio é muito aderente quando deixado sobre a lesão, formando uma cobertura seca que gradualmente se destaca quando o novo epitélio se forma abaixo^{9, 49, 50}. Por esse motivo pode ser utilizado em regiões de contornos irregulares do corpo; como face e mãos^{7, 9}.

A capacidade de agir como uma matriz de regeneração epitelial deriva da produção e liberação de diversos fatores de crescimento pelas células amnióticas, como: Fator de Crescimento Epidérmico, Fator de Crescimento Transformador, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina, Fator de Crescimento do Hepatócito, Fator de Crescimento Neural e Fator de Crescimento Vascular Endotelial¹². Todas essas citocinas têm sido apontadas como mecanismos de influência positiva sobre o crescimento das células epiteliais^{6, 52}. Mesmo quando o método de preservação do tecido destrói sua celularidade, a manutenção da sua arquitetura proteica tridimensional parece servir como um arcabouço para a proliferação e migração de queratinócitos⁹.

Quinby et al.⁵³ utilizaram o âmnio como cobertura cutânea temporária em quatro grupos com situações clínicas distintas: em curativos de áreas doadoras de enxertos autólogos; em queimaduras de segundo grau; no preparo do leito receptor para posterior enxertia autóloga; e em feridas contaminadas. Nos dois primeiros, houve uma reepitelização semelhante a outros curativos convencionais, mas com acentuada redução da dor. Como mecanismo de preparo da ferida, comprovou-se que a taxa de integração dos enxertos beirou 95% de sucesso. Já nas feridas contaminadas, com o auxílio de culturas quantitativas seriadas, verificou-se a redução da contagem bacteriana.

Ravishanker et al.⁵⁰ utilizaram MA gliceroladas no tratamento de 71 pacientes com queimaduras de segundo grau, avaliando alguns critérios: dor, efeito protetor a infecção, facilidade de aplicação, tempo de reepitelização e custo. Em todos esses critérios, os resultados obtidos foram excelentes,

especialmente pelo baixo tempo necessário para reepitelização (7 a 10 dias), redução da dor e baixo custo.

Em relação à antigenicidade do transplante de âmnio alógeno foram descritos achados conflitantes na literatura. Douglas et al.⁴⁸ notaram que a aplicação do âmnio associado ao córion ocasionava um processo de penetração vascular na membrana, com a presença de um infiltrado inflamatório. Dessa forma, o córion seria uma estrutura antigênica, estimulando uma rejeição ao curativo. Contudo, quando a aplicação incide com a face epitelial do âmnio voltada à ferida, a invasão vascular deixa de ocorrer, indicando a pouca antigenicidade da MA isolada.

3.3 Preservação amniótica: glicerolização

Por se tratar de um material biológico humano, o transplante amniótico alógeno apresenta potencial risco de transmissão de doenças ao receptor. Para contornar esse problema foram criados protocolos internacionais de triagem e captação dos tecidos, seguindo regras rígidas de seleção. Estas normatizações exigem maior tempo de conservação do material até que todas as etapas de avaliação estejam cumpridas. O uso na forma fresca torna-se inviável, em razão da pouca durabilidade biológica do tecido, exigindo a utilização de métodos de preservação que permitam sua estocagem a longo prazo.

Diversas formas de conservação das MA já foram testadas com sucesso, entretanto, quase todas com alto custo e grandes dificuldades técnicas. De

acordo com a viabilidade celular residual, os tipos de preservação podem ser classificados em dois grupos: um primeiro que mantém a viabilidade celular, sendo representada principalmente pela criopreservação^{54, 55}, e outro em que não há células viáveis, porém a arquitetura tecidual permanece íntegra, exemplificada pela liofilização⁵⁶ e pela impregnação em altas concentrações de glicerol⁹.

Em razão do baixo custo e da simplicidade técnica, esta última é a técnica de escolha do BT-ICHC para conservação de pele humana⁵⁷. O glicerol é um poliálcool presente em vários tecidos animais, sendo inclusive produzido no trato gastrointestinal pela hidrólise de lípidos⁵⁸. Hoekstra et al.²⁷ relatam que essa substância foi isolada por Scheele em 1779, e, em 1823, Chevreuil manufacturou a primeira patente do glicerol diluído a 85% (glicerina). Nessa concentração, a solução apresenta aspecto licoroso, quase transparente e higroscópio, sendo útil à indústria farmacêutica como solvente.

Em 1971, Pigossi et al.⁵⁹ descreveram o uso de dura-máter armazenada em glicerol com concentração de 98% em cirurgias reconstrutoras de assoalho pélvico, parede abdominal e neurocirurgia. Observaram também, por meio de estudos microbiológicos, a existência de possíveis efeitos antimicrobianos da glicerina.

Juntamente com o DMSO, o glicerol é um conhecido crioprotetor empregado em laboratório para o congelamento celular. Apesar de sua toxicidade, quando usado em baixas concentrações (5 a 15%), acaba por reduzir a formação de cristais intracelulares durante o processo gradual de

congelamento⁶⁰. Já em relação à preservação tecidual, imaginava-se que as altas concentrações de glicerol conservavam o tecido por meio do processo de desidratação com saída de água, porém recentes estudos mostraram que na realidade ocorre o inverso, é o álcool que penetra o tecido e sequestra a água⁶¹.

Em 1982, Basile⁶² descreveu a glicerolação de pele porcina para aplicação desses xenoenxertos como curativos biológicos temporários no tratamento de queimaduras. Em 1984, o Banco Nacional da Holanda (Euro Skin Bank) adotou a glicerolação como método de escolha para conservação dos enxertos de pele humana. A partir desse momento, esse Banco começou a distribuir aloenxertos conservados em glicerol aos centros de queimadura de toda a Europa²⁷.

Em nosso meio, em 2007, Cunha et al.⁶³ utilizaram com sucesso o glicerol para conservar veias e utilizá-las como tubos para o estímulo da regeneração nervosa em ratos. Também em modelo murino, Lemos et al.⁶⁴ compararam nervos conservados em glicerol, enxertos autógenos neurais e veias gliceroladas como condutores para o estímulo da regeneração nervosa. Os dois grupos que usaram material glicerolado evidenciaram menor taxa de formação de neuromas.

Com relação ao tecido amniótico, a glicerolação foi empregada para a conservação desse material. Maral et al.⁴⁹ demonstraram que o uso de âmnio glicerolado apresenta resultados semelhantes ao fresco quanto à capacidade de estimular a reepitelização de feridas em ratos. Ravishanker et al.⁵⁰ defendem a criação de bancos de âmnio glicerolados, pois se trata de um curativo

biológico barato com resultados clínicos eficientes e comparáveis a outros substitutos dérmicos existentes.

Outra vantagem conquistada pela impregnação de tecido no glicerol parece ser a redução da sua carga antigênica. Em estudos com pele alógena glicerolada, percebe-se que com a eliminação do componente celular há uma interrupção do processo de rejeição iniciado por células T⁶⁵. Na verdade, resta apenas a formação de um processo inflamatório mediado por monócitos, muito mais lento em sua capacidade de destruir o aloenxerto, propiciando que em pacientes imunossuprimidos, a estrutura proteica seja invadida por células autógenas e acabe parcialmente incorporada ao indivíduo⁶⁶.

O tecido amniótico é muito menos antigênico que a pele quando transplantado sem o córion. As células epiteliais amnióticas não expressam antígenos de membrana do tipo HLA -A, -B, -C e -DR.^{67,68} Desse modo, o processo de rejeição dos aloenxertos amnióticos glicerolados pode ser considerado ínfimo.

Quanto ao efeito antimicrobiano, mesmo após meses de incubação de tecidos em solução concentrada de glicerol, foi possível o isolamento de alguns tipos de vírus ou bactérias^{28, 30}. Foi verificado o crescimento de bactérias como *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus sanguis* e *Bacillus sp* em peles gliceroladas sem outro método de esterilização. Estudos mostram que o glicerol é capaz de inativar o vírus do HIV tipo I⁶⁹, entretanto, o mesmo não pode ser afirmado sobre o vírus da hepatite, em razão de os resultados não serem conclusivos³¹.

Na verdade, a glicerolação²⁶ provoca o que se chama de desinfecção, que geralmente é menos letal do que a esterilização e, na prática, é um processo que reduz o número de micro-organismos, sendo seu objetivo apenas evitar a disseminação de agentes patogênicos. A desinfecção inativa virtualmente todos os micro-organismos patogênicos reconhecidos, mas não necessariamente as formas microbianas vegetativas (ex: formas esporuladas) em objetos inanimados⁷⁰.

A efetividade da desinfecção depende de alguns fatores tais como: natureza e número de micro-organismos contaminantes; concentração do agente químico aplicado; tempo de exposição ao agente químico; quantidade de matéria orgânica presente; tipo e condição do material a ser desinfetado e temperatura⁷⁰.

Apesar dos relatos de diversos autores sobre o efeito antimicrobiano da glicerolação, na verdade, ela apenas reduz o nível de contaminação microbiana^{29, 49, 59}. Esse método só pode ser considerado como um meio de conservação de tecidos com poder descontaminante, necessitando de um mecanismo complementar de esterilização para garantir a inativação de todo tipo de micro-organismo.

3.4 Esterilização amniótica

A preocupação com a transmissão de doenças no transplante de aloenxertos deve-se aos inúmeros relatos de contaminação em receptores. Em 1998, Kuehnert et al.⁷¹ descreveram um caso de endocardite e fungemia após uma troca de valva aórtica com material alógeno contaminado por *Candida Albicans*. Em 2004, Kainer et al.⁷² notificaram a morte de um homem por septicemia pela bactéria *Clostridium sordelli*, transmitida pelo transplante de um aloenxerto músculoesquelético contaminado. O primeiro caso de transmissão do vírus HIV por um aloenxerto ósseo ocorreu em 1988, e até o ano de 2001, segundo Lee et al.⁷³, oito casos de contaminação por HIV em transplante ósseo foram notificados.

As normatizações europeias e americanas de controle do transplante de tecidos alógenos recomendam que qualquer tecido disponibilizado para uso clínico obrigatoriamente seja submetido a algum tipo de procedimento de esterilização validado^{22, 23, 24}.

No Brasil, os métodos químicos são proibidos pela Anvisa em razão dos riscos de resíduos tóxicos cancerígenos no material, sendo permitido apenas a utilização do calor úmido e radioesterilização²¹. Contudo, o calor úmido provoca excessiva destruição proteica tecidual, tornando a radioesterilização o principal meio de esterilização disponível no país.

Esterilização é o ato ou processo, físico ou químico, que destrói ou elimina todas as formas de vida, especialmente de micro-organismos. Entretanto, essa

definição é extremamente questionável, pois vírus não são considerados propriamente seres vivos; e os príons proteicos são ainda mais complexos de se encaixar nessa definição. Portanto, o mais adequado é o uso do termo inativação de agentes patogênicos ou não⁷⁴.

A carga microbiológica (*bioburden*) refere-se à população de micro-organismos viáveis, presentes ou no interior, de um material ou produto previamente à esterilização. A contaminação inicial de tecidos humanos tende a ser diferente de um doador para outro, e os tipos de micro-organismos e sua distribuição podem estar não uniformemente difundidos em sua superfície³⁵.

As densidades de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e esporos de bactérias tendem a ser razoavelmente baixas, com exceção do intestino e da pele. A contagem de eventuais príons patogênicos ou vírus, como HIV, vírus da hepatite B ou C, CMV, torna-se mais complicada. Nesses casos, o *bioburden* pode ser muito maior, pois doadores contaminados podem levar de 10^3 a 10^6 vírions por mililitro de sangue³⁵.

Qualquer procedimento de esterilização deve reduzir o número de agentes patogênicos a um determinado nível de segurança de esterilidade (SAL). A cinética de inativação é de caráter exponencial, o que significa que alguns agentes patogênicos podem permanecer ativos independentemente do grau de tratamento aplicado. Esse declínio exponencial geralmente é convertido em uma relação linear pelo logaritmo 10 ($\log_{10}$) de *bioburden*, e depois o valor de redução decimal (D10) pode ser calculado (Figura 3). O valor de D10 é a dose

de esterilização necessária para reduzir o *bioburden* por 1 log 10, ou seja, para inativar 90% dos agentes⁷⁵.

Figura 3. Relação entre carga microbiológica x dose aplicada (kGy): relação da queda exponencial do logaritmo de micro-organismos com aumento da dose aplicada.

Sabendo-se o valor de D10 contra o agente patogênico mais resistente presente nos espécimes, pode-se calcular quantos valores de D10 são exigidos para reduzir o *bioburden* para o nível de SAL adequado. Em geral, considera-se o valor de 10^{-6} como um valor padrão de SAL seguro para garantir esterilidade de tecidos⁷⁰.

Se a carga microbiológica inicial for extremamente alta, nenhum método de esterilização consegue atingir um SAL de 10^{-6} padrão. Assim, a garantia de esterilidade de um tecido inicia-se pela seleção do doador com uma revisão da sua história social e médica, exame físico do indivíduo, testes sorológicos e resultados de culturas. Esses fatores são ainda mais relevantes, se

considerarmos que vírus e príons são extremamente resistentes a qualquer procedimento de esterilização, incluindo a radiação. Caso seja identificado um doador de alto risco, o material coletado deve ser descartado antes do próprio processamento⁷⁶.

A forma de processamento tecidual também interfere no resultado final de esterilização. Algumas formas de conservação, como a glicerolização, reduzem a carga inicial de micro-organismos e, conseqüentemente, a exposição ao agente esterilizante pode ser menos prolongada⁵⁹.

Os processos de esterilização podem ser divididos em três grupos: químicos, térmicos e não térmicos⁷⁷.

Os métodos químicos consistem em expor o objeto a algumas substâncias que são capazes de inativar os micro-organismos, incluindo bactérias, esporos e vírus. Entre essas substâncias destacam-se: óxido de etileno (EtO), ácido paracético, álcool 70% etc. Todavia, esses esterilizantes são tóxicos à saúde pois têm potencial carcinogênico, exigindo sua completa remoção antes do uso em humanos. A retirada completa é quase impossível, principalmente em estruturas porosas, inviabilizando a disponibilização desse tipo de esterilização para tecidos humanos⁷⁴. Os mecanismos térmicos são considerados eficazes, porém não são rotineiramente utilizados, porque as altas temperaturas desnaturam proteínas essenciais da estrutura tecidual⁷⁸.

O principal destaque dos métodos não térmicos é a irradiação. A radioesterilização é considerada um método com pouco aumento de temperatura, boa penetrabilidade e alta eficácia na inativação de micro-

organismos. Permite ainda a esterilização com o tecido embalado, evitando a recontaminação durante a reembalagem. Além disso, não deixa resíduos, não libera gases poluentes e não transforma os materiais em produtos radioativos⁷⁷.

Na prática, para a esterilização de tecidos, há duas fontes básicas de radiação: as fontes de raio gama por ^{60}Co (Gammacell) e os aceleradores de elétrons⁷⁸.

As fontes de raio gama produzem ondas eletromagnéticas obtidas pela desintegração do ^{60}Co . Como qualquer átomo instável, o ^{60}Co tende a se estabilizar e, desse modo, libera energia na forma de uma partícula beta e dois raios gama, que agem sobre o material a ser esterilizado⁷⁹.

Um acelerador de partículas pode ser definido como um equipamento que aplica forças a partículas carregadas por meio de alguma combinação de campos elétrico e magnético, gerando íons de alta velocidade e alta energia cinética. Quando se estabelece um potencial de alta tensão entre o cátodo e o ânodo, no vácuo, o cátodo emite feixe de elétrons, chamados raios catódicos ou feixes eletrônicos. Segue o mesmo princípio do tubo de televisão, no qual a diferença fundamental é que este utiliza potenciais de aceleração de aproximadamente 25 mil volts, enquanto o acelerador de partículas atinge uma carga da ordem de milhões de volts⁷⁹.

As radiações ionizantes agem por mecanismos diretos, através da quebra de reações químicas importantes de moléculas como o DNA, provocando danos estruturais, inibição da sua síntese, produção de

erros na síntese de proteínas e determinando a morte celular dos micro-organismos. Também atuam de forma indireta, produzindo radicais livres e moléculas reativas que atacam quimicamente as células⁷⁸.

No entanto, a irradiação não causa danos exclusivos às células patogênicas. Dependendo da dose utilizada, causa alterações nos tecidos, acarretando modificações físico-químicas na arquitetura dos aloenxertos, as quais interferem nas suas propriedades biológicas. A seleção de uma dose de radiação deve ser um balanço entre uma dose alta o suficiente para inativar todos os patógenos e baixa para preservar as propriedades biológicas dos enxertos⁷⁸.

3.5 Substitutos cutâneos

Os substitutos cutâneos são um grupo heterogêneo de materiais que permitem a oclusão temporária ou permanente de algumas feridas, dependendo das características do leito e do produto utilizado. Constituem alternativas para o tratamento de situações clínicas, em que o uso clássico da enxertia autógena se mostra ineficaz ou insuficiente para a resolução de lesões do revestimento cutâneo⁷⁹.

Esses produtos são opções de cobertura rápida e eficiente, que permitem uma reconstrução em um leito não tão bem vascularizado, modulando o processo de reparação tecidual, com redução de resposta inflamatória e, conseqüentemente, reduzindo o risco de formação de cicatrizes hipertróficas⁷⁹.

Podem ser originados a partir de materiais biológicos como tecidos animais ou humanos, ou criados por meio de compostos químicos em laboratório (sintéticos). Recentemente, uma nova classe tem sido criada pela junção de componentes químicos associados a elementos celulares cultivados *in vitro*, constituindo os chamados materiais biossintéticos⁸⁰.

Para que um substituto seja considerado ideal, deve possuir algumas propriedades fundamentais: facilidade de preparo, armazenamento e uso, capacidade de resistir a situações de infecção e hipóxia no leito da ferida, biocompatibilidade, baixo custo, grande disponibilidade, flexibilidade, baixa antigenicidade, estabilidade como cobertura permanente, capacidade de recriar componentes epidérmicos e dérmicos, apresentar resistência semelhante à da pele normal e completa ausência de risco ao indivíduo receptor⁷⁹.

Infelizmente, até o presente momento, não há nenhum equivalente cutâneo considerado perfeito e, por isso, cientistas continuam suas pesquisas para alcançar tal objetivo⁷⁹.

Segundo Carver e Leigh (1992), desde 1500 a.C., os xenoenxertos cutâneos já eram conhecidos para oclusão de feridas, inclusive com relatos da utilização de pele de rã misturada a óleo quente para oclusão de ferimentos⁸¹. No século XX, outros animais foram testados como doadores cutâneos, obtendo-se resultados clínicos bastante favoráveis com a pele de suínos, conforme demonstraram Bromberg et al. em 1965⁸².

Ainda hoje, os enxertos porcinos são indicados para a cobertura de queimaduras de segundo grau, já que reduzem a dor, estimulam a reparação

tecidual e retardam a evaporação. Todavia, nas queimaduras de terceiro grau debridadas, esses enxertos acarretam um preparo do leito da ferida de pior qualidade em comparação aos alógenos⁷⁹.

Segundo Shuck et al.⁸³, o primeiro relato de transplante alógeno de pele humana foi realizado por Gidner em 1881. Objetivando o tratamento de pacientes queimados, a pele de um cadáver foi colocada sobre as feridas de uma vítima de trauma elétrico causado por raio.

No período da Segunda Guerra Mundial (1939-1945), Brown e MacDowell defenderam que a pele alógena poderia servir como curativo temporário em queimados. Os aloenxertos preveniam o ressecamento, diminuía as perdas evaporativas e de calor, reduziam a dor, limitavam o crescimento bacteriano e melhoravam a qualidade do tecido de granulação⁸⁴.

Entretanto, notaram também que a sobrevivência do tecido no leito durava somente entre três a dez semanas. Segundo Gallico, esse fenômeno foi esclarecido pelos trabalhos de Gibson e Medawar (1943), que demonstraram as distinções entre a integração dos autoenxertos e os aloenxertos, definindo conceitos de rejeição e introduzindo a Imunologia moderna⁸⁵. Logo, estabeleceu-se o uso clínico dos aloenxertos como substitutos cutâneos temporários.

Com o aumento da demanda por homoenxertos para tratamento de queimados, surgiram os primeiros bancos de pele, que desenvolveram protocolos para preservação tecidual, permitindo o seu armazenamento por longos períodos. Dentre os principais métodos de preservação desenvolvidos,

têm-se a criopreservação, a liofilização e a exposição ao glicerol em altas concentrações⁸⁶.

Seguindo a tendência da oclusão temporária da ferida por tecidos biológicos, a membrana amniótica também começou a ser empregada pelos grandes centros de queimaduras. O âmnio possui muito das características da pele humana, podendo funcionar como barreira e restabelecendo as condições ideais para que os processos de cicatrização progridam satisfatoriamente⁷.

No entanto, na década de 1980, com o aumento das infecções virais, em especial HIV e hepatites, e o risco dos aloenxertos veicularem estas doenças, houve uma inibição da demanda por tecidos biológicos e se iniciou o desenvolvimento dos curativos bio sintéticos, combinando materiais de origem animal ou vegetal a elementos sintéticos.

Nessa fase, os curativos deixaram de ser vistos apenas como meras barreiras de proteção e assumiram um papel importante na modulação do processo de reparação tecidual. Essa nova visão incentivou a busca por materiais, que, quando aplicados sobre a ferida, modificassem o microambiente das lesões, estimulassem o processo de cicatrização e, se possível, se integrassem ao leito, reconstituindo a pele lesada⁸⁷.

Em 1983, Burke descreveu um substituto cutâneo sintético acelular, composto por uma matriz bilaminada de colágeno bovino e condroitina-6-sulfato (análogo dérmico) recoberta por uma lâmina plástica (análogo epidérmico), que controla a perda de fluidos e reduz a invasão bacteriana. A matriz possui uma porosidade entre 20 e 50 micrômetros, permitindo a invasão de fibroblastos e

de capilares advindos do leito receptor e possibilitando a reparação dérmica. Depois disso, a lâmina plástica pode ser retirada, colocando-se um fino enxerto autógeno para cobertura definitiva. Este produto é comercializado até hoje com o nome de Integra®, porém seu alto custo é um empecilho para seu uso indiscriminado⁸⁷.

Outro grande avanço aconteceu com a obtenção *in vitro* de epitélios de queratinócitos cultivados passíveis de transplante como substitutos cutâneos. Desde 1910, Carrel e Burrows⁸⁸ identificaram a capacidade dos queratinócitos de proliferar centripetamente a partir de fragmentos de pele aderidos a um frasco de cultura, chamada de explante. Contudo, o baixo rendimento celular desencorajou a disseminação dessa técnica.

No final da década de 1970, Reinwald e Green¹⁴ descreveram protocolo de cultura de queratinócitos em que a pele é digerida por enzimas proteolíticas, que degradam as proteínas de adesão celular e liberam uma suspensão de queratinócitos. Essas células se reproduzem em frascos de cultura em uma camada única de fibroblastos murinos letalmente irradiados (3T3-*feeder-layer*). De uma área de pele de cerca de 2 cm² pode-se obter uma lâmina estável de 1 m².

Alguns autores questionavam o risco de desenvolvimento de respostas antigênicas aos resíduos proteicos dos fibroblastos, acarretando perdas tardias desses enxertos após o transplante dos epitélios. Para contornar essa questão, propôs-se o cultivo de queratinócitos semeados em alta densidade, eliminando-se a necessidade do *feeder-layer*^{89, 90}.

Em 1981, O'Connor⁹¹ relatou a primeira utilização clínica dos epitélios autólogos cultivados, em queimaduras, porém 50% dos enxertos foram perdidos por infecção local⁸⁹. Em 1984, Gallico et al.⁹², utilizando epitélios autólogos cultivados, conseguiram salvar duas crianças com queimaduras que abrangiam 97% e 98% de superfície corpórea, sendo a maior parte de terceiro grau.

Porém, o uso clínico de epitélios cultivados apresentou alguns problemas. Trata-se de estrutura extremamente frágil, requerendo habilidade para manuseá-los. As células exigem um leito receptor em ótimas condições, pois em caso de contaminação há risco de grande perda dos enxertos. Além disso, a estrutura da nova pele no receptor permanece instável principalmente nos primeiros anos de transplante. Isso se deve à ausência de ondulações dérmicas e à reestruturação tardia da membrana basal. Por causa disso, os pacientes costumam evoluir com ulcerações graves e dolorosas nos primeiros anos do tratamento⁹³.

Para contornar essas dificuldades, a comunidade científica voltou seu foco para a busca de substratos de sustentação ao cultivo de queratinócitos. Essas estruturas deveriam simular a função de derme e proporcionar a formação de epitélios mais organizados e com maior resistência a traumas em decorrência da formação de uma nova junção dermoepidérmica.

Em 1979, Bell et al.¹⁵ cultivaram queratinócitos sobre bases de colágeno povoadas por fibroblastos e identificaram a formação de um epitélio estratificado, construindo um substituto dermoepidérmico *in vitro*.

Em 2007, Paggiaro et al.¹⁶ realizaram modelo semelhante com exposição à interface ar-líquido, obtendo epitélios com boa estratificação. Os resultados indicaram que os queratinócitos aumentam a contração das matrizes colágenas em comparação aos sistemas contendo apenas gel colágeno com fibroblastos.

Seguindo os preceitos de Bell et al.¹⁵, atualmente nos EUA, comercializa-se um substituto cutâneo conhecido como Apligraf®. Consiste em estrutura bilaminar, formada por gel de colágeno bovino do tipo I povoado por fibroblastos neonatais vivos, e, sobre ele, uma camada de células epiteliais (queratinócitos neonatais)⁸⁷.

Peles alógenas, com diferentes tipos de preservação, foram testadas como suporte dérmico para o cultivo celular. Em 1996, Medalie et al.⁹⁴ utilizaram os tecidos criopreservados e decelularizados para o crescimento de epitélios cultivados e descobriram que após o implante em ratos foi possível identificar revascularização da derme humana.

Em nosso meio, em 2001, Herson et al.^{17, 95} cultivaram queratinócitos sobre bases dérmicas alógenas preparadas previamente em altas concentrações de glicerol, seguindo os protocolos do Euro Skin Bank. O epitélio apresentou multiestratificação e verificou-se a formação de uma membrana basal rudimentar, principalmente no grupo em que houve exposição ao ar.

Em 1993, Hansborough et al.¹⁸ produziram um substituto cutâneo com fibroblastos humanos repovoando uma malha biodegradável de ácido polivinilglicólico. Depois do posicionamento sobre o leito da ferida, esses fibroblastos secretam fatores de crescimento, os quais recrutam a chegada de

células fibrovasculares para formação de um novo tecido local, enquanto o composto é reabsorvido pelo organismo. Esse material é vendido comercialmente com o nome de Dermagraft®⁸⁷.

Em 1994, Kaiser et al.⁹⁶ descreveram protocolo de cultura de queratinócitos autólogos sobre uma suspensão gel de fibrina. Este gel permitia que os epitélios fossem manipulados com maior facilidade, evitando o risco de rompimento. Estes experimentos foram repetidos com sucesso em nosso meio por Tanikawa et al. em 2004⁹⁷.

Recentemente, descobriu-se que o âmnio tem a capacidade de servir como suporte para o cultivo de células humanas⁴⁵. Nesse sentido, os primeiros usos do âmnio como base ao cultivo celular ocorreram no campo oftalmológico. Em 1999, Schwab descreveu estudo clínico em que células límbicas eram cultivadas sobre diferentes carreadores de células e aplicou em pacientes com lesões de córnea. Identificou que o âmnio denudado apresentava os melhores resultados de restauração corneana¹⁰.

Baseados nos achados de Schwab¹⁰, diversos autores começaram a realizar o cultivo de células límbicas sobre membranas amnióticas frescas, criopreservadas e liofilizadas com sucesso na formação de um epitélio^{98, 99, 100}.

Em 2006, Ahn et al.¹⁰¹ descreveram um substituto de mucosa que consistia no cultivo de queratinócitos bucais sobre membranas amnióticas liofilizadas. Esses substitutos eram posicionados sobre retalhos musculares do grande dorsal de coelhos e usados para reconstrução de defeitos confeccionados na mucosa oral dos animais. A integração dos equivalentes ao

músculo era excelente, demonstrando seu potencial para o uso em cirurgias reconstrutoras de tumor de cabeça e pescoço.

Considerando os efeitos positivos do âmnio nas queimaduras e feridas e sua capacidade de servir como substrato ao cultivo celular, as membranas tornaram-se candidatas naturais a funcionarem como derme símile para a construção de novos substitutos cutâneos.

Em 2006, Yang et al.¹⁹ propuseram a criação de um novo substituto dermoepidérmico em que os queratinócitos eram cultivados sobre membranas amnióticas criopreservadas e denudadas de seu epitélio, que por sua vez eram apostas sobre matrizes colágenas povoadas por fibroblastos. A vantagem da adição das membranas desepitelizadas, residia no fato de que a sua membrana basal estava preservada e auxiliava na formação de um epitélio mais bem organizado e estratificado e com maior resistência a traumas.

Em 2008, Wilshaw et al.¹⁰² demonstraram que o âmnio, decelularizado e esterilizado pela exposição ao ácido paracético, era biocompatível à adesão e à proliferação de queratinócitos e fibroblastos humanos.

Em 2009, novos experimentos de Yang²⁰ relatam 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, 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 migravam para o âmnio e formavam um novo tipo de equivalente cutâneo.

4. MÉTODO

---

4. Método

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microcirurgia e Cirurgia Plástica (LIM 04) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sendo aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 1 de setembro de 2008, sob o n. 0309/08.

As membranas amnióticas (MA) foram cedidas pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas (BT-ICHC). A irradiação do material aconteceu no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e os experimentos de avaliação da membrana basal, no Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia (LIM 17) da FMUSP.

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

Fluxograma de trabalho

n= número de lotes de membranas amnióticas usados por experimento.

x= número de lotes provenientes de cada membrana amniótica.

N= número de doadoras de pele para isolamento de queratinócitos.

4.1 Triagem das doadoras

O BT-ICHC cedeu quatro membranas amnióticas provenientes de doações voluntárias que preenchiam os seguintes critérios: gestantes jovens (20-35 anos), com gestações sem intercorrências, pós-partos de cesarianas com conceitos normais, sem antecedentes médico-sociais que contraindicassem a doação e que fossem confirmadas como sorologicamente negativas para contato com HIV, Hepatite B e C, HTLV, Doença de Chagas, Sífilis, CMV e Toxoplasmose no momento do parto, e após 6 meses, para HIV e Hepatite B e C.

4.2 Processamento das membranas amnióticas

Ainda em centro cirúrgico, após a dequitação placentária, coletaram-se as MA de forma estéril. A obtenção do tecido foi realizada por uma manobra digitiforme capaz de separá-lo do córion (Figura 4-A). Transportou-se o material ao laboratório (LIM 04) e, a partir desse instante, todo o manuseio ocorreu dentro da proteção do fluxo laminar. O âmnio foi lavado e limpo com soro fisiológico (Figura 4-B), sendo coletadas por *swab* amostras para provas microbiológicas. A seguir, depositou-se o material em solução salina com antibióticos (penicilina cristalina – 1.000.000 U/L e sulfato de estreptomicina – 1g/L) por 6 horas a 4° C.

Figura 4. Captação da membrana amniótica: A - Manobra digitiforme de separação do âmnio do córion. B – Lavagem exaustiva do material para retirada de resíduos de sangue e córion.

Removidos os resíduos remanescentes, as membranas foram expostas a uma solução de glicerol de concentração >85% (Figura 5-A), com antibióticos semelhantes aos da solução salina, sendo mantidas sob agitação a 37 °C durante duas horas. Transcorrido esse intervalo, efetuou-se a troca da solução de glicerol >85% por uma fresca. Em seguida, o âmnio foi apostado sobre papel-filtro, com a porção epitelial mais brilhante voltada para cima e recortado em formato retangular de 8 X 7 cm. Posteriormente à nova coleta de material para análise microbiológica (bactérias aeróbicas/anaeróbicas Gram-positivo, Gram-negativo e fungos), cada uma das amostras retangulares foi duplamente embalada (Figura 5-B) em plástico validado para essa finalidade e armazenado a 4 °C, configurando um lote de tecido. Portanto, cada uma das MA foi capaz de fornecer diversos lotes de tecido.

Figura 5. Processamento das membranas: A - Exposição das MA em glicerol de concentração >85%. B - Dupla embalagem do material – um lote.

A liberação para uso ocorreu quando confirmados os resultados negativos das culturas microbiológicas e a realização da segunda bateria de provas sorológicas, após 6 meses do parto.

4.3 Padronização do método de desepitelização

Para a realização dos testes de desepitelização foi utilizado um lote de cada uma das quatro membranas amnióticas. Em condições de trabalho em fluxo laminar (VECO®) e com técnica asséptica, todas foram reidratadas em solução fisiológica por 30 minutos para a completa remoção do glicerol. Cada um desses lotes de 8 X 7 cm foi recortado em oito fragmentos de 2 X 1,5 cm. Um desses fragmentos foi enviado para análise histológica em hematoxilina-eosina (HE), como controle de teste pré-desepitelização. A partir de então, cada

um dos restantes foi exposto a um diferente método enzimático de retirada epitelial:

a. Incubação em dispase a 0,04% (Protease Neutra – grau II, Boehringer-Manheim, Alemanha) por 45 minutos, a 37 °C.

b. Incubação inicial em dispase a 0,04% (Protease Neutra – grau II, Boehringer-Manheim, Alemanha) por 30 minutos, seguida de tripsina 0,05%/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,02% (GIBCO®) por 15 minutos, a 37 °C.

c. Incubação em EDTA 0,02% por 2 horas a 37 °C, seguido por fricção mecânica para a retirada das células epiteliais.

d. Incubação em tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (GIBCO®) variando-se o tempo de exposição em: 15, 20, 30 e 45 minutos, a 37 °C.

Em seguida, as amostras de cada um dos métodos de desepitelização foram conservadas em formaldeído 10% e enviadas para inclusão em parafina. Após os cortes histológicos, foram coradas por HE. O preparo das lâminas ocorreu segundo protocolo do Laboratório de Patologia da FMUSP.

4.3.1 Análise por microscopia óptica

Cada uma das lâminas foi analisada em microscópio óptico Olympus BX2, e, com base nessa análise, determinou-se o melhor método de desepitelização utilizando-se os seguintes critérios de escolha: retirada completa do epitélio e manutenção do restante da estrutura histológica do âmnio.

Determinado o protocolo de desepitelização, essa escolha foi avaliada por microscopia eletrônica para verificação da presença de membrana basal após a retirada do epitélio do âmnio.

4.3.2 Avaliação do método de desepitelização por microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de 0,5 cm X 0,8 cm de MA glicerolada e desepitelizadas (pelo melhor método visualizado em microscopia óptica) foram expostas à ação do gluteraldeído a 2%, durante duas horas, e transferidas para solução de ósmio a 1%. Após as duas lavagens em solução salina 0,9% e sacarose 8%, foram submersas durante 18 horas em acetato de uranila 0,5%.

O material foi desidratado por meio de banhos em etanol 70% (duas vezes, durante 10 minutos), etanol 95% (duas vezes, durante 15 minutos), etanol absoluto (quatro vezes, durante 15 minutos) e acetona (duas vezes, durante 15 minutos).

Os fragmentos foram transferidos para mistura de 1 : 1 de acetona e resina de Spurr, permanecendo em agitação por três horas. A seguir, foram imersos em resina de Spurr pura sob agitação lenta e constante e à temperatura ambiente, por duas horas.

Realizada a inclusão do material em molde preenchido por resina de Spurr, este foi colocado em estufa seca a 70 °C pelo período de 18 horas.

Desbastados os blocos de resina resultantes, realizaram-se cortes espessos de 300 a 350 nanômetros (micrótomo Reichert) e foi feita a coloração com solução azul de metileno 19%, corante azur de Giemsa 2 a 19%, citrato de bórax 19% em água destilada (volume: 100 mL). O material foi observado em microscópio óptico em aumento de 100 e 400 vezes, permitindo a identificação da sua qualidade e do melhor sítio para os cortes finos.

Os cortes finos de 70 a 75 nanômetros de espessura nos blocos de resina foram transferidos para telas de cobre de 200 mesh, recobertas de película de FormVar 0,25% (Ladd Research Industries – EUA). O material foi corado com uranila saturada (exposição durante 20 minutos e lavado em água destilada por duas) e citrato de chumbo (exposição durante 20 minutos seguida de duas lavagens em água destilada). Observou-se o material em microscópio eletrônico de transmissão Philips modelo Tecnai 10.

4.4 Padronização do método de irradiação

Dois lotes de cada uma das MA foram enviados para radioesterilização no IPEN. Expôs-se cada um deles a um tipo de fonte irradiação: Cobalto-60 (MA-iC60) (Figura 6) e acelerador de elétrons (MA-iAE) (Figura 7). A dose aplicada foi de 25 kGy em ambos os equipamentos e, posteriormente, o material foi novamente transportado ao laboratório (LIM 04).

Figura 6. Fontes de Cobalto-60: A - Podemos observar o caminho do material a ser esterilizado, representado pelas caixas amarelas. O halo vermelho representa o local onde fica o material radioativo (^{60}Co) antes da radioesterilização. B - Visualiza-se a piscina de segurança para blindagem das fontes de ^{60}Co . (Fonte: IPEN)

Figura 7. Aceleradores de elétrons: A - Fonte de aceleradores de elétrons responsáveis pela formação de campos eletromagnéticos. B - Esteiras de rolagem onde o material é posicionado e exposto ao campo magnético. (Fonte: IPEN)

Em fluxo laminar, os lotes irradiados foram reidratados para remoção do glicerol e cada um deles cortado em três. Antes da exposição aos banhos enzimáticos de retirada do epitélio, um fragmento de cada lote de MA-iC60 e

outro de MA-iAE foram emblocados e corados em HE, servindo como controle pré-desepitelização.

Os demais fragmentos de MA-iC60 e MA-iAE foram desepitelizados segundo o protocolo escolhido no Item 4.3. A seguir, um fragmento de MA-iC60 e outro de MA-iAE, de cada uma das MA utilizadas, foram preservados em formaldeído 10%, inclusos em parafina, cortados e corados em HE, sendo observados em microscópio Olympus BX2.

Os últimos fragmentos de MA-iC60 e de MA-iAE desepitelizados foram preparados seguindo o protocolo descrito no Item 4.3.2, para análise em microscopia eletrônica. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips modelo Tecnai 10.

A escolha do método de irradiação baseou-se nos achados histológicos em microscopia óptica e eletrônica de transmissão, usando como critério de escolha: a possibilidade de completa retirada do epitélio aplicando-se o protocolo de desepitelização padronizado no Item 4.3, estabelecido a partir dos experimentos em MA-ni.

4.5 Estabelecimento dos grupos de estudo

Depois de padronizados o método de desepitelização e o de irradiação das MA, foi possível estabelecer os dois grupos de estudo desse trabalho. O primeiro é representado pelas membranas amnióticas gliceroladas não irradiadas (MA-ni) e o segundo, composto pelas membranas amnióticas

gliceroladas irradiadas (MA-i), no qual as MA seriam irradiadas segundo a fonte de energia escolhida no Item 4.4. Os experimentos de comparação entre os dois grupos foram realizados com as quatro diferentes membranas. Pelo fato de cada MA gerar mais de um lote, foi possível realizar os estudos comparativos com a mesma membrana em duplicata.

4.6 Estudos comparativos entre as MA-ni e as MA-i

4.6.1 Avaliação qualitativa das características físicas

Nessa etapa, as MA-ni e MA-i foram avaliadas comparativamente em relação a aspectos visuais quanto às seguintes características: coloração, friabilidade, facilidade de manuseio e manutenção da umidade durante manipulação.

4.6.2 Estudos histológicos da membrana basal das MA-ni e MA-i após a desepitelização

Lotes de MA-ni e MA-i foram desepitelizados e avaliados por microscopia óptica, imunofluorescência indireta, microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão.

4.6.2.1 Microscopia óptica

Amostras de MA-ni e MA-i desepitelizadas foram preservadas em formaldeído 10%, inclusas em parafina e preparadas em cortes de 3 a 4 micras. Utilizaram-se duas colorações: HE, para avaliação da estrutura e Picrossírius, para a observação da histoarquitetura das fibras colágenas sob microscópio de luz polarizada Olympus BX2.

4.6.2.2 Imunofluorescência e microscopia confocal

Amostras de MA-ni e MA-i desepitelizadas foram inclusas em parafina, cortadas e preparadas em lâminas de microscopia com aminosilane. 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 pepsina bovina (10.000/ unidades de tecido seco-UTD) (Sigma Chemical Co.), em tampão ácido (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) e incubadas com leite Molico® a 5% em tampão fosfato pH=7,0.

As lâminas foram incubadas por uma noite, a 4 °C, com anticolágeno tipos IV humano (Sigma Diagnostics, St Louis, USA) monoclonal, obtido em camundongo, e antilaminina humana (Dako A/S Copenhagen, Denmark), obtido em cabra, diluídos em PBS nas concentrações de 1 : 100. Na sequência, as

lâminas foram lavadas com PBS com Tween 20 a 0,05% por três vezes e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou de cabra conjugados com fluoresceína isoticianato (FITC) (Sigma Chemical Co.), diluídos 1 : 50, lavadas cinco vezes em PBS com Tween 20 a 0,05% e posicionadas as lamínulas com solução de glicerina tamponada. A reação foi avaliada em microscópio de fluorescência Olympus BX2, com aumento de 400X.

Para análise tridimensional por microscopia confocal, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou cabra, conjugados com Alexa 633 ou 488 (Invitrogen), diluídos na proporção de 1 : 500, em solução de PBS por 60 minutos e posicionadas as lamínulas com solução de glicerina tamponada. A reação foi observada em microscópio a *laser* LSCM (LSM 410; Carl Zeiss; Jena, Germany), usando aumento de 400X.

4.6.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de MA-ni e MA-i (0,5 cm X 0,8 cm) desepitelizadas foram submetidas ao protocolo descrito no Item 4.3.2 com o objetivo de preparo de material para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se o material em microscópio eletrônico de transmissão Philips modelo Tecnai 10.

4.6.3 Capacidade de servir como suporte para a formação de epitélios humanos cultivados

4.6.3.1 Cultura primárias de queratinócitos

Os queratinócitos foram isolados a partir de fragmentos cutâneos de espessura total removidos em Centro Cirúrgico, por ocasião de mamoplastias redutoras, realizadas em cinco pacientes saudáveis do sexo feminino, com idade entre 18 e 42 anos.

Após antissepsia cirúrgica com solução degermante (clorexidina) e sua retirada, os fragmentos de pele total foram lavados em solução salina a 0,9% para a remoção de resíduos grosseiros de sangue. A seguir, foram transportados até o laboratório em frascos estéreis com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).

A partir desse momento, toda a manipulação foi realizada no LIM 04 em fluxo laminar (VECO®), empregando-se técnica asséptica.

Para a remoção do antisséptico e eventuais resíduos de sangue, o fragmento foi retirado do frasco de transporte e submetido à agitação breve em solução salina a 0,9%. Em seguida, agitação em etanol a 70% durante 30 segundos e dois banhos complementares em solução salina a 0,9%.

Após a transferência para placa de Petri, o tecido celular subcutâneo e o máximo de derme possível foram removidos com tesoura, resultando em pele de espessura parcial fina. Esta foi recortada em fragmentos menores que 1

mm² (Figura 8-A), que foram, então, imersos em solução enzimática de tripsina a 0,05%/EDTA a 0,02% (GIBCO®) e mantidos em agitação a 37 °C (Figura 8-B).

Figura 8. Isolamento enzimático de queratinócitos: A - fragmentos cutâneos de 1 mm². B - Exposição a solução enzimática de tripsina/EDTA em agitação magnética.

A cada 30 minutos, o sobrenadante (solução enzimática e células desprendidas) era removido e transferido para tubo cônico. A ação da enzima tripsina foi bloqueada pelo íon cálcio introduzido no sistema pela adição de meio DMEM enriquecido com 10% de soro bovino fetal (GIBCO®) na proporção 1 : 1.

A suspensão de células foi centrifugada a 1.500 rpm durante cinco minutos (centrífuga Marathon 8k – Fisher Scientific). O sobrenadante foi desprezado e o botão celular (Figura 9-A) ressuspendido em volume conhecido de DMEM. O número de células por mililitro (céls/mL) foi estabelecido pela contagem em câmara de Neubauer.

Nova solução de tripsina/EDTA foi adicionada aos fragmentos de pele dentro do agitador e o processo descrito acima foi repetido de cinco a seis vezes. Essa rotina de procedimento prolongou-se por intervalos de 30 minutos até se observar o decréscimo do rendimento de células obtidas no intervalo.

Normalmente, para as culturas primárias, foram utilizadas células provenientes da 2ª à 5ª meia hora do processo de separação enzimática. Optou-se pelo sistema de cultivo sem a presença de fibroblastos murinos, conhecido por cultivo em alta densidade; para tanto, 5×10^6 células ressuspendidas em 5 mL de meio de cultura foram semeadas em garrafas plásticas tratadas para essa finalidade (FALCON®), com 25 cm² de superfície de cultivo (Figura 9-B).

Figura 9. Cultura de queratinócitos: A - Botão de células centrifugados após dissolução enzimática. B - Frascos de cultura mantidos em estufa.

O meio utilizado para o cultivo dos queratinócitos foi baseado no proposto por Rheinwald e Green¹⁰³, modificado por Benassi et al.¹⁰⁴, a saber: 60% de

meio DMEM (GIBCO®), 30% de meio Ham F12 (GIBCO®), 10% de soro fetal bovino (GIBCO®), glutamina (GIBCO®) (4 mM), adenina (SIGMA®) (0,18 mM), insulina (SIGMA®) (5 µg/mL), hidrocortisona (SIGMA®) (0,4 µg/mL), toxina da cólera (SIGMA®) (0,1 nM), tri-iodotironina (SIGMA®) (2nM), fator de crescimento epidérmico (SIGMA®) (10 ng/mL) e solução antibiótica de penicilina, 100 UI/mL – estreptomicina, 100 µg/mL (GIBCO®).

As garrafas de cultura foram colocadas em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% e temperatura constante de 37 °C (Fisher Scientific). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas até a semiconfluência das células.

4.6.3.2 Culturas secundárias dos queratinócitos sobre as MA-ni e MA-i desepitelizadas – sistema imerso e interface ar-líquido

Uma vez observada a semiconfluência dos queratinócitos das culturas primárias em torno do 4^o e do 5^o dia de cultivo, estes foram soltos das garrafas de cultura pela ação de solução de tripsina a 0,05%/EDTA a 0,02%, durante 15 a 20 minutos, a 37 °C . Uma vez soltas as células, a ação da enzima foi bloqueada com a adição na garrafa de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino na proporção 1 : 1.

A suspensão de células foi centrifugada a 1.500 rpm durante cinco minutos (centrífuga Marathon 8k- Fisher Scientific). Após desprezar o sobrenadante, o botão de células foi ressuspensionado em 2 mL de meio de

cultura, e as células contadas em câmara de Neubauer. O total de células obtido originalmente foi diluído até uma concentração final de $1,5 \times 10^6$ céls/mL.

Lotes de MA-ni e MA-i de cada uma das quatro membranas amnióticas usadas no estudo foram retirados da dubla embalagem, mantidos sobre o papel-filtro e recortados em tamanhos de 1,5 x 2 cm. As membranas foram então reidratadas em solução fisiológica 0,9% por 30 minutos e submetidas ao protocolo de desepitelização padronizado.

Posteriormente, cada uma delas foi colocada em placas *multiwell* de seis poços, totalizando quatro amostras de 1,5 x 2 cm de MA-ni ou MA-i dispostas em cada placa. Os experimentos foram realizados em duplicata. Em seguida, anéis de aço inoxidável de 1 cm de diâmetro foram posicionados no centro de cada amostra e mantidos por 15 minutos em estufa a 37 °C, com atmosfera de CO₂ a 5%. Após esse período, foram semeadas $1,5 \times 10^5$ células suspensas em meio de cultura proposto por Rheinwald e Green¹⁰³ dentro de cada anel (Figura 10-A). Após 48 horas, o anel foi retirado.

As culturas foram mantidas em estufa de cultivo com atmosfera de CO₂ a 5%, à temperatura constante de 37 °C, sendo o meio de cultivo trocado a cada dois dias até o 14º dia de estudo e diariamente até o 21º dia, quando os estudos foram interrompidos. Ao redor do 7º dia, quatro amostras em cada um dos grupos, foram suspensas em grelhas inoxidáveis de maneira que apenas a base de membrana amniótica ficasse em contato com meio de cultura e os queratinócitos expostos ao ar, criando-se a situação de cultivo na interface ar-líquido (Figura 10-B).

Figura 10. Culturas secundárias de queratinócitos em bases amnióticas: A - posicionamento do anel sobre a membrana amniótica. B - Suspensão das culturas secundárias sobre grelhas inoxidáveis para exposição da cultura de queratinócitos ao ar. A seta branca indica o crescimento do epitélio no centro do âmnio.

Em dias predeterminados de cultivo (14^o e 21^o), duas amostras de cada um dos grupos cultivados imersos e na interface ar-líquido foram retiradas e enviadas a exames histológicos.

4.6.3.3 Microscopia óptica do composto dermoepidérmico

As amostras de cultura de queratinócitos sobre as MA-ni e MA-i com 14 e 21 dias, tanto na situação imersa como na interface ar-líquido, foram enviadas para inclusão em parafina, cortes e coloração com HE, sendo analisadas por microscopia óptica.

4.6.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão do composto dermoepidérmico

As amostras de cultura de queratinócitos sobre as MA-ni e MA-i com 21 dias na situação de interface ar-líquido foram processadas segundo o protocolo de preparo de material para microscopia eletrônica (Item 4.3.2) e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips modelo Tecnai 10.

5. RESULTADOS

---

5. Resultados

5.1 Avaliação do processamento das membranas amnióticas em altas concentrações de glicerol (> 85%)

Após a triagem, o tecido foi limpo para que se retirassem todos os restos coriônicos. As MA foram submetidas com êxito ao processo de glicerolação, sendo estocadas a 4 °C. Em média, apresentavam um tamanho de 1100 cm², perfazendo um total de aproximadamente 20 lotes de MA embalados individualmente.

Figura 11. Glicerolação e reidratação das membranas amnióticas: A - MA glicerolada com aspecto brilhante e inelástico. B - MA reidratadas e recuperando opacidade e elasticidade.

Após a conservação em glicerol com concentração > 85%, as membranas amnióticas apresentam aspecto inelástico e brilhante (Figura 11-A). Uma vez removido o glicerol pela exposição em solução salina por 30 minutos, ocorreu o retorno da opacidade e da maleabilidade natural do tecido (Figura 11-B).

Após a reidratação, a análise em microscopia óptica das MA conservadas em glicerol revelou que a arquitetura estrutural do tecido permanecia preservada. A monocamada de epitélio colunar estava aderida ao estroma, porém as células mostravam claros sinais de morte celular com um núcleo celular mais brilhante e picnótico. As células epiteliais mostravam uma adesão entre si, não sendo observados intervalos entre elas. As demais camadas amnióticas também estavam presentes, sendo possível inclusive a visualização de fibroblastos no tecido (Figura 12).

Figura 12. Membrana amniótica preservada em glicerol – microscopia óptica: Observa-se a manutenção da arquitetura do tecido com a existência das cinco camadas amnióticas. (Coloração HE, aum: 200X)

5.2 Padronização da desepitelização das MA-ni

Em todas as técnicas de desepitelização testadas, a estrutura macroscópica das membranas manteve-se íntegra. Embora estivessem mais finas e suscetíveis a rompimentos por traumas mecânicos, mesmo assim, a manipulação de todas foi possível sem a destruição das amostras.

Nessa padronização, objetivou-se identificar por microscopia óptica o método de desepitelização que fosse capaz de retirar todo o epitélio do tecido, mantendo as características estruturais das demais camadas.

A dispase 0,04% por 45 minutos retirava completamente o epitélio (Figura 13), em contrapartida, causava uma destruição importante das demais camadas da membrana, com eliminação dos fibroblastos e delaminação da estrutura colágena residual.

Figura 13. Dispase a 0,04% por 45 minutos – microscopia óptica: nota-se a ausência completa de células epiteliais, porém com destruição da estrutura colágena de todas as camadas amnióticas. (Coloração HE, aum: 400X.)

Nas amostras, submetidas à incubação inicial em dispase a 0,04% por 30 minutos, seguida de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos (Figura 14), observou-se completa retirada do epitélio, entretanto, a destruição da estrutura colágena foi ainda maior, inclusive com áreas de completa separação das camadas amnióticas.

Figura 14. Dispase a 0,04% por 30 minutos, seguida por tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos – microscopia óptica: nota-se a ausência completa de células epiteliais e delaminação das demais camadas amnióticas. A seta indica áreas em que houve a separação de camadas estromais da estrutura conjuntiva. (Coloração HE, aum: 400X.)

O banho em EDTA 0,02% por 30 minutos seguido de fricção mecânica foi ineficaz (Figura 15). Na análise em microscopia óptica, pode-se perceber uma retirada epitelial bastante heterogênea, sendo que, em algumas áreas, as células foram retiradas, entretanto, em outras, o epitélio estava praticamente íntegro.

Figura 15. EDTA 0,02% por 30 minutos seguido de fricção mecânica - microscopia óptica: presença de restos epiteliais ao longo de toda a superfície da membrana, indicada nas setas. (Coloração HE, aum: 200X.)

A imersão em tripsina 0,05 % /EDTA 0,02% por 45 (Figura 16) e 30 minutos (Figura 17) resultou em uma completa denudação do epitélio, porém com delaminação das camadas colágenas. Por outro lado, a exposição por 15 minutos (Figura 18) preservava a arquitetura do tecido, mas não era suficiente para retirar todo o epitélio. Com o tempo de 20 minutos (Figura 19), ocorreu a completa retirada do epitélio, com a menor destruição da arquitetura amniótica quando comparada com os resultados obtidos nas demais formas de desepitelização.

Figura 16. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 45 minutos – microscopia óptica: ausência completa de epitélio com importante delaminação e separação estromal. (Coloração HE, aum: 400X.)

Figura 17. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 30 minutos – microscopia óptica: ausência completa de epitélio com destruição estromal e vacuolização da estrutura colágena apontada pela seta. (Coloração HE, aum: 400X.)

Figura 18. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos – microscopia óptica: nota-se, na superfície, a existência de restos epiteliais, apontados pelas setas. (Coloração HE, aum: 200X.)

Figura 19. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos – microscopia óptica: observa-se, na superfície, a completa ausência de restos epiteliais com a menor destruição estromal em comparação a todos os outros métodos. (Coloração HE, aum: 400X.)

Desse modo, escolhemos a exposição a tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos (Figura 19) como o método padrão de desepitelização para a realização dos demais experimentos deste estudo.

5.2.1 Avaliação do método de desepitelização por microscopia eletrônica de transmissão

Após a definição da técnica de desepitelização, utilizou-se a análise em microscopia eletrônica para confirmação da persistência da continuidade da membrana basal na estrutura do tecido.

No menor aumento (Figura 20A), nota-se a presença de material eletrodenso em toda a superfície da estrutura e, sobre ele, resquícios de material eletroluscente. Nos maiores aumentos (Figura 20B), confirmam-se esses achados, evidenciando-se uma irregularidade na disposição do material eletroluscente da superfície. A observação desses achados indica a persistência da membrana basal.

Figura 20. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos – microscopia eletrônica: A - ausência completa de queratinócitos e presença de material eletrodenso indicando presença da membrana basal (continuidade indicada pelas setas)(aum: 2.550X). B - material eletroluscente (setas de cor preta) irregular sobre material eletrodenso (setas de cor vermelha)(aum: 6.200X).

5.3 Padronização do método de irradiação

Diante da possibilidade de radioesterilização por diferentes equipamentos, estes experimentos visavam determinar o tipo de radiação ionizante que proporcionava esterilização do tecido e, concomitantemente, possibilitava a sua desepitelização.

As análises em microscopia óptica das amostras íntegras irradiadas em acelerador de elétrons (MA-iAE) e irradiador de Cobalto-60 (MA-iC60) não evidenciaram diferenças significativas na estrutura epitelial do âmnio, principalmente em suas camadas mais externas. Nas fotografias dos cortes histológicos das duas amostras, visualiza-se a presença de células epiteliais com núcleos picnóticos e sinais de degeneração apical, sendo inclusive semelhante ao encontrado nas MA-ni (Figura 12).

Em relação ao tecido conjuntivo, as MA-iAE (Figura 21) apresentavam as camadas estromais mais compactadas, enquanto nas MA-iC60 (Figura 22), estas pareciam menos agrupadas, com pequenas áreas de vacuolações, sendo morfológicamente análogas às MA-ni.

Figura 21. Membranas amnióticas irradiadas em acelerador de elétrons – microscopia óptica: células epiteliais com morfologia intacta, mas com picnose de núcleos celulares, camadas estromais compactadas com redução da espessura conjuntival (medida de estroma em pixel= 48 pixels). (Coloração HE, aum: 200X.)

Figura 22. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de cobalto 60 – microscopia óptica: células epiteliais com morfologia intacta, mas com picnose de núcleos celulares e degeneração apical, camadas estromais menos compactadas com áreas de vacuolizações e maior espessura de tecidos conjuntivos quando comparados ao material irradiado em acelerador de elétrons (medida de espessura do estroma em pixel=88 pixels). (Coloração HE, aum: 200X.)

Em virtude da necessidade de cultivo dos queratinócitos sobre membranas desepitelizadas, testou-se a possibilidade de desepitelização do âmnio após o processo de irradiação.

Em microscopia óptica, as MA-iC60 (Figura 23), posteriormente à exposição enzimática, apresentavam-se completamente desepitelizadas. Além disso, notou-se uma delaminação importante dos demais estratos amnióticos. Em contrapartida, não foi possível a completa denudação do epitélio das MA-iAE (Figura 24) no tempo padrão de 20 minutos. Nas colorações em HE, percebe-se menor delaminação estromal nesse grupo, porém é clara a existência de restos epiteliais sobre a superfície do tecido.

Figura 23. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de cobalto 60 desepitelizadas – microscopia óptica: após utilização de método de desepitelização padrão percebe-se a completa ausência de células epiteliais e intensa delaminação do estroma conjuntival. (Coloração HE, aum: 400X.)

Figura 24. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de aceleradores de elétrons desepitelizadas em 20 minutos – microscopia óptica: presença de restos de células epiteliais (apontada pela seta), inclusive com a existência de alguns núcleos picnóticos, compactação do estroma conjuntival. (Coloração HE, aum: 200X.)

Mesmo com o aumento do tempo de exposição para 28 minutos (Figura 25), a desepitelização não ocorreu por completo e ainda existiam restos epiteliais nas MA.

Figura 25. Desepitelização das MA-iAE por 28 minutos em solução enzimática: presença de poucos restos epiteliais com núcleos (indicado na seta) e áreas mais livres de células em comparação aos 20 minutos de exposição. (Coloração HE, aum: 200X)

Nos estudos histológicos de microscopia eletrônica de transmissão, esses achados foram melhor visualizados. Nas MA-iC60 desepitelizadas (Figura 26-A), encontramos completa ausência de células epiteliais, sendo possível apenas a identificação de um conglomerado de tramas colágenas dispersas. Notam-se os efeitos destrutivos que a irradiação por Cobalto-60 ocasiona às tramas colágenas da camada esponjosa amniótica, marcados pelas áreas de vacuolização entre as fibras, coincidindo com o processo de delaminação encontrado em HE. No maior aumento (Figura 26-B), fica mais evidente a ausência de restos celulares e de membrana basal na superfície da estrutura, observando-se apenas a presença de fibras colágenas com disposição randômica.

Figura 26. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de Cobalto- 60 desepitelizadas – microscopia eletrônica: A - Ausência de células epiteliais na superfície da estrutura e de lâmina lúcida ou densa da membrana basal. Observa-se ainda a existência de área de vacuolização na estrutura da matriz estromal (apontado na seta vermelha) (aum: 6.600X). B - Em maior aumento, nota-se a completa retirada da membrana basal, identificando-se na superfície da estrutura a presença de fibras colágenas que podem corresponder a fibras de ancoragem do tecido conjuntivo(apontado pela seta vermelha) (aum: 15.000X).

Nas MA-IAE desepitelizadas por 20 minutos em tripsina/EDTA, encontramos a existência de restos epiteliais na superfície amniótica. Embora as células apresentem sinais de morte, como a perda de integridade de membrana, núcleos picnóticos, ausência completa de núcleo ou a simples presença de resíduos celulares, mesmo assim, muitas delas ainda estavam aderidas à membrana basal amniótica (Figura 27-A). Nos maiores aumentos (Figura 27-B), visualizam-se pequenos pseudópodes partindo das células epiteliais mortas até a membrana basal, que aparentemente continua íntegra. Em relação ao arcabouço, podemos perceber uma trama mais compactada em comparação às MA-iC60.

No aumento de 12.500 vezes (Figura 27-C), visualizam-se pontos em que os hemidesmossomos das células epiteliais permanecem ligados à membrana basal. Porém, nos locais onde essa ligação é danificada, existe um extravasamento do colágeno estromal com perda da continuidade da membrana basal.

Figura 27. Membranas amnióticas irradiadas em fontes de aceleradores de elétrons desepitelizadas – microscopia eletrônica: A- Células epiteliais (seta de cor preta) claramente danificadas ainda aderidas a membrana basal (apontada pela seta vermelha). (aum: 1650X) B- na região com o círculo em vermelho podemos observar o prolongamento da células epiteliais em forma de podócitos. Nesta região, os hemidesmossomos da células epiteliais encontram-se ligados a membrana basal do tecido. As setas pretas indicam a continuidade da membrana basal. (aum: 8900X). C- o círculo vermelho indica a região de ligação dos hemidesmossomos a membrana basal. No local em que há liberação das células epiteliais, a membrana basal perde a sua continuidade (seta preta), e ocorre o extravazamento do colágeno estromal (seta vermelha). (aum: 15.000X).

A partir das observações relatadas acima, conclui-se que o método de desepitelização padronizado para retirada epitelial nas MA-ni só foi capaz de denudar as MA-iC60, enquanto as MA-iAE permaneceram com epitélio aderido.

Assim, padronizou-se o Cobalto-60 como o método de irradiação a ser utilizado para radioesterilizar as MA do grupo de estudo das membranas amnióticas irradiadas (MA-i), o qual será comparado ao grupo MA-ni.

5.4 Estudos comparativos entre as MA-ni e as MA-i

5.4.1 Avaliação qualitativa das características físicas

A avaliação das alterações qualitativas físicas que a radiação ionizante provoca nos aloenxertos glicerolados é fundamental para determinar a capacidade de manuseio do material.

Seguida a reidratação, as diferenças entre as MA, irradiadas ou não, são facilmente identificáveis (Figura 28). As MA-ni apresentam uma coloração mais esbranquiçada e são menos friáveis, possibilitando seu manuseio. As MA-i tem coloração acastanhada e maior friabilidade, sendo mais suscetíveis a rompimentos com mínimos traumas.

Figura 28. Comparação macroscópica entre MA-ni e MA-i: Na figura A, temos uma amostra de membrana amniótica não irradiada aposta sobre papel-filtro. Nota-se a coloração mais esbranquiçada da estrutura. Na figura B, observa-se uma amostra irradiada, e podemos perceber uma coloração mais acastanhada e uma dificuldade para retirar o tecido do papel, sendo que no canto superior esquerdo podemos observar o tecido se soltando, e enrolando-se sobre si mesmo.

Quando expostas ao ar, ambas as membranas sofrem um ressecamento natural, porém as do grupo MA-i secam quase que instantaneamente, enquanto, no grupo MA-ni, esse tempo é um pouco mais prolongado.

5.4.2 Estudos da membrana basal das MA-ni e MA-i após a desepitelização

Os estudos histológicos comparativos de análise da membrana basal visavam esclarecer os efeitos que o processo de desepitelização podem provocar na estrutura da membrana basal tanto no âmnio não irradiado como no irradiado.

5.4.2.1 Microscopia óptica: hematoxilina-eosina

Em ambos os grupos, foi possível perceber a completa retirada da camada de epitélio colunar, não sendo vistos resíduos celulares na superfície amniótica (Figura 29-A e 29-B). A arquitetura colágena amniótica mostrava algum grau de destruição, caracterizada pela presença de delaminação em ambas as amostras. No grupo irradiado, cada uma das camadas parece mais adensada, porém com maior separação entre elas quando comparadas ao encontrado no grupo não irradiado.

Figura 29. MA-ni e MA-i desepitelizadas – microscopia óptica (hematoxilina-eosina): A - MA-ni desepitelizada: ausência completa de células epiteliais e delaminação estromal. (HE- aum 400X) B - MA-i desepitelizada: resultados semelhantes ao grupo não irradiado, porém com maior alteração estromal. (HE- aum: 400X.)

Na coloração de Picrossirius sob luz polarizada, notou-se, no grupo MA-ni (Figura 30-A), uma birrefringência de cor laranja-avermelhada na maior parte da estrutura do tecido, enquanto, em sua superfície, essa birrefringência mostrou-se mais amarelo-esverdeada, indicando a existência de fibras de diferentes calibres.

Em contrapartida, no grupo MA-i (Figura 30-B), só foi possível visualizar a existência das fibras grossas de coloração laranja-avermelhada. Na superfície da estrutura do tecido, nenhum outro tipo de birrefringência é observada. Diferentemente do que foi encontrado no outro grupo, não se veem as fibrilas finas reticulares.

Outra diferença percebida é a conformação de entrelaçamento das fibras grossas nos dois grupos. Nas MA-ni, as fibras laranja-avermelhadas apresentam-se firmemente entrelaçadas e agrupadas, enquanto, no grupo MA-i, se veem as fibras mais soltas e menos unidas entre si, formando verdadeiras lâminas de tecido.

Figura 30. Ma-ni e Ma-i desepitelizadas – microscopia óptica de luz polarizada (coloração Picrossirius): A - MA-ni desepitelizada: observa-se na superfície birrefringência amarelo-esverdeado indicando a existência de fibras finas. A birrefringência laranja-avermelhada mostra uma estrutura firmemente compactada. (Picrossirius, aum: 400X) B - MA-i desepitelizada: ausência de coloração amarelo-esverdeada na superfície, birrefringência laranja avermelhada com sinais de delaminação das tramas. (Picrossirius, aum: 400X.)

5.4.2.2 Imunofluorescência para colágeno IV e laminina

Após a desepitelização, com o intuito de comprovar a permanência de elementos da membrana basal, realizamos testes de imunofluorescência

indireta para colágeno IV e laminina, presentes na camada lúcida e densa, respectivamente.

As reações dos anticorpos aos antígenos específicos, laminina e colágeno IV, provocaram alterações cromáticas nos preparados histológicos de coloração verde fosforescente claro.

Nas reações no grupo MA-ni, observamos que sobre toda a superfície da estrutura amniótica existe a expressão verde fosforescente clara de colágeno IV (Figura 31-A) e laminina (Figura 31-B). Essa expressão identifica a existência desses dois antígenos na MA.

Em relação ao grupo MA-i, não observamos nenhum tipo de fluorescência sobre a superfície da membrana. A falta de expressão de fluorescência de colágeno IV (Figura 31-C) e laminina (Figura 31-D) indica a ausência desses marcadores.

Figura 31. Imunofluorescência de MA-ni e MA-i para colágeno IV e laminina: nas fotos, a coloração verde-fosforescente clara indica a expressão do antígeno estudado – colágeno IV (A e C); laminina (B e D). As fotos A e B representam o grupo MA-ni desepitelizada, as flechas brancas, em A e B, indicam o local de expressão dos antígenos, e as C e D, o grupo MA-i desepitelizado, onde não ocorreu reação. (aum: 400X.)

5.4.2.3 Microscopia confocal

As reações para colágeno IV e laminina foram analisadas em microscopia confocal, com o objetivo de verificar a estrutura tridimensional da membrana basal residual em relação ao restante do estroma.

Tanto em relação ao colágeno IV como à laminina, vemos, nas Ma-ni, a formação de uma linha verde fosforescente na superfície. Essa imagem pode ser vista tridimensionalmente em todas as angulações da estrutura (Figura 32 –

A, B, C e D). Nas MA-i, não se verificaram os mesmos resultados, não sendo possível a visualização da linha verde fosforescente (Figura 32 – E e F).

Figura 32. Microscopia confocal das MA-ni e MA-i para colágeno IV e laminina- microscopia confocal: Em A e B, observamos uma visão em dois ângulos da expressão de colágeno IV sobre MA-ni desepitelizadas. Em C e D, nota-se a expressão de laminina em MA-ni desepitelizadas em ângulos diferentes. Em E e F, temos as reações de colágeno IV e laminina, respectivamente, sobre MA-i. Não se observa nenhuma reação neste grupo.

5.4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Os estudos em microscopia eletrônica de transmissão são considerados o padrão-ouro para identificação da existência da membrana basal.

No material não irradiado desepitelizado, o ponto de clivagem e liberação das células epiteliais parece ter ocorrido em um ponto acima da lâmina densa (Figura 33-A). Observa-se uma linha de material eletrodenso contínua na superfície da estrutura e, acima dela, há uma pequena quantidade de material eletroluscente disposto de forma heterogênea sobre essa linha (Figura 33-B).

No material irradiado, não se identificam as mesmas estruturas encontradas no grupo MA-ni. Na verdade, deixa de existir a faixa contínua de material eletrodenso, percebendo-se a exposição de estruturas com aspecto de colágeno do tecido conjuntivo amniótico (Figura 33-C e D).

Figura 33. MA-ni e MA-i desepitelizadas – microscopia eletrônica: A – MA-ni desepitelizada com protocolo padrão. Observa-se a existência de estrutura eletrodensa (apontada pelas setas vermelhas) contínua sugestiva de presença de membrana basal. (aum: 2.550 X). B – No maior aumento, nota-se no grupo MA-ni desepitelizado a presença de estrutura eletrodensa (setas vermelhas) e acima dela material eletroluscente (seta preta). (aum: 6.600X). C – No grupo MA-i, não se visualiza a material eletrodensa na superfície da estrutura. (aum: 6.600 X). D – Em maior aumento, percebe-se o extravazamento de fibras colágenos do estroma conjuntival (setas pretas). (aum: 15.000X)

5.4.3 Capacidade de servir como suporte para a proliferação de queratinócitos humanos

5.4.3.1 Cultura primárias de queratinócitos

Foram utilizadas doações de um total de cinco doadoras de pele, as quais preenchiam os critérios de inclusão. O método proposto para obtenção de queratinócitos 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 2×10^6 céls/cm² de pele de espessura total inicial.

Com a densidade de semeadura proposta (5×10^6 céls/25 cm²), atingiu-se a semiconfluência das culturas ao redor do 4º dia de cultivo, o que permitiu a dissociação dessas células do frasco de cultura e sua transferência para o cultivo secundário nas membranas amnióticas desepitelizadas nos dois grupos de estudo.

Figura 34. Cultura de queratinócitos: notam-se as colônias de queratinócitos circundadas por alguns fibroblastos que desaparecerão com a evolução do cultivo. (aum: 200X)

5.4.3.2 Culturas secundárias dos queratinócitos sobre as membranas amnióticas irradiadas e não irradiadas desepitelizadas – sistema imerso e interface ar-líquido

Devido à fragilidade e à fina espessura das membranas amnióticas, algumas delas se soltaram do papel-filtro durante a fase imersa de cultivo. Para solucionar esse problema, passamos a envolver as membranas no papel-filtro tal qual envelopes e com isso reduzimos bastante as perdas.

Em razão da transparência das membranas, foi possível acompanhar o crescimento dos queratinócitos ao longo do tempo. Estes proliferaram de maneira uniforme tanto nas fase imersa como na presença da interface ar-líquido.

Em relação aos compostos cultivados em interface ar-líquido, essa modalidade de cultivo foi possível em razão da existência das grelhas inoxidáveis, que permitiam o contato apenas da membrana amniótica com o

meio de cultivo (Figura 10). Isso facilitou a visualização do processo de queratinização dos epitélios e permitiu o acompanhamento do processo de contração causado sobre as membranas. Vale ressaltar que o acompanhamento visual da formação do epitélio foi muito mais fácil e rápido (ao redor do 7º ao 8º dia) de ser visto nas culturas realizadas sobre membranas não irradiadas. Por outro lado, aquelas sobre as irradiadas só puderam ser vistas após o 10º ao 14º dia.

5.4.3.3 Microscopia óptica do compostos dermoepidérmicos

Nas análises histológicas, evidenciamos um resultado díspar na formação dos epitélios cultivados sobre as bases irradiadas e não irradiadas. Também foi possível perceber que a forma de cultivo, em meio imerso ou em interface ar-líquido, influi na estratificação epitelial principalmente sobre as bases não irradiadas.

No 14º dia de cultivo em situação imersa sobre MA-ni (Figura 35), verifica-se o início do processo de estratificação do epitélio, com a formação de apenas três a quatro camadas de células epiteliais. A arquitetura do novo tecido apresentava-se ainda bastante desorganizada, com as células dispostas de forma aleatória.

Figura 35. 14^o dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-ni – situação imersa – microscopia óptica: epitélio desorganizado com pouca estratificação (3 a 4 camadas de células). (Coloração HE, aum: 200X.)

Na situação de cultivo em interface ar-líquido sobre MA-ni (Figura 36), encontramos no 14^o dia um epitélio muito mais estratificado e, principalmente, organizado em relação à situação imersa (Figura 43). Os cones epiteliais apresentam-se mais bem formados, sendo compostos por queratinócitos justapostos entre si em camadas, com a ocorrência de uma clara diferenciação celular. Nas camadas mais próximas ao âmnio, temos uma morfologia celular mais cuboide típica de camadas basais. Com o decorrer do processo de estratificação, as células adquirem uma conformação mais achatada com núcleo denso, sendo possível ver na superfície algumas células queratinizadas.

Figura 36. 14º dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-ni – situação interface ar líquido – microscopia óptica: epitélio com certa organização, células da camada basal com aspecto cubóide (seta preta), diferenciando-se em células cilíndricas nas camadas mais superiores do epitélio (seta vermelha). (Coloração HE, aum: 200X.)

No 21º dia, no sistema imerso sobre MA-ni (Figura 37), observamos que a estratificação aumentou consideravelmente, porém a arquitetura epitelial permaneceu desorganizada. As células mais apicais do epitélio encontram-se mais alongadas e queratinizadas, porém não se observa a formação de uma camada córnea propriamente dita.

Figura 37. 21º dia– Cultura de queratinócitos sobre MA-ni –situação imersa–microscopia óptica: epitélio desorganizado, porém pluriestratificado com queratinócitos apicais com aspecto fusiforme. Ausência de camada córnea.(Coloração HE, aum: 200X)

No 21º dia de cultivo na interface ar-líquido sobre MA-ni (Figura 38), nota-se a formação de um epitélio melhor estratificado e diferenciado em comparação a todas as demais situações de cultivo celular (Figura 43). O epitélio apresenta um certo desarranjo na sua estrutura, sendo marcada pela presença de pérolas córneas de queratina. Existe a formação de lamelas de material queratinizado fortemente eosinófilico, indicando o início de formação da camada córnea (Figura 38).

Figura 38. 21º dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-ni – situação interface ar líquido – microscopia óptica: epitélio com melhor estratificação e organização, notando-se a presença de pérolas córneas (seta preta). Formação de camada córnea (seta vermelha). (Coloração HE, aum: 200X.)

Avaliando-se os resultados das culturas de queratinócitos sobre as membranas irradiadas, percebe-se que a formação dos neoepitélios foi frustrada em comparação aos resultados sobre o grupo não irradiado (Figura 43).

No 14º dia em sistema imerso (Figura 39), verifica-se a formação de um epitélio fino e praticamente todo em monocamada. As células apresentam um aspecto alongado e espalhado. Em poucas regiões da estrutura, encontra-se algum foco de estratificação com duas camadas celulares.

Figura 39. 14º dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i – situação imersa – microscopia óptica: epitélio em monocamada, com poucos focos de estratificação. (Coloração HE, aum: 200X.)

No 14º dia na situação de interface ar-líquido das culturas sobre MA-i (Figura 40), vê-se a formação de um epitélio mais estratificado que na situação imersa, porém com menos camadas quando comparado com as culturas do grupo MA-ni (Figura 43). Na maioria das suas áreas, o epitélio apresenta duas a três camadas de células, mas ainda são observadas monocamadas de queratinócitos. A morfologia celular é alongada e alguns grânulos de queratina já podem ser notados.

Figura 40. 14º dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i – interface ar-líquido – microscopia óptica: epitélio pouco estratificado com duas a três camadas, células alongadas e grânulos de queratina (seta preta). (Coloração HE, aum: 200X.)

No 21º dia de imersão das culturas sobre MA-i (Figura 41), percebe-se que a estratificação do epitélio torna-se mais homogênea ao longo da sua estrutura, mas permanece restrita a duas ou três camadas celulares. Os queratinócitos apresentam um aspecto mais alongado, com algumas pérolas córneas.

Figura 41. 21º dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i – situação imersa – microscopia óptica: mínima estratificação e poucas pérolas córneas (seta preta). (Coloração HE, aum: 200X.)

Por volta do 21º dia na situação de interface ar-líquido nas bases irradiadas (Figura 42), percebe-se um epitélio mais estratificado, contudo distante dos resultados obtidos nas MA-ni (Figura 43). Visualiza-se a disposição celular em três ou quatro camadas em alguns pontos. Estas apresentam núcleos alongados, com grânulos de queratina. A arquitetura epitelial apresenta-se bastante desorganizada, não sendo possível a identificação de camadas bem definidas. Na superfície epitelial, nota-se a formação de estruturas que lembram a eliminação de pequenas lamelas de queratina, no entanto, em um processo bastante primitivo.

Figura 42. 21º dia – Cultura de queratinócitos sobre MA-i – interface ar-líquido – microscopia óptica: estratificação epitelial em três a quatro camadas, desorganização da arquitetura com pérolas córneas (seta preta). Formação de camada córnea primitiva (seta vermelha). (Coloração HE, aum: 200X.)

A- **B-**

Figura 43. Quadro comparativo entre as culturas de queratinócitos sobre os dois grupos de estudo: A - Culturas em MA-ni. B - Culturas em MA-i.

5.4.3.4 Microscopia eletrônica dos compostos dermoepidérmicos

O estudo em microscopia eletrônica permitiu uma análise mais minuciosa da comparação do cultivo de queratinócitos nos dois grupos de estudo. Nessa técnica, avaliou-se a reestruturação do epitélio. A decisão pela análise em sistema de interface ar-líquido no 21º dia ocorreu porque, nessa situação, as células epiteliais estão em uma condição mais fisiológica, expostas ao ar, mimetizando as condições normais de estratificação do tecido cutâneo no organismo.

No grupo MA-ni, notam-se sinais de desorganização do epitélio, porém as células epiteliais apresentam as membranas plasmáticas mais agrupadas entre si, sem a existência de *gaps* entre elas. Visualiza-se a formação de estrato córneo na superfície epitelial (Figura 44-A). Nos maiores aumentos, pode-se observar a existência de desmossomos bem formados e em grande número entre os queratinócitos (Figura 44-C e E). No interior das células, nota-se a presença de vacúolos com a formação de lamelas de queratina em seu interior (Figura 44-D). Em algumas situações, essa queratina acaba sendo liberada pelas células, permanecendo nos espaços intercelulares ou, algumas vezes, formando as chamadas pérolas córneas (Figura 44-B). Em corte longitudinal, pode-se perceber um certo espessamento da membrana basal existente (Figura 44-F).

Figura 44. 21º dia de cultivo de queratinócitos sobre MA-ni em interface ar-líquido – microscopia eletrônica: A - Visualização das membranas plasmáticas dos queratinócitos agrupadas de forma coesa (setas indicando boa adesão entre as membranas plasmáticas celulares), formação de estrato córneo (indicada em círculo) (aum: 2.550X). B - presença de lamela de queratina (seta preta) nos espaços intercelular e formação de pérola córnea propriamente dita (seta vermelha) (aum: 2.550X). C - coesão celular marcada pela presença de desmossomos ao longo de toda a membrana plasmática das células (setas vermelhas), unindo-as entre si (aum: 8.900X). D - Nota-se, no citoplasma da célula, a formação de vacúolo com a presença de queratina lamelar em seu interior (destacada em maior aumento no quadrado vermelho no canto esquerdo); ao lado, queratina liberada no espaço intercelular (seta preta) (aum: 8.900X). E - Maior aumento mostrando forte adesão celular pela existência de desmossomos entre as células. Em quadrado vermelho, melhor visualização de desmossomo (aum: 12.500X). F - membrana basal com sinais de espessamento (seta vermelha) (aum:12.500 X).

No grupo MA-i, percebe-se um epitélio menos estratificado, com a adesão celular bem menos coesa, sendo marcada pela presença de *gaps* intercelulares (Figura 45-A). A produção de queratina (Figura 45-B) é bem menos intensa, estando presente em poucas áreas no espaço intercelular. Não são visualizadas perlas córneas propriamente ditas. As células mostram uma morfologia cilíndrica (Figura 45-C). Diferentemente do encontrado no outro grupo, praticamente não se observa a formação de desmossomos (Figura 45-C) entre as células nos menores aumentos. Apenas em aumentos muito maiores, pode-se visualizar a presença de poucos desmossomos entre alguns queratinócitos (Figura 45-D).

Figura 45. 21º dia de cultivo de queratinócitos sobre MA-i em interface ar-líquido – microscopia eletrônica: A - Queratinócitos com morfologia cilíndrica e presença de *gaps* intercelulares (seta vermelha).(aum: 1250X) B - Queratina no espaço intercelular (seta vermelha). (aum: 3700X) C - Queratinócito com aspecto cilíndrico, *gap* entre células sem a presença de desmossomos (seta vermelha indicando). (aum:3700X) D - Poucos desmossomos entre células (indicado pela seta).(aum: 8900X)

6. DISCUSSÃO

---

6. Discussão

A busca por fatores de estimulação da regeneração tecidual propicia o surgimento de alternativas terapêuticas com o objetivo de substituir os transplantes convencionais de órgãos, tecidos e suas complicações por mecanismos mais simples e seguros de restauração dos tecidos lesados¹⁰⁵.

Nesse contexto, o âmnio é um biomaterial com grande potencial de reparação tecidual, servindo como uma matriz de regeneração ou um substrato para o transplante de células autógenas e alógenas cultivadas¹⁰². Por essa razão, optamos por estudar a membrana amniótica (MA) e suas potencialidades quando gliceroladas e irradiadas.

Neste trabalho, a preservação amniótica em altas concentrações de glicerol mostrou-se efetiva, justificando sua escolha. O método foi de fácil execução, permitindo que a preservação fosse realizada sem rompimento das membranas. A aposição do tecido sobre papel-filtro facilitou sobremaneira a sua embalagem (Figura 5-B), na medida em que diminuiu o contato direto com o âmnio e aumentou a espessura do material a ser embalado.

O desenvolvimento dessa padronização (Figura 11) permite o estabelecimento de um protocolo de conservação e armazenamento de MA, servindo de modelo ao BT-ICHC, para que este inicie a captação e distribuição do tecido glicerolado aos centros de tratamento de queimados do país.

A análise histológica das membranas gliceroladas evidenciou sua arquitetura preservada, no entanto, com claros sinais de inviabilidade dos componentes celulares (Figura 12). Os estudos de Rejzek et al.⁹ indicam resultados semelhantes aos nossos, também com picnose dos núcleos das células epiteliais e destruição de mitocôndrias. A confirmação da morte celular pela exposição ao glicerol proporciona um benefício ao nosso intuito de usar o âmnio como biomaterial.

Os biomateriais constituem um grupo de produtos que, ao ser inseridos no corpo humano, tratam, melhoram ou substituem qualquer tecido, órgão ou função do corpo, sendo de origem natural ou sintética. Dessa maneira, é fundamental que o material seja biocompatível e, conseqüentemente, propicie uma resposta adequada em uma aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contacto com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos¹⁰⁶.

Sabe-se, pela experiência clínica com o transplante de MA criopreservadas, que a taxa de rejeição dos receptores é quase nula⁶⁷. Provavelmente isto se deve ao fato de as células epiteliais não expressarem antígenos do tipo HLA-A, -B, -C e -DR^{68, 69}. Entretanto, observa-se que há algum grau de rejeição quando o transplante é realizado com restos coriônicos ou com repetidos transplantes da mesma doadora, devido à reestimulação de linfócitos CD4+ e CD8+ por antígenos específicos existentes nas células¹⁰⁷.

Com o objetivo de reduzir a antigenicidade, tivemos a preocupação constante de retirar por completo os restos coriônicos, sendo fundamental a

realização de limpeza exaustiva previamente ao início dos banhos em glicerol (Figura 4-B).

Courtman et al.¹⁰⁸ especulam que a decelularização acarreta um decréscimo na carga antigênica do tecido, reduzindo a resposta imune do hospedeiro após o implante e facilitando sua incorporação ao organismo. Wilshaw et al.¹⁰² testaram a MA decelularizada, implantando-as em modelo animal murino, verificando boa integração, com raríssimas células T de resposta imunológica.

A glicerolação, como a realizada no processamento das MA deste estudo (Figura 11-A), provoca a completa extirpação da viabilidade do componente celular (Figura 12), descelularizando o tecido e aumentando a sua biocompatibilidade.

Após o processamento, a segunda etapa de nossos experimentos buscava padronizar o melhor método de desepitelização. Os critérios utilizados para definir essa escolha foram a retirada completa do epitélio e a preservação da integridade das demais camadas amnióticas.

Embora não haja consenso na literatura, a nossa preferência pela completa denudação epitelial deveu-se ao fato de muitos autores indicarem melhores resultados das culturas celulares quando realizadas sobre membranas denudadas, em comparação àquelas sobre epitélio íntegro ou parcialmente retirado.

Koizumi et al.^{109, 110} comparam o cultivo de células límbicas sobre MA intactas ou desepitelizadas por EDTA. Em seus resultados, evidencia-se que as

células migram mais rapidamente sobre a membrana denudada e o epitélio final é mais estratificado e organizado. Por outro lado, com a presença das células epiteliais, a morfologia das células límbicas fica alterada e o epitélio desorganizado, quase que completamente em monocamada. As células próximas à camada basal, que deveriam adquirir um aspecto colunar, mostram-se cilíndricas, semelhantes às das camadas mais superficiais da epiderme.

Outros autores também apontam a importância da desepitelização para o cultivo celular e a formação de epitélios mais estratificados^{111, 112, 113, 114}. Koizumi et al.¹⁰⁹ consideram que a exposição da matriz extracelular estromal seria um fator estimulador ao crescimento e à organização do tecido cultivado. Yang et al.¹⁹ avaliam que a existência de resíduos de membrana basal ocasionaria melhor estratificação.

Não existe concordância sobre qual método de desepitelização é o mais adequado para a separação do epitélio amniótico. Isso porque ao mesmo tempo que as técnicas retiram as células, danificam as demais camadas do tecido, ocasionando uma delaminação.

Em geral, realiza-se uma exposição a enzimas, que clivam as ligações de hemidesmossomos das células epiteliais à membrana basal, liberando-as. Diferentes técnicas baseiam-se no uso de enzimas como EDTA, tripsina e dispase, em concentrações e tempos variados de exposição^{20, 115, 116}. Quando a exposição é exclusiva ao EDTA, faz-se obrigatório o uso de fricção mecânica posterior, já com as demais substâncias, nenhum outro tipo de procedimento auxiliar é necessário.

Melo et al.¹¹⁷ comparam diferentes protocolos usando dispase, tripsina e EDTA por tempos variados de exposição e avaliam seus resultados em microscopia óptica e eletrônica. Observam que o EDTA, mesmo seguido de fricção mecânica, é um método com pouca eficácia na retirada das células. A tripsina e a dispase, nos tempos testados, desepitelizavam completamente o âmnio e, ao mesmo tempo, retiravam a membrana basal. Assim, recomendam novos estudos sobre o assunto, enfatizando a necessidade de redução do tempo de ação das enzimas.

Almejando a solução desses impasses, efetuamos nossos próprios testes, buscando padronizar o método ideal de desepitelização com a menor desestruturação tecidual e preservando a continuidade da membrana basal. Considerando os resultados de Melo et al.¹¹⁷, repetimos seus protocolos e acrescentamos outros, com menor tempo de exposição, principalmente à solução de tripsina/EDTA.

A enzima dispase popularizou-se com Green et al.¹¹⁸ em sua utilização para soltura de epitélios confluentes de queratinócitos. Em relação à desepitelização amniótica, Spurr e Gipson¹¹⁶ demonstram que a dispase retira o epitélio mantendo-o íntegro, em contrapartida, deteriora a membrana basal e demais camadas do âmnio. Corroborando esses resultados, também não obtivemos sucesso com dispase, pois a destruição das demais camadas era demasiadamente intensa (Figuras 13 e 14).

O uso exclusivo de EDTA foi insatisfatório. A exigência do “raspador” de células prejudica o trabalho pela fina espessura do tecido, levando a

rompimentos da membrana durante a raspagem. Histologicamente, fica clara a ineficácia do processo, identificando-se células aderidas em diversos locais (Figura 15).

Os melhores resultados foram conseguidos com a associação de tripsina ao EDTA. A ação conjunta dessas substâncias tem seu uso consagrado nas técnicas de isolamento celular¹⁴. No tempo de 45 e 30 minutos de exposição (Figuras 16 e 17), a retirada do epitélio foi completa, mas com excessiva delaminação. Com 15 minutos (Figura 18), restos celulares ainda podiam ser notados, já com 20 minutos (Figura 19), observamos a retirada completa do epitélio e a menor delaminação das demais camadas. Por isso, esse foi o método considerado padrão para nossos estudos.

Com o intuito de esclarecer o ponto de clivagem de liberação epitelial, foram realizadas análises em microscopia eletrônica de transmissão. Após a exposição à tripsina/EDTA por 20 minutos, visualizou-se que as membranas amnióticas gliceroladas apresentavam preservação da estrutura da membrana basal (Figura 20 A e B). Consideramos esse achado bastante favorável ao cultivo celular e suas implicações serão exploradas com mais detalhes quando discutirmos os estudos de avaliação da membrana basal.

Após o estabelecimento do protocolo de desepitelização, iniciamos os experimentos de padronização do método de irradiação. Atualmente, a esterilização complementar de tecidos, mesmo glicerolados, tem sido recomendada como mecanismo fundamental de garantia de qualidade e segurança aos receptores dos enxertos alógenos^{22, 23, 24}.

A preocupação com a transmissão de doenças no transplante de alógenos deve-se aos inúmeros relatos de contaminação em receptores (conforme Item 3.4 – Revisão bibliográfica). Dziedzic-Goclawska³³ afirma que durante a retirada, processamento ou armazenamento dos enxertos, micro-organismos conseguem infectar o tecido, e, mesmo quando esses procedimentos são realizados em condições de assepsia, a possibilidade de uma doença viral, fúngica ou bacteriana do doador não pode ser completamente descartada, obrigando a esterilização dos aloenxertos.

A radiação ionizante apresenta uma série de vantagens: não produz resíduos radioativos, não origina substâncias tóxicas, pode ser feita na temperatura de armazenamento e embalagem final, com confiabilidade excelente⁷⁷.

Fundamentalmente, existem duas fontes principais de radiação com o fim de esterilização tecidual: raios gama das fontes de ^{60}Co e os feixes de elétrons gerados em aceleradores. Apesar de as duas serem capazes de fornecer a mesma dose de irradiação, a absorção da energia pelos tecidos pode ser diferente para cada um dos equipamentos. Essa disparidade traz resultados desiguais na estrutura biofísica do material esterilizado, exigindo que se estudem previamente os efeitos de cada uma das fontes¹¹⁹.

Na segunda etapa de padronização, comparamos os efeitos da irradiação fornecida por essas duas fontes sobre o âmnio glicerolado com dose de 25 kGy. Os efeitos foram avaliados por microscopia óptica e eletrônica, tanto com as membranas íntegras, como após o processo de denudação do epitélio. A dose

empregada é considerada um valor padrão adotado por grande parte dos Bancos de Tecido do mundo³².

Quando íntegras, não se perceberam grandes diferenças nos epitélios das membranas irradiadas por cobalto-60 (MA-iC60) ou no acelerador de elétrons (MA-iAE). Em relação às camadas estromais, notou-se que as tramas de colágeno parecem mais compactadas no grupo MA-iAE (FIGURA 21) que no MA-iC60 (FIGURA 22), sugerindo que cada um dos tipos de radiação ionizante provoca um determinado efeito sobre o colágeno¹²⁰.

Após a aplicação do processo de desepitelização, as MA-iC60 se desepitelizaram em 20 minutos, semelhante às MA-ni. A comprovação desses achados ocorreu tanto em microscopia óptica como eletrônica (Figura 23 e 26).

Nas MA-iAE, a retirada do epitélio não se completava com o mesmo tempo de ação das enzimas (Figura 24) e, mesmo prolongando-se o tempo de exposição até 28 minutos (Figura 25), ainda se observava a presença de células. Em microscopia eletrônica, foi possível observar restos de células epiteliais, inclusive com pseudópodes, ainda aderidos à membrana basal (Figura 27).

Uma possível explicação para esses achados pode estar ligada ao mecanismo de ação de cada uma dessas fontes. A radiação gama, proveniente de uma fonte de ^{60}Co , e os feixes de elétrons, oriundos de um acelerador de elétrons, diferem no seu poder de penetração. A radiação gama, embora com grande poder de penetração e distribuição mais homogênea, tem baixa intensidade (10^2 a 10^4 Gy/s). A faixa de penetração efetiva de um feixe de

elétrons é função da energia desse feixe e a densidade-espessura do material a ser irradiado⁷⁰.

Em seus estudos, Bourroul¹²⁰ descreve uma análise comparativa dos efeitos dessas duas fontes na esterilização de pele glicerolada, variando a dose de irradiação ofertada entre 5 a 50 kGy e avaliando os efeitos biomecânicos e morfológicos nos aloenxertos. Apesar de testar a pele, podemos extrapolar alguns de seus resultados para explicar nossos achados em relação às MA.

Em suas conclusões, Bourroul verifica que a radiação ionizante em doses acima de 25 kGy no ⁶⁰Co e 5 kGy no acelerador de elétrons provoca significativa alteração na estrutura de colágeno tipo I na derme, sendo diretamente proporcional ao aumento da dose e dependente do tipo de irradiação¹²⁰.

Suas análises histológicas mostram que em 25 kGy, o feixe de elétrons altera as fibras colágenas de tal forma que equivale à desestruturação observada com 50 kGy na fonte de ⁶⁰Co. Provavelmente, isso ocorre porque os raios gama atravessam o material e têm a tendência a perder a maior parte de sua energia em uma única colisão. Por outro lado, a trajetória dos elétrons na matéria é irregular e, assim, a deposição de energia no tecido é maior no seu interior que em sua superfície. Como a dose indicada nos dosímetros equivale à depositada na superfície e não em seu interior, é provável que os tecidos irradiados com aceleração de elétrons estejam recebendo uma dose maior que aqueles por raios gama¹²⁰.

Extrapolando seus dados aos nossos experimentos com âmnio, é possível que a irradiação em acelerador a 25 kGy tenha provocado uma alteração tão significativa das fibras colágenas, que a adesão dessas fibras às células epiteliais tenha aumentado consideravelmente. Assim, o método de desepitelização padronizado por nós não foi suficientemente eficiente para quebrar essas ligações e liberar as células.

Com a fonte de ^{60}Co , as alterações do colágeno não foram tão intensas e as enzimas aplicadas por 20 minutos sobre as MA-iC60 foram eficazes na quebra das ligações epiteliais à membrana basal.

Vale ressaltar que nas MA-IAE, embora a continuidade da membrana basal estivesse preservada enquanto as células epiteliais estavam aderidas à membrana, percebe-se que, quando as células se desprendem, concomitantemente, os elementos da membrana basal também se soltam.

Esta observação fica evidente na Figura 27-C, na qual visualiza-se o extravasamento de colágeno no local em que a membrana basal torna-se descontinuada pela falta do epitélio. Esse achado sugere que, funcionalmente, exista algum tipo de dano à membrana basal provocado pela radiação ionizante dos aceleradores de elétrons na dose de 25 kGy.

Em decorrência desses resultados, optamos por padronizar o uso ^{60}Co a 25 kGy como método de irradiação, formando o grupo das membranas amnióticas irradiadas (MA-i). Dessa maneira, conseguimos padronizar um protocolo único de desepitelização aplicável aos dois grupos (MA-ni e MA-i),

evitando a inclusão de novas variáveis que poderiam dificultar a posterior comparação entre eles.

A comparação entre os dois grupos (MA-ni e MA-i) foi iniciada pela avaliação qualitativa das características físicas. Mesmo antes da aplicação do processo de desnudação, as alterações macroscópicas que a radiação ionizante provoca no âmnio são facilmente perceptíveis, tanto visualmente como na sua manipulação.

Os aloenxertos irradiados apresentam coloração acastanhada, ressecam rapidamente quando expostos ao ar, rompem-se com mais facilidade ao serem submetidos à pequena tração mecânica, aderem com facilidade às luvas e, em alguns momentos, chegam a enrolar-se sobre si mesmos, dificultando sua disposição sobre alguma estrutura plana como o papel-filtro. No material não irradiado, a resistência a traumas é maior, a umidade é mantida por tempo superior, a manipulação é efetuada com mais facilidade e a chance de rompimento é menor (Figura 28).

Essas dificuldades de manejo do âmnio irradiado implicam questionamentos ao Banco de Tecidos quanto à viabilidade de distribuição de membranas irradiadas como curativos biológicos. Sem dúvida, a enxertia desse tipo de material exigirá grande habilidade técnica do usuário para o correto posicionamento dos enxertos no leito receptor. Para solucionar este problema, uma alternativa plausível é a distribuição do material aderido em papéis, tule ou *rayon*, como se fossem curativos autoadesivos do tipo “*band aid*”.

Em relação aos estudos histológicos da membrana basal, a avaliação em HE comprovou que o método de desepitelização padronizado foi eficiente na retirada completa da camada epitelial em ambos os grupos (Figura 29 A e B).

Na coloração de Picrossirius, as fibras de coloração vermelho-alaranjada costumam indicar a existência de fibras colágenas mais grossas do tipo I e III, presentes principalmente nas camadas estromais amnióticas. As fibras amarelo-esverdeadas sugerem a existência de um tipo de colágeno mais fino, como IV e VII, encontrado na membrana basal¹²¹. Apenas o grupo MA-ni apresentava a birrefringência amarelo-esverdeada (Figura 30-A), indicando a presença de resíduos de membrana basal na superfície do tecido. Em contrapartida, nas MA-i não foram vistas essas birrefringências, sugerindo a ausência de membrana basal (Figura 30-B).

As reações de imunofluorescência para colágeno IV (Figura 31-A e C) e laminina (Figura 31-B e D) foram expressas apenas no grupo não irradiado. Essas duas substâncias são marcadores típicos da membrana basal, estando presentes na camada densa e lúcida, respectivamente. A análise em microscopia confocal comprovou a distribuição homogênea das duas proteínas na superfície das MA-ni e completa ausência nas MA-i (Figura 32).

A microscopia eletrônica foi conclusiva quanto à existência ou não de membrana basal após o processo de desepitelização. Corroborando os resultados do Picrossirius e da imunofluorescência, a análise ultraestrutural comprovou a presença da membrana basal no grupo não irradiado (Figura 34 A e B). No grupo das membranas irradiadas, nenhum dos experimentos

evidenciou sinais de membrana basal ou mesmo de resquícios dela. Este fato foi confirmado em análise por ME (Figura 34 C e D), em que se observa a exposição de fibras colágenas do estroma conjuntival.

A manutenção da membrana basal é fundamental para o desenvolvimento dos epitélios cultivados, derivando em estruturas mais organizadas e estratificadas. Herson et al.⁹⁵ comparam a área de junção dermoepidérmica a um trilho que orienta a migração e estruturação do novo epitélio. A interação entre os queratinócitos e a membrana basal contribui para a manutenção da arquitetura tissular, estimulando diversos processos biológicos como a adesão, proliferação, diferenciação e migração celular^{122, 123}.

Para a construção de substitutos dermoepidérmicos baseados no cultivo de queratinócitos sobre qualquer tipo de matriz de origem biológica ou sintética (Item 3.5 – Revisão da literatura), sabe-se que a preexistência de componentes da membrana basal, além de contribuir para a melhora da morfologia da epiderme, tem papel fundamental na formação dos hemidesmossomos e no desenvolvimento da lâmina densa¹²⁴

No grupo não irradiado, o painel histológico indicou a persistência de elementos da membrana basal em todos os experimentos. Esses achados apontam que estabelecemos um modelo de desepitelização que mantém a membrana basal e permite que o biomaterial seja compatível ao suporte de células, com capacidade de gerar um epitélio mais estratificado.

Nas MA-ni, especula-se sobre o ponto de clivagem de separação epidérmica do substrato estroma. A importância desse conhecimento reside no

fato de que algumas proteínas como a laminina e o colágeno IV, quando presentes no remanescente de membrana basal, influenciam positivamente a formação de novos hemidesmosmosos¹²⁴.

A imunofluorescência indireta mostrou-se positiva para colágeno IV (Figura 31-A) e laminina (Figura 31-B) na superfície epitelial do lado denudado. A microscopia eletrônica indica a existência de material eletrodenso em superfície, correspondendo à lâmina densa e, acima disso, imagem eletroluscente sugestiva da camada lúcida da membrana basal eletrônica (Figura 34 A e B). Portanto, a ação de clivagem das enzimas provavelmente ocorreu em algum ponto da lâmina lúcida, preservando o colágeno IV e parte da laminina.

A laminina é um dos principais componentes da membrana basal e contribui para a diferenciação e movimentação celular. Existe um amplo espectro de isoformas de laminina do tipo 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11³⁹. A laminina do tipo 5 é fundamental para a adesão epitelial. A partir da associação das lamininas 6 e 7, formam-se pontes de ligação entre as integrinas $\alpha_6\beta_4$, presentes nas células epiteliais, e as fibras de ancoragem conjuntivas, principalmente colágeno do tipo IV¹⁹, presentes na lâmina densa.

Por outro lado, no grupo irradiado, a microscopia eletrônica não evidenciou sinal de membrana basal, visualizando-se na superfície apenas a presença de tecido conjuntivo amorfo. Esse achado implica a formação de um provável epitélio menos estratificado em comparação às MA-ni, pela falta de laminina e colágeno IV.

A falta de membrana basal no grupo irradiado é contraditória ao que foi afirmado por Von Versen-Hoynck et al.²⁵. Os autores discutem que a continuidade da membrana basal encontra-se preservada quando as MA gliceroladas são irradiadas a 32 kGy. Ressalta-se, porém, que em seus estudos as MA irradiadas não foram submetidas ao processo de desepitelização. Talvez, por esse motivo a estrutura de membrana permaneça íntegra, já que as células epiteliais encontram-se aderidas à estrutura amniótica.

Em nossos estudos, superamos a simples análise morfológica ultraestrutural da membrana amniótica irradiada intacta, e avaliamos também os efeitos agressivos do banho enzimático de desepitelização. Assim, percebemos que a membrana basal não resistia e se desprendia completamente do âmnio, diferindo do encontrado no grupo não irradiado. Assim, possivelmente, a preservação da continuidade da membrana basal citada por Von Versen-Hoynck et al.²⁵ é meramente um achado morfológico microscópico, uma vez que, do ponto de vista funcional, a membrana basal não apresenta a mesma resistência a agentes agressores.

A radiação ionizante pode ter provocado algum tipo de dano à estrutura dos colágenos finos (IV e VII). Enquanto as células epiteliais estavam unidas ao tecido, esses danos não podiam ser percebidos. Porém, com a perda da arquitetura tecidual, o colágeno danificado acabou se soltando, levando à perda completa da zona de membrana basal.

Vale salientar que outras discrepâncias foram identificadas. Por ter utilizado uma dose de 32 kGy, Von Versen-Hoynck et al.²⁵ referem destruição

epitelial com intensa degeneração vacuolar e dissolução das camadas do tecido conectivo em quatro ou cinco bandas com perda da camada de fibroblastos.

Como aplicamos a dose de 25 kGy, não encontramos resultados tão expressivos em termos de destruição tecidual quando comparados aos de Von Versen-Hoynck et al²⁵. Na estrutura íntegra, a destruição epitelial foi menos intensa com a morfologia celular mais preservada e, no tecido conjuntivo, havia delaminações menos intensas, sendo mantida a camada de fibroblastos (Figura 22).

Provavelmente, a redução maior da dose de irradiação acarretará diminuição nas alterações físicas e químicas do tecido. Nos congressos de Bancos de Tecidos, a discussão sobre a dose de irradiação para esterilização permanece um tema controverso. Teoricamente, o estabelecimento da dose ocorre por um cálculo matemático simples, contudo, vários fatores (tipo de conservação, de tecido, de contaminação do material) influenciam esses valores.

A ISO 13409 1996¹²⁵ aconselha para produtos ligados à saúde, inclusive tecidos, a dose de 25 kGy para esterilização. Esta recomendação deve-se ao fato de a carga microbiológica final do produto ser normalmente baixa, pois eles são descontaminados e processados em condições definidas e limpas. Sob o argumento da complexidade da determinação do *bioburden* dos micro-organismos presentes nos doadores cadáveres, o grupo do Banco de Tecidos de Warsaw, na Polônia, utiliza doses de 35 kGy para esterilização tecidual¹¹⁹.

Entretanto, essa alta dose provoca danos físicos, químicos e biomecânicos maiores aos tecidos¹²⁰.

A maior parte dos Bancos de Tecidos aplica 25 kGy para esterilização dos tecidos biológicos, sendo essa a razão da eleição da respectiva dose para irradiar as membranas amnióticas deste projeto. Apesar disso, ressalta-se que essa dosagem causou perda da membrana basal do tecido após o processo de desepidermização, fator que prejudica a cultura de células sobre o biomaterial.

As culturas de queratinócitos humanos sobre as MA-ni e MA-i foram realizadas no sistema de cultivo imerso e em interface ar-líquido. Em 1976, Freeman et al.¹²⁶ demonstram a importância da exposição das células cultivadas sobre bases dérmicas ao ar ambiente, observando a formação de um epitélio com maior proliferação e diferenciação em relação ao sistema imerso.

Em todos os sistemas de cultivo (Figura 35 a 42), tanto no 14º dia como no 21º dia de cultura, o grupo não irradiado mostrou a formação de epitélios melhor estratificados e diferenciados que o irradiado (Figura 43). Como explicado anteriormente, essa diferença provavelmente deve-se à falta da membrana basal no material irradiado.

No grupo não irradiado, as culturas em sistema imerso mostravam um epitélio estratificado, desorganizado, com pequena diferenciação celular sem a formação de um estrato córneo propriamente dito (Figuras 35 e 37). Com a exposição ao ar, o desenvolvimento epitelial foi muito mais exuberante, com melhor estratificação e diferenciação celular, começando a formar um estrato córneo propriamente dito, principalmente ao redor do 21º dia (Figuras 36 e 38).

Embora ainda haja uma certa desorganização epitelial, a situação de cultivo sobre bases não irradiadas em interface ar-líquido foi o grupo que alcançou o resultado mais eficaz e próximo de um substituto cutâneo ideal.

No grupo irradiado, em ambas as situações de cultivo, os resultados foram frustrantes (Figuras 39 a 42). No 14º dia, os epitélios apresentavam-se quase que em monocamada e, com o passar do tempo, houve uma pequena estratificação com a formação de três a quatro camadas de células. A morfologia celular apresentava-se alterada com aspecto fusiforme em todas as camadas, não sendo visualizada a formação de estrato córneo.

A interferência do sistema ar-líquido foi pequena, não sendo suficiente para provocar uma estratificação e diferenciação dos epitélios no sistema imerso e emerso sobre as MA-i, semelhante ao encontrado no grupo MA-ni. Esta observação reforça a importância da presença da membrana basal ao cultivo celular, pois mesmo a exposição ao ar não foi capaz de suprir a falta da junção dermoepidérmica.

As análises em microscopia eletrônica confirmaram a superioridade das culturas em tecido não irradiado. No grupo MA-ni, notava-se a presença de queratina (Figura D) e de pérolas córneas (Figura 44 B), e, entre as células, pôde-se identificar a presença de desmossomos de junção celular bem formados (Figura 44 C e E). Todos esses fatores são indicativos de uma diferenciação celular e da formação de um epitélio mais próximo do tecido cutâneo normal. Sobre as MA-i, estas estruturas quase não foram identificadas, evidenciando um atraso na maturação da epiderme (Figura 45).

Outra diferença constatada na microscopia eletrônica refere-se à membrana basal. No cultivo sobre as bases gliceroladas, pode-se perceber o acúmulo eletrodenso próximo às células epidermais (Figura 44-F), indicando a formação de uma nova membrana basal. No outro grupo, não se visualizou nenhuma neoformação de junção dermoepidérmica.

A desorganização epitelial identificada em todos os grupos pode ser explicada por diversos motivos. A falta de membrana basal completa e de fibroblastos prejudicaria o crescimento e a formação da arquitetura do epitélio¹²⁷. A perda de contato entre os queratinócitos pode ter sido um estímulo à hiperproliferação das células, que passaram a se desenvolver de forma rápida e desordenada sem a membrana basal madura para coordenar a reestruturação da nova arquitetura tecidual⁹⁵.

Yang et al.²⁰ descrevem um substituto dermoepidérmico constituído por queratinócitos cultivados sobre membranas amnióticas criopreservadas. Nesse sistema, há a formação de uma epiderme organizada e estratificada com boa incorporação do novo substituto cutâneo em modelo animal. O possível motivo dessa boa organização talvez seja o repovoamento do âmnio por fibroblastos humanos, os quais estimulariam e orientariam a formação do novo epitélio.

Esses achados representam um novo caminho para a melhora da organização epitelial em nosso substituto cutâneo. Novos testes são necessários para avaliar a capacidade de membranas amnióticas gliceroladas de incorporar fibroblastos em sua estrutura.

Outro ponto que merece reavaliação é a dose de irradiação dos tecidos. Uma dose inferior pode gerar menor dano estrutural ao âmnio, propiciando que a desepitelização ocorra sem a perda da membrana basal. Com a seleção rigorosa de doadores e os cuidados na captação e processamento dos tecidos, ocorre uma redução natural da carga microbiológica, exigindo doses menores de esterilização para que se alcance o nível de segurança de esterilidade.

Além disso, a preservação em altas concentrações de glicerol possui um efeito de desinfecção e, portanto, o tecido glicerolado naturalmente apresenta um *bioburden* reduzido, fato que também reduziria a dose necessária.

A mais recente ISO 11137¹²⁸, de 2006, recomenda uma dose de 15 kGy para esterilização de produtos em saúde. Ngyhen et al.¹²⁹ validam em seu Banco de Tecidos o uso da dose de 15 kGy para esterilização de ossos. Essa nova dosagem pode permitir a criação de uma membrana amniótica segura e estéril e, ao mesmo tempo, compatível ao cultivo de células humanas.

A membrana glicerolada mostrou ser um biomaterial compatível ao cultivo de células alógenas e autógenas com potencial para o uso clínico no tratamento de queimaduras e feridas, contudo, são necessários novos testes *in vivo* para avaliação da biocompatibilidade desse material. Em doses menores, a irradiação tem papel importante para que os Bancos de Tecido consigam fornecer âmnio com qualidade e segurança aos receptores, permitindo o cultivo celular em sua superfície.

7. CONCLUSÕES

---

7. Conclusões

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

1. A exposição de membranas amnióticas gliceroladas em solução enzimática de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos permite a sua completa desepitelização com manutenção da integridade da membrana basal.

2. Quando expostas a tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos, as membranas irradiadas a 25 kGy em Cobalto-60 sofreram completa desepitelização, enquanto as irradiadas em acelerador de elétrons não evidenciaram o mesmo resultado, motivo pelo qual o Cobalto-60 foi adotado como processo de irradiação das MA.

3. A radiação ionizante a 25 kGy em ^{60}Co dificulta o manuseio e a embalagem das membranas amnióticas gliceroladas, além de provocar alterações na coloração do material.

4. O estudo comparativo, em microscopia óptica e eletrônica, entre as MA-ni e MA-i mostrou que o primeiro grupo mantinha a continuidade da membrana basal preservada após a desepitelização, enquanto no segundo grupo não foi possível a identificação de nenhum resquício de membrana basal.

5. O âmnio glicerolado, não irradiado e desepitelizado quimicamente segundo protocolo proposto, é compatível com a proliferação de queratinócitos em sua superfície, conformando epitélio confluyente e pluriestratificado.

6. O âmnio glicerolado, irradiado a 25 kGy e desepitelizado, permitiu o cultivo de queratinócitos em sua superfície, porém o epitélio, embora confluyente, é pouco estratificado e diferenciado.

7. No grupo MA-ni, a situação de cultivo na interface ar-líquido desencadeou processos de proliferação e diferenciação mais acentuados do que na situação imersa, com maior estratificação e formação de camada córnea verdadeira.

8. No grupo MA-i, a situação de cultivo na interface ar-líquido não desencadeou processo de diferenciação mais acentuado que na situação imersa, provocando discreto aumento na estratificação epitelial.

Embora o cultivo de queratinócitos sobre membranas irradiadas a 25 kGy seja possível, evidenciou-se que o processo de proliferação e diferenciação fica bastante prejudicado, quando comparado ao grupo de membranas não irradiadas.

8. ANEXOS

Anexo A**Dados das doadoras de tecidos amnióticos**

Nome	RG-HC	Idade	Cor	Antecedentes médicos
C.A.M.	3238352G	29	Negra	-
E.S.	13739142K	32	Branca	-
D.A.B.R.	4084975G	37	Branca	Dupla lesão Mitral + Hipertensão
I.C.S.	13905827H	27	Branca	Diabetes Mellitus + Hipertensão

Anexo B**Dados das doadoras de pele**

Nome	Idade	Cor	Área inicial (cm²)	Rendimento Primária céls/ml
L.R.N	44	Branca	24	$1,33 \times 10^6$
T.R.F.	40	Branca	12	$1,06 \times 10^6$
M.M.S	38	Parda	9	$1,1 \times 10^6$
I.M.S.	57	Negra	9	$1,2 \times 10^6$
S.A.B.F.	37	Parda	12	$1,45 \times 10^6$

9. REFERÊNCIAS

Referências

1. Mathes SJ. *Plast Surg*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 2600 de 21 de outubro de 2009. *Atualização, aperfeiçoamento e padronização do funcionamento do Sistema Nacional de Transplantes*. Brasília: Brasus; 2009.
3. Tanner JC, Vandreput J, Olley JF. The mesh skin graft. *Plast Reconstr Surg*. 1964;34:287-92.
4. Burke JF, Quinby WC, Bondoc CC. Primary excision and prompt grafting. *Surg Clin North Am*. 1976;56:447-94.
5. Mcmillan BG. Closing the burn wound. *Surg Clin North Am*. 1978;58:1205-31.
6. Bankiewicz KS, Palmatier M, Plunkett RJ, Cummins A, Oldfield EH. Reversal of hemiparkinsonian syndrome in nonhuman primates by amnion implantation into caudate nucleus. *J Neurosurg*. 1994;81(6):869-76.
7. Gajiwala K, Lobo Gajiwala A. Use of banked tissue in plastic surgery. *Cell Tissue Bank*. 2003;4(2-4):141-6.
8. Ward DJ, Bennett JP, Burgos H, Fabre J. The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion. *Br J Plast Surg*. 1989;42(4):463-7.
9. 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.
10. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1999;97:891-986.

11. Singhal S, Vemuganti GK. Primary adult human retinal pigment epithelial cell cultures on human amniotic membranes; cultures on human amniotic membranes. *Indian J Ophthalmol*. 2005;53(2):109-13.
12. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Modulation of keratin and connexin expression in limbal epithelium expanded on denuded amniotic membrane with and without a 3T3 fibroblast feeder layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(10):4230-6.
13. Li W, He H, Kuo CL, Gao Y, Kawakita T, Tenseg SC. Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(6):2381-9.
14. Rheinwald JG, Green H. Growth of cultured mammalian cells on secondary glucose sources. *Cell*. 1974;2:287-93.
15. Bell E, Ehlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. 1981;211:1052-4.
16. Paggiaro AO, Isaac C, Bariani G, Mathor M, Herson MR, Ferreira MC. Construção de equivalente dermoepidérmico *in vitro*. *Rev Bras Cirurg Plast*. 2007;22(3):153-7.
17. Herson MR, Mathor MB, Altran S, Capelozzi VL, Ferreira MC. *In vitro* construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. *Artif Organs*. 2001;25(11):901-6.
18. Hansborough JF, Morgan JL, Greenleaf GE, Bartel R. Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh cultures fibroblast dermal

substitute, function as a bilayer skin replacement in full thickness wounds on athymic mice. *J Burn Care Rehabil.* 1993;14:485-94.

19. Yang L, Shirakata Y, Masachita S, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, Sayama K, Hamuro J, Hashimoto K. New skin: equivalent model from de-epithelized amnion membrane. *Cell and Tissue Research.* 2006;326(1):69-77.

20. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Hanakama Y, Hirakawa S, Sayama K, Hamuro J, Hashimoto K. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *J Dermatol Sci.* 2009;56(3):188-95.

21. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 220, de 16 de dezembro de 2006. *Regulamentação técnica para o funcionamento de bancos de pele e bancos de tecido musculoesquelético.* Brasília: MS; 2006. seção 1: 610.

22. Agência Internacional de Energia Atômica. *Proyecto INT/6/049. Normas Generales para la Operación de Banco de Tejidos em la Region de America Latina.* Lima: AIEA; 2002.

23. American Association of Tissue Banks. *Standards for Tissue Banking.* Virginia: AATB; 2006.

24. European Association of Tissue Banks. *General Standards for Tissue Banking.* Viena: EATB; 2002.

25. Von Versen-Hoeynck F, Syng C, Bachmann S, Möller DE. The influence of different preservation and sterilization steps on the histological properties of amnion allografts – light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank.* 2004;5(1):45-56.

26. Von Versern–Höeynck F, Steinfeld AP, Becker J, Hermel M, Rath W, Hesselbarth U. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. *Biologicals*. 2008;36(4):248-55.
27. Hoekstra MJ, Kreis, RW, du Pont, JS. History of the euro skin bank: the innovation of preservation techniques. *Burns*. 1994;(Suppl. 1):543-7.
28. Van Baare J, Cameron PU, Vardaxis N, Pagnon J, Reece J, Middelkoop E, Crowe SM. The 1998 Lindberg Award Comparison of glycerol preservation with cryopreservation methods on HIV-1 inactivation. *J Burn Care Rehabil*. 1998;19(6):494-500.
29. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns*. 1995;21:356-61.
30. Van Baare J, Buitenwerf J, Hoeshttra MJ, du Pont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns*. 1994;20(Suppl 1):77-80.
31. Blome-Eberwein S, Jester A, Kuentche M, Raff T, Germann G, Pelzer M. Clinical practice of glycerol preserved allograft skin coverage. *Burns*. 2002;28(Suppl. 1):10-2.
32. Djefal A, Tahtat D, Khodja A. Validation and substantial of 25 kgy as sterilization dose for lyophilized human amnion membrane. *Cell Tissue Banking*. 2007;8:9-12.
33. Dziedzic-Goclawska A, Kaminski A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Stachowicz W. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(3):201-19.

34. Singh R, Chouhan US, Purohit S, Gupta P, Kumar P, Kumar A, Chacharkar MP, Kachhawa D, Ghiya BC. Radiation processed amniotic membranes in the treatment of non-healing ulcers of different etiologies. *Cell Tissue Bank*. 2004;5(2):129-34.
35. Singh R, Purohit S, Chacharkar MP, Bhandari PS, Bath AS. Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns. *Burns*. 2007;33(4):505-10.
36. Delascio D, Guariento A. *Obstetricia normal*: Briquet. 3a ed. rev. São Paulo: Sarvier; 1981.
37. Boune GL. The anatomy of the human amnion and chorion. *Proc R Soc Med*. 1966;59:1127-8.
38. John, T. Human amniotic membrane transplantation: Past, present, and future. *Ophtalmol Clin Nor Am*. 2003;(6):43-65.
39. Champliand MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol*. 1996;132:1189-98.
40. Oyama N, Bhogal BS, Carrington P, Gratian MJ, Black MM. Human placental amnion is a novel substrate for detecting autoantibodies in autoimmune bullous diseases by immunoblotting. *Br J Dermatol*. 2003;148:939-44.

41. Almeida PC. Estudo da transição dermoepidérmica dos enxertos de pele e sua relação com o surgimento de vesículas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2009.
42. Rodas ACD. Desenvolvimento de membranas como compostos dermoepidérmicos [tese], São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2004.
43. Atlas de Biologia. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/biologia/celularatlashistologia.ufcspa.edu.br>. Acesso em: 22 nov. 2010.
44. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Brighet N, Macvicar J. Confocal imunofluorescence localization of collagen types I, II, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta*. 1993;14:385-406.
45. Shortt AJ, Genevieve AS, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substance for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2009;30:1059-65.
46. Davis, JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *John Hopkins Med J*. 1910;15:307-96.
47. Sabella N. Use of the fetal membranes in skin grafting. *Medical Record*. 1913;15:478-80.
48. 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.* 1954;13:125-9.

49. Maral T, Bormana H, Arslanb H, Demirhanc B, Akinbingola G, Haberald M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns.* 1999;25:625-35.

50. 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;29:369-74.

51. Ward DJ, Bennett JP, Burgos H, Fabre J. The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion. *Br J Plast Surg.* 1989;42:463-7.

52. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta.* 1991;12:285-8.

53. Quinby WC Jr, Hoover HC, Schefflan M, Walters PT, Slavin SA, Bondoc CC. Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care. *Plast Reconstr Surg.* 1982;70:711-7.

54. Colocho G, Graham WP, Greene AE, Matheson DW, Lynch D. Human Amniotic membrane as a physiologic wound dressing. *Arch Surg.* 1974;109:370-3.

55. Burman S, Tejawani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan VS. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. *Cell and Tissue Bank.* 2004;5:161–75.

56. Gajiwala K, Lobo Gajiwala A. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell and Tissue Bank.* 2004;5:73–80.

57. Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas. *Manual de procedimentos e rotinas*. São Paulo: BT-ICHHC; 2010.
58. Tao RC, Kelley RE, Yoshimura NN, Benjamin F. Glycerol: its metabolism and use as an intravenous energy source. *J Parent Emt Nut*. 1983;7:479-88.
59. Pigossi N, Raia A, Lex A, Habr Gama A, Simonsen O, Haddad J, Stolf NAG, Zerbini EJ, Miniti A, Tenuto R. Estudo experimental e clínico o emprego, como implante, da dura-mater homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. *Rev Assoc Med Bras*. 1971;17:263-78.
60. Fahy G. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*. 1989;23:1-13.
61. Ross A, Kearney JN. The measurement of water activity in allogeneic skin grafts preserved using high concentration glycerol or propylene glycol. *Cell Tissue Bank*. 2004;5:37-44.
62. Basile ARD. A comparative study of glycerinized and lyophilized porcine skin dressings for third degree burns. *Plast Reconstr Surg*. 1982;69:969-72.
63. Cunha AS, Lemos SPS, Silva CF, Barros Filho TEP; Costa, MP; Ferreira MC. Utilização da veia glicerolada na regeneração neural: estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2007;15:210-3.
64. Lemos SPS, Cunha AS; Silva CF, Barros Filho TEP; Costa, MP; Ferreira MC. Nervo alógeno conservado em glicerol: estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2008;16:133-7.

65. Richters CD, Hoekstra MJ, Van Baare J, du Pont JS, Kamperdijk EW. Immunogenicity of glycerol- preserved human cadaver skin *in vitro*. *Burn Care Rehabil*. 1997;18:228-33.
66. Wenst JR, Ulich T, Rao PN. Long term survival of human skin allografts in patients with imunossupresion. *Plast Reconstr Surg*. 2001;113:1347-54.
67. Akle CA, Adinolfi M, Welsh, KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981;2 (8254):1003-5.
68. Akle C, McColl I, Dean M, Adinolfi M, Brown S, Fenson AH et al. Transplantation of amniotic epithelial membranes in patients with mucopolysaccharidoses. *Exp Clin Immunogenet*. 1985;2:43-8.
69. Cameron PU, Pagnon JC, Van Baare J, Reece JC, Vardaxis NJ, Crowe SM. Efficacy and kinetics of glycerol inactivation of HIV-1 in split skin grafts. *J Med Virol*. 2000;60:182-8.
70. Karam Junior D. *Estudo de aplicação da tecnologia “fieldbus” nos sistemas de controle e segurança de uma planta de radioesterilização* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2000.
71. Kuehnert MJ, Clark E, Lockhart SR, Soll DR, Chia J, Jarvis WR. Candida albicans endocarditis associated with a contaminated aortic valve allograft: implications for regulation of allograft processing. *Clin Infect Dis*. 1998;27:688-91.

72. Kainer MA, Linden JV, Whaley DN, Holmes HT, Jarvis WR, Jernigan DB, Archibald LB. Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med*. 2004;350:2564-71.
73. Lee CM, Ho YR, Liu WC. Transmissions of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report. *J Formos Med Assoc*. 2001;100:350-1.
74. Kalil E M, Costa AJF. Desinfecção e esterilização. *Acta Ortop Bras* 1994;2:1-4.
75. Santos GCM. Redução da biocarga e garantia de esterilidade em implantes mamários de silicone [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2009.
76. Martinho Júnior AC, Estudo dos efeitos químicos, físicos e estruturais ocasionados pela radiação ionizante e preservação em cartilagem humana costal. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2008.
77. Phillips GO, coordenador e editor. Multi-media distance learning package on Tissue Banking, Singapore: National University of Singapore, IAEA/NUS Regional Training (RCA), IAEA/NUS Interregional Training Centre 5, 1997.
78. International Atomic Energy Agency. *Radiation biology: a handbook for teachers and students- Training course series*. Vienna; 2010,v.42.
79. Shores JT, Gabriel A, Gupta S. Skin substitutes and alternatives: a review. *Adv Skin Wound Care*. 2007;20:493-508.
80. Kearney JN. Clinical evaluation of skin substitutes. *Burns*. 2001;27:545-51.
81. Carver N, Leigh IM. Synthetic dressings. *Int J Dermatol*. 1992;31:10-8.

82. Bromberg BE, Song IC, Mohn MP. The use of pig skin as a temporary biological dressing. *Plast Reconstr Surg.* 1965;36:80-90.
83. Shuck JM, Pruitt BA, Moncrief JA. Homograft skin for wound coverage: a study in versatility. *Arch Surg.* 1969;98:472-9.
84. Brown JB, Fryer MP, Randall P, Lu M. postmortem homografts as “biological dressings” for extensive burns and denuded areas. *Ann Surg.* 1953;138:618-30.
85. Gallico GG, O’Connor NE, Compton CC, Remensnyder JP, Kehinde O, Green H. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84:1-9.
86. Heck EL. Operational standards and regulation for Tissue Banks. *J Burn Care Rehabil.* 1997;(Suppl1):1511-2.
87. Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff G, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns.* 2007;33:947-57.
88. Carrel A, Burroows MT. Cultivation of adult tissues and organs outside the body. *JAMA.* 1910;55:1379.
89. Arons JA, Wainwright DJ, Jordon RE. The surgical applications and implications of cultures human epidermis: a comprehensive review. *Surgery.* 1992;111:4-11.
90. Cairns BA, DeSerres S, Brady LA, Hultman CS, Meyer AA. Xenogenetic mouse fibroblasts persist in human cultured epidermal grafts: a possible mechanism of graft loss. *J Trauma.* 1995;75-9.

91. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde T, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*. 1981;1:75-8.
92. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelial. *New Engl J Med*. 1984;448-51.
93. Compton CC, Gill JM, Bradfird DA, Gallico GG, O'Connor NE. Skin regenerated from culture epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years grafting. *Lab Invest*. 1989;60:600-12.
94. Medalie DA, Eming AS, Tompkins RG, Yarmush ML, Kreger GG, Morgan JR. Evaluation of human skin reconstituted from composite grafts of cultured keratinocytes and human acellular dermis transplanted to athymic mice. *J. Invest. Dermatol*. 1996;197:121-7.
95. Herson MR. Estudo da composição *in vitro* de substituto cutâneo dermoepidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
96. Kaiser HW, Stark GB, Kopp J, Balcerkiewicz A, Spilker G, Kreysel HW. Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique). *Burns*. 1994;20:23-9.

97. Tanikawa, DYS, Herson MR, Mathor M, Ferreira MC. Uso de gel de fibrina como transportador de queratinócitos humanos *in vitro*. Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica. *Trabalhos Premiados*. 2008;136-40.
98. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2001;108:1569-74.
99. Shimazaki J, Aiba M, Goto E et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2002;109:1285-90.
100. Meller D, Pires RTF, Tseng SCG. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:463-71.
101. Ahn KM, Lee JH, Hwang SJ, Choung PH, Kim MJ, Park HJ, Park JK, Jahng J, Yang EK. Fabrication of myomucosal flap using tissue-engineered bioartificial mucosa constructed with oral keratinocytes cultured on amniotic membrane. *Artif Org*. 2006;30:411-23.
102. 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;4:463-73.
103. Rheinwald JG, Green H. Formation of a keratinizing epithelium in cultured by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*. 1975a;6:317-30.
104. Benassi L, Marconi A, Seignani C, Vaschieri C, Zambruno G. Metodiche di coltura umani normali. In: Zambruno G, Cancedda R, De Luca M, Andreassi L. *Colture de cheratinociti umani normali e loro applicazioni*. Workshop di

biologia cellulari e immunologia della cute. Modema. Università degli Studi di Modela; 1993:5-34.

105. 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;105:215-28.

106. Turrer, CL, Ferreira FPM. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações: revisão de literatura. *Rev Bras Cirurg Plast.* 2008;23(3):234-9.

107. Adinolfi M, Akle CA, McColl, Fensom AH, Tansley L, Connolly P et al. Expression on HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature.* 1982;295:325-7.

108. 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;28:655-66.

109. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(9):2506-13.

110. Koizumi N, Rigby H, Fullwood N, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K et al. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(1):123-34.

111. Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S. Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic

membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea*. 2003b;22:70-1.

112. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Nakamura T et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:93-9.

113. 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;86(4):463-71.

114. Grueterich M, Tseng SC. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane. *Arch. Ophthalmol*. 2002;120(6):783-90.

115. Campbell S, Allen TD, Moser BB, Aplin JD. The translaminal fibrils of the human amnion basement membrane. *J Cell Sci*. 1989;94 (2):307-18.

116. Spurr SJ, Gipson IK. Isolation of corneal epithelium with Dispase II or EDTA. Effects on the basement membrane zone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985;26(6):818-27.

117. Melo GB, Gomes JA, Glória MA, Martins MC, Haapalainen EF. Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da membrana amniótica humana. *Arq Bras Oftalmol*. 2007;70(3):407-11.

118. Green H, Kehinde O, Thomas J Growth of cultured human epidermis cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Acad Sci USA*. 1979;76:5665-8.

119. Dziedzic-Goclawska A, Stachowicz W. Sterilization of tissue allografts. In: Phillips GO, editor. *Advances in Tissue Banking*. Singapore: World Scientific/IAEA. 1997;1:261-315.
120. Bourroul SC. Caracterização dos efeitos da radiação ionizante em pele humana para aloenxertos [dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2004.
121. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan; 1982.
122. Blome EA, Weckmann MT, Capen CC, Rosol TJ. Influence of extracellular matrix macromolecules on normal human keratinocyte phenotype and parathyroid hormone-related protein secretion and expression *in vitro*. *Exp Cell Res*. 1998;238:204-15.
123. Kim JP, Chen JD, Wilke MS, Schall TJ, Woodley DT. Human keratinocyte migration on type IV collagen. Roles of heparin-binding and alpha 2 beta 1 integrin. *Lab Invest*. 1994;71:401-8.
124. Kim SW, Park KC, Kim HJ, Cho KH, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Lee JS, Park KD. Effects of collagen IV and laminin on the reconstruction of human oral mucosa. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:108-12.
125. ISO 13.409 1996. Sterilization of health care products: radiation sterilization – substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches. Disponível em: <http://www.iso.org>. Acesso em: 21 nov. 2010.

126. Freeman AE, Igel UJ, Herrman BJ, Kleinfeld KL. Growth characterization of human skin epithelial cultures. *In vitro*. 1976;12:352-62.
127. Andriani F, Margulis A, Lin N, Griffey S, Garlick JA. Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype. *J Invest Dermatol*. 2003;120:923-31.
128. ISO 11137-2:2006. Sterilization of care products radiation Parte 2: establishing the sterilization dose. Disponível em: <http://www.iso.org>. Acesso em: 21 nov. 2010.
129. Ngyhen.H, Morgan DA, Sly LI, Benkovich M, Cull S, Forwood MR. Validation of 15 kGy as a radiation sterilisation dose for bone allografts manufactured at the Queensland Bone bank: application of the Vmax 15 method. *Cell Tissue Bank*. 2008;9:139-47.

APÊNDICES

|

RECEBIDO SPG **13/7/09**
ASS: *Sueli*

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0203/09**, intitulado: "**CULTURA DE QUERATINÓCITOS HUMANOS SOBRE MEMBRANAS AMNIÓTICAS PRESERVADAS EM GLICEROL DE CONCENTRAÇÃO > 85%.**" apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Mônica Beatriz Mathor**

Pesquisador (a) Executante: **André Oliveira Paggiaro**

CAPPesq, 02 de Julho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Termo de consentimento do BT-ICHC

DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E QUEIMADURAS BANCO DE TECIDOS ICHC

Laboratório de Investigação Médica – LIM 04 - FMUSP.

TERMO DE DOAÇÃO DE TECIDOS / CÉLULAS – IN VIVO

Eu _____
Nascida (o) em ____/____/____ portadora do RG no. _____
CIC no. _____, residente e domiciliada à Rua _____
Cidade _____ Estado _____ CEP: _____
Telefone ( ) _____ estando no juízo de minhas atribuições, **APÓS ESCLARECIMENTOS** feitos pela equipe médica acerca da necessidade da retirada de _____ como parte integrante do ato cirúrgico ao qual serei submetido(a) e do destino dado normalmente a este tecido.

ACEITO: doar, gratuitamente, este tecido e/ou seus componentes para finalidade de pesquisas atuais e futuras de técnicas em ciências da saúde e biotecnologia, para cultivo e criopreservação de células, para transplante alógeno (todo ou partes) a receptor, ou para outro destino que o Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas ou do Laboratório de Investigação Médica LIM 04 – FMUSP, venha a considerar de interesse científico. Autorizo a conservação e distribuição destes tecidos/células por tempo indeterminado.

Entendo que o procedimento cirúrgico e tratamentos complementares dispensados pela equipe médica e para médica NÃO serão modificados em caso de aceite ou recusa desta solicitação para a doação.

ASSINATURA DO (A) DOADOR(A):

_____

São Paulo, de de 200

1º Testemunha: Nome _____
RG.: _____ Ass.: _____

2º Testemunha: Nome _____
RG.: _____ Ass.: _____

Colar Etiquetas