

Comparação dos meios de preparação e preservação de membrana amniótica humana para uso no tratamento de doenças da superfície ocular

Comparison of the preparation and preservation techniques of amniotic membrane used in the treatment of ocular surface diseases

Peter Alexander von Harbach Ferenczy¹ <https://orcid.org/0000-0001-5693-3844>
Luciene Barbosa de Souza² <https://orcid.org/0000-0001-6542-1277>

RESUMO

Atualmente a membrana amniótica (MA) tem obtido importância devido à comprovada capacidade de reduzir inflamação, auxiliar a cicatrização e epitelização, possuindo propriedades antimicrobianas e antivirais, além de baixa imunogenicidade. As indicações de seu uso na oftalmologia têm aumentado muito nas duas últimas décadas. Objetivo: Descrever a estrutura básica e as propriedades biológicas da MA em relação aos componentes da sua matriz extracelular e fatores de crescimento, as consequências de diferentes técnicas empregadas na sua preservação e esterilização, métodos para remoção do epitélio e a comparação dos custos dos diferentes meios de conservação atualmente empregados. Métodos: Pesquisa nas bases de dados do Portal da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Pubmed, Cochrane, Scielo e Lilacs com as palavras-chave: membrana amniótica, transplante, reconstrução da córnea, doenças da conjuntiva. Resultados: A literatura é vasta na descrição dos efeitos de diversos agentes e técnicas na preparação da MA, dentre elas sua preservação, esterilização e desepitelização. A membrana desnuda tem sido a escolha para a reconstrução da superfície ocular, pois facilita a cicatrização. Em relação aos agentes conservantes, o glicerol é o meio mais utilizado mundialmente pelo baixo custo e facilidade de manuseio. Conclusão: A comparação das diversas técnicas nos guia na elaboração de protocolos de preparo da MA para uso oftalmológico. A membrana desnuda facilita a cicatrização em relação a com células epiteliais. O glicerol é o meio de conservação mais utilizado pelo baixo custo e facilidade de manuseio.

Descritores: Transplante; Membrana amniótica; Doenças da córnea; Doenças da túnica conjuntiva

ABSTRACT

Currently, the amniotic membrane (AM) has obtained importance due to its ability to reduce inflammation, helping in the healing and epithelialization processes, having antimicrobial and antiviral properties and low immunogenicity. Its indications in ophthalmology have increased considerably in the past two decades. Objective: To describe the basic structure and biological properties of the AM, the components of the extracellular matrix and growth factors, the consequences of different techniques used in its preservation, and sterilization methods for the epithelium removal. To compare the costs of the different preservation solutions currently employed. Study design: literature review. Methods: Research in BVS databases, PubMed, Cochrane, Scielo and Lilacs with keywords: amniotic membrane transplantation, corneal reconstruction, conjunctival diseases. Results: The literature is vast in describing the effects of different agents and techniques used in the preparation of MA, including its preservation, sterilization and desepithelization. The naked membrane is the choice to reconstruct the ocular surface, as it facilitates the healing course. Regarding the preservatives, glycerol is the most used worldwide due its low cost and easy handling. Conclusion: Comparing different techniques guides us in developing a MA preparation protocol for ophthalmic use. The naked membrane facilitates the healing process compared with the presence of epithelial cells. The glycerol is the most used preservation method because of its low cost and easy handling.

Keywords: Transplantation; Amniotic membrane; Corneal diseases; Conjunctival diseases

¹ Setor de Segmento Anterior, Hospital de Olhos do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

² Setor de Córnea e Doenças Externas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Instituição onde o trabalho foi realizado: Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Recebido para publicação em 26/05/2019 - Aceito para publicação em 27/08/2019.

INTRODUÇÃO

A membrana amniótica (MA) é a camada mais interna das três que constituem as membranas fetais. Sua primeira utilização no tratamento de doenças data de 1910 em transplante de pele.⁽¹⁾ Também foi utilizada em procedimentos cirúrgicos relacionados ao trato genito-urinário, cérebro, cabeça e pescoço, entre outros.^(2,3) A primeira utilização documentada na oftalmologia foi em 1940 no tratamento de queimaduras oculares.⁽⁴⁾ Em 1990, Kim e Tseng propagaram seu uso na prática oftalmológica devido ao sucesso obtido na reparação de defeitos corneanos.⁽⁵⁾ Atualmente a MA tem obtido importância devido à comprovada capacidade de reduzir inflamação, auxiliar a cicatrização e epitelização, possuindo propriedades antimicrobianas e antivirais, além de baixa imunogenicidade.⁽⁶⁾

As indicações de seu uso têm aumentado nas duas últimas 2 décadas, como em defeito epitelial corneano persistente, úlcera neurotrófica, perfurações corneanas, úlcera em escudo, ceratite infecciosa, ceratopatia bolhosa, reconstrução da superfície ocular após exérese de tumores, na Síndrome de Stevens Johnson, reparo de seidel em trabeculectomias, na cirurgia de pterígio, ceratopatia em faixa e após queimaduras químicas.⁽⁴⁾ Mais recentemente, tem sido utilizada como substrato para transplante de células tronco epiteliais da superfície ocular, células do endotélio corneano e como substrato epitelial de pigmento retiniano.⁽⁷⁻¹⁰⁾

O processo desde a retirada da placenta doadora até o transplante da MA é complexo. Antes da retirada é necessária seleção adequada do potencial doador. Outro importante passo é o processo de desepitelização. A MA desnuda promove melhor proliferação e diferenciação celular, melhor integridade estrutural, assim como um padrão mais uniforme de crescimento celular quando comparada à MA não-desepitelizada.^(11,12)

A literatura é vasta na descrição dos efeitos de diversos agentes e técnicas na preparação da MA, dentre elas sua preservação, esterilização e desepitelização. Nessa revisão, descreveremos a estrutura básica e as propriedades biológicas da MA em relação aos componentes da sua matriz extracelular e fatores de crescimento, as consequências de diferentes técnicas empregadas na sua preservação e esterilização, métodos para remoção do epitélio e a comparação dos custos dos diferentes meios de conservação atualmente empregados.

MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica com pesquisa nas bases de dados do Portal da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Pubmed, Cochrane, Scielo e Lilacs com as palavras-chave: membrana amniótica, transplante, reconstrução da córnea e doenças da conjuntiva.

RESULTADOS

Estrutura básica

Histologicamente, a MA é uma membrana avascular de cinco camadas, com 0,02 a 0,5mm de espessura e que delimita a camada mais interna das 3 que constituem as membranas fetais. O líquido amniótico banha a superfície apical interna, enquanto a superfície externa é ligada ao córion. A camada mais externa das membranas fetais é a decídua, que é composta por endométrio modificado e é o único componente das membranas fetais de origem materna.⁽¹³⁾

A camada amniótica epitelial consiste em uma camada simples de células cuboidais e colunares com microvilos na superfície apical. O epitélio está sobre a membrana basal (MB), que lembra muito a MB conjuntival. A substância própria contém uma camada colágena compacta, que promove força tênsil e uma camada fibroblástica, que é a camada mais espessa da MA e consiste de fibroblastos embutidos em uma frouxa rede reticular. A camada esponjosa, rica em mucina, é a mais externa da MA e a mais próxima ao córion.⁽¹³⁾ As últimas 3 camadas podem ser difíceis de ser distinguidas por exame histológico em tecido criopreservado (Figura 1).



Figura 1: Coloração com hematoxilina-eosina de uma amostra de membrana amniótica. Uma única camada de células epiteliais cubóides que recobrem a membrana basal e o tecido conjuntivo frouxo do estroma podem ser observados.⁽¹⁴⁾

Fonte: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Cornea. 3rd ed. New York: Elsevier; 2011.

Propriedades biológicas

Componentes mesenquimais da matriz extracelular (MEC)

A MEC tem várias funções, tais como prover suporte e ancoragem às células e regular o comportamento dinâmico celular. Na MA a substância própria enreda uma variedade de fatores de crescimento e age como um depósito local.⁽¹⁵⁾

Colágeno dos tipos 1 e 3 são os componentes fibrilares estruturais principais da substância própria. A imunohistoquímica revela predominância do colágeno tipo 1 nas camadas estromais. A distribuição do tipo 3 é similar à do tipo 1, entretanto, a intensidade da coloração do tipo 3 é maior perto da MB amniótica. Colágeno tipo 4 é um componente comum a todas as membranas basais e aparece como uma banda densa na MA com cerca de 0,2 micra. As camadas compacta e fibroblástica mostram fraca fluorescência do colágeno tipo 4. Colágenos 5 e 6 são filamentosos e conectam os colágenos fibrilares às estruturas dos tecidos conectivos circundantes e à MB. A intensidade do colágeno tipo 6 é equivalente entre as camadas compacta e fibroblástica. Sua concentração é maior perto da membrana basal amniótica, enquanto que a camada esponjosa evidencia imunocoloração menos intensa.⁽¹⁶⁻¹⁹⁾

Outra importante propriedade estrutural fundamental na aplicação clínica é o papel de suporte como substrato à organização celular epitelial, já que membranas basais geralmente servem como suporte biológico. Fukuda et al relataram semelhanças entre laminina, fibronectina e colágeno tipos 4, 5 e 7 da MB da conjuntiva, córnea e MA. Entretanto, notou-se que a sub-cadeia alfa do colágeno tipo 4 da MB amniótica assemelhava-se mais com a conjuntival do que com a corneana.⁽¹⁹⁻²¹⁾

Outro importante componente da MB é a endostatina, que é um heparan-sulfato proteoglicano e tem mostrado ser um potente fator anti-angiogênico, podendo inibir a proliferação celular endotelial, angiogênese e crescimento tumoral. Trombospondina-1 (TSP-1) é uma matriz proteica multifuncional secretada pelas células e também tem mostrado papel anti-angiogênico. Riau et al mostraram por imuno-histoquímica que a TSP-1 se localiza nas células epiteliais amnióticas com mínima expressão no estroma.⁽²²⁾

Outro componente menos estudado, a elastina, é detectada principalmente nas células epiteliais amnióticas com presença regular no estroma. A importância maior da elastina reside na habilidade funcional em prover elasticidade ao tecido.⁽²³⁾

Fatores de crescimento

Um dos mecanismos de ação do transplante de MA é a liberação de fatores de crescimento que facilitam a re-epitelização corneana, bem como redução de cicatrizes e inflamação. Vários fatores de crescimento estão presentes na MA, tais como: fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformador (TGF)- α , β 1, β 2 e β 3, fator de crescimento de queratinócito (KGF), receptor de KGF (KGFR), fator de crescimento de hepatócito (HGF), receptor de HGF (HGFR), fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).^(24,25) Quantificação pelo método ELISA mostrou níveis maiores de fatores de crescimento (e potentes mitógenos) EGF, HGF, KGF e bFGF na MA contendo epitélio quando comparada a MA desnuda. Receptores EGF (EGFR), KGF e bFGF são mais concentrados no epitélio amniótico (Figura 2). O EGF é um potente mitógeno no crescimento celular epitelial e seu elevado nível de expressão pode ser uma explicação para a promoção da cicatrização da superfície ocular após transplante. O PDGF é também responsável por nortear respostas celulares como proliferação, sobrevivência, migração, e ainda a deposição de fatores de remodelamento e da MEC.^(25,26)

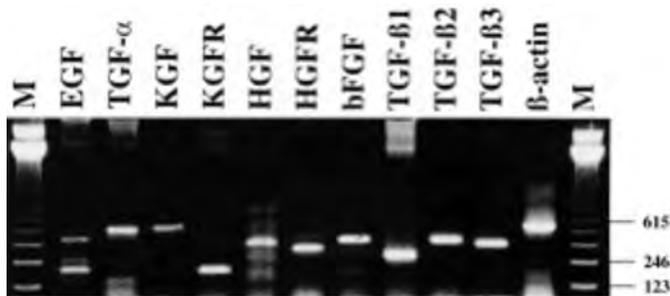


Figura 2: Gel corado com brometo de etídio de produtos RT-PCR para oito fatores de crescimento (fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador-(TGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), e os fatores de crescimento transformadores (TGF) β 1, β 2 e β 3) e dois receptores do fator de crescimento (receptor KGF (KGFR) e receptor HGF (HGFR)) em membrana amniótica humana preservada.

Fonte: Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000;20(3):173-7.⁽²⁵⁾

Koizumi et al. evidenciaram a produção de KGF e HGF pelo epitélio amniótico, fatores de crescimento que são comumente produzidos por células mesenquimais, como os fibroblastos estromais corneanos.⁽²⁵⁾ Na superfície ocular esses fatores de crescimento no epitélio devem influenciar a cicatrização corneana por meio de uma ação parácrina. Portanto, pode-se sugerir que após

o transplante da MA, a re-epitelização corneana pode ser acelerada pelos KGF e HGF produzidos pelo epitélio amniótico.⁽²⁷⁾

O TGF-beta estimula a síntese e deposição de proteínas da matriz extracelular através do incremento da síntese de inibidores de protease, supra-regulação de moléculas de adesão celular e da supressão da síntese de proteases degradadoras da matriz, podendo ser considerado fator de crescimento influente no controle da atividade fibroblástica durante a cicatrização.⁽²⁸⁾ Entretanto, a MA suprime a sinalização de TFG-beta em fibroblastos corneanos e limbares, e em fibroblastos da conjuntiva e de pterígio.^(29,30) Isso, por sua vez, sugere que a redução do hiper-crescimento fibroblástico após o transplante de MA depende mais da supressão da expressão de TGF-beta pelos fibroblastos da superfície ocular do que de um efeito direto do TGF-beta liberado pela MA.⁽²⁵⁾

Seleção e captação da membrana doadora

A transmissão de doenças ao receptor é sempre um fator de risco nos transplantes de órgãos e tecidos humanos. A doadora de MA deve ser paciente com história clínica saudável, não-usuária de drogas, submetida à cesariana eletiva.⁽³¹⁾

Por recomendações da Food and Drug Administration (FDA), a amostra sanguínea retirada em visita pré-natal deve ser submetida a uma série mínima de testes sorológicos, que incluem HIV-1/2, Hepatite B e C e sífilis.^(4,32) Exames adicionais podem ser realizados, como triagem para citomegalovírus e HTLV. Como existe a possibilidade de o doador estar em período de janela imunológica, os testes devem ser repetidos, mesmo quando negativos, 6 meses após o parto. Enquanto isso, a MA é geralmente preservada em glicerol até que os resultados sejam confirmados.⁽³¹⁾ Por se tratar de processo de doação de tecido, a documentação da captação é mandatória.

O processamento e a preparação da membrana são realizados sob condições estéreis. Um coquetel antibiótico para cobrir bactérias e fungos Gram-negativos e Gram-positivos é usado em soluções de lavagem e armazenamento. Dois protocolos diferentes estão em voga. Uma popularizada pelo grupo de Tsuboto em que a membrana é cortada em pedaços medindo 10 cm x 10 cm e enxaguada sequencialmente durante cinco minutos cada em dimetilsulfóxido 0,5 M (DMSO) (4% w / v em solução salina tamponada com fosfato 0,01M PBS) , 1,0 M de DMSO (8% w / v em 0,01M PBS) e 1,5 M de DMSO (12% w / v em 0,01M PBS).⁽³³⁾ O segundo método foi popularizado por Tseng et al. e consiste em armazenar os pedaços de membrana em glicerol a 50% em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) ou TC-199.⁽⁵⁾ Os pedaços de membrana geralmente são espalhados pelo lado epitelial, em papel de nitrocelulose antes do armazenamento em meio. O tecido é armazenado congelado a -80°C e liberado para uso somente após o segundo teste de triagem sorológica, realizado seis meses após o parto cesárea. O tecido tem sido armazenado e usado por até 2 anos pós-parto. O tecido é descongelado em temperatura ambiente e enxaguado em solução salina normal tamponada imediatamente antes de ser.⁽⁴⁾

Desepitelização

A MA possui uma variedade de proteínas e fatores promotores de crescimento. Não é bem claro ainda como eles são afetados pelos diversos procedimentos empregados para o preparo da MA. Tampouco foram determinados quais fatores e componentes da matriz extracelular são mais determinantes na promoção do crescimento e da adesão epitelial. Várias técnicas e reagentes têm sido descritos para realizar a remoção das células epiteliais na tentativa de produzir um substrato biológico capaz.

de cultivar diferentes tipos celulares.⁽³⁴⁾ Há dúvidas se a MA intacta ou desnuda é o melhor tipo de substrato para a expansão ex vivo de células epiteliais para a construção da superfície ocular. Alguns autores reportaram potenciais benefícios da MA intacta. Foi demonstrado que células epiteliais da MA podem produzir neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores neurotróficos e fatores de crescimento derivados de pigmento.⁽³²⁻³⁸⁾

Em contrapartida, outros grupos demonstraram que a MA desnuda pode promover melhor proliferação e diferenciação celular, melhor adesão celular, assim como padrão de crescimento celular mais uniforme comparado à MA intacta.^(11,39) A presença do epitélio amniótico pode também impedir um crescimento uniforme de explantes cultivados na membrana e atrasar a formação de ligações hemidesmosomais resistentes.⁽⁴⁰⁾ Esses fatores se traduzem em um melhor processo de cicatrização. Facilitar a cicatrização pode ser considerada uma das mais importantes propriedades da MA e determina a maior parte de suas indicações clínicas. Por isso, MA desnuda tem sido uma das opções para a reconstrução da superfície ocular.

Vários métodos têm sido descritos para a desepitelização da MA. Cada método tem revelado diferentes efeitos na estrutura e nas propriedades biológicas da membrana. Idealmente, o método de desepitelização seria eficiente e não alteraria a integridade estrutural (membrana basal em particular) ou sua função biológica.

Método da Dispase

A ideia do uso da dispase para remoção de células epiteliais amnióticas foi adaptada da técnica usada para obtenção de epitélio corneano intacto.^(41,42) A dispase age enzimaticamente através de ação proteolítica que atinge proteínas da MB, tais como laminina, colágeno tipos IV e VII, e fibronectina.^(43,44)

A literatura mostra o uso clínico da MA desnuda empregando 1,2 U/mL de dispase II com tempo de tratamento variando de 5 minutos a 2 horas em temperatura ambiente. Segue-se então delicada raspagem. O tratamento com dispase II resulta em ruptura da MB, especialmente a lâmina densa. Há dano físico e biológico irreversíveis após incubação com dispase II. O arranjo estromal subjacente torna-se frouxo e colágeno tipo VI, fibronectina, e vários fatores de crescimento (TGF- α , receptores β 1 e β 2, PDGF-A, VEGF e EGFR) diminuem após incubação prolongada. Remoção completa da MB é observada somente após 30 minutos de tratamento.⁽⁴⁵⁾

Li et al investigaram explantes epiteliais limbares cultivados em MA intacta e desepitelizada.⁽⁴²⁾ Após desagregação da membrana basal nas amostras de MA notou-se posterior formação de componentes da MB mesmo na amostra desepitelizada. Isso sugere que uma membrana intacta talvez não seja de suma importância na expansão de células epiteliais. Isso também explica a alta taxa de sucesso do uso da MA tratada com dispase, mesmo com a MB totalmente removida, na reconstrução da superfície ocular.

Método do EDTA

O ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) é um agente quelante que influencia o contato intercelular regulado por íons cálcio. Estudos reportam uso do EDTA em concentrações variando de 0,02% a 0,25% por 10 minutos a 2 horas a 37°C.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ É seguido geralmente de raspagem mecânica das células epiteliais remanescentes.

Uma remoção de células epiteliais mais vasta sem quebra da MB subjacente é descrita usando essa técnica.^(46,48) Os componentes da membrana extracelular (MEC) da MA desepitelizada usando EDTA sem lesão à MB são semelhantes aos da MA intacta e fatores de crescimento são mais escassos na forma

desnuda pela raspagem mecânica vigorosa após a quelação com EDTA. Componentes da MA (colágeno tipos IV e VII, laminina-5 e fibronectina) também são mantidos após desepitelização.⁽⁴⁹⁾ Entretanto, a associação de desepitelização ao tratamento com uso de EDTA demonstrou comprometimento da integridade da membrana.⁽⁵⁰⁾ Com o objetivo de se obter uma remoção de células epiteliais completa, é necessária uma raspagem mais agressiva e com isso mais dano é causado.

Em termos de resistência, não foi observada significância estatística na diferença entre MA intacta e a desepitelizada com método EDTA a 0,02%.⁽⁵¹⁾

Método Tripsina-EDTA

Tripsina-EDTA é geralmente usada para separar células semeadas do frasco de cultura. Tem sido utilizada na remoção de células epiteliais da MA em concentrações variando de 0,1% a 0,25% a 37°C por 30 minutos. Na maioria dos casos, a retirada das células epiteliais amnióticas foi observada sem raspagem, embora em alguns grupos foi necessária raspagem após incubação. Tratando a membrana com tripsina-EDTA a 0,25%, Mehta et al mostraram presença de colágeno tipos IV e VII, laminina-5 e a presença de lâmina densa.⁽²⁴⁾ Entretanto, muitos componentes da MEC e fatores de crescimento não foram detectados por imunocoloração, provavelmente devido à natureza agressiva do tratamento com tripsina-EDTA, que possivelmente degradou os componentes da MEC e os fatores de crescimento.

Método da Ureia

A ureia é conhecida por sua propriedade desnaturante de proteínas e tem a capacidade de solubilizá-las. A desepitelização da MA pode ser obtida através do tratamento com ureia refrigerada 5 M por 5 minutos, seguida por suave desepitelização. As vantagens do uso desse método são o relativo período de incubação curto e o agente facilmente disponível (ureia). A membrana amniótica desepitelizada por esse método apresenta uma superfície lisa e presença de lâmina basal. Componentes da MEC permaneceram presentes na forma desepitelizada.⁽⁵²⁾

Método do Etanol

Etanol tem sido usado para separar a camada epitelial da MB na confecção de flaps.⁽⁵³⁾ Desepitelização com uso de etanol utiliza incubação da MA em etanol a 20% por 30 segundos seguido de desepitelização mecânica. Semelhante à técnica da ureia, os benefícios da técnica são o curto período de incubação e a fácil disponibilidade do etanol. Esse método requer raspagem mais agressiva devido ao baixo poder de desnaturação do etanol. Apesar de a lesão à MB ser frequente devido à raspagem agressiva, como demonstrado pela maioria dos estudos, poucos autores têm evidenciado em microscopia eletrônica a presença de MB intacta.⁽²⁴⁾ A existência de remanescentes celulares pode ser benéfica para o crescimento de células cultivadas, assim como tem sido sugerido em outros biomateriais que micro ou nano irregularidades de superfície podem potencializar o crescimento celular.⁽⁵⁴⁾ Componentes da MEC como colágeno tipos I, II, IV, VI e VII, laminina-5, fibronectina, elastina e trombospondina, e fatores de crescimento tais como TGF- α , receptores β 1 e β 2, EGFR, KGF, bFGF, VEGF e PDGF são expressos na forma desnuda.⁽²⁴⁾

Método da termolisina

O uso da termolisina na remoção do epitélio amniótico é novo. Termolisina é uma metaloproteínase termoestável isolada do bacilo *Streptothermophilus*, que já foi previamente usada para isolar células epidérmicas.^(55,56) Com o emprego da termolisina, um simples passo de lavagem é capaz de remover as células epiteliais

amnióticas sem nenhum procedimento mecânico de raspagem. O tratamento da MA com termolisina a 125µg/mL por 9 minutos é capaz de gerar uma membrana completamente desnuda, a qual tem aparência morfológica consistente e lâmina basal intacta.⁽⁵⁰⁾

Componentes da MB tais como colágeno tipos IV e VII, integrinas α6 e β4, e laminina-5 são distintas e consistentemente expressas na MA tratada por esse método.⁽⁵⁰⁾ A detecção de integrinas α6 e β4 na ausência de células sugere que a termolisina cliva especificamente o complexo desmossômico.⁽⁵⁷⁾ Isso também sugere que a atividade proteolítica da termolisina é mais específica que a de outros agentes usados para isolar células epiteliais. Essas observações são corroboradas por Perreault e cols, que utilizaram termolisina para isolar e gerar culturas de células epiteliais intestinais humanas normais viáveis.⁽⁵⁸⁾

Método do tampão hipotônico, SDS e nuclease

Wilshaw e cols foram pioneiros no emprego desse método e a MA foi transplantada com sucesso em região subcutânea de modelo murino.^(59,60) Seu uso na reconstrução da superfície ocular não foi reportado, porém Shortt e cols realizaram expansão ex vivo de células tronco epiteliais limbares em MA desepitelizada usando a técnica descrita por Wilshaw e cols e evidenciou que havia maior proliferação celular e número de células expressando ΔN-p63α e ABCG2 comparado a MA intacta.⁽⁶¹⁾

Nesse método, a MA é incubada em solução tampão hipotônica 10mM contendo EDTA 0,1% e aprotinina 10 KIU/mL a 4°C por 16 horas para induzir lise através do edema celular pela dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente iônico, que é então utilizado para tratar a MA à temperatura ambiente por 24 horas. O detergente se liga à membrana celular separando a bicamada lipídica e causando sua desintegração. A seguir é incubada com DNase 50 U/mL e RNase 1 U/mL por 3 horas a 37 °C para assegurar a remoção de DNA e RNA residuais da matriz. O isolamento das células epiteliais amnióticas pode ser atingido sem raspagem mecânica. Não foi evidenciada perda de colágeno tipo IV, glicosaminoglicanas, ou elastina na MA e também não houve diferença significativa no montante de colágeno desnaturado encontrado na MA desnuda quando comparada a intacta. Microscopia eletrônica revelou arranjo de fibrilas colágenas similar na desnuda e na intacta.⁽⁵⁹⁾

Preservação e esterilização da membrana

A MA utilizada em cirurgia oftalmológica tem sido fresca ou processada através de diversos métodos de preservação tais como congelação, liofilização ou criopreservação em glicerol. Com o objetivo de minimizar riscos de infecção que podem ser transmitidas pela MA, estudos recentes têm usado a combinação de preservação com esterilização por irradiação gama. Novos agentes como ácido paracético e trealose também têm sido usados recentemente para preservação e esterilização da MA. (Figura 3)

Criopreservação em Glicerol

A preservação em glicerol é o método mais empregado no mundo. O armazenamento em glicerol foi introduzido nos Países Baixos em 1984 para preservar pele doadora para transplante. Ótimos resultados obtidos nas últimas décadas levaram a uma aceitação clínica global, incluindo sua utilização na preservação da MA. Embora se saiba que tem certo efeito antiviral, não é conhecida sua ação esterilizante. Mesmo após preservação por vários meses, vírus e bactérias podem ser ainda viáveis. O uso de uma concentração elevada de glicerol compromete a viabilidade das células da MA.⁽⁶²⁻⁶⁶⁾

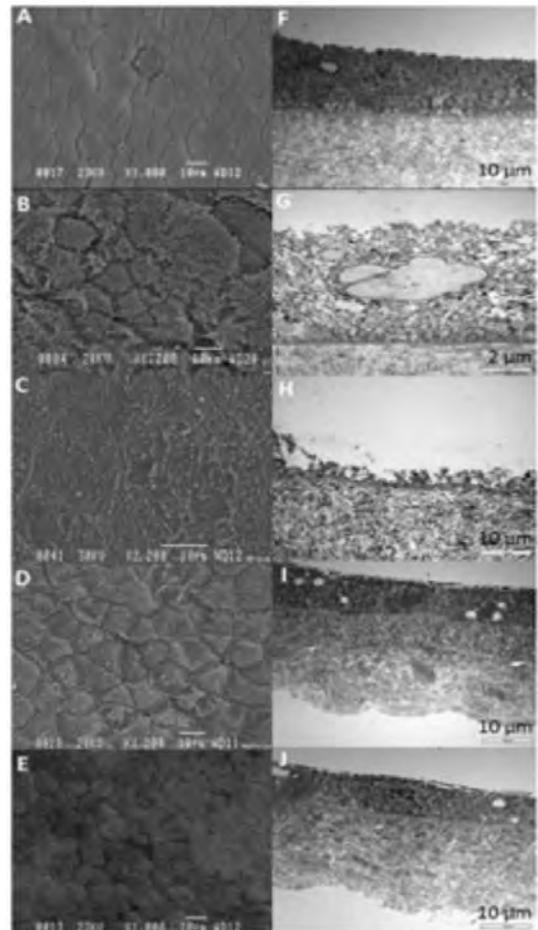


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura e micrografias de microscopia eletrônica de transmissão correspondentes das camadas epiteliais e estromais em substratos de MA preservados. Fresco, (A, F); criopreservado, (B, G); desnudado (C, H); seco (D, I) e pós-tratamento com trehalose (E, J). As fotomicrografias mostram danos extensos à camada de CEA e microvilosidades após criopreservação em comparação com substratos tratados frescos, secos e trehalose. Fonte: Allen CL, Clare G, Stewart EA, Branch MJ, McIntosh OD, Dadhwal M, Dua HS, Hopkinson A. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing. PLoS One. 2013;8(10):e78441.

A placenta é geralmente lavada em solução salina balanceada contendo antibióticos tais como estreptomicina, penicilina, neomicina e anfotericina. A MA é armazenada em glicerol geralmente misturado com meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) na proporção de 1:1 (vol/vol). A MA pode então ser armazenada a -80°C por até 2 anos 22. Esse método de preservação foi iniciado com Lee e Tseng⁽⁶⁷⁾ e desde então tem demonstrado altas taxas de sucesso em transplante de MA.^(47,68-70) Quase a totalidade da literatura sobre o uso da MA na reconstrução da superfície ocular evidencia o uso desse meio de preservação. Os componentes e a estrutura biológica da MA criopreservada em glicerol lembram a fresca, não preservada.⁽⁷¹⁾

O principal entrave a esse processo é a necessidade de um congelador que é oneroso, pesado e difícil de ser encontrado, particularmente em países menos desenvolvidos. Além disso, é relativamente difícil manter uma temperatura estável durante o transporte da membrana.

Criopreservação em Dimetil-Sulfóxido

Dimetil sulfóxido (DMSO) tem sido usado como alternativa ao glicerol- DMEM. Em vez de lavar a MA com uma solução salina contendo antibióticos após a remoção da placenta, uma concentração aumentada de DMSO é utilizada. A MA é armazenada em solução a 10% ou 0,15M de DMSO a -80°C por vários meses. Clinicamente, vários trabalhos evidenciam sucesso no uso desta técnica de preservação para uso em cirurgia de superfície ocular.^(33,72,73) O efeito na integridade estrutural e nos componentes biológicos da MA ainda não foram estudados extensivamente com essa técnica, mas com base nos dados dos testes já realizados pode-se assumir que tenha qualidade similar a criopreservada em glicerol.

Liofilização e esterilização por Radiação Gama

Liofilização é um método que remove a água de um tecido por sublimação. Isso resulta na inibição de reações químicas destrutivas que podem levar à alteração tecidual. Membrana amniótica liofilizada pode ser armazenada a temperatura ambiente por um longo período de tempo sem deterioração. Seu transporte é fácil, eliminando o maior problema da criopreservação. Alguns estudos mostram a associação da liofilização com a esterilização por meio da irradiação gama.^(51,74)

Doses adequadas de radiação são efetivas contra bactérias, fungos e vírus, entretanto, afeta propriedades biológicas e a integridade dos tecidos.^(75,76) Há poucos estudos avaliando a eficácia da combinação de liofilização e irradiação gama como uma técnica de esterilização de MA.

Devido a remoção de água da MA, a membrana liofilizada parece ser mais fina e macroscopicamente mais frágil que a criopreservada.⁽⁷¹⁾ Em contraste, Nakamura e cols reportaram não haver diferenças significantes na resistência física entre a MA criopreservada e a liofilizada associada a radiação. Não há alterações observadas na estrutura do tecido e componentes da MEC (colágenos I, III, IV, V e VII, fibronectina e laminina-5) entre a MA liofilizada esterilizada com 25 kGy de irradiação gama e a MA criopreservada.⁽⁵¹⁾ O nível total de proteínas é significativamente menor que o encontrado na MA não-preservada.⁽⁷⁷⁾ A liofilização provavelmente causa a desnaturação das proteínas e alterações na estrutura tecidual.⁽⁷⁸⁾

Um menor nível de fatores de crescimento: TGF- α , - β 1, β 2 e β 3, VEGF, PDGF-A e -B, KGF, bFGF, EGFR e receptor TGF- β 2 é evidenciado na MA desnuda liofilizada e tratada com irradiação comparada à criopreservada.^(74,79)

Liofilização com Método da Trealose

Embora a MA liofilizada retenha a maior parte das características biológicas da MA não-preservada, o processo de congelamento - associado à evaporação por sublimação inerentes ao processo de liofilização - afeta algumas das suas propriedades biofísicas.

A trealose é um dissacarídeo não redutor encontrado em altas concentrações em vários organismos que são capazes de sobreviver em quase total desidratação. Sua presença confere resistência à dessecação em células humanas. Ela tem a habilidade de repor parte da água intracelular, permitindo proteção e estabilização da estrutura amniótica durante o processo de liofilização.^(80,81)

Nakamura et al sugerem que as propriedades físicas e a biocompatibilidade da MA tratada com trealose a 10% previamente a liofilização são superiores à MA liofilizada tratada sem trealose. Eles demonstraram a presença de colágenos tipos I, III, IV, V e VII, fibronectina e laminina 5 na MA tratada com trealose. Embora esse método não seja rotineiramente usado na

MA em uso oftalmológico, outras aplicações são descritas tais como preservação de pulmão para transplante bem como em forma de colírio para o tratamento do olho seco moderado e severo.⁽⁸²⁻⁸⁴⁾

Esterilização em Ácido Paracético

O ácido paracético (APA), pertencente à família dos peróxidos orgânicos, é um agente esterilizante padrão altamente efetivo contra bactérias, vírus e esporos dado o seu potencial de oxidação.^(85,86) É excelente uma vez que seus metabólitos são não-tóxicos (ácido acético e peróxido de hidrogênio). A estrutura da MA esterilizada em APA se mostrou bem conservada quando comparada a MA sem esterilização. Comparada a MA esterilizada com irradiação gama, colágenos tipos I e III são relativamente mais abundantes na MA tratada com APA. Colágeno tipo IV, fibronectina e laminina foram também retidas na MA tratada com APA, o que sugere que a MB e seus conteúdos biológicos não foram rompidos.⁽⁸⁷⁾

A comparação dos benefícios e desvantagens dos diferentes meios de conservação atualmente empregados no preparo da MA é demonstrada nas tabelas 1 e 2.

DISCUSSÃO

Tanto a MA intacta como a desnuda são substratos para a expansão ex vivo de células epiteliais para a reconstrução da superfície ocular. Alguns autores reportaram potenciais benefícios da MA intacta. Foi demonstrado que células epiteliais da MA podem produzir neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores neurotróficos e fatores de crescimento derivados de pigmento.⁽³⁵⁻³⁸⁾

Em contrapartida, outros grupos demonstraram que a MA desnuda pode promover melhor proliferação e diferenciação celular, melhor adesão celular, assim como padrão de crescimento celular mais uniforme comparado à MA intacta.^(11,39) A presença do epitélio amniótico pode também impedir um crescimento uniforme de explantes cultivados na membrana e atrasar a formação de ligações hemidesmosomais resistentes.⁽⁴⁰⁾ Esses fatores se traduzem em um melhor processo de cicatrização. Facilitar a cicatrização pode ser considerada uma das mais importantes propriedades da MA e determina a maior parte de suas indicações clínicas. Por isso, MA desnuda tem sido a escolha para a reconstrução da superfície ocular.

Desde os sucessos iniciais nos enxertos realizados na década de 60, a MA tem sido amplamente usada como patch biodegradável em cirurgia corneana e também como substrato anatômico natural para cultura de células tronco epiteliais limbares (CTEL) no tratamento da deficiência de células tronco limbares (DCTL).^(12,88) O epitélio que recobre firmemente a MA humana é um substrato pobremente adesivo para a maioria (senão todas) as células epiteliais. Se as células epiteliais amnióticas não são removidas, as monocamadas de CTCL não se estabelecem facilmente na MA. Apenas explantes limbares podem desenvolver crescimentos substanciais em MA intacta (não-desepitelizada), possivelmente por desarranjo das células epiteliais amnióticas. A criopreservação da MA com meio de preservação em glicerol destrói as células amnióticas, permitindo um fácil crescimento de explantes contendo fragmentos de CTCL.⁽⁸⁹⁾ Seu uso disseminado tem forte relação com esse efeito desepitelizante pois torna facultativa a desepitelização mecânica. Quando comparadas à MA desnuda, membranas intactas evidenciam o crescimento de culturas de CTCL de um modo pobre pois inibem a diferenciação terminal dessas células. Estímulo à diferenciação celular é observado especialmente quando as culturas são expostas ao confinamento com ar (air-lifting).⁽⁹⁰⁾ Além disso, é preferível utilizar MA desepitelizada no intuito de obter culturas de CTCL mais propícias para transplante.

Ao mesmotempo, é importante manter células estromais fora do contato de agentes desepitelizantes o máximo possível, uma vez que elas secretam fatores necessários a promoção da proliferação celular e cicatrização de feridas.⁽⁹¹⁾

Em relação aos agentes desepitelizantes, dispase, EDTA e Tripsina-EDTA, apesar de serem processos de fácil manuseio, permitem obtenção de uma membrana desnuda de qualidade razoável (comprometem a integridade estrutural da matriz) e geralmente é necessária raspagem epitelial adicional.

As vantagens do uso da uréia como agente desepitelizante são o curto período de incubação e o fato de o agente ser facilmente disponível. O etanol é também de fácil obtenção e seu uso é barato, rápido e fácil.

Com o emprego da termolisina, um simples passo de lavagem é capaz de remover as células epiteliais amnióticas sem nenhum

procedimento mecânico de raspagem. O tratamento da MA com termolisina é capaz de gerar uma membrana completamente desnuda, a qual tem aparência morfológica consistente e lâmina basal intacta, porém a membrana torna-se muito frágil e friável ao manuseio. Termolisina e tampão hipotônico permitem obtermos uma MA desnuda de excelente qualidade com processamento simples, enquanto que o álcool aumenta o risco de lesão estrutural do tecido pela necessidade de raspagem mecânica agressiva. É importante salientar que tampão hipotônico – SDS é um método demorado e trabalhoso que envolve tratamento com nuclease.

Todas as técnicas de desepitelização de MA com EDTA, dispase, tripsina, termolisina, SDS, álcool ou ureia requerem imersão da MA em soluções desepitelizantes de 30 segundos a 24 horas, as quais tem impacto nas estruturas epitelial e estromal. Alguns inconvenientes têm sido associados com a maioria dos

Tabela 1
Tabela comparativa de agentes desepitelizantes utilizados no preparo de membrana amniótica

Agentes desepitelizantes	Vantagens	Desvantagens
DISPASE 1mg/ml 100mL	- Baixo custo	- Causa ruptura da MB, especialmente a lâmina densa. - O arranjo estromal subjacente torna-se frouxo e colágeno tipo VI, fibronectina e, vários fatores de crescimento diminuem após incubação prolongada.
EDTA 100mL (Sigma-Aldrich®)	- Remoção de células epiteliais mais vasta sem quebra da MB	- Comprometimento da integridade da membrana. - Quando associada a desepitelização, há comprometimento da integridade da membrana. - Requer uma raspagem mais agressiva..
EDTA-TRIPSINA 500 mL (Science pro®)	- Retirada de células epiteliais sem raspagem	- Degrada componentes da MEC e fatores de crescimento.
URÉIA 100mL (Sigma-Aldrich®)	- Período de incubação relativamente curto - Agente facilmente disponível.	
ETANOL 500mL (Sigma-Aldrich®)	- Curto período de incubação e rápida disponibilidade. - Mantém MB intacta.	- Requer raspagem mais agressiva devido ao baixo poder de desnaturação.
TERMOLISINA 25 mg (Sigma-Aldrich®)	- Um simples passo de lavagem é capaz de remover as células epiteliais amnióticas sem nenhum procedimento mecânico de raspagem. - Cliva especificamente o complexo desmossômico (atividade proteolítica mais específica).	
TAMPÃO HIPOTONICO, SDS 25g E NUCLEASE (Sigma-Aldrich®)	- O isolamento das células epiteliais amnióticas pode ser atingido sem raspagem mecânica. - Não há perda de colágeno na MA desnuda quando comparada a intacta.	

Tabela 2
Tabela comparativa de agentes conservantes utilizados no preparo de membrana amniótica

Agentes conservantes	Vantagens	Limitações
GLICEROL	- Os componentes e a estrutura biológica da MA lembram a fresca, não preservada. - Método mais utilizado mundialmente.	- Pouca ação esterilizante. - Em concentração elevada, compromete a viabilidade das células da MA. - Necessidade de um congelador oneroso pesado e difícil de ser encontrado. - Relativamente difícil manter a temperatura estável durante o transporte da MA.
DMSO 1000mL (Synth®)	- Técnica eficaz na preservação da MA.	- Há poucos estudos a respeito do efeito na integridade estrutural e nos componentes biológicos da MA.
LIOFILIZAÇÃO	- Doses adequadas de radiação são efetivas contra bactérias, fungos e vírus.	- A membrana liofilizada parece ser mais fina e macroscopicamente mais frágil que a criopreservada. - A liofilização provavelmente causa a desnaturação das proteínas e alterações na estrutura tecidual
RADIAÇÃO GAMA	- Não há alterações observadas na estrutura do tecido e componentes da MEC entre a MA liofilizada esterilizada com 25 kGy de irradiação gama e a MA criopreservada.	- Um menor nível de fatores de crescimento é evidenciado na MA desnuda liofilizada e tratada com irradiação comparada à criopreservada.
TREALOSE (Anhui Elite industrial Co. Ltd®)	- Propriedades físicas e biocompatibilidade da MA tratada com trealose 10% previamente a liofilização são superiores.	- Método pouco usado em meio oftalmológico.
ÁCIDO PARA-ACÉTICO (Lvzhiyuan®)	- Boa conservação da estrutura da MA quando comparada a MA sem esterilização - Não há rotura da MB e seus conteúdos biológicos.	

métodos de desepitelização, sendo necessários futuros critérios de padronização desses importantes procedimentos.

Em relação aos agentes conservantes, o glicerol é o meio mais utilizado mundialmente pelo baixo custo e facilidade de manuseio, porém necessita um congelador oneroso não disponível em todos os serviços oftalmológicos.

CONCLUSÃO

Atualmente existe uma vasta gama de agentes e técnicas na preparação da membrana amniótica. A membrana desnuda tem sido a escolha para a reconstrução da superfície ocular, pois facilita a cicatrização quando comparada à membrana com a presença das células epiteliais. Em relação aos agentes conservantes, o glicerol é o meio mais utilizado mundialmente pelo baixo custo e facilidade de manuseio. Ainda, para uso oftalmológico é vantajoso quando utilizado com objetivo cicatrizante e estimulador da diferenciação celular.

REFERÊNCIAS

- Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J.* 1910;15:307.
- Fishman IJ, Flores FN, Scott FB, Spjut HJ, Morrow B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol.* 1987;138(5):1291-4.
- Lawson VG. Oral cavity reconstruction using pectoralis major muscle and amnion. *Arch Otolaryngol.* 1985;111(4):230-3.
- Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2004;49(1):51-77.
- Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* 1995;14(5):473-84.
- Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schønheyder HC, Ulbjerg N, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;94(2):224-9.
- Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet.* 1997;349(9057):990-3.
- Tan DT, Ang LP, Beuerman RW. Reconstruction of the ocular surface by transplantation of a serum-free derived cultivated conjunctival epithelial equivalent. *Transplantation.* 2004;77(11):1729-34.
- Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(3):800-6.

10. Capeáns C, Piñeiro A, Pardo M, Sueiro-López C, Blanco MJ, Domínguez F, et al. Amniotic membrane as support for human retinal pigment epithelium (RPE) cell growth. *Acta Ophthalmol Scand.* 2003;81(3):271–7.
11. 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.
12. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea.* 2000;19(1):65–71.
13. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol.* 1960;79(6):1070–3.
14. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea.* 3rd ed. New York: Elsevier; 2011.
15. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000;2(10):737–44.
16. Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1981;91(3 Pt 2):205s–23s.
17. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta.* 1993;14(4):385–406.
18. Modesti A, Scarpa S, D’Orazi G, Simonelli L, Caramia FG. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion. *Prog Clin Biol Res.* 1989;296:459–63.
19. Modesti A, Kalebic T, Scarpa S, Togo S, Grotendorst G, Liotta LA, et al. Type V collagen in human amnion is a 12 nm fibrillar component of the pericellular interstitium. *Eur J Cell Biol.* 1984;35(2):246–55.
20. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng.* 2006;12(3):519–26.
21. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea.* 1999;18(1):73–9.
22. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials.* 2010;31(2):216–25.
23. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(2):261–72.
24. Mehta JS, Beuerman R, Thein ZM, Tan DT. Modification of human amniotic membrane as a carrier for stem cell transplantation. *Proceedings of ARVO 2007 Annual Meeting; 2007 May 6–10; Fort Lauderdale, USA.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:E-Abstract 453.
25. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000;20(3):173–7.
26. Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development.* 2003;130(20):4769–84.
27. Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J. Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Exp Eye Res.* 1994;59(4):385–91.
28. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 1987;105(3):1039–45.
29. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol.* 1999;179(3):325–35.
30. Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000;20(4):325–34.
31. Regulatory and quality assurance for amniotic membrane donation. [cited 2015 Jul 14]. Available from: <https://www.appliedbiologics.com/company-info/regulatory-and-quality-assurance/>.
32. Food and Drug Administration, HHS. Current good tissue practice for human cell, tissue, and cellular and tissue-based product establishments; inspection and enforcement. Final rule. *Fed Regist.* 2004;69(226):68611–88.
33. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(4):399–402.
34. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med.* 2004;351(12):1187–96.
35. Sakuragawa N, Elwan MA, Uchida S, Fujii T, Kawashima K. Non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. *Jpn J Pharmacol.* 2001;85(1):20–3.
36. Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, Hurukawa S, Araie M, Sakuragawa N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res.* 2000;62(4):585–90.
37. Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):987–94.
38. Shao C, Sima J, Zhang SX, Jin J, Reinach P, Wang Z, et al. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(6):1758–62.
39. Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, 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.
40. Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan VS. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. *Cell Tissue Bank.* 2004;5(3):161–75.
41. Lim LS, Riau A, Poh R, Tan DT, Beuerman RW, Mehta JS. Effect of dispase denaturation on amniotic membrane. *Mol Vis.* 2009;15:1962–70.
42. Li W, He H, Kuo CL, Gao Y, Kawakita T, Tseng SC. Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(6):2381–9.
43. Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol.* 1989;93(2):287–90.
44. 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.
45. Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, et al. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(1):106–16.
46. Sun CC, Cheng CY, Chien CS, Pang JH, Ku WC, Chen PY, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells cultured on human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(3):808–15.
47. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82(4):468–71.
48. Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(1):63–71.
49. Cooper LJ, Kinoshita S, German M, Koizumi N, Nakamura T, Fullwood NJ. An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. *Cornea.* 2005;24(6):722–9.
50. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, et al. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng Part C.* 2008;14(4):371–81.
51. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(1):93–9.

52. Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(9):5142-7.
53. Shah S, Sebai Sarhan AR, Doyle SJ, Pillai CT, Dua HS. The epithelial flap for photorefractive keratectomy. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(4):393-6.
54. Dolatshahi-Pirouz A, Pennisi CP, Skeldal S, Foss M, Chevallier J, Zachar V, et al. The influence of glancing angle deposited nano-rough platinum surfaces on the adsorption of fibrinogen and the proliferation of primary human fibroblasts. *Nanotechnology*. 2009;20(9):095101.
55. Miyoshi S, Nakazawa H, Kawata K, Tomochika K, Tobe K, Shinoda S. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect Immun*. 1998;66(10):4851-5.
56. Germain L, Guignard R, Rouabhia M, Auger FA. Early basement membrane formation following the grafting of cultured epidermal sheets detached with thermolysin or Dispase. *Burns*. 1995;21(3):175-80.
57. Eble JA, Golbik R, Mann K, Kühn K. The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]2 alpha 2(IV). *EMBO J*. 1993;12(12):4795-802.
58. Perreault N, Beaulieu JF. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res*. 1996;224(2):354-64.
59. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006 Aug;12(8):2117-29.
60. 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;14(4):463-72.
61. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2009;30(6):1056-65.
62. Hermans MH. Clinical experience with glycerol-preserved donor skin treatment in partial thickness burns. *Burns*. 1989;15(1):57-9.
63. van Baare J, Buitenwerf J, Hoekstra MJ, du Pont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns*. 1994;20 Suppl 1:S77-80.
64. van Baare J, Cameron PU, Vardaxis N, Pagnon J, Reece J, Middelkoop E, et al. The 1998 Lindberg Award. Comparison of glycerol preservation with cryopreservation methods on HIV-1 inactivation. *J Burn Care Rehabil*. 1998;19(6):494-500.
65. Prabhasawat P, Kosrirukvongs P, Booranapong W, Vajaradul Y. Application of preserved human amniotic membrane for corneal surface reconstruction. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(3):213-22.
66. Prabhasawat P, Tseng SC. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol*. 1997;115(11):1360-7.
67. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*. 1997;123(3):303-12.
68. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1999;97:891-986.
69. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2001;108(9):1569-74.
70. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, et al. Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology*. 2006;113(10):1765-72.
71. Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*. 2009;87(4):396-403.
72. Maharajan VS, Shanmuganathan V, Currie A, Hopkinson A, Powell-Richards A, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: indications and outcomes. *Clin Exp Ophthalmol*. 2007;35(2):140-7.
73. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2002;109(7):1285-90.
74. Bhatia M, Pereira M, Rana H, Stout B, Lewis C, Abramson S, et al. The mechanism of cell interaction and response on decellularized human amniotic membrane: implications in wound healing. *Wounds*. 2007;19(8):207-17.
75. Munting E, Wilmart JF, Wijne A, Hennebert P, Delloye C. Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand*. 1988;59(1):34-8.
76. Komender J, Komender A, Dziedzic-Goclawska A, Ostrowski K. Radiation-sterilized bone grafts evaluated by electron spin resonance technique and mechanical tests. *Transplant Proc*. 1976;8(2 Suppl 1):25-37.
77. Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennett JP, Burgos H, Hsi BL. Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet*. 1980;1(8179):1156-8.
78. Jiang S, Nail SL. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;45(3):249-57.
79. Mehta JS, Riau A, Tan DT, Beuerman RW. Analysis of matrix proteins, growth factors and membrane surface in commercial available freeze-dried amniotic membrane. *Proceedings of ARVO 2008 Annual Meeting*; 2008 April 27-May 1; Fort Lauderdale, USA. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:E-Abstract 5745.
80. Guo N, Puhlev I, Brown DR, Mansbridge J, Levine F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol*. 2000;18(2):168-71.
81. Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*. 2001;43(2):89-105.
82. Nakamura T, Sekiyama E, Takaoka M, Bentley AJ, Yokoi N, Fullwood NJ, et al. The use of trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2008;29(27):3729-37.
83. Chen F, Fukuse T, Hasegawa S, Bando T, Hanaoka N, Kawashima M, et al. Effective application of ET-Kyoto solution for clinical lung transplantation. *Transplant Proc*. 2004;36(9):2812-5.
84. Matsuo T, Tsuchida Y, Morimoto N. Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome. *Ophthalmology*. 2002;109(11):2024-9.
85. Baldry MG. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol*. 1983;54(3):417-23.
86. Kline LB, Hull RN. The virucidal properties of peracetic acid. *Am J Clin Pathol*. 1960;33(1):30-3.
87. von Versen-Höyneck F, Syring C, Bachmann S, Möller DE. The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts—light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank*. 2004;5(1):45-56.
88. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989;96(5):709-22.
89. Kruse FE, Joussem AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000;238(1):68-75.
90. Chen B, Mi S, Wright B, Connon CJ. Differentiation status of limbal epithelial cells cultured on intact and denuded amniotic membrane before and after air-lifting. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(9):2721-9.
91. Schulze U, Hampel U, Sel S, Goecke TW, Thäle V, Garreis F, et al. Fresh and cryopreserved amniotic membrane secrete the trefoil factor family peptide 3 that is well known to promote wound healing. *Histochem Cell Biol*. 2012;138(2):243-50.

Autor correspondente:

Peter Alexander von Harbach Ferenczy
 Rua Coronel Dulcídio, 199 - 1º andar - Curitiba - PR.
 CEP: 81.420-170
 E-mail: ferenczy@me.com