

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**



**CLAUDIA MARTINS BOROWSKY**

**COMPARAÇÃO ENTRE TRANSPLANTE**  
**DE MEMBRANA AMNIÓTICA CRIOPRESERVADA E LIOFILIZADA**  
**NO TRATAMENTO DE CÓRNEAS DESEPITELIZADAS DE COELHOS**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**



**CLAUDIA MARTINS BOROWSKY**

**COMPARAÇÃO ENTRE TRANSPLANTE**  
**DE MEMBRANA AMNIÓTICA CRIOPRESERVADA E LIOFILIZADA**  
**NO TRATAMENTO DE CÓRNEAS DESEPITELIZADAS DE COELHOS**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Médicas

Orientadora: Profa. Dra. Diane Marinho

Porto Alegre  
Agosto 2009

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora, Prof. Dra. Diane Marinho, pela excelência em suas ações voltadas à pesquisa, pelo exemplo de profissional e pela confiança depositada em mim por ser sua primeira aluna de mestrado.*

*Aos meus pais, Waldo Borowsky e Tatiana Martins Borowsky, pelo apoio contínuo e estímulo para seguir em frente, sendo minha base em todos os momentos da minha vida.*

*À minha irmã, Luciane Martins Borowsky, pela compreensão e auxílio técnico na realização desta dissertação.*

*Ao Prof. Dr. Samuel Rymer, pelo seu constante apoio à pesquisa e esforço para o desenvolvimento desse estudo.*

*Aos residentes do Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilidade, assistência e colaboração.*

*À Dra. Lucia Klimann, médica patologista do HCPA, pela realização da documentação dos exames histopatológicos.*

*Ao Prof. Dr. Pigatto, doutor em veterinária pela UFRGS, e sua orientanda, Dra. Carolina Rodarte, pela realização da microscopia eletrônica de varredura.*

*À técnica do banco de Olhos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Claudete Locatelli, pela disponibilidade e assistência prestada em todos os momentos em que necessitei.*

*Ao fotógrafo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Clóvis S. Prates, pela realização de toda fotodocumentação.*

*Ao Prof. Dr. Davi Dreimeier, professor titular da patologia veterinária da UFRGS, e sua orientanda Dra. Luciana Sonne, pelo auxílio na realização da microscopia óptica e imunohistoquímica.*

*Aos funcionários do HCPA, em especial aos da Zona 17, pelo auxílio prestativo em todas as fases do trabalho.*

*À Profa. Dra. Roseli Mollerke (in memorian), do Centro de Experimentação Animal do HCPA, por toda a assistência em prol da realização desse trabalho, em especial ao seu incrível conhecimento em pesquisa com os animais.*

*Aos funcionários do Centro de Experimentação Animal do HCPA, pelo apoio técnico prestado.*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AIDS	-	<i>Acquire Immune Deficiency Syndrome</i>
ANOVA	-	Análise de Variância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	-	Células Amplificadoras de Transição
CEA	-	Centro de Experimentação Animal
CG	-	Células Germinativas
cm	-	Centímetro
CME	-	Centro de Microscopia Eletrônica
CPM	-	Célula Pós-mitótica
Dr.	-	Doutor
Dra.	-	Doutora
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetracético
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
GPPG	-	Grupo de Pesquisa e Pós-graduação
HCPA	-	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	-	Hematoxilina-eosina
HIV	-	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IHQ	-	Imunohistoquímica
kGy	-	Quilogray
IL	-	Interleucina
MA	-	Membrana amniótica
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
n	-	Número de pacientes
p	-	Valor P (significância estatística)
PAS	-	<i>Periodic Acid Schiff</i>
Prof.	-	Professor
Profa.	-	Professora

SPSS	-	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	-	Transplante de Membrana Amniótica
TGF	-	Transforming Growth Factor
UFRGS	-	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VHS	-	<i>Video Home System</i>

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

<b>Figura 1:</b>	Camadas da membrana amniótica.....	13
<b>Figura 2:</b>	Separação do âmnion e córion.....	25
<b>Figura 3:</b>	Diagrama das três fases da liofilização.....	30
<b>Figura 4:</b>	Esquema do processo de liofilização, passagem de uma matéria do estado físico sólido para o gasoso, sem passar pelo estado líquido.....	30
<b>Figura 5:</b>	Pinçamento do lado estromal da MA lembrando vítreo.....	36

### Artigo

<b>Figura 1:</b>	Ilustração da colocação da MA sobre o defeito epitelial corneano.....	54
<b>Figura 2:</b>	Representação da histologia da MA em papel de nitrocelulose..	57
<b>Figura 3:</b>	Imagem externa da córnea do coelho obtida para as fotografias.....	58
<b>Figura 4:</b>	Imagem da área corneana já reepitelizada que foi calculada em AutoCAD.....	58
<b>Figura 5:</b>	Área desepitelizada marcada com programa de AutoCad para cálculo da área do coelho 1 do grupo 1 no primeiro (A), quarto (B) e sétimo (C) dias de pós-operatório.....	63
<b>Figura 6:</b>	Área desepitelizada marcada com programa de AutoCad para cálculo da área do coelho 6 grupo 2 no primeiro (A), quarto (B) e sétimo (C) dias pós-operatório.....	63
<b>Figura 7:</b>	Gráfico sobre a distribuição comparativa das médias e desvios- padrões nos dois grupos: A e B.....	65

<b>Figura 8:</b>	Exemplos de cortes histológicos de coelhos do grupo 1 com coloração HE (A) e PAS (B) e de coelhos do grupo 2 com coloração HE (C) e PAS (D).....	67
<b>Figuras 9 A e B:</b>	Exemplos de marcações positivas de citoqueratina (coloração amarronada) observadas no epitélio corneano do coelho 6 do grupo 1(A) e do coelho 5 do Grupo 2 (B).....	69
<b>Figuras 10 A e B:</b>	Exemplos de marcações positivas de citoqueratina (coloração amarronada) observadas no epitélio corneano do coelho 6 do grupo 1 (A) e do coelho 5 do Grupo 2 (B).....	69
<b>Figura 11:</b>	Superfície coriônica da MA criopreservada.....	70
<b>Figura 12:</b>	Membrana liofilizada vista lateral.....	71



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Graduação anatomopatológica para autólise e vacuolização epitelial.....	59
<b>Tabela 2:</b>	Graduação anatomopatológica para integridade da membrana basal.....	59
<b>Tabela 3:</b>	Classificação da análise imunohistoquímica.....	60
<b>Tabela 4:</b>	Resultados de medidas de tendência central e dispersão do grupo 1.....	64
<b>Tabela 5:</b>	Resultados de medidas de tendência central e dispersão do grupo 2.....	64
<b>Tabela 6:</b>	Resultados conforme graduação quanto à análise histopatológica do grupo 1.....	66
<b>Tabela 7:</b>	Resultados conforme graduação quanto à análise histopatológica do grupo 2.....	66
<b>Tabela 8:</b>	Graduação em relação à presença de marcação positiva ao marcador grupo1.....	68
<b>Tabela 9:</b>	Graduação em relação à presença de marcação positiva ao marcador grupo 2.....	68

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
2.1 HISTÓRIA .....	12
2.2 ANATOMIA, FISILOGIA E PROPRIEDADES DA MEMBRANA AMNIÓTICA ..	12
2.3 FISILOGIA DA REEPITELIZAÇÃO CORNEANA .....	16
<b>2.3.1 Células tronco do limbo (<i>stem cells</i>)</b> .....	18
2.4 USOS DA MEMBRANA AMNIÓTICA EM OFTALMOLOGIA .....	19
<b>2.4.1 Defeitos epiteliais persistentes e úlceras tróficas corneanas</b> .....	19
<b>2.4.2 Ceratites infecciosas</b> .....	20
<b>2.4.3 Ceratopatia bolhosa</b> .....	20
<b>2.4.4 Ceratopatia em faixa</b> .....	21
<b>2.4.5 Ceratectomia fotorrefrativa e fototerapêutica</b> .....	22
<b>2.4.6 Queimaduras químicas agudas</b> .....	22
<b>2.4.7 Reconstrução da superfície conjuntival</b> .....	22
<b>2.4.8 Pterígio</b> .....	23
<b>2.4.9 Cultura de células tronco epiteliais</b> .....	24
<b>2.4.10 Bolhas filtrantes</b> .....	24
2.5 PREPARAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA .....	24
<b>2.5.1 Membrana amniótica fresca</b> .....	27
<b>2.5.2 Membrana amniótica congelada (criopreservada)</b> .....	28
<b>2.5.3 Membrana amniótica desidratada</b> .....	28
<b>2.5.4 Membrana amniótica preservada em sílica gel</b> .....	29
<b>2.5.5 Membrana amniótica liofilizada</b> .....	29
2.6 COLOCAÇÃO E FIXAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NO TRANSOPERATÓRIO .....	35
2.7 COMPLICAÇÕES DO USO DA MEMBRANA AMNIÓTICA .....	37
2.8 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	38
<b>3 REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>4 OBJETIVO</b> .....	48
<b>5 ARTIGO EM PORTUGUÊS</b>	
5.1 INTRODUÇÃO .....	51
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	53
<b>5.2.1 Preparo e preservação da membrana amniótica humana</b> .....	55
<b>5.2.2 Técnica cirúrgica</b> .....	57
<b>5.2.3 Critérios avaliados</b> .....	57
5.2.3.1 Velocidade de reepitelização corneana .....	57
5.2.3.2 Anatomopatológico .....	59
5.2.3.3 Imunohistoquímica .....	60
5.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	61
<b>5.2.4 Desenho do estudo e análise estatística</b> .....	62

5.3 RESULTADOS .....	62
<b>5.3.1 Velocidade de reepitelização corneana</b> .....	63
<b>5.3.2 Anatomopatológico</b> .....	64
<b>5.3.3 Imunohistoquímica</b> .....	67
<b>5.3.4 Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	70
5.4 DISCUSSÃO .....	71
5.5 REFERÊNCIAS .....	76

## **6 ARTIGO EM INGLÊS**

6.1 INTRODUCTION .....	82
6.2 MATERIALS AND METHODS .....	84
<b>6.2.1 Preparation and preservation of the human amniotic membrane</b> .....	86
<b>6.2.2 Surgical technique</b> .....	88
<b>6.2.3 Evaluated criteria</b> .....	88
6.2.3.1 Corneal reepitheliazation rate .....	88
6.2.3.2 Anatomopathological exam .....	90
6.2.3.3 Imunohistochemistry analysis .....	91
6.2.3.4 Scanning electron microscopy .....	92
<b>6.2.4 Study design and statistical analysis</b> .....	93
6.3 RESULTS .....	93
<b>6.3.1 Corneal reepitheliazation rate</b> .....	94
<b>6.3.2 Anatomopathological exams</b> .....	97
<b>6.3.3 Imunohistochemistry</b> .....	98
<b>6.3.4 Scanning electron microscopy</b> .....	101
6.4 DISCUSSION .....	102
6.5 REFERENCES .....	107
<b>ANEXOS</b> .....	110
ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA DOAÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA .....	111
ANEXO 2: IMUNOHISTOQUÍMICA – PREPARAÇÃO .....	112

## 1 INTRODUÇÃO

A membrana amniótica (MA) humana já tem sido utilizada há algum tempo na oftalmologia, tendo entre suas principais indicações os defeitos epiteliais persistentes, as úlceras tróficas corneanas, os defeitos conjuntivais, a ceratopatia bolhosa, entre outros.

A MA possui propriedades que promovem a reepitelização, sendo capaz de reduzir o processo cicatricial e inflamatório, além de apresentar características antiangiogênicas. Todas essas propriedades podem ser explicadas devido à presença, em sua estrutura, de fatores de crescimento, citocinas e inibidores das metaloproteinases, além de outros (1).

Para o uso clínico ideal, a membrana amniótica deveria ser estéril, facilmente armazenada e transportada até o local de utilização. O método mais comum de preservação, a criopreservação, não permite que o tecido seja esterilizado por completo. Esse processamento requer um freezer especial a  $-80^{\circ}\text{C}$  que, além de dispendioso, precisa estar alocado em um espaço físico adequado. Além disso, após ser retirada do freezer para o uso, a membrana amniótica necessita ser transportada a  $-4^{\circ}\text{C}$  até o centro cirúrgico onde será utilizada, por um período mínimo de tempo. O tempo de validade da MA armazenada dessa forma não é bem definido na literatura, variando de três meses a dois anos (2). Esses inconvenientes limitam e encarecem o uso da membrana amniótica, principalmente em países em desenvolvimento e nas cidades distantes dos centros de pesquisa.

Outros métodos de preservação têm sido propostos, como a própria membrana amniótica “fresca” (armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$ , também chamada

hipotermicamente preservada), a desidratação em temperatura ambiente, sílica gel e a liofilização.

A liofilização é um método atual e promissor de preservação que desidrata a membrana amniótica, mantendo-a viável por um período maior de tempo, podendo ser conservada em temperatura ambiente, facilitando a estocagem, diminuindo custos e facilitando o transporte. Ademais, o método de esterilização por irradiação com raios gama, após embalagem a vácuo, garante a esterilidade desse material biológico por até cinco anos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRIA

A membrana amniótica (MA) possui uma história antiga, porém irregular, de utilização em reparos de superfícies epiteliais ulceradas. Davis, em 1910, foi, provavelmente, o primeiro a usá-la para transplante de pele, e tem sido, subsequentemente, utilizada para esse fim (3). Na área oftalmológica, a primeira utilização dessa membrana data de 1940 com De Roth (4) para o tratamento de defeitos conjuntivais persistentes. Sorsby e Simons, em 1946, utilizaram membrana amniótica seca quimicamente processada chamada amnioplastina para o tratamento de queimaduras oculares (5). Curiosamente, vinte e dois anos depois, Forgacs demonstrou que extratos de placenta poderiam ser usados no tratamento de lesões corneanas superficiais, mas pouca importância foi dada a esse estudo (6).

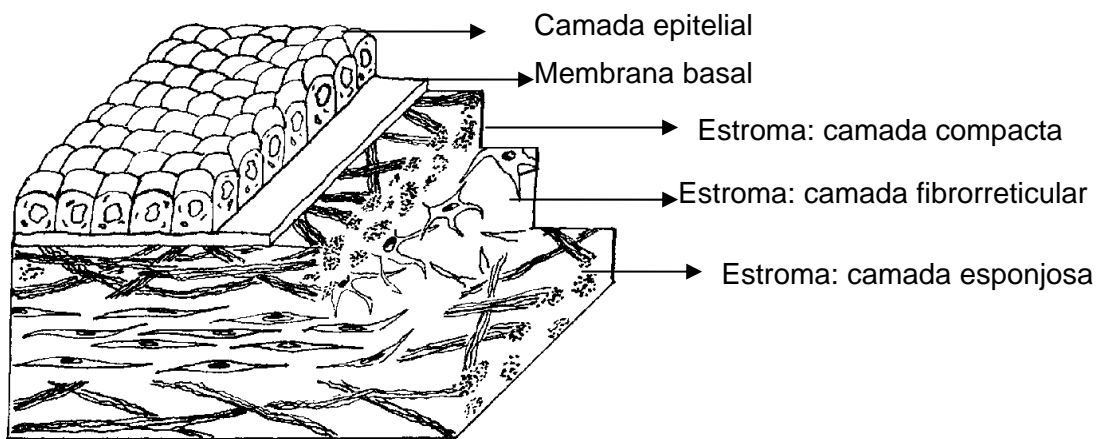
Em 1995, Kim e Tseng reintroduziram o uso da membrana amniótica fresca em um modelo experimental de deficiência limbar em coelhos, relatando que 77% dos olhos no grupo que utilizou a membrana tiveram melhora na transparência corneana e diminuição da neovascularização (7).

### 2.2 ANATOMIA, FISIOLOGIA E PROPRIEDADES DA MEMBRANA AMNIÓTICA

A membrana amniótica humana tem sido utilizada com sucesso para promover a reepitelização em córneas com defeitos epiteliais persistentes. Isso pode ser explicado pela capacidade da membrana de restaurar as propriedades da

arquitetura corneana, fornecendo fatores de crescimento epitelial, o que favorece a migração de células epiteliais, aumentando a adesão entre as células da membrana basal e prevenindo a apoptose celular (8).

A membrana amniótica é a camada mais interna da membrana placentária, composta, na parte externa, pelo material coriônico (que se desenvolve do tecido trofoblástico-mesenquimal) e, internamente, pelo âmnion de origem fetal (tecido ectodérmico). É composta de três camadas: uma de células epiteliais, uma espessa membrana basal e uma matriz avascular, acelular, estromal (Figura 1). Sua espessura varia de 0.02 a 0.05 milímetros (9).



**Figura 1.** Camadas da membrana amniótica

A camada epitelial consiste em uma única camada de células poligonais sobre a membrana basal. Tem um grande número de microvilosidades na superfície apical, o que a distingue de outros epitélios da superfície ocular. Lateralmente, os microvilos são numerosos e podem formar canalículos intercelulares. A criopreservação tende a desvitalizar essas células, deixando a membrana basal e o estroma intactos (10). Essas células estão conectadas, lateralmente, por desmossomos, promovendo uma via efetiva no transporte de macromoléculas.

Intracelularmente, o núcleo é irregular, grande e homogêneo. No citoplasma, existe, também, um funcional e bem formado citoesqueleto (2).

A membrana basal é espessa (uma das mais espessas encontradas em tecidos humanos) e é composta por colágenos dos tipos IV e VII (também presentes no epitélio corneano), colágenos tipos I, II, III e V; elastina, fibronectina e várias outras integrinas. A membrana basal é conhecida por prevenção da cicatrização conjuntival, neovascularização e fibrose.

Histologicamente, a membrana basal é mais parecida com a conjuntiva. É um substrato ideal para o crescimento de células tronco, por prolongar a vida celular e manter sua clonegenicidade, o que explicaria a facilitação da reepitelização (13). A membrana basal está fortemente aderida ao epitélio por múltiplos processos interdigitais (14).

A matriz estromal é dividida em lâmina compacta, lâmina fibrorreticular e lâmina esponjiforme, todas avasculares. É rica em ácido hialurônico fetal que suprime a proliferação celular por alterar a regulação de TGF beta, diminuindo a fibrose por inibir a proliferação e diferenciação dos miofibroblastos. O TGF beta está presente em todo estroma corneano, com concentrações maiores na camada esponjosa (15). Isso explica porque a membrana amniótica reduz o processo de cicatrização, durante a construção de superfície ocular, prevenindo leucomas após a retirada de pterígios ou diminuindo o *haze* corneano após cirurgias refrativas, por exemplo (16).

A matriz estromal também suprime a expressão de várias citocinas inflamatórias que se originam do epitélio da superfície ocular, incluindo a interleucina 1 alfa, 1 beta, interleucinas 2 e 8, interferon e fator de necrose tumoral. A supressão



da inflamação é o elemento chave na prevenção da cicatrização conjuntival, neovascularização e fibrose.

Além de promover a reepitelização, agindo como membrana basal, facilitando a migração celular e diminuindo a fibrose, a membrana amniótica possui atividade anti-inflamatória e antiangiogênica. O mecanismo exato ainda é desconhecido, mas a membrana amniótica parece agir como uma barreira ao filme lacrimal, reduzindo a quantidade de células inflamatórias e de mediadores da inflamação. Interleucinas IL-10 e IL-1, além de inibidores de metaloproteinases tissulares, presentes na matriz estromal, parecem estar envolvidos nesse processo. Trombospondina 1, um fator antiangiogênico, está expressa na camada de células epiteliais, o que poderia explicar a atividade antiangiogênica (9).

A membrana amniótica parece ter propriedades antimicrobianas que fazem diminuir o risco de infecção pós-operatória. Ela contém cistatina E, um análogo dos inibidores de proteinase das cistinas, que tem propriedades antivirais e antibacterianas (17).

As diferentes camadas da placenta têm sido estudadas e foi achado que a MA tem uma alta condutividade hidráulica que facilitaria a reparação de bolhas seguindo cirurgias antiglaucomatosas (18).

Estudos imunogenéticos evidenciaram que as células epiteliais da MA não expressam antígenos leucocitários humanos (*HLA*) A, B, C ou DR, ou beta2-microglobulinas, o que tornaria esta estrutura supostamente inerte.

Kubo et al. estudaram a imunogenicidade da MA humana em xenotransplantes em ratos e encontraram poucos sinais de rejeição, sugerindo que a MA seja um tecido imunologicamente privilegiado com propriedades

imunorreguladoras (19). Vários estudos experimentais com animais já utilizaram a MA humana como xenoenxerto sem a ocorrência de rejeição (7,12,20-26).

### 2.3 FISILOGIA DA REEPITELIZAÇÃO CORNEANA

Como as demais superfícies do organismo, a córnea está sempre em constante estado de regeneração. As células epiteliais escamosas são, continuamente, descamadas para o filme lacrimal e substituídas por novas células que se movem, centralmente, a partir do limbo e, anteriormente, das camadas basais do epitélio. Esse conceito foi proposto por Thoft e Friend (1983), em sua hipótese “X, Y e Z”, e substanciado por várias outras observações e experimentos. O “X” representa a proliferação das células basais epiteliais; o “Y” é a proliferação e migração centrípeta das células limbares; e o “Z”, a perda epitelial da superfície. Para que o equilíbrio seja mantido,  $X + Y$  deve ser igual a Z. Quando o equilíbrio é interrompido, como ocorre após uma desepitelização mecânica, o processo de cicatrização epitelial corneana se instala. Tal resposta representa uma exacerbação do processo fisiológico normal, envolvendo eventos celulares e subcelulares, ocorrendo sob a influência de proteínas da matriz extracelular e de fatores de crescimento (27).

Dua e Forrester estudaram defeitos epiteliais de córneas humanas com envolvimento limbar e, claramente, demonstraram que uma migração celular, preferencialmente, circunferencial ocorre em torno do limbo, em ambos os lados do defeito limbar. Observaram que, somente depois da reepitelização limbar, ocorria a completa cicatrização corneana (28).

Estudos experimentais evidenciaram que as células epiteliais do limbo, e não as da conjuntiva, inibem a angiogênese estimulada por fibroblastos e podem ter um papel importante na manutenção da avascularidade corneana (29).

### 2.3.1 Células tronco do limbo (*stem cells*)

Embora a migração celular seja um processo independente da proliferação, ambos se complementam durante a reepitelização. A proliferação restaura a massa celular, aumentando o número de células. As células basais epiteliais são as principais responsáveis pelo processo proliferativo. Outras células epiteliais do organismo com características semelhantes têm sido extensivamente investigadas, em particular, a epiderme, o epitélio intestinal, o sistema hematopoiético e epitélio dos canais seminíferos. Todas essas pesquisas da cinética celular indicam haver a presença de um compartimento celular proliferativo, também presente na superfície ocular, constituído de células germinativas (CGs), também conhecidas como células tronco e células amplificadoras de transição (CATs) (30,31).

As CGs são células quiescentes, indiferenciadas, com baixa atividade mitótica em circunstâncias normais, porém têm longa duração e podem ser ativadas quando há necessidade de regeneração celular. Estão localizadas na camada basal do limbo. As CATs, localizadas em toda a camada basal corneana, têm ciclo rápido, são mais diferenciadas, duram pouco e, efetivamente, amplificam a massa celular em cada ciclo mitótico. Em um determinado momento, a CAT cessa sua atividade mitótica e se torna uma célula pós-mitótica (CPM) que vai gerar a célula diferenciada terminal (CDT). Uma CAT pode produzir até 1000 CDT (32). Tanto a CPM como a CDT são incapazes de fazer divisão celular (33).

Em cada ciclo mitótico, uma CG dá origem a outra CG e a uma CAT; em situação normal, existe um perfeito equilíbrio entre os dois tipos celulares. Schermer et al. sugeriram que as células basais corneanas representariam as CATs e as

suprabasais, as CPMs e CDTs. A função da CG é determinada pela CAT, que é responsável pela regeneração tecidual por sua rápida proliferação (34) .

Na presença de um defeito epitelial, as CATs podem migrar para a superfície corneana desnudas de vasos, ao contrário das CPMs que, localizadas em ambiente limbar vascularizado, não conseguem migrar para um estroma avascular. Outro aspecto que diferencia a CPM da CAT é a capacidade de migração celular e a dependência na modulação ambiental adjacente (35).

A exata localização anatômica das células germinativas do epitélio corneano no limbo só foi esclarecida por Schermer et al. (1986). Por meio do uso de anticorpos monoclonais (AE-5), em culturas de colônias epiteliais corneanas de coelhos, esses autores mostraram que a queratina básica 64kD, juntamente com seu par, queratina ácida 55kD, são características do fenótipo epitelial da córnea, pois se expressaram em todo o epitélio da córnea e apenas nas camadas superficiais do epitélio limbar. A camada basal do limbo não impregnou, indicando que tais células epiteliais estão em estado mais indiferenciado do que as células basais corneanas. A partir daí, vários autores têm utilizado a queratina 64kD como marcador do epitélio corneano em estado avançado de diferenciação (35-37).

## 2.4 USOS DA MEMBRANA AMNIÓTICA EM OFTALMOLOGIA

### **2.4.1 Defeitos epiteliais persistentes e úlceras tróficas corneanas**

Quando o tratamento clínico falha, o transplante de membrana amniótica (TMA) pode ser utilizado, por diminuir a inflamação e aumentar a velocidade de reepitelização de defeitos epiteliais e úlceras tróficas, com índices de sucesso

variando entre 50 e 90%. O uso de múltiplas camadas, em uma úlcera neurotrófica profunda não infecciosa, dá um substrato para a produção de colágeno e fatores de crescimento epitelial, promovendo a reepitelização. As limitações para o uso de membrana amniótica, nesses casos, incluem a denervação corneana, a falta de um número adequado de células tronco limbares e ceratócitos normais ao redor do defeito epitelial (9).

A membrana amniótica também pode ser usada com sucesso juntamente com cola de fibrina em perfurações corneanas de até 2 mm (9).

#### **2.4.2 Ceratites infecciosas**

A membrana amniótica tem sido utilizada com sucesso em ceratites bacterianas, fúngicas ou por acantameba (38). É difícil decidir qual o melhor momento para utilizá-la. Sua eficácia em ceratites por acantamoeba é questionada devido ao fato de os cistos persistirem no estroma corneano por um longo período de tempo. Monitorar o processo da infecção pela membrana amniótica também pode ser um pouco mais difícil.

#### **2.4.3 Ceratopatia bolhosa**

O transplante de membrana amniótica pode ser indicado para aliviar a dor em olhos com ceratopatia bolhosa, com resultados favoráveis, variando em 88%, em um período de dez meses, sem recorrência da dor ou das bolhas (39). Pires, em estudo que avaliou cinquenta pacientes sintomáticos, em uma média de 33,8 semanas, encontrou uma taxa de melhora dos sintomas em 90% dos pacientes (40). Em

estudo realizado por Georgiadis, em 2008, com uma média de 21 meses de seguimento, encontrou melhora dos sintomas em 87,6% e melhora da acuidade visual em 79%. O exato mecanismo do alívio da dor permanece incerto, mas parece que sua capacidade em facilitar a adesão entre as células tem um papel importante (41). A membrana amniótica é uma ótima alternativa ao recobrimento conjuntival por fornecer um resultado cosmético melhor, não danificar as células-tronco limbares nem induzir retração conjuntival. No entanto, outros estudos, como o de Lopez, que acompanhou pacientes por seis meses, encontrou uma taxa de 20% no retorno da dor ao final desse período (42).

#### **2.4.4 Ceratopatia em faixa**

Pacientes com ceratopatia em faixa, geralmente, sentem dor e desconforto pela ruptura do epitélio e pela instabilidade da superfície corneana. Em uma série de 16 pacientes com ceratopatia em faixa, foi realizado ceratectomia com ou sem quelação com EDTA seguido por transplante de membrana amniótica, com resultados de melhora da superfície ocular e alívio da dor em 15 olhos (93,75%), talvez pela membrana basal da membrana amniótica substituir a membrana basal original (43).

#### **2.4.5 Ceratectomia fotorrefrativa e fototerapêutica**

O TMA pós-ceratectomia fotorrefrativa em olhos de coelhos reduziu o número de células inflamatórias, diminuiu a apoptose dos ceratócitos, reduziu a hiperplasia subepitelial tardia dos fibroblastos e melhorou a regularidade da estrutura corneana, reduzindo, portanto, o *haze* corneano (44).

#### **2.4.6 Queimaduras químicas agudas**

Em queimaduras químicas agudas, existe uma grave inflamação da superfície ocular e dano epitelial que pode resultar em *melting* tecidual. O objetivo do tratamento com a MA é reduzir a inflamação, promover a reepitelização e prevenir a necrose tecidual no intuito de evitar seqüelas com perda visual. Em casos leves a moderados, a MA parece diminuir a reação inflamatória e a formação de simbléfaro (45). Jang, em 2006, utilizando cultivo de células epiteliais e fibroblastos em MA liofilizada, em um modelo experimental de queimadura alcalina corneana em coelhos, mostrou que esse método parece acelerar a recuperação corneana em coelhos (26).

#### **2.4.7 Reconstrução da superfície conjuntival**

Enxertos conjuntivais e de mucosa têm sido utilizados na reconstrução da superfície ocular, apesar do efeito estético ruim, fibrose dos sítios doadores, risco de infecção e disponibilidade limitada. O primeiro uso de membranas fetais, na oftalmologia, foi justamente utilizado na reconstrução da superfície conjuntival por



Roth, em 1940 (4). Após, foi utilizada com sucesso em pacientes com síndrome de Sjogren (em associação com transplante limbar e tarsorrafia) (46) e tem sido utilizada, atualmente, nos seguintes casos: excisão de tecido cicatricial conjuntival, excisão de tumores, necrólise epidérmica tóxica aguda, conjuntivocálase, penfigóide ocular cicatricial e síndrome de Stevens-Johnson. A distribuição de cadeias do tipo alfa no colágeno tipo IV da membrana basal da membrana amniótica é similar ao da conjuntiva (47).

#### **2.4.8 Pterígio**

Entre as propriedades da membrana amniótica está a de suprimir o crescimento de fibroblatos do corpo do pterígio. Ela foi usada com ou sem transplante conjuntival em pterígios primários e recorrentes com uma taxa de reicidiva de 10,9% e 37,5%, respectivamente (48). Esses níveis foram significativamente mais altos, quando comparados ao transplante conjuntival. Shimazaki, em estudo comparando MA associada ao transplante de limbo autólogo ou transplante conjuntival para pterígios reicidivados, não encontrou diferença entre os grupos (49). Luanratanakorn, em estudo randomizado comparando MA isolada com transplante conjuntival, encontrou índices maiores de reicidiva no grupo que utilizou MA (50). A MA está indicada, especialmente, naqueles casos que necessitam de uma grande exérese conjuntival, com resultados melhores, quando associada ao transplante conjuntival (51). Nakamura, em 2006, publicou estudo usando MA liofilizada e mitomicina C em 13 olhos, sem recorrência do pterígio em um seguimento de 14 meses (23).

#### **2.4.9 Cultura de células tronco epiteliais**

Embora os resultados da reconstrução da superfície ocular em olhos com deficiência de células limbares tenha melhorado com o surgimento de técnicas como o transplante de limbo, problemas ainda permanecem, principalmente, quando existe uma deficiência de *stem cells* bilateral, necessitando o paciente de um doador, com risco de rejeição e necessidade de imunossupressão. A membrana amniótica tem sido utilizada na realização de cultura para células tronco limbares. A MA produz fatores de crescimento, o que parece facilitar a proliferação dessas células (52).

#### **2.4.10 Bolhas filtrantes**

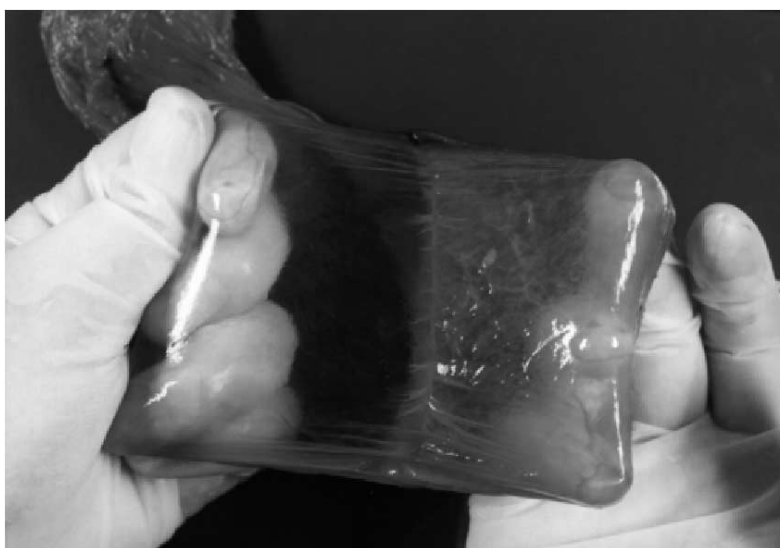
A MA tem sido utilizada em cirurgias antiglaucomatosas com o objetivo de diminuir a reação inflamatória e, dessa maneira, inibir a cicatrização, podendo até mesmo funcionar como substituto aos antifibróticos. Um estudo experimental em coelhos mostrou um menor crescimento de fibroblastos em olhos que tiveram enxertado MA (53). Já outro estudo controlado com enxerto conjuntival para a correção de bolhas com *leakage* mostrou que os olhos em que foram utilizados enxertos conjuntivais tiveram melhores resultados (54).

### **2.5 PREPARAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA**

As placentas selecionadas para uso devem ser de doadoras com história clínica saudável, não usuárias de drogas, submetidas à cesareana eletiva e que

tiveram negatividade aos exames para sífilis, HIV e marcadores de hepatites virais. Esses testes são todos realizados no terceiro trimestre e, então, repetidos seis meses após o parto. Somente quando esses últimos testes são negativos é que a membrana amniótica pode ser utilizada, para descartar a possibilidade de um falso negativo para HIV em virtude da janela imunológica do vírus (55). Além disso, todas as pacientes assinam termo de consentimento informado em relação à doação do tecido (Anexo 1).

O processo e preparação da membrana amniótica são realizados sob condições estéreis. O primeiro protocolo de preparação e criopreservação foi descrito por Kim e Tseng (7) e consiste na separação do âmnion do córion (Figura 2).



**Figura 2:** Separação do âmnion e córion

Após, realiza-se uma lavagem copiosa da membrana amniótica com soro fisiológico e outra com solução contendo antibióticos como estreptomicina, neomicina, penicilina e anfotericina B. A MA é, então, aderida em papel de

nitrocelulose com o epitélio para cima, cortada em pedaços de 4x3mm e armazenada em meio de Dulbeco (DMEM, GIBCO) e glicerol na proporção de 1:1.

A seguir, é estocada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e deve ser transportada em gelo até o momento da cirurgia, quando é colocada em solução salina para ser restaurada para o uso. Por esse método de preservação, a membrana tem sido utilizada por um período de até dois anos (2).

O glicerol tem propriedades antivirais e antibacterianas que são dependentes de sua concentração e temperatura. Maral et al. preservaram MA em 85% de glicerol a  $-4^{\circ}\text{C}$  por um ano e mostraram que os resultados, nos tratamentos de queimaduras químicas em córneas de ratos, são tão bons quando comparados com a utilização de âminon fresco (56). Cameron et al. mostraram que o armazenamento de pele de doadores HIV positivos em 85% glicerol a  $-4^{\circ}\text{C}$  inativou completamente o vírus em um período de cinco dias (57).

No HCPA, o Setor de Superfície Ocular do Serviço de Oftalmologia iniciou, em 1999, o processamento de membranas amnióticas baseado no protocolo descrito por Kim e Tseng (7). Existe, junto ao GPPG, um projeto vinculado à pesquisa com MA em oftalmologia (GPPG número 98264).

De uma placenta, em geral, consegue-se processar, aproximadamente, 40 a 50 fragmentos de MA. De cada lote, é retirada uma amostra para realização de exames culturais e somente após a obtenção dos resultados negativos as MA são liberadas para uso.

A maioria dos métodos utilizados na conservação da membrana amniótica afeta suas propriedades de alguma maneira. Kruse demonstrou que a criopreservação diminui, significativamente, a viabilidade e capacidade de proliferação celular, funcionando mais como uma matriz e não por transferência de

células funcionalmente ativas (58). Nakamura et al. não acharam diferenças significativas entre a membrana criopreservada e a liofilizada, quando submetidas a testes de *stress*; além disso, análises realizadas com imunohistoquímica e microscopia eletrônica da membrana liofilizada não mostraram alterações morfológicas significativas produzidas pelo processo de liofilização e irradiação (22).

Atualmente, a MA pode ser utilizada de quatro formas com diferentes modos de preparação e tempos de armazenamento, a saber:

### **2.5.1 Membrana amniótica fresca**

Nesse tipo de preservação, também chamado de preservação hipotérmica, a membrana é mantida em meio de cultura, na geladeira, a 4°C. Este método permite que o tecido seja utilizado dentro de 7 a 12 dias da data da coleta (55,59,60). A MA fresca também pode ser preservada em glicerol a 50% pelo mesmo período de tempo (58). Alguns trabalhos têm utilizado MA fresca; no entanto, apesar de existirem, teoricamente, vantagens nessas membranas em relação às preservadas de outras formas, o risco de contaminação, especialmente por HIV (por estar no período de soroconversão), deve ser fortemente considerado, impedindo seu uso na prática clínica (61).

Por outro lado, não existem evidências clínicas suficientes que provem que o tecido fresco seja melhor que o preservado (62,63).

### 2.5.2 Membrana amniótica congelada (criopreservada)

Essa preservação, descrita primeiramente por Kim e Tseng em estudo com coelhos, em 1995, é o método de preservação realizado como rotina também no HCPA, como descrito anteriormente. Nesse método, o tecido é congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  em meio contendo antibióticos e glicerol a 50% (meio de preservação de córnea modificado para MA) ou em meio de Dulbecco (7) e pode ser usado pelo prazo de até dois anos (2).

Quanto retirada do freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , a MA pode ser mantida em refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$  por até uma semana. O descongelamento deve ser realizado à temperatura ambiente, no momento de sua utilização, por, no máximo, 24 horas.

Nos Estados Unidos, a membrana criopreservada é, comercialmente, disponível e aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), com o nome de Amniograft<sup>®</sup> (Amniograft<sup>®</sup>, Bio-Tissue, Miami, FL, EUA).

### 2.5.3 Membrana amniótica desidratada

Nessa maneira de preservação, a membrana amniótica é desidratada em temperatura ambiente, sem passar pelo processo de congelamento profundo. Nos Estados Unidos, ela é, comercialmente, disponível com o nome de Ambiodry<sup>®</sup> (Ambiodry<sup>®</sup>, Okto Ophtho Inc., Costa Mesa, CA, EUA) e Ambiodry2<sup>®</sup>, este último contendo uma marcação, para que o cirurgião possa, mais facilmente, localizar o lado da MA. Existem poucos trabalhos, na literatura, utilizando esse tipo de MA. Memarzadeh, em 2008, comparou dois grupos que realizaram exérese de pterígios

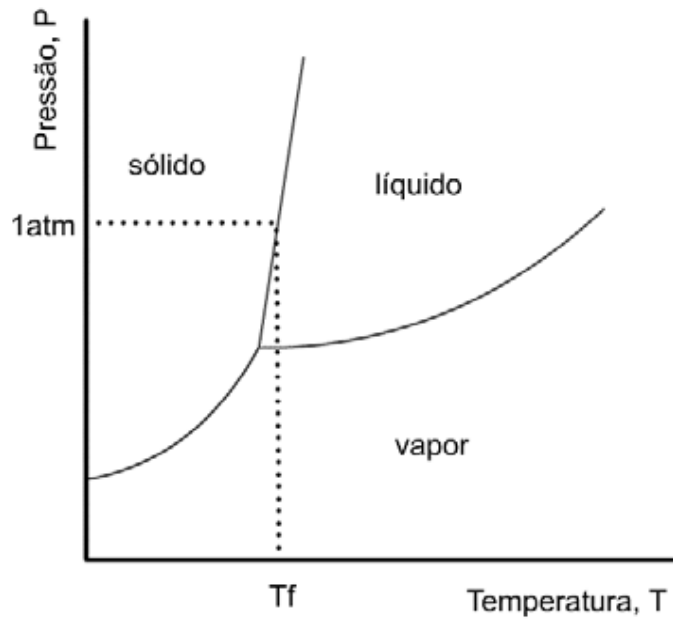
primários: um grupo utilizou Ambiodry, e o outro, transplante conjuntival autólogo, sendo que não houve diferença significativa de recorrência em um seguimento de seis meses (64). Fournier, em 2005, publicou um relato de caso em que foi utilizado MA desidratada para reconstrução da superfície ocular após queimadura química, com resultado satisfatório (65).

#### **2.5.4 Membrana amniótica preservada em sílica gel**

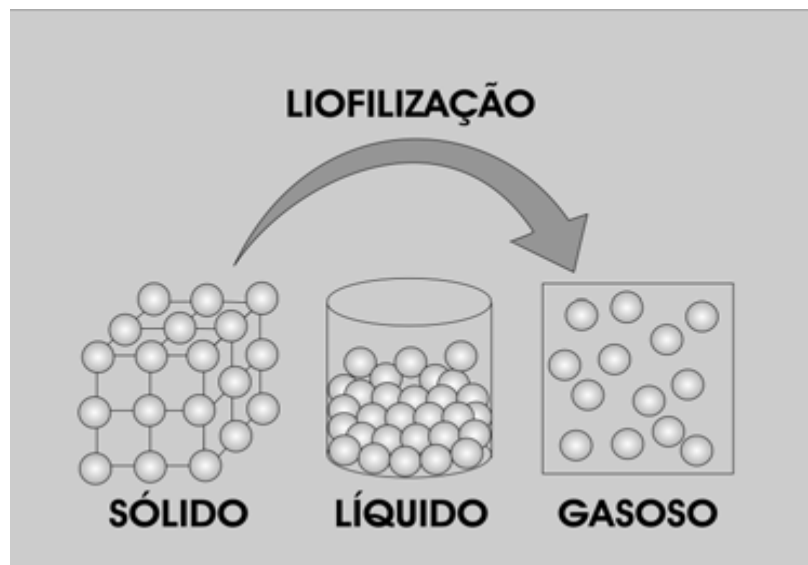
Miljudin estudou uma maneira de preservar MA em sílica gel dessecante com esterilização e a utilizou em 18 olhos de coelhos com queimaduras químicas ou térmicas, mostrando bons resultados; porém, nada mais foi publicado sobre o assunto (66).

#### **2.5.5 Membrana amniótica liofilizada**

O processo de desidratação de substâncias em baixas temperaturas (por congelamento profundo) e posterior sublimação do dissolvente é denominado liofilização. Nesse processo, o produto é congelado em uma temperatura abaixo de -20°C e, então, submetido à baixa pressão (alto vácuo) (Figura 3). Assim, a água que foi transformada em gelo passará diretamente do estado sólido para o gasoso (Figura 4), resultando num produto final com estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituída pela simples adição de água (67).



**Figura 3:** Diagrama das três fases da liofilização



**Figura 4:** Esquema do processo de liofilização, passagem de uma matéria do estado físico sólido para o gasoso, sem passar pelo estado líquido.

O processo não utiliza conservantes ou produtos químicos. É um método adequado para preservação de células, enzimas, vacinas, vírus, leveduras, soros,



derivados sanguíneos, algas, bem como frutas, vegetais, carnes, peixes e alimentos em geral. Os produtos liofilizados não sofrem alterações de tamanho, textura, cor, sabor, aroma, teor de vitaminas, sais minerais, proteínas e, quando conservados de maneira adequada, mesmo em temperatura ambiente, podem resistir intactos por muitos anos (68).

O princípio básico do processo é a secagem ou desidratação a vácuo (por sublimação) da água contida no produto, com a intenção de otimizar a estabilidade química deste durante períodos maiores de armazenamento, o que contribui, largamente, para a melhoria da tecnologia de produção. A ausência de água no meio e a baixa temperatura do processo fazem com que as reações químicas e/ou enzimáticas se mantenham em nível basal e, no caso de conservação de cepas microbianas, seu crescimento se mantenha inibido (69).

O ciclo de liofilização inclui fases que são adaptadas para cada produto processado (68):

- 1ª. a preparação do material: seja ele sólido, líquido, pastoso ou emulsão, cuidando para não alterar suas propriedades;
- 2ª. o processo de congelamento: o material é solidificado pela baixa temperatura e todos os componentes líquidos congelam-se, tornando-se cristalinos;
- 3ª. fase de sublimação ou secagem primária: o material congelado é submetido a vácuo e, progressivamente, aquecido de forma a conservar a capacidade de sublimação. Durante esse processo, é fundamental que se mantenha o equilíbrio entre o processo de transferência de calor e a sublimação (transferência de massa), para que a desidratação ocorra

---

sem danos ao material congelado, como pode ser o caso de descongelamento e colapso. A monitoração constante, nos ajustes da pressão, deve ser contínua de forma a manter o equilíbrio entre o influxo de calor e capacidade de evaporação do produto;

- 4ª. fase de desidratação secundária: inicia quando a água está sendo destilada e um vácuo maior permite extração progressiva do limite máximo de água em temperatura acima de zero. É uma fase delicada, pois tanto a hiperdesidratação quanto a hipohidratação podem comprometer o processo. Pelo fato de cada produto possuir peculiaridades inerentes à carga residual de água, o controle da pressão e da temperatura deverá ser ajustado para cada um deles em particular;
- 5ª. estado final: inicia com a retirada do produto do equipamento, que deve ser feita, cautelosamente, para que não haja alterações na qualidade do produto final. É recomendado parar o equipamento sob vácuo ou gás neutro no compartimento até a estabilização da temperatura (68).

O armazenamento final deve ser realizado de acordo com a sensibilidade de cada produto. Deve-se ter cuidado excessivo com exposição ao vapor d'água, oxigênio, ar, luz, calor e ambientes não-estéreis. A reconstituição do produto final pode ser feita com água, solução salina balanceada ou solventes, para que a concentração inicial do produto seja restaurada ou, então, para que se consiga um produto mais concentrado ou mais diluído (68). Produtos liofilizados têm baixo peso, já que a maioria dos produtos naturais possui cerca de 80% de água e, quando reconstituídos, retomam suas propriedades originais como nenhum outro produto desidratado (67).

---

Alguns produtos liofilizados, como alimentos, podem ser conservados à temperatura ambiente, resistindo intactos por muitos anos (67). A legislação brasileira estipula dois anos de validade para hemoderivados liofilizados, estocados à temperatura entre 2°C e 8°C e protegidos da luz, e de cinco anos para tecidos moles liofilizados (70).

A maioria dos produtos liofilizados, principalmente as proteínas, é desidratada num sistema complexo que utiliza substâncias, a fim de que a mesma seja protegida dos estresses causados pelo congelamento e desidratação. A formulação de produtos liofilizados estáveis, muitas vezes, requer a utilização de agentes protetores amorfos (crioprotetores), agentes que estabilizam o processo de desidratação (cristalizadores) e agentes surfactantes que inibem a perda protéica, substâncias essas que garantem a obtenção de um produto fisicamente estável. A sacarose e o glicerol, substâncias crioprotetoras amorfas e estabilizadoras, respectivamente, têm-se mostrado eficazes na preservação das proteínas, por reduzir ou eliminar os desgastes causados pelo processo da liofilização (71,72). Atualmente, é a indústria farmacêutica que lidera o desenvolvimento dessa inovação tecnológica denominada liofilização, subsidiada pela elevada perspectiva de lucratividade comercial (68).

Dentre os atributos do processo de liofilização, destacam-se as seguintes vantagens comparativas:

- a) inalterabilidade da composição química das substâncias pelo fato de serem submetidas a baixas temperaturas. Com isso, o produto consegue manter inalterada sua composição química original, a atividade terapêutica e outras propriedades características;

- b) estrutura esponjosa resultante, o que contribui para melhor e mais rápida dissolução;
- c) inibição do desenvolvimento de microrganismos e das reações enzimáticas devido às baixas temperaturas de exigência do processo;
- d) capacidade de secagem e preservação que dispensa altas temperaturas;
- e) tempo maior no processo de preservação das substâncias do que o das preservadas por outras técnicas (73).

Em 1992, Visuthikosol et al. publicaram estudo sobre o uso, em dermatologia, de membrana fetal como enxerto biológico para queimaduras térmicas. Com o objetivo de investigar um método de preparação de membrana fetal que pudesse ser armazenada em temperatura ambiente, por um longo período, concluíram que ambas obtiveram resultados histológicos similares. Apesar de terem encontrado melhores resultados nos tecidos frescos, os produtos liofilizados se mostraram mais convenientes para serem transportados e armazenados por longo tempo (73). Nada mais foi publicado por essa equipe sobre o assunto.

Onerci, em 1991, também estudou o uso de MA liofilizada, porém em mucosa sublingual de coelhos, e provou que o uso desse tecido não apenas facilitou a cicatrização como induziu a epitelização nesses animais (74). Gomes et al. publicaram relato de caso com o uso de MA humana liofilizada sobre feridas cruentas em áreas de biópsia bucal de dois pacientes. Concluíram que a MA liofilizada minimizou a dor pós-operatória, promoveu rápida hemostasia e teve boa aceitação na cavidade bucal. No estudo, não foi descrita a metodologia para preservação do tecido (75).

Embora os benefícios do TMA liofilizada sejam bem demonstrados, lidar com este tecido frágil é, freqüentemente, um desafio técnico para o cirurgião. As propriedades biomecânicas da MA, preservada de formas diferentes, pouco foram estudadas e comparadas. Ao escolher entre preparações disponíveis, os oftalmologistas devem considerar vários fatores; alguns cirurgiões preferem armazenar, segurar, medir e cortar o tecido em estado seco, enquanto outros preferem na forma hidratada (59)

Na literatura oftalmológica atual existem poucos trabalhos utilizando MA liofilizada, sendo que todos com resultados promissores (1, 22, 23, 26, 76).

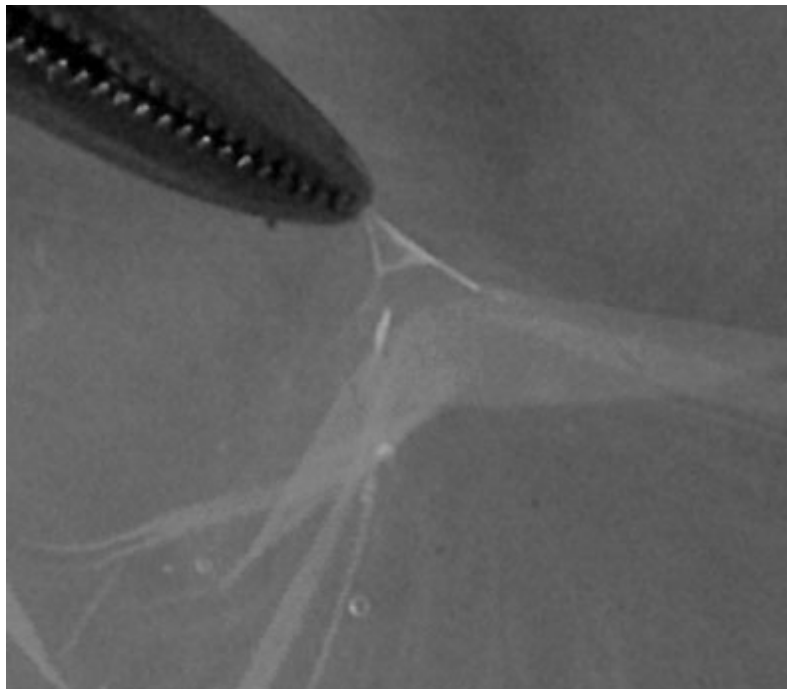
## 2.6 COLOCAÇÃO E FIXAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NO TRANSOPERATÓRIO

A fixação da MA, no olho, pode ser realizada por fio de sutura, habitualmente o mononylon 10-0, com suturas contínuas ou com pontos separados. O uso do fio, além de requerer maior habilidade cirúrgica, pode trazer algumas desvantagens, como o prolongamento do tempo cirúrgico, formação de granuloma, abscesso, necrose tecidual e deiscência da sutura, além de um pós-operatório mais desconfortável pela sensação de corpo estranho (76).

Pode ser utilizado, ao invés do fio, um adesivo tecidual. A cola de fibrina, uma mistura de fibrinogênio e trombina, trata-se de uma substância autosselante que imita a parte final do processo de coagulação. A trombina converte o fibrinogênio em fibrina por uma reação enzimática e o fator VIII, presente no componente de

fibrinogênio, estabiliza os monômeros de fibrina. Ela pode ser aplicada diretamente sobre a superfície ocular ou sobre a membrana amniótica (76).

Em relação ao lado da MA a ser utilizado em contato com a superfície ocular, pode ser com o epitélio para baixo, para cobrir uma grande área da superfície ocular com a função de curativo, bandagem, ou como lente de contato terapêutica biológica. Quando é utilizada com o objetivo de ser substrato para o crescimento epitelial e espera-se que seja incorporada ao tecido hospedeiro, ela é usada como enxerto e colocada com o epitélio para cima. O lado epitelial é mais liso que o lado estromal (coriônico). Geralmente, é fácil orientar-se em relação ao lado da membrana, já que é colocada nos papéis de nitrocelulose com o epitélio para cima. Em caso de dúvida, o cirurgião pode fazer um teste simples, pinçando a membrana com uma pinça de conjuntiva delicada ou tocando a MA com uma esponja de nitrocelulose. Se ao soltar a pinça ou esponja de nitrocelulose houver aderência de um material que lembra vítreo, então esse é o lado estromal (Figura 5) (2).



**Figura 5:** Pinçamento do lado estromal da MA lembrando vítreo

---

Além disso, podem ser utilizadas várias camadas de membrana amniótica, uma agindo como enxerto e a outra, externa, agindo como lente de contato, ou, ainda, em úlceras tróficas profundas, quando até mais que duas membranas superpostas podem ser usadas.

## 2.7 COMPLICAÇÕES DO USO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Complicações relacionadas ao uso da membrana amniótica são raras. A falha em não alcançar o objetivo desejado com a MA é o que ocorre mais comumente. A incidência deve diminuir com a experiência do cirurgião, com a indicação apropriada e com o melhor entendimento de suas propriedades biológicas.

Já foi descrita a formação de granuloma relacionada à sutura ou inflamação persistente, provavelmente, relacionadas à patologia de base do paciente e não, necessariamente, à membrana. Perda da membrana ou degradação da mesma, no pós-operatório imediato, também foram descritos (2). Glaber é o único autor que relatou hipópio, após uso da MA em úlcera neurotrófica, que respondeu bem ao uso de corticoides tópicos. Os autores atribuem esse hipópio a uma reação imune do paciente (77).

A mais temida complicação é uma infecção ocular bacteriana ou fúngica causada por tecido contaminado ou, então, a transmissão de uma infecção sistêmica viral. Essas complicações podem ser minimizadas, respectivamente, com o adequado processamento da membrana e a realização dos exames de rotina na paciente doadora.

## 2.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

As técnicas de imunohistoquímica (IHQ) consistem na utilização de anticorpos para revelar a presença de antígenos de interesse em sua célula de origem, na maioria das vezes, utilizando a microscopia óptica para avaliar os resultados. Atualmente, a IHQ é aplicada, largamente, para fins diagnósticos e científicos (78).

A maior parte dos antígenos pesquisados são proteínas. Com a finalidade de preservar a estrutura tridimensional e localização celular dos antígenos, é necessário que o tecido seja fixado apropriadamente e o mais rápido possível. Um dos fixadores mais utilizados é a solução tamponada de formaldeído a 10%, devido à rápida penetração nos tecidos, baixo custo e adequada preservação (79). As amostras de tecido são incluídas em blocos de parafina após fixação. Esse processo não tem efeito adverso na antigenicidade do tecido (80).

Dois tipos de anticorpos podem ser utilizados: os policlonais e os monoclonais. Os anticorpos policlonais são produzidos por meio da imunização em animais, geralmente, coelhos, seguida da purificação do soro dos mesmos após um intervalo adequado, para que uma resposta imunológica ao antígeno tenha ocorrido. Uma variedade de anticorpos dirigidos a diferentes epítomos do antígeno, com diferentes afinidades é produzida. Esses anticorpos têm alta sensibilidade, entretanto podem causar reações não específicas. É necessário que sua especificidade em relação ao antígeno testado seja avaliada antes de sua utilização. Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de células de mieloma múltiplo fundidas com células do baço de camundongos imunizados. Os anticorpos produzidos são idênticos e dirigidos contra o mesmo epítomo do antígeno. Esses anticorpos têm alta especificidade, porém, como apenas um anticorpo pode se ligar



ao mesmo epítopo do antígeno, a sua sensibilidade é baixa. Misturas de anticorpos monoclonais contra diferentes epítopos do mesmo antígeno podem ser utilizadas para melhora da sensibilidade (80).

O sistema de detecção IHQ envolve a aplicação do anticorpo primário contra o antígeno de interesse em material adequadamente fixado, incluído em bloco de parafina, seccionado e, posteriormente, preparado. Como a maioria dos tecidos é incluída em parafina, e as etapas da reação IHQ ocorrem em soluções aquosas tamponadas, a parafina precisa ser removida, previamente, ao processo com xilol e álcool (81).

No método direto de detecção, o anticorpo primário é marcado com uma substância fluorescente. Não há necessidade de outros anticorpos, e o resultado da reação é observado com microscópio de epifluorescência (80).

No método indireto, o anticorpo primário não é marcado. Um anticorpo secundário dirigido contra a imunoglobulina do animal no qual o anticorpo primário foi produzido é empregado. O anticorpo secundário é conjugado à peroxidase de rábano. A enzima peroxidase transforma um cromógeno solúvel, incolor e reduzido em um precipitado colorido e oxidado na presença de peróxido de hidrogênio. Essa reação é restrita ao sítio de ligação antígeno-anticorpo e produz resultado visível ao microscópio óptico, em marrom ou vermelho, dependendo do cromógeno utilizado, diaminobenzidina ou aminoetilcarbazol, respectivamente. A atividade da peroxidase endógena, normalmente encontrada nas hemácias e leucócitos presentes no tecido, deve ser bloqueada com peróxido de hidrogênio antes da adição do anticorpo primário (78,80).

No método indireto, duas maneiras podem ser utilizadas: peroxidase-antiperoxidase e estreptavidina-biotina. Na modalidade peroxidase-antiperoxidase,

são utilizados três reagentes principais: o anticorpo primário, o secundário e um terceiro contra e ligado à peroxidase. Como cada anticorpo possui dois sítios de ligação, essa técnica é bastante sensível devido à amplificação das ligações que ocorrem entre os anticorpos utilizados. Na modalidade do complexo estreptavidina-biotina, o anticorpo secundário é conjugado à biotina. A estreptavidina é uma glicoproteína com afinidade pela biotina superior à de anticorpos por antígenos, complexos de moléculas de estreptavidina, biotina e peroxidase que, por sua vez, se ligam à biotina do anticorpo secundário e amplificam o resultado final (80).

Em toda técnica, são utilizados controles positivos e negativos para averiguação da ocorrência de ligações não específicas. O controle positivo é um espécime que possui reatividade conhecida para um determinado antígeno. O controle negativo é uma secção do mesmo espécime em estudo na qual o anticorpo primário foi omitido, mas todas as outras etapas foram realizadas. Um terceiro tipo de controle é o controle interno, positivo ou negativo, isto é, células presentes no espécime que, normalmente, apresentam coloração positiva ou negativa para o antígeno testado (80).

A sensibilidade de um sistema de detecção representa a menor quantidade de antígeno que o mesmo é capaz de detectar. Atualmente, as modalidades peroxidase-antiperoxidase e complexo estreptavidina-biotina são consideradas as mais sensíveis em virtude da amplificação do sinal resultante que ocorre nas mesmas (78,80).

As citoqueratinas são utilizadas como marcadores epiteliais, enquanto a vimentina é utilizada como marcador de células mesenquimais (como fibroblastos e células musculares lisas). No presente estudo, foi utilizado marcador vimentina com o objetivo de verificar a presença de células mesenquimais no tecido corneano

(normalmente não presentes), sendo que sua presença pode ser indicativa de conjuntivalização por reação inflamatória, fibrose. Já a citoqueratina foi utilizada para verificar a presença e integridade do epitélio corneano.

### 3 REFERÊNCIAS

1. Libera RD, Melo GB, Lima AS, Haapalainen EF, Cristovam P, Gomes JAP. Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (A.M) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. *Arq Br Oftalmol* 2008; 71(5):669-73.
2. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004 Jan-Feb;49(1):51-77.
3. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J.* 1910;15:307.
4. de Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940;23:522-5.
5. Sorsby A, Symmons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1946;30:337-45.
6. Forgacs L. Effects of placental extracts on epithelization of the rabbit cornea. *Ann Ocul* 1962;195:1-12.
7. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995 Sep;14(5):473-84.
8. Ronk JF, Ruiz-Esmenjaud S, Osorio M, Bacigalupi M, Goosey JD. Limbal conjunctival autograft in a subacute alkaline corneal burn. *Cornea* 1994;13:465-8.
9. Fernandes M, Sangwan VS., Rao GN. Amniotic Membrane Transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005 Aug 24;(6):643-53.
10. Zhong Y, Ye W, Cheng Y, Sun J, Wang K. The effect of frozen storage for amniotic membrane ultrastructure. *Yan Ke Xue Bao* 2001 Dec; 17(4):202-05.
11. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, DoMing JE. Adhesion of regenerating corneal epithelium and the role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 1968;65:339-48.
12. 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 Jun; 179:325-35.
13. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol.* 1997;123:303-12.
14. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 1960;79:1070-3.

15. Hopkinson A, Mcintosh RS, Tighe PJ, James DK, Dua HS. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF- $\beta$ . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 Apr;47:4316-22.
16. Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan V. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. *Cell Tissue Bank* 2004 Nov; 5:161-75.
17. Talmi YP, Sigler L, Inge E. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991;12:285-8.
18. Lloyd SJ, Garlid KD, Reba RC, Seeds AE. Permeability of different layers of the human placenta to isotopic water. *J Appl Physiol* 1969; 26:274-6.
19. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui MI. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1539-46.
20. Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W. Single and multi layer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1455-63.
21. Solomon A, Meller D, Prabhasawat P. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocoeles and deep ulcers. *Ophthalmology* 2002;109:694-703.
22. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Shimizu Y, Kinoshita S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:93-9.
23. Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E. et al. Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 2006 Jun; 84(3):401-5.
24. Marinho D, Hofling Lima AL, Kwitko S. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation. *Cornea* 2003 Jun; 22(4):338-42.
25. Resch MD, Schlotzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Kruse FE, Beckmann MW. Adhesion structures of amniotic membranes integrated into human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 Dec; 47(5):1853-61.
26. Jang IK, Ahn JI, Shin JS, Kwon YS, Ryu YH, Lee JK et al. Transplantation of reconstructed corneal layer composed of corneal epithelium and fibroblasts on a lyophilized amniotic membrane to severely alkali-burned cornea. *Artif Organs* 2006 Jun; 30(6):424-31.
27. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1442-3.

28. Dua HS, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1990;15:646-56.
29. Basti S, Rao SK. Current status of limbal conjunctival autograft. *Curr Opin Ophthalmol* 2000;11:224-32.
30. Potten CS, Schofield R, Lajtha LG. A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochim Biophys Acta* 1979; 560:281-99.
31. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619-33.
32. Pfister RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization and treatment by auto and homotransplantation of limbal stem cells. *CLAO J* 1994;20:64-72.
33. Leblond CP. The life story of cells in renewing systems. *Am J Anat* 1981;160:114-58.
34. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64-K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.
35. Tseng SC, Chen JJ, Huang AJ. Classification of conjunctival surgeries for corneal disease based on stem cell concept. *Ophthalmol Clin North Am* 1990;3:595-610.
36. Rodrigues M, Ben-Zvi A, Krachmer J, Schermer A, Sun TT. Suprabasal expression of a 64-kilodalton (no. 3) in developing human corneal epithelium. *Differentiation* 1987; 34:60-7.
37. Kruse FE, Chen JJY, Tsai RFJ, Tseng SC. Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1903-13.
38. Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WCI. Amniotic membrane transplantation in infected corneal ulcer. *Cornea*. 2001;20:720-6.
39. Mejia LF, Santamaria SP, Acosta C. Symptomatic management of post operative bullous keratopathy with non-preserved human amniotic membrane. *Cornea* 2002; 21:342-5.
40. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P, Puangsricharern V, Maskin SL, Kim JC et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999 Oct; 117(10):1291-7.
41. Georgiadis NS, Ziakas NG, Boboridis KG, Terzidou C, Mikropoulos DG. Cryopreserved amniotic membrane transplantation for the management of symptomatic bullous keratopathy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008 Mar. 36(2):130-5.

42. Lopez FN, Celis SJ, Gonzales DVF, Lopez ME. Monolayered amniotic membrane transplantation as a palliative for bullous keratopathy. *Arch Soc Esp Oftalmology* 2004 Jan;79(1):27-31.
43. Anderson DF, Prabhasawat P, Alfonso E, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy. *Cornea* 2001;20:354-61.
44. Wang MX, Gray T, Parks WC, Prabhasawat P, Culbertson W, Forester R, et al. Corneal haze and apoptosis is reduced by amniotic membrane matrix in excimer laser photocoagulation in rabbits. *J Cataract Refract Surg.* 2000;27:310-19.
45. Meller D, Pires RTF, Mack RJS, Figueiredo F, Heiligenhaus A, Park WC et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107:980-90.
46. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, Shinozaki N, Shimazaki J. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced OCP and SJS. *Am J Ophthalmol.* 1996 Dec; 122(1):38-52.
47. 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;18:73-9.
48. Prabhasawat P, Tseng SCG. Impression cytology of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1360-7.
49. Shimazaki J, Kosaka K, Shimura S, Tsubora K. Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmol* 2003 Jan;110(1):119-24.
50. Luanratanakorn P, Ratanapakorn T, Suwan- Apichon O, Chuck RS. Randomised controlled study of conjunctival autograft versus amniotic membrane graft in pterygium excision. *Br J Ophthalmol* 2006 Dec. 90(12):1476-80.
51. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji ZSC, Pflugfelder SC, Tseng SCGI. Suppression of interleukin-1a and interleukin-1b in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85:444-9.
52. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000 Feb;20:173-7.
53. Barton K, Budenz DL, Khaw PT, Tseng SCG. Glaucoma filtration surgery using amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1762-8.
54. Budenz DL, Barton K, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 2001;30:580-8, 2000.

55. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JKG. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 2001;85:905-7.
56. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns* 1999May;25(7):625-35.
57. Cameron P, Pagnon J, Reece J. Inactivation of intracellular and extracellular HIV-1 after glycerol treatment at 40C. Workshop on glycerol-preserved donor skin. Amsterdam 3 Oct. 1996; Quoted by Maral et al. 1999.
58. Kruse FE, Jousen 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 Jan; 238(1):68-75.
59. Chuck RS, Graff JM, Bryant MR, Sweet PM. Biomechanical Characterization of Human Amniotic Membrane Preparations for Ocular Surface Reconstruction. *Ophthalmic Res* 2004 Nov-Dec;36(6):341-8.
60. Kandavel GR, Chuck RS. Staining properties of deepithelialized human amniotic membrane. *Cornea* 2005Oct;24(7):853-6.
61. Simmonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992 Dec;326:726-32.
62. Panda A. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology (fresh vs preserved tissue). *Br J Ophthalmol* 1999;83:1410
63. Dua HS, Maharajan VS, Hopkinson A. Controversies and limitations of amniotic membrane in ophthalmic surgery. In: Kriegstein GK, Weinreb RN: *Cornea and External Eye Disease*. Berlin: Springer; 2006: p.21-33.
64. Memarzadeh F, Fahd AK, Shamie N, Chuck RS. Comparison of de-epithelialized amniotic membrane transplantation and conjunctival autograft after primary pterygium excision. *Eye* 2008 Jan;22(1):107-12.
65. Fournier JH, McLachlan DL. Ocular surface reconstruction using amniotic membrane allograft for severe surface disorders in chemical burns: case report and review of the literature. *Int Surg*. 2005 Jan-Mar;90(1):45-7.
66. Miljudin ES, Zolotaryov AV, Volova LT, Ahmerova UM. Silica gel dessication of amniotic membrane with related epithelium cells for ocular surface reconstruction. *Cell Tissue Bank* 2004;5(4):271-5.
67. Guilherme DA. Liofilização Industrial. *Control Contam* 2002;43:22-30.
68. Rey L. Glimpses into the realm of Freeze-Drying: Fundamental Issues. In: Rey L, May JC. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. New York: Ed Marcel Dekker Inc; 2004. p.1-32



69. Ximenes J. Atualidades científicas. Princípios fundamentais do sistema de conservação de cepas microbianas por liofilização. 4ª ed. São Paulo: Cefar; 2004. 1p.
70. Brasil. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RDC nº 46 de 18 de maio de 2000. Normatiza os processos de produção e Controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano.
71. Sato H, Shimazaki J, Shimazaki N. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:S428.
72. Liu W, Wang DQ, Nail SL. Freeze-drying of proteins from a sucrose-glycine excipient system: effect of formulation composition on the initial recovery of protein activity. *AAPS PharmSciTech* 2005 Jun;6(2):150-7.
73. Visuthikosol V, Somna R, Nitiyanant P, Navikarn T. The preparation of lyophilised of fetal membrane for biological dressing. *J Med Assoc Thai* 1992;75:52-9.
74. Onerci M. The effects of lyophilized homograft amniotic membrane on wound healing on rabbits. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1991;11:491-6.
75. Gomes MF, Santos VW, Nogueira TO. Membrana Amniótica Humana Liofilizada Sobre Feridas Cruentas em Áreas de Biópsia Bucal. *Rev APCD* 2001;55:327-31.
76. Sekiyama E, Nakamura T, Kurihara E, Copeer LJ, Fullwood NJ, Takaoka M, et al. Novel sutureless transplantation of bioadhesive-coated freeze-bried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Apr;48(4):1528-34.
77. Gabler B, Lohmann CP. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto corneal surface. *Ophthalmology* 2000;107:1344-6.
78. Burnier Jr MNN, Neves RA, Pereira MG, Alberti VN, Rigueiro M. Aplicações da técnica de imunoperoxidase em patologia. *Arq Inst Penido Burnier* 1988, 30:46-9.
79. Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo: Michalany; 1998.
80. White VA. Advanced diagnostic techniques - diagnostic immunohistochemistry. In: Albert DM, Jakobiec FA. (Ed.). *Principles and practice of ophthalmology: clinical practice*. Philadelphia: Saunders 1994;4:2372-85.
81. Alves VAF. Imuno-histoquímica. In: Michalany J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. São Paulo: Ed. Michalany, 1998; p.190-200.

#### **4 OBJETIVO**

Verificar se o transplante de membrana amniótica liofilizada possui a mesma eficácia que o transplante de membrana amniótica criopreservada na velocidade de reepitelização de defeitos epiteliais corneanos em coelhos.

## 5 ARTIGO EM PORTUGUÊS

### RESUMO

**Objetivo:** Comparar a eficácia do transplante de membrana amniótica (MA) criopreservada e liofilizada quanto à velocidade de reepitelização em defeitos epiteliais corneanos em coelhos.

**Desenho do estudo:** Estudo experimental intervencional.

**Métodos:** Foram utilizados vinte e seis olhos de vinte e seis coelhos divididos em dois grupos cujas córneas foram submetidas a uma desepitelização de 7 mm de diâmetro e, posteriormente, recobertas com MAs fixadas com cola de fibrina. O Grupo 1 recebeu MAs criopreservada, enquanto o Grupo 2 recebeu MAs liofilizadas. Foram avaliados os seguintes critérios: velocidade de reepitelização corneana por fotografias seriadas das córneas no primeiro, quarto e sétimos dia pós-operatório, estudo anatomopatológico e imunohistoquímico das córneas e análise por microscopia eletrônica de varredura de uma amostra de cada MA.

**Resultados:** Em cada grupo, o percentual de reepitelização corneana foi significativamente maior entre o primeiro e sétimo dia pós-operatório ( $p < 0,001$ ). Entre os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,867$ ). Em relação à análise anatomopatológica, não houve diferença significativa entre autólise e vacuolização epitelial entre os grupos ( $p = 0,064$  e  $p = 0,204$ , respectivamente). Em relação à integridade da membrana basal, quando vista ao PAS, todas as amostras receberam classificação 2 (membrana basal íntegra). A imunohistoquímica mostrou marcação positiva para citoqueratina e vimentina em todos os olhos de ambos os grupos. A microscopia eletrônica revelou que a MA criopreservada possui uma

espessura maior do que a liofilizada.

**Conclusão:** A MA liofilizada mostrou-se tão eficaz quanto a criopreservada no tratamento de defeitos epiteliais corneanos em coelhos. Não houve diferença nas características anatomopatológicas e imunohistoquímicas entre os dois tipos de MA. A MA liofilizada deve ser considerada no arsenal terapêutico dos oftalmologistas, com a vantagem de ser mais facilmente armazenada, ter um prazo de validade maior, além da segurança biológica de se ter um material esterilizado.

**Palavras-chave:** membrana amniótica, criopreservação, liofilização, transplante, córnea, coelhos.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A membrana amniótica (MA) foi, primeiramente, utilizada na oftalmologia por Roth, em 1940, na reconstrução da superfície ocular em um caso de simbléfaro (1). Desde sua reintrodução na oftalmologia por Kim e Tseng, em 1995, tem sido utilizada em várias doenças da superfície ocular, como úlceras tróficas, ceratopatia bolhosa, defeitos epiteliais persistentes, entre outras (2). O sucesso da utilização deste tecido biológico pode ser explicado por suas propriedades anti-inflamatórias, antifibroblásticas e antiangiogênicas (3).

A membrana amniótica é a camada mais interna da placenta e é composta, no exterior, pelo córion de origem materna e pelo lado interno do âmnion, de origem fetal. Histologicamente, é composta, basicamente, por três camadas: epitelial, membrana basal e estroma.

A camada de células epiteliais está uniformemente colocada sobre a membrana basal. Diferencia-se do epitélio da superfície ocular pela presença de um grande número de microvilosidades em sua superfície. A técnica de criopreservação tende a desvitalizar essas células, deixando a membrana basal e o estroma intactos.

A membrana basal é espessa – uma das mais espessas encontradas em tecidos humanos –, e é composta por colágenos do tipo IV e VII, também presentes no epitélio corneano, colágenos do tipo I, II, III e V; elastina, fibronectina e várias outras integrinas. A membrana basal é conhecida por promover a migração, adesão e diferenciação epitelial, diminuindo a apoptose celular (4,5). Histologicamente, a membrana basal é mais parecida com a conjuntiva. É um substrato ideal para o crescimento de células tronco epiteliais da córnea, por prolongar a vida celular e manter sua clonegenicidade, o que explicaria a facilitação da reepitelização (6). A

membrana basal está fortemente aderida ao epitélio por múltiplos processos interdigitais (7).

A matriz estromal é rica em ácido hialurônico fetal que suprime a proliferação celular por alterar a regulação de TGF beta, diminuindo a fibrose por inibir a proliferação e diferenciação dos miofibroblastos. Isso explica porque a membrana amniótica reduz o processo de cicatrização, durante a construção de superfície ocular, prevenindo leucomas após a exérese de pterígios ou diminuindo o *haze* corneano após cirurgia refrativa (8). O estroma também suprime a expressão de certas citocinas inflamatórias que se originam do epitélio da superfície ocular, incluindo interleucina 1 alfa,1-beta, interleucinas 2 e 8,interferon e fator de necrose tumoral. A supressão da inflamação é o elemento chave na prevenção da cicatrização conjuntival, neovascularização e fibrose.

A MA criopreservada é, atualmente, a mais utilizada nas cirurgias oftalmológicas, e inúmeros trabalhos já foram publicados com a utilização desse tecido. Esse método, apesar de amplamente utilizado e de fazer parte do arsenal terapêutico dos oftalmologistas, tem o inconveniente de necessitar de um freezer especial onde o tecido é mantido estocado à temperatura de -80°C. Além disso, é necessário o transporte pelo menor período de tempo a 4°C, até o momento de sua utilização. O tempo máximo de utilização da MA criopreservada é de até dois anos(9). Outro problema potencial é a possível contaminação do tecido, já que não se pode esterilizar o tecido processado dessa forma.

A liofilização vem como um método de preservação alternativo em que a membrana pode ser estocada por um período maior de tempo em temperatura ambiente, facilitando a distribuição, o transporte e diminuindo os custos, podendo tornar a MA acessível a um número maior de cirurgiões, especialmente em países

em desenvolvimento. A possibilidade de esterilização da membrana liofilizada com irradiação gama do mesmo modo proporciona maior segurança biológica na prevenção de possíveis infecções no receptor (1,10).

Existem poucos trabalhos, na literatura, utilizando MA liofilizada, mas todos com resultados animadores (11-15).

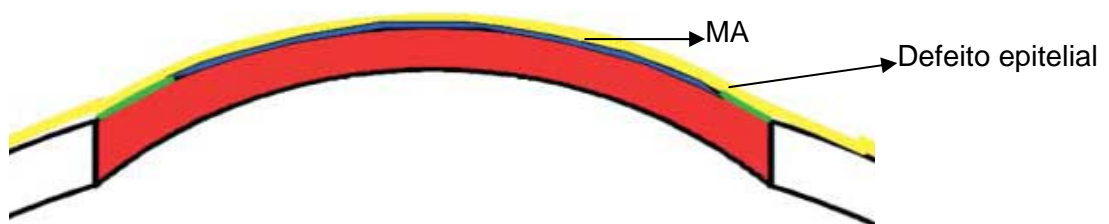
Este estudo visa a comparar a MA criopreservada com a liofilizada na cicatrização de defeitos epiteliais corneanos em coelhos.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo experimental seguiu as normas aprovadas pela Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para cirurgias em animais. Foram utilizados vinte e seis olhos de vinte e seis coelhos *oryctolagus cuniculus*, da linhagem Nova Zelândia, albinos, machos, entre quatro e seis meses de idade, pesando entre 2500 gramas a 3500 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Centro de Experimentação Animal (CEA) do Centro de Pesquisas do HCPA, tratados com ração padronizada e água *ad libitum*, bem como acompanhamento veterinário. Ficaram um período de sete dias na unidade de experimentação animal, previamente às cirurgias, com o objetivo de climatizar as cobaias e servir como período de isolamento de possíveis enfermidades.

Para o procedimento, todos os animais receberam anestesia geral intramuscular com xilazina e ketamina, 1 ml de cada, antes da manipulação cirúrgica. Também foi utilizado anestésico tópico (Anestalcon® colírio) para diminuir o estímulo doloroso.

Após a anestesia, um olho de cada coelho foi submetido a uma desepitelização manual, guiada por trépano, de 7 mm de diâmetro. Logo a seguir, o defeito epitelial foi recoberto com membrana amniótica humana (trepanada 0.5 mm maior), colocada sobre a córnea com o lado epitelial para cima (Figura 1). A fixação da membrana à córnea foi realizada com a aplicação de adesivo de fibrina (Beriplast®). Após, foi colocada uma lente de contato terapêutica sobre a córnea, que foi retirada no primeiro dia pós-operatório. Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis e com microscópio cirúrgico. A documentação do procedimento foi realizada por vídeo acoplado ao microscópio no sistema VHS.



**Figura 1:** Ilustração da colocação da MA sobre o defeito epitelial corneano

Os coelhos foram randomizados em dois grupos de treze coelhos cada: Os olhos dos coelhos do grupo 1 foram transplantados com membrana amniótica humana armazenada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  (criopreservada), e os olhos dos coelhos do grupo 2 foram transplantados com membrana amniótica humana liofilizada hidratada no momento do procedimento.

Imediatamente após o procedimento, todos os coelhos receberam analgesia sistêmica com dipirona sódica (0,5 mL) e foram tratados utilizando-se, no olho



operado, colírio de antibiótico e corticóide (dexametasona e tobramicina), duas vezes ao dia, por sete dias. Os coelhos foram acompanhados com exames externos e fotografias no primeiro, quarto e sétimo dias de pós-operatório. Em cada revisão, os animais foram examinados com a utilização de colírio anestésico e colírio de fluoresceína para verificar a área corneana já reepitelizada e para fotografar as córneas. As lentes de contato terapêuticas foram retiradas no primeiro dia pós-operatório. No sétimo dia pós-operatório, os coelhos foram eutanasiados, sendo que, para isso, foi utilizada anestesia sistêmica com as mesmas doses citadas anteriormente e, posteriormente, injetados 3 ml de lidocaína intracardíaca. Os olhos foram, então, enucleados, e as córneas preservadas em ambiente estéril, com a mesma técnica e instrumental usados em humanos. Após isso, foram feitos cortes do material, além de colorações apropriadas das lâminas, que foram avaliadas por exame anatomopatológico e por imunohistoquímica.

### **5.2.1 Preparo e preservação da membrana amniótica humana**

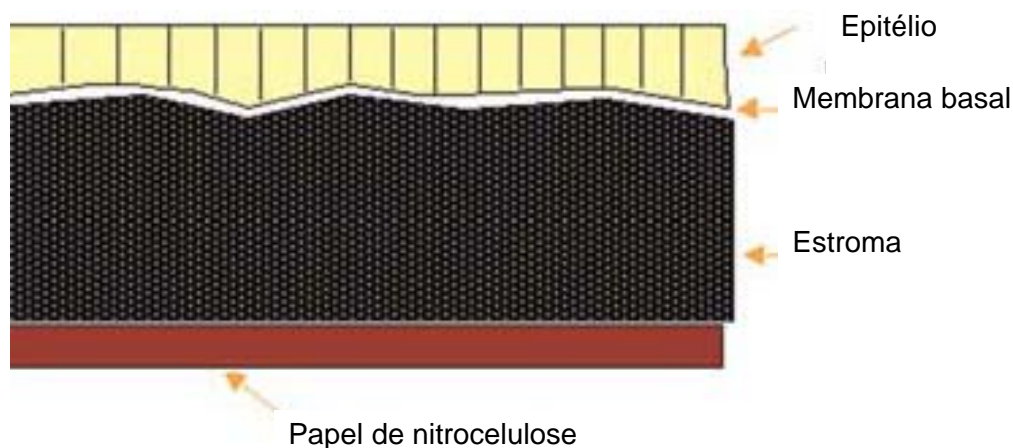
#### **a) Congelada a -80°C (Grupo 1)**

O preparo e a preservação da MA seguiu o protocolo de Kim e Tseng, proposto em 1995. A placenta foi obtida por cesareana eletiva de pacientes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HCPA, após assinatura do termo de consentimento (Anexo A), de acordo com a Declaração de Helsinki. A gestante doadora da placenta foi testada, sorologicamente, apresentando negatividade para sífilis, AIDS, hepatite B e C. Em ambiente estéril e com cuidados de assepsia, a placenta foi lavada, várias vezes, inicialmente, com soro fisiológico para retirar a

maior quantidade de coágulos e, após, com solução contendo penicilina, estreptomicina, neomicina e anfotericina-B. Separou-se o âmnion do córion por dissecação, no plano de clivagem existente, com o auxílio de esponjas de celulose, deixando uma membrana transparente livre de debris. No lado coriônico da membrana, aderiram-se pedaços de papel de nitrocelulose de, aproximadamente, 4x 3 cm e cortaram-se os bordos da membrana com lâmina 15 de bisturi. O conjunto papel e membrana foram imersos em solução contendo antibióticos e anfotericina B antes de serem colocados em frascos estéreis contendo glicerol e meio Dulbecco modificado (meio de cultura de tecidos obtido pela *Life Technologies*®), na proporção 1:1 e estocados a -80°C. As membranas foram utilizadas após seis meses de preservação (após o teste de sorologia negativa da paciente doadora).

#### **b) Liofilizada (Grupo 2)**

A placenta foi obtida da mesma forma descrita no grupo 1. Não se utilizou para essas membranas o papel de nitrocelulose, já que os fragmentos cortados de tamanho 4x3 cm foram colocados, diretamente, em frascos estéreis contendo água destilada. Imediatamente após, esses tecidos foram retirados dos frascos, colocados sobre uma plataforma de vidro e submetidos à liofilização em um Liofilizador Edwards modelo MODYLIO, 99608 (com câmera, condensador em aço inox 304L, dois compressores herméticos com temperatura mínima de -70°C, 24 horas) Após a liofilização, os tecidos foram embalados a vácuo e esterilizados com radiação gama na dose de 25 kGy, de acordo com a dose preconizada para esterilização de âmnion (16,17). Trinta minutos antes da cirurgia, as embalagens eram abertas e as membranas hidratadas em solução salina balanceada (BSS).



**Figura 2:** Representação da histologia da MA em papel de nitrocelulose

### 5.2.2 Técnica cirúrgica

Todas as cirurgias foram realizadas por duas cirurgiãs (mestranda e orientadora), utilizando microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos<sup>®</sup>, BR), instrumental adequado e técnicas de assepsia. Foi empregada anestesia geral do mesmo modo já descrito. O pós-operatório, com análise da córnea ao exame com fluoresceína sob o microscópio, bem como as fotografias, foram todos realizados pela mestranda e documentados por um fotógrafo profissional.

### 5.2.3 Critérios avaliados

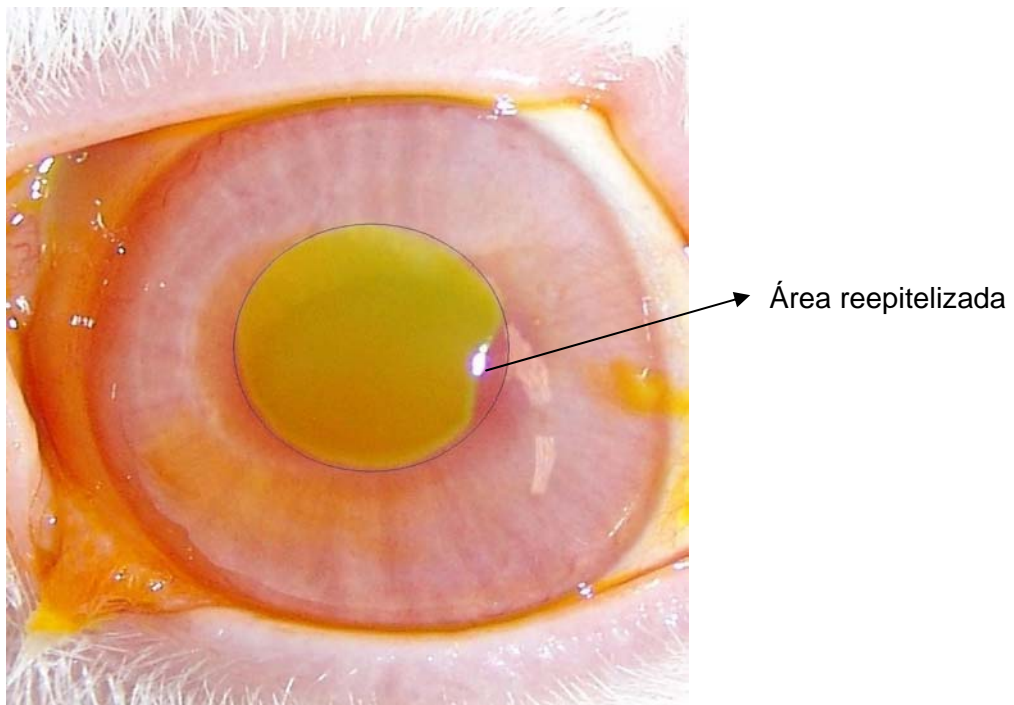
#### 5.2.3.1 Velocidade de reepitelização corneana

O tempo de cicatrização foi avaliado em dias, até a total epitelização da córnea. Imagens externas foram obtidas por fotografias no primeiro, no quarto e

sétimo dias de pós-operatório (dias 1, 4 e 7), utilizando-se colírio de fluoresceína (Figura 3). Após, com as imagens digitais das córneas, foi demarcada a área já reepitelizada com programa computacional e, então, utilizado *software* de AutoCad para cálculo de percentagem de área já reepitelizada (Figura 4).



**Figura 3:** Imagem externa da córnea do coelho obtida para as fotografias



**Figura 4:** Imagem da área corneana já reepitelizada que foi calculada em AutoCad

### 5.2.3.2 Anatomopatológico

Foram realizados estudos anatomopatológicos das córneas com as membranas preservadas por congelação e por liofilização para comparação. As córneas foram fixadas em formalina, tamponadas a 10% e incluídas em parafina para serem cortadas em microcerátomo Zeiss tx-40. Os cortes em parafina foram submetidos a métodos de rotina da hematoxilina-eosina (HE) e do ácido periódico de Schiff (para PAS). As Tabelas 1 e 2 mostram como foram analisados a integridade da membrana basal pelo PAS, o grau de vacuolização do epitélio e o grau de autólise pelo HE com microscopia óptica:

**Tabela 1:** Graduação anatomopatológica para autólise e vacuolização epitelial

Para lâminas coradas com HE	Grau	Descrição
Autólise (AUT)	0	Ausência de autólise
	1	Autólise discreta
	2	Autólise moderada
	3	Autólise (AUT)
Vacuolização epitelial (VE)	0	Ausência de vacuolização epitelial
	1	Vacuolização epitelial discreta
	2	Vacuolização epitelial moderada
	3	Vacuolização epitelial intensa

**Tabela 2:** Graduação anatomopatológica para integridade da membrana basal

Para lâminas coradas com PAS	Grau	Descrição
Integridade da membrana basal (IMB)	0	Ausência de membrana basal
	1	Membrana basal com falhas
	2	Membrana basal íntegra

### 5.2.3.3 Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada no Serviço de Patologia da Medicina Veterinária da UFRGS, pelo método indireto do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase para citoqueratinas e estreptavidina-biotina fosfatase alcalina para vimentina. Para a pesquisa e localização dos antígenos, foram utilizados:

- a) anticorpo monoclonal de camundongo antivimentina humana diluído 1:200 (Zimed) – como marcador de tecido mesenquimal;
- b) anticorpo policlonal de coelho anticitoqueratina primário diluído 1:200 (Dako) – como marcador de tecido epitelial.

A Tabela 3 mostra como as amostras foram classificadas:

**Tabela 3:** Classificação da análise imunohistoquímica

Expressão IHQ	Grau	Descrição
Para os anticorpos estudados	0	Quando nenhuma célula mostrou reação ao marcador
	1	Menos de 50% das células apresentaram reação positiva ao marcador
	2	50% ou mais células apresentaram reação positiva ao marcador
	3	100% das células apresentaram reação positiva ao marcador

A citoqueratina foi utilizada com o objetivo de marcar células epiteliais presentes no epitélio corneano. A vimentina é um marcador de células mesenquimais. Essas células, normalmente, não estão presentes no tecido corneano, e sua presença pode indicar reação inflamatória ou fibrose, por induzir conjuntivalização.

#### 5.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Foi realizada microscopia eletrônica de varredura em duas amostras de membrana amniótica, uma liofilizada e outra criopreservada para análise morfológica ilustrativa.

As amostras colhidas foram acondicionadas individualmente e mantidas imersas em solução de glutaraldeído 2.5%, com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7.4, durante oito horas, à temperatura de 4°C e temperatura ambiente durante sete dias.

O preparo e a análises das amostras foram realizados junto ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

As amostras, após serem fixadas, foram submetidas a uma nova lavagem em solução tampão de cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações ascendentes de álcool etílico (30,50,70,85,90,95 e 100%) e acetona PA (100%), sendo mantidas nas soluções pelo período de 15 minutos para cada concentração, repetindo três vezes esse protocolo na concentração de 100%.

Secaram-se, em ato contínuo, com secador de ponto crítico, utilizando-se dióxido de carbono líquido. Foram fixadas em porta-espécime, com fita condutiva de cola de carbono e metalizadas, utilizando-se um metalizador, com uma camada de ouro e paládio de 35 nm de espessura, em íon *sputter coater*, durante dois minutos. Na seqüência, cada amostra foi avaliada no microscópio eletrônico de varredura operado com 15 kv. Três eletromicrografias de varredura da superfície, com aumentos entre 35 e 55 vezes da região perincisional da membrana amniótica foram obtidas de cada amostra. Ocasionalmente, obtiveram-se imagens com outros aumentos. As imagens foram gravadas em arquivo digital.

#### 5.2.4 Desenho do estudo e análise estatística

Foi realizado um estudo experimental intervencional. Os resultados da velocidade de reepitelização foram analisados, quantitativamente, pelo teste t de student e por ANOVA para médias repetidas ( $p$  do tempo – para avaliar se houve mudança ao longo do tempo dentro do grupo;  $p$  interação – para avaliar a variação, ao longo do tempo, entre os grupos; e  $p$  grupo – para avaliar a média nos três dias de exame). Na análise descritiva, utilizaram-se média, mediana, desvio padrão, valores, mínimo e máximo, e percentis. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$  e um intervalo de confiança de 95%. Para a análise dos grupos quanto aos parâmetros histológicos, foi usado o teste de Mann-Whitney (para amostras não paramétricas). Foi utilizado o programa estatístico SPSS para a análise de todos os dados.

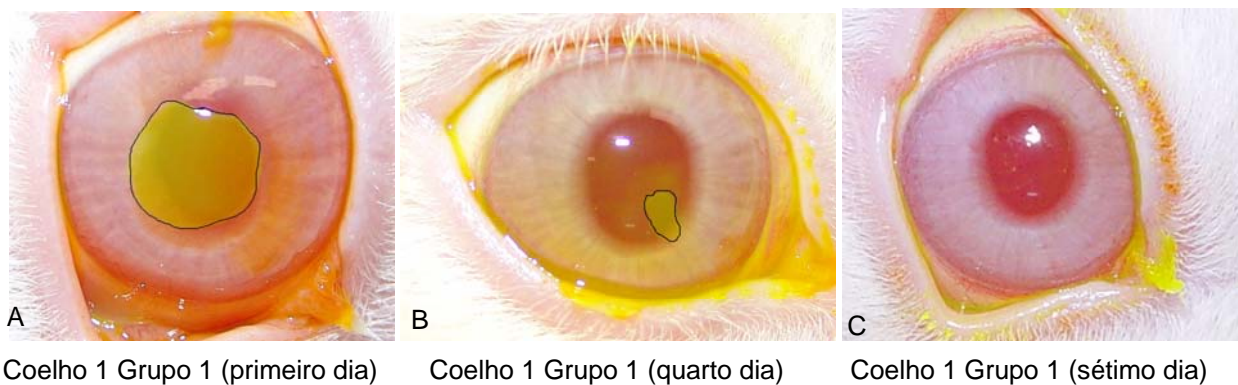
### 5.3 RESULTADOS

Tanto a membrana liofilizada quanto a criopreservada foram fáceis de manusear depois de hidratadas. A MA liofilizada apresentou-se um pouco mais fina do que a criopreservada. Todos os enxertos mantiveram sua integridade no pós-operatório. Houve queda da lente de contato antes da realização do primeiro exame em dez coelhos, quatro do grupo 1 e seis do grupo 2. Não houve nenhum caso de ceratite infecciosa.

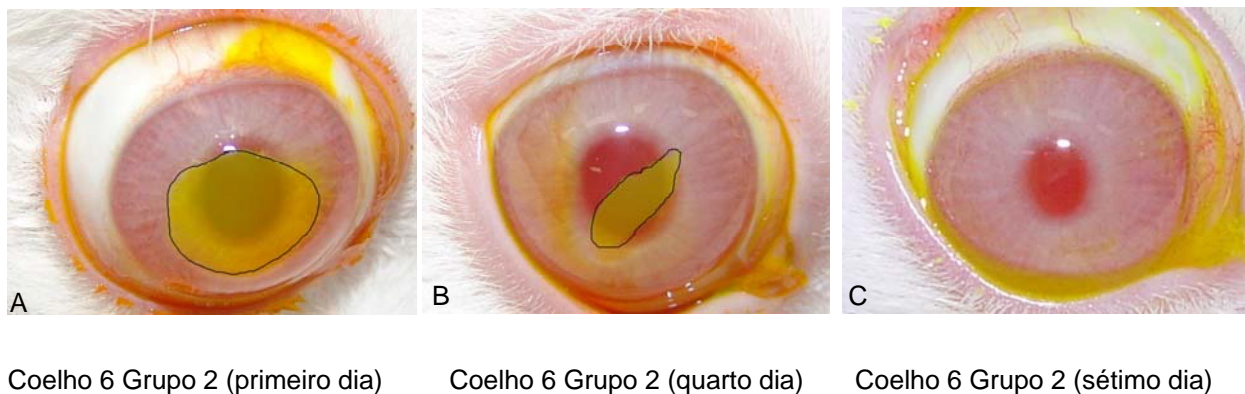


### 5.3.1 Velocidade de reepitelização corneana

No grupo 1 (MA criopreservada), todos os coelhos tiveram suas córneas completamente reepitelizadas no último dia de exame pós-operatório, enquanto que, no grupo 2 (MA liofilizada), doze dos treze coelhos tiveram suas córneas completamente reepitelizadas no último dia de exame pós-operatório. Exemplo de um olho de cada grupo nos diferentes dias de pós-operatório podem ser vistos nas Figuras 5 e 6.



**Figura 5:** Área desepitelizada marcada com programa de AutoCad para cálculo – coelho 1 do grupo 1 no primeiro (A), quarto (B) e sétimo (C) dias de pós-operatório.



**Figura 6:** Área desepitelizada marcada com programa de AutoCad para cálculo - coelho 6 grupo 2 no primeiro (A), quarto (B) e sétimo (C) dias pós-operatório.

A média ( $\pm dp$ ) e a mediana de reepitelização, no grupo 1, no primeiro dia de exame pós-operatório, foi de 67,6% ( $\pm 9,70$ ) e 66,9%; no quarto dia de pós-operatório, de 96,9% ( $\pm 5,3$ ) e 100%; e, no sétimo dia pós-operatório, foi de 100% com desvio padrão de 0 e mediana de 100%.

No grupo 2, a média de reepitelização, no primeiro dia, foi de 65,8% ( $\pm 12,8$ ), com mediana de 66%; no quarto dia, foi de 96,6% ( $\pm 8,9$ ) e mediana de 100%; e, no sétimo dia de pós-operatório, de 99,8% ( $\pm 0,5$ ) e mediana de 100%.

Os resultados são apresentados com mais detalhes nas Tabelas 4 e 5:

#### a) Grupo 1 (MA criopreservada)

**Tabela 4:** Resultados de medidas de tendência central e dispersão do grupo 1

		Dia 1	Dia 4	Dia 7
N		13	13	13
Média		67,5677	96,8692	100,0000
Mediana		66,8700	100,0000	100,0000
Desvio padrão		9,69552	5,35977	,00000
Mínimo		51,12	82,56	100,00
Máximo		82,02	100,00	100,00
Percentis	25	60,3500	94,6850	100,0000
	75	77,7200	100,0000	100,0000

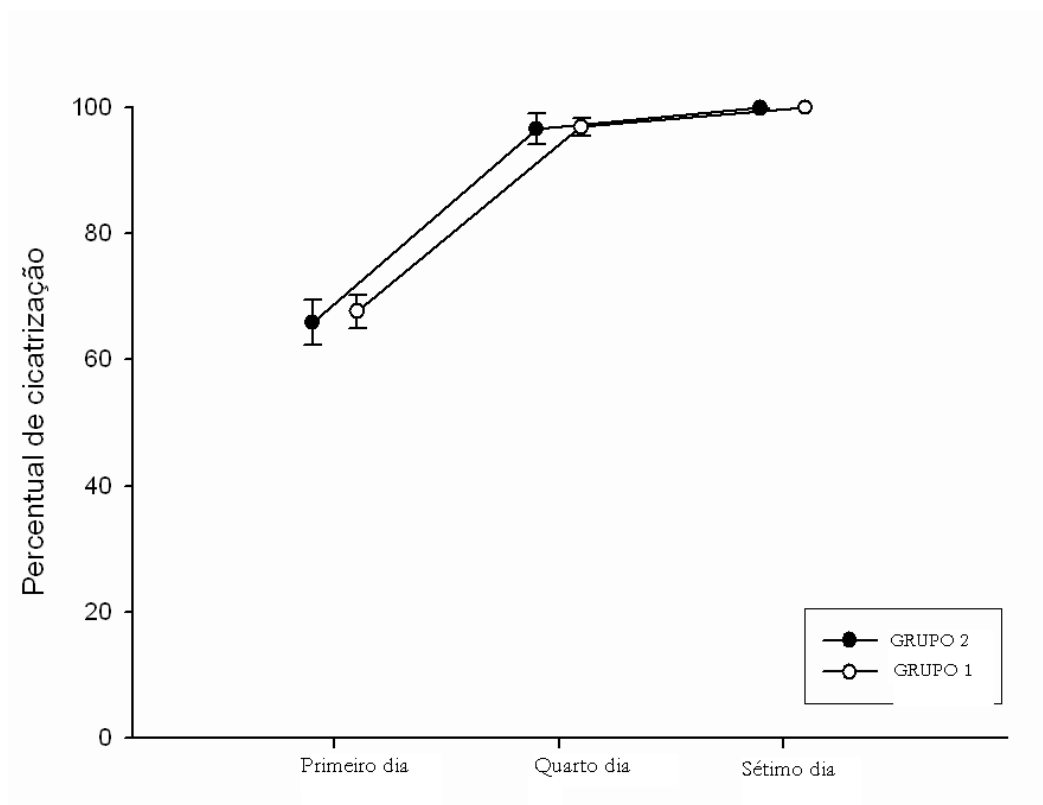
#### b) Grupo 2 (MA liofilizada)

**Tabela 5:** Resultados de medidas de tendência central e dispersão do grupo 2

		Dia 1	Dia 4	Dia 7
N		13	13	13
Média		65,8700	96,6362	99,8585
Mediana		65,9600	100,0000	100,0000
Desvio padrão		12,78203	8,89016	,51032
Mínimo		37,32	69,55	98,16
Máximo		83,60	100,00	100,00
Percentis	25	57,3550	99,8450	100,0000
	75	77,6100	100,0000	100,0000

Em cada grupo, o percentual de reepitelização corneana foi, significativamente, maior entre o primeiro e sétimo dia pós-operatório ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença, estatisticamente, significativa, entre os grupos ( $p = 0,867$ ), nem entre os dias pós-operatórios, quando analisados entre si – média dos três momentos ( $p = 0,726$ ).

A distribuição comparativa das médias e desvios padrão de reepitelização corneana entre os grupos é apresentada no gráfico a seguir (Figura 7).



**Figura 7:** Gráfico referente à distribuição comparativa das médias e desvios-padrões nos dois grupos.

### 5.3.2 Anatomopatológico

Os achados do anatomopatológico HE e PAS dos dois grupos estão descritos nas Tabelas 6 e 7:

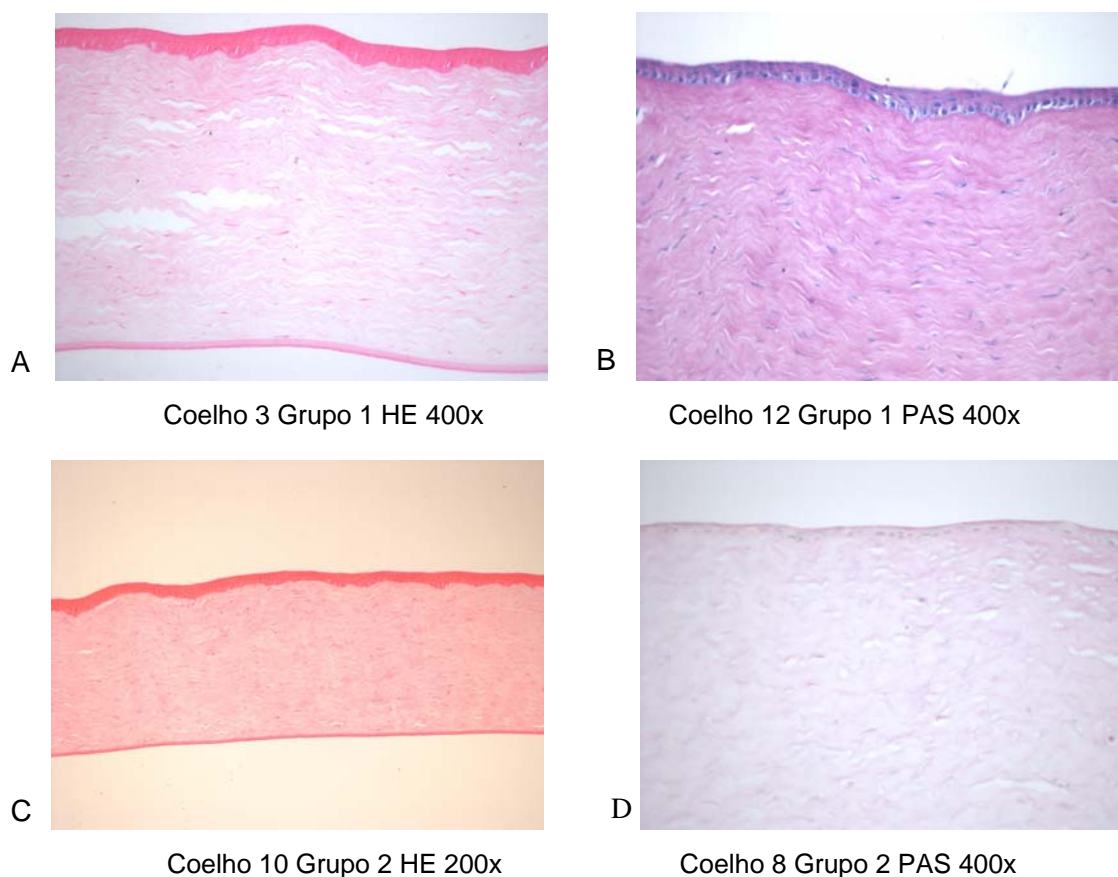
**Tabela 6:** Resultados conforme graduação quanto à análise histopatológica do grupo 1 (criopreservada)

<b>Animal</b>	<b>Vacuol. epitélio (0-3)</b>	<b>Autólise (0-3)</b>	<b>Int. membrana (0-2)</b>
Coelho 1	0	0	2
Coelho 2	0	0	2
Coelho 3	1	1	2
Coelho 4	1	0	2
Coelho 5	1	2	2
Coelho 6	3	2	2
Coelho 7	3	0	2
Coelho 8	1	2	2
Coelho 9	1	0	2
Coelho 10	2	2	2
Coelho 11	1	2	2
Coelho 12	0	0	2
Coelho 13	2	2	2

**Tabela 7:** Resultados conforme graduação quanto à análise histopatológica do grupo 2 (liofilizada)

<b>Animal</b>	<b>Vacuol. epitélio (0-3)</b>	<b>Autólise (0-3)</b>	<b>Int. membrana (0-2)</b>
Coelho 1	1	0	2
Coelho 2	1	1	2
Coelho 3	1	3	2
Coelho 4	2	2	2
Coelho 5	2	1	2
Coelho 6	1	1	2
Coelho 7	1	3	2
Coelho 8	2	3	2
Coelho 9	1	3	2
Coelho 10	2	1	2
Coelho 11	3	2	2
Coelho 12	2	2	2
Coelho 13	3	2	2

Nos coelhos 4, 6 e 8 do grupo 1 (criopreservada), foi observada proliferação do epitélio corneano. Quando comparados entre si, não houve diferença significativa entre autólise e vacuolização epitelial entre os grupos ( $p=0,064$  e  $p=0,204$ , respectivamente). Em relação à integridade da membrana basal, quando vista ao PAS, todas as amostras receberam classificação 2 (membrana basal íntegra) (Figura 8).



**Figura 8:** Exemplos de cortes histológicos de coelhos do grupo 1, com coloração HE (A) e PAS (B) e de coelhos do grupo 2 com coloração HE (C) e PAS (D)

### 5.3.3 Imunohistoquímica

A análise com anticorpos citoqueratina e vimentina para os dois grupos é descrita nas Tabelas 8 e 9:

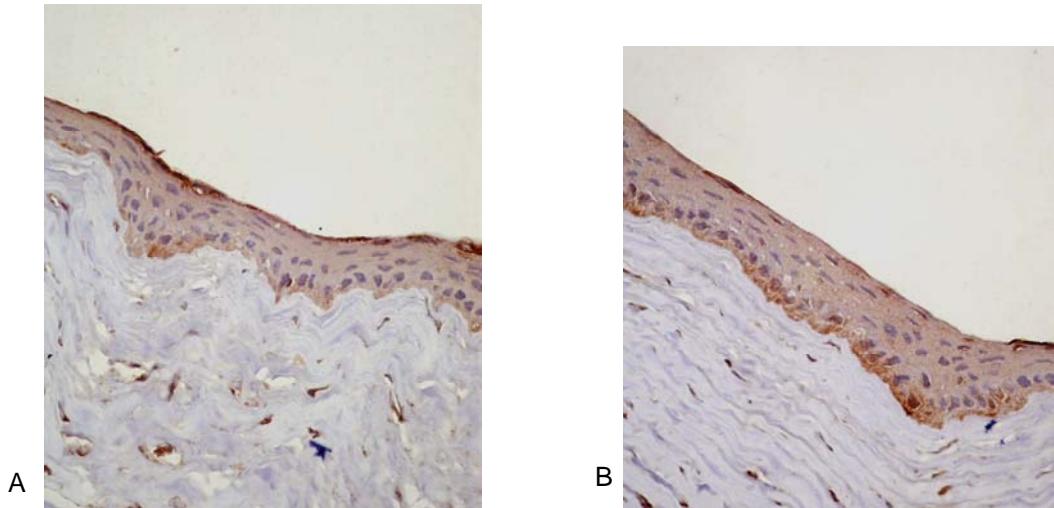
**Tabela 8:** Graduação em relação à presença de marcação positiva ao marcador grupo 1 (criopreservada)

<b>Animal</b>	<b>IHQ Citoqueratina</b>	<b>IHQ Vimentina</b>
Coelho 1	2	1
Coelho 2	2	1
Coelho 3	2	1
Coelho 4	2	2
Coelho 5	2	1
Coelho 6	2	1
Coelho 7	2	1
Coelho 8	2	1
Coelho 9	2	1
Coelho 10	2	1
Coelho 11	2	1
Coelho 12	2	1
Coelho 13	2	1

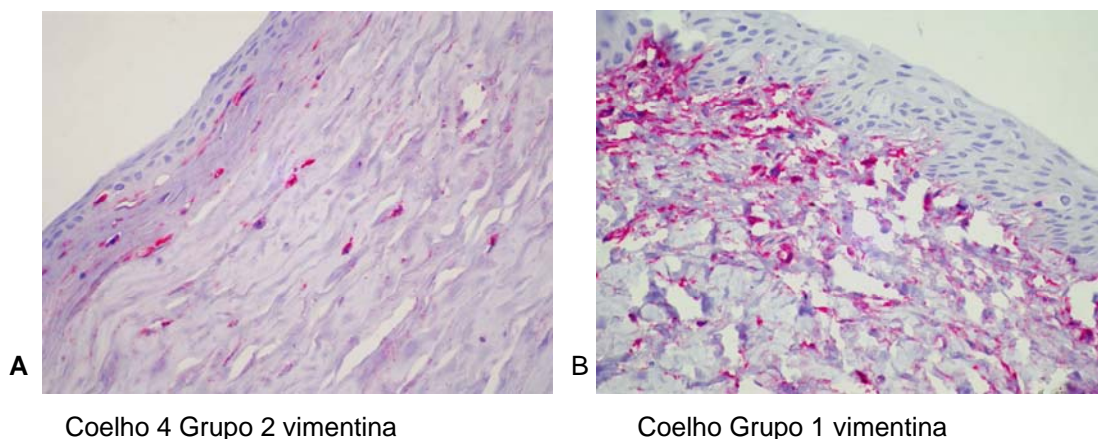
**Tabela 9:** Graduação em relação à presença de marcação positiva ao marcador grupo 2 (liofilizada)

<b>Animal</b>	<b>IHQ Citoqueratina</b>	<b>IHQ Vimentina</b>
Coelho 1	2	1
Coelho 2	2	1
Coelho 3	2	1
Coelho 4	2	1
Coelho 5	2	1
Coelho 6	2	1
Coelho 7	2	1
Coelho 8	2	1
Coelho 9	2	1
Coelho 10	2	1
Coelho 11	2	1
Coelho 12	2	1
Coelho 13	2	1

No coelho 4 do Grupo 1 (criopreservada), houve marcação positiva para vimentina no meio do estroma corneano (Figuras 9 e 10). Clinicamente, no entanto, não foi observada nenhuma diferença na velocidade de cicatrização ou presença de outro achado.



**Figuras 9 A e B:** Exemplos de marcações positivas de citoqueratina (coloração amarronada) observadas no epitélio corneano do coelho 6 do grupo 1 (A) e do coelho 5 do Grupo 2 (B)



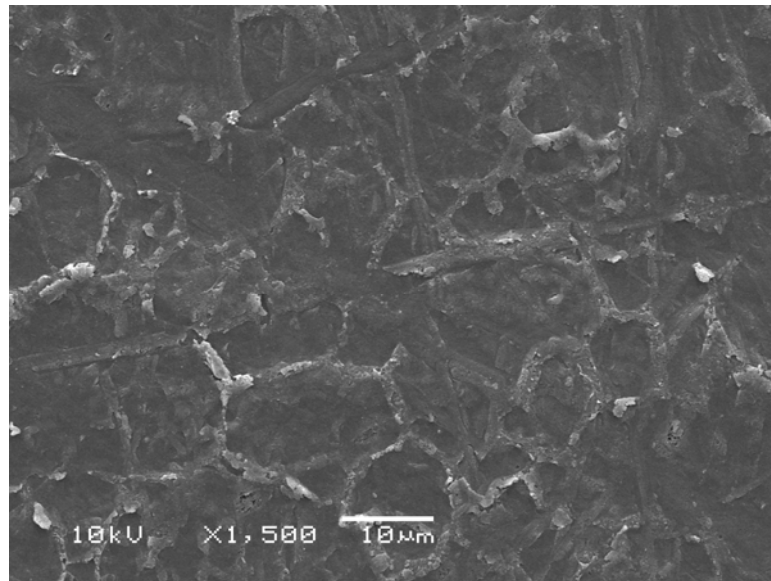
Coelho 4 Grupo 2 vimentina

Coelho Grupo 1 vimentina

**Figuras 10 A e B:** Exemplos de marcações positivas de vimentina (coloração avermelhada) observadas na região próxima à conjuntiva, tecido conjuntivo e fibras musculares do corpo ciliar nas córneas do coelho 4 do grupo 2 (A) e do coelho 4 do grupo 1 (B).

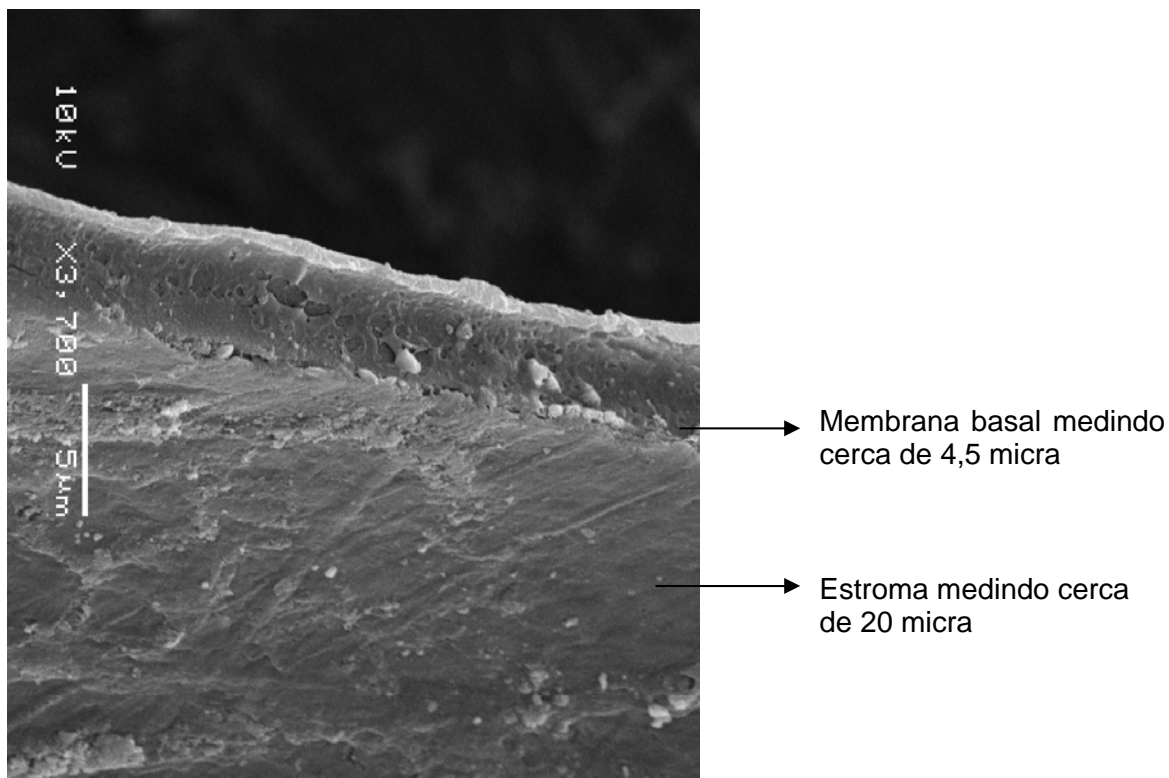
### 5.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural por varredura revelou ausência do epitélio da membrana amniótica em ambas as amostras. A preservação da membrana basal, de característica homogênea e contínua, ocorreu, também, em ambas as membranas (liofilizada e criopreservada). O lado coriônico mostrou uma típica aparência de fibras de colágeno nas duas membranas (Figura 11). Em relação à espessura, a membrana liofilizada mostrou-se mais fina, em média 25 micra (Figura 12), enquanto a criopreservada mediu em torno de 35 micra.



**Figura 11:** Superfície coriônica membrana amniótica criopreservada





**Figura 12:** Membrana amniótica liofilizada.  
Vista lateral

#### 5.4 DISCUSSÃO

Foram utilizados coelhos como modelo experimental pela semelhança anatômica entre a córnea desse animal e a do homem (18), já que, com exceção da membrana de Bowman, que inexistente na córnea dos coelhos, as demais estruturas são muito semelhantes às da córnea humana.

Assim como vários autores (5,10,13,14,19-22), também se utilizou, neste trabalho, MA humana em coelhos, o que caracteriza um xenoenxerto, já que é descrito que a MA não apresenta imunogenicidade.

O transplante de MA é muito utilizado na oftalmologia, possuindo diversas indicações, pois ela apresenta propriedades únicas extremamente úteis no

tratamento de diversas doenças da superfície ocular, no entanto, existem, ainda, algumas dificuldades relacionadas ao processamento e distribuição desse tecido biológico que limitam seu uso. A falta de legislação brasileira regulamentando sua utilização, a dependência de doação de placenta e a disponibilidade de bancos de tecidos que realizam a obtenção e distribuição do material, limitam sua utilização a poucos centros de pesquisa existentes no Brasil (23-25).

O fato de a criopreservação necessitar de um congelador volumoso a  $-80^{\circ}\text{C}$  torna esse método de preservação dispendioso e inviável para muitos centros, pelo custo do equipamento e, também, pelo alto consumo de energia, particularmente, em países em desenvolvimento.

Outro fator a ser ponderado são as quedas constantes de energia, nesses países, que podem fazer com que os enxertos tenham que ser desprezados pela perda da viabilidade do produto em questão (10).

A utilização da MA fresca ou hipotermicamente preservada (conservada em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ ) possui desvantagens como o curto prazo de validade, fazendo com que parte do material disponível seja desprezado, por ser considerado inapropriado para uso (26).

O problema mais grave, todavia, seria a falta de segurança biológica. Nesse tipo de preservação, existe um alto risco de transmissão de doenças devido ao tempo curto entre sua obtenção e uso, inviabilizando um reteste sorológico do doador. Embora esse risco seja reduzido pela seleção cuidadosa da doadora, um risco remanescente ainda existe. O congelamento do tecido permite repetição de exames para HIV e hepatite C do doador seis meses após a coleta, reduzindo, efetivamente, esse risco. Com os fragmentos congelados, mais de 30 amostras

---

podem ser preparadas a partir de uma única placenta, reduzindo o custo de preservação (26,27).

Kruse (2000) comparou MA fresca à criopreservada em glicerol a 50%. A análise histológica não mostrou significância nas alterações morfológicas após criopreservação. Entretanto, as MAs frescas continham, predominantemente, células epiteliais viáveis, que não foram encontradas nas MAs criopreservadas. Enquanto que as células epiteliais e fibroblásticas cresceram em cultura, nas MAs frescas, o crescimento não foi observado nas criopreservadas. Os resultados sugeriram que o método de preservação empregado (criopreservação) diminui, significativamente, a capacidade de proliferação e viabilidade de cultura de células. Entretanto, o curto prazo de validade, o alto risco de transmissão de doenças, o desperdício de material, entre outras, são desvantagens das MAs frescas (28).

Há um relato de caso na literatura de infecção ocular após o uso de MA não preservada, porém sem confirmação de contaminação prévia (29). Souza, em 2004, avaliou a contaminação do líquido amniótico e das MAs não preservadas, com o intuito de comprovar a segurança do uso da MA. Foi analisado o líquido amniótico e a MA no tempo zero, em 30 e 60 minutos após o parto. Demonstrou, ainda, que, mesmo envolvendo todos os cuidados assépticos, contaminação bacteriana foi evidenciada em todas as MAs. Essa contaminação não variou de forma significativa nos diferentes tempos estudados. Devido à alta prevalência da contaminação das MAs não preservadas, o autor sugere a sua irrigação com solução antibiótica (30).

No processamento utilizado neste trabalho (20), existe a imersão dos fragmentos em antibióticos e antifúngicos, o que diminuiu a chance de contaminação do tecido. A MA liofilizada, além disso, pode ser esterilizada com raios gama, o que traz maior segurança nesse tipo de processamento.

A esterilização da MA, como tecido que irá ser transplantado e, sendo assim, possível vetor de contaminação, é uma das maiores preocupações quando se pensa em meios de processamento e preservação da MA, principalmente, nos dias de hoje, quando se sabe que qualquer material biológico pode ser o carreador de agentes causadores de patologias, muitas vezes, até desconhecidos, como partículas virais, por exemplo. A MA liofilizada, por ser embalada a vácuo e, posteriormente, irradiada com raios gama, confere uma assepsia muito maior ao tecido do que a criopreservada. A ANVISA, em consulta pública número quarenta e seis que regulamenta o uso de órgão e tecidos, recomenda a maior esterilidade possível do material biológico (31).

Dias, em estudo comparando MA liofilizada e MA criopreservada em análise histológica e imunohistoquímica, não encontrou diferenças significativas entre elas (32). Nakamura, em estudo comparando propriedades físico-químicas entre MA criopreservada e liofilizada, também não encontrou diferenças estatisticamente significativas entre elas (10). Neste estudo, apesar de não se avaliarem as propriedades mecânicas das MAs, percebeu-se que o processo de liofilização tornou a MA discretamente mais fina, tornando seu manuseio um pouco mais difícil do que a criopreservada, porém sem inviabilizar o procedimento. É possível que a metodologia do processo de liofilização seja responsável por essas diferenças.

Em relação à fixação das membranas na córnea, optou-se pelo uso do adesivo de fibrina ao invés da sutura, pois a cola diminui o tempo cirúrgico, assim como previne possíveis complicações relacionadas à sutura, como rasgo da MA, granuloma, infecção e necrose tecidual (3,33). A MA liofilizada, por ser mais fina e frágil, presta-se mais ao uso da cola biológica do que de suturas.

Não existe, na literatura, um consenso em relação ao tempo de validade das membranas criopreservadas. Alguns autores sugerem validade de três meses (34,35) até dois anos (9). As MAs liofilizadas, depois de embaladas a vácuo, têm maior durabilidade, pois podem ser utilizadas até cinco anos, que é o prazo de validade da esterilização por raios gama (17). A ANVISA, em relação à regulamentação de validade, preconiza até dois anos para tecidos moles criopreservados e até cinco anos para tecidos liofilizados embalados a vácuo (31).

O presente estudo avaliou a área corneana reepitelizada por fotografias seriadas e posterior análise das mesmas com programa de computador. Além disso, foram avaliadas, histologicamente, as alterações do epitélio e de sua membrana basal, cuja integridade foi verificada pela coloração de PAS e expressão imunohistoquímica, utilizando vimentina como marcador de estroma e citoqueratina para marcar células epiteliais. Analisando os resultados, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos em nenhum dos critérios avaliados. Na análise com imunohistoquímica, foi encontrada marcação positiva com vimentina em áreas próximas ao ângulo camerular, o que pode ser explicado por ser local de inserção iriana, que contém musculatura lisa. Já no estroma, local de maior interesse, houve marcação em apenas um coelho (4 do Grupo 1). No entanto, não foram observadas alterações clínicas que pudessem justificar esse achado.

Os resultados, encontrados no presente estudo, comprovam que os dois métodos são eficientes, sugerindo que as MAs liofilizadas podem ser uma alternativa às congeladas. Poucos relatos existem, na literatura nacional e internacional, comparando as duas MAs. Os achados deste trabalho foram compatíveis com os estudos existentes atualmente (10,11,32).

Em relação à microscopia eletrônica de varredura, nesta pesquisa, os achados em relação à espessura de ambas as membranas também foram compatíveis com a literatura, sendo a liofilizada mais fina do que a congelada.

O próximo passo seria realizar um estudo comparando as duas membranas em humanos, o que, atualmente, inexiste na literatura.

Os resultados aqui obtidos sugerem que a liofilização, como método alternativo à criopreservação, não modifica a facilitação da cicatrização corneana, nem altera suas características anatomopatológicas e imunohistoquímicas. Além disso, apresenta a vantagem de tornar este tecido biológico estéril, com a possibilidade de ser armazenado em temperatura ambiente, por período maior de tempo.

Todas essas vantagens poderiam democratizar o acesso da membrana amniótica a um número maior de oftalmologistas. Acredita-se que, no futuro, quando a legislação brasileira regulamentar a obtenção, preparação e distribuição da MA nos bancos de tecidos, este processamento deva ser fortemente considerado.

## 5.5 REFERÊNCIAS

1. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940;23:522–5.
2. Fernandes M, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic Membrane Transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005 Aug; 24(6):643-53.
3. Sekiyama E, Nakamura T, Kurihara E, Copeer LJ, Fullwood NJ, Takaoka M. et al. Novel sutureless transplantation of bioadhesive-coated freeze-bried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Apr; 48(4):1528-34.
4. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, et al. Adhesion of regenerating corneal epithelium and the role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 1968;65:339-48.

5. 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 Jun; 179(3):325-35.
6. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-12.
7. Bourne G.L. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 1960;79:1070-3.
8. Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan V. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. *Cell Tissue Bank* 2004 Nov; 5:161-75.
9. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004 Jan-Feb;49(1):51-77.
10. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Shimizu Y, Kinoshita S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:93-9.
11. Libera RD, Melo GB, Lima AS, Haapalainen EF, Cristovam P, Gomes JAP. Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (A.M) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. *Arq Br Oftalmol* 2008; 71(5):669-73.
12. Kim JY, Choi YM, Jeong SW, Williams DL. Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BA) on uncomplicated canine corneal erosion. *Vet Ophthalmol* 2009 Jan-Feb;12(1):36-42.
13. Jang IK, Ahn JI, Shin JS., Kwon YS, Ryu YH, Lee Jk et al. Transplantation of reconstructed corneal layer composed of corneal epithelium and fibroblasts on a lyophilized amniotic membrane to severely alkali-burned cornea. *Artif Organs* 2006 Jun; 30(6):424-31.
14. Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S. Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 2006 Jun; 84(3):401-5.
15. Koh JW, Shin YJ, Oh Jy, Kim MK, Ko JH, Hwang JM. The expression of TIMPs in cryo-preserved and freeze-dried amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2007, Jul-Aug; 32(7-8):611-16.
16. Djefal A, Tahtat D, Khodja AN, Bouzid SS, Remane NI. Validation and substantiation of 25 Kgy as sterilization dose for lyophilized human amnion membrane. *Cell Tissue Bank* 2007; 8(1):9-12.
17. Hilmy N, Febrida A, Basril A. validation of radiation sterilization dose for lyophilized amnion and bone grafts. *Cell Tissue Bank* 2000 June1;(2):143-8.

18. Prince JH, Diesen CD, Eglitis I. The Rabbit. In: Prince JH, Diesen CD, Eglitis I. Anatomy and histology of the eye and orbit in domestic animals. Springfield: Charles Thomas; 1960: p. 260-301.
19. Marinho D, Hofling-Lima AL, Kwitko S, Tseng SCG. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation Cornea 2003 Jun; 22(4):338-42.
20. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 1995 Sep 14; (5):473-84.
21. Solomon A, Meller D, Prabhasawat PI. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocoeles and deep ulcers. Ophthalmology 2002; 109:694-703.
22. Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. Br J Ophthalmol 2001 Dec; 85(12):1455-63.
23. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur J Pharm Biopharm 1998; 45:221-9.
24. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in Ophthalmology. Surv Ophthalmol 2004 Jan-Feb; 49(1):51-77.
25. Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. Cell Tissue Bank 2004; 5:73-80.
26. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JKG. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. Br J Ophthalmol. 2001; 85:905-7.
27. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. Br J Ophthalmol 1999; 83:748-52.
28. Kruse FE, Jousseaume 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 Jan. 238(1):68-75.
29. Khokhar S, Sharma N, Kumar H, Soni A. Infection after use of nonpreserved human amniotic membrane for reconstruction of the ocular surface. Cornea 2001; 20:773-4.
30. Souza CEB, Engel DP, Branco BC, Hofling-Lima AL, Freitas D, Gomes JAP, Souza LB. Avaliação da contaminação microbiana da membrana amniótica e líquido amniótico. Arq Bras Oftalmol 2004; 67:709-12.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RDC nº 46 de 18 de maio de 2000. Normatiza os processos de produção e Controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano.



32. Dias, Ana Beatriz Toledo. Liofilização como alternativa à preservação de membrana amniótica para uso oftalmológico. Avaliação histológica e imuno-histoquímica. 2007. Tese (Doutorado em Ciências visuais) - Universidade Federal de São Paulo.
33. Szurman P, Warga M, Grisanti S, Roters S, Rohbac HJ, Aisembry S. et al. Sutureless amniotic membrane fixation using fibrin glue for ocular surface reconstruction in a rabbit model. *Cornea* 2006 May; 25(4):460-5.
34. Chuck RS, Graff JM, Bryant MR, Sweet PM. Biomechanical Characterization of Human Amniotic Membrane Preparations for Ocular Surface Reconstruction. *Ophthalmic Res* 2004; 36:341-8.
35. Maharajan VS, Shanmuganathan V, Currie A, Hopkinson A, Powell-Richards A, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: indications and outcomes. *Clin Exper Ophthalmol* 2007; 35:140-7.

## 6 ARTIGO EM INGLÊS

### COMPARISON BETWEEN CRYOPRESERVED AND FREEZE-DRIED AMNIOTIC MEMBRANE TRANSPLANTATION FOR CORNEAL EPITHELIAL DEFECTS IN RABBITS

#### ABSTRACT

**Objective:** To compare the effectiveness of cryopreserved and freeze-dried (lyophilized) amniotic membrane transplantation (AM) in corneal epithelial defects in rabbits.

**Study design:** Interventional experimental study.

**Methods:** Twenty-six eyes of 26 rabbits were submitted to a 7mm diameter epithelial defect and subsequently covered with human AM fixed with fibrin glue. The animals were randomized into 2 groups with 13 rabbits each, Group 1 received cryopreserved AM, while group 2 received sterilized lyophilized AM. The following criteria were evaluated: rate of corneal reepithelialization by serial photographs on the first, fourth and seventh day postoperatively. After the animals were sacrificed, anatomopathological and immunohistochemical study of the corneas were done. A sample of each kind of AM was analysed by scanning electron microscopy for comparison.

**Results:** In each group, corneal reepithelialization rate was significantly higher between the first and seventh day postoperatively ( $p < 0.001$ ). There was no statistically significant difference between the groups ( $p = 0.867$ ). Regarding to

anatomopathological analysis, there was no significant difference between autolysis and epithelial vacuolization among the groups ( $p=0.064$  and  $p=0.204$ , respectively). As to basement membrane integrity, when seen with PAS, all the samples were classified as 2 (basement membrane preserved). Immunohistochemistry showed a positive staining for cytokeratin in all eyes in both groups. Electron microscopy revealed that cryopreserved AM is thicker than the freeze-dried one.

**Conclusion:** Freeze-dried AM is as effective as the cryopreserved AM in treating deepithelialized corneas in rabbits. Anatomopathological and immunohistochemical exams showed similar results in both groups. Lyophilization should be considered as an alternative method of AM preservation because has the advantage of easy storage for a longer period of time, and the safety of a sterilized biomaterial.

**Key-words:** amniotic membrane transplantation, cryopreservation, lyophilization, freeze-drying, cornea, rabbits.

## 6.1 INTRODUCTION

The amniotic membrane (AM) was initially used in ophthalmology by Roth, in 1940, for the reconstruction of the ocular surface in a case of symblepharon (1). Ever since it was re-introduced in ophthalmology by Kim and Tseng in 1995, it has been used in several ocular surface diseases, such as trophic ulcers, bullous keratopathy, persistent epithelial defects, and others (2). Success in using this biological tissue may be explained by its anti-inflammatory, antifibroblastic and anti-angiogenic properties. (3).

The amniotic membrane is the innermost layer of the placenta and it is composed by the chorion on the outside, and by amnion,, on the inside. Histologically, it consists basically of three layers: epithelial cells, basal membrane and stroma.

The epithelial cell layer is uniformly placed over the basement membrane. It is different from the ocular surface epithelium due to the presence of a large number of surface microvillousities. The cryopreservation technique tends to devitalize these cells, leaving the basement membrane and the stroma intact.

The basement membrane is thick – one of the thickest found in human tissues – and it is composed by type IV and VII collagens, which are also present in the corneal epithelium, type I, II, III and V collagens, elastin, fibronectin and several other integrins. The basement membrane is known for promoting epithelial migration, adhesion and differentiation, reducing cell apoptosis (4,5). Histologically, the basement membrane is more like the conjunctiva. It is an ideal substrate for the growth of corneal epithelial stem cells, because it prolongs cell life and maintains its clonogenicity, which would explain why the reepithelialization occurs easily (6). The

basement membrane is strongly adhered to the epithelium by multiple interdigital processes (7).

The stromal matrix is rich in fetal hyaluronic acid which suppresses cell proliferation because it changes the regulation of TGF-beta, diminishing fibrosis by inhibiting myofibroblast proliferation and differentiation. This explains why the amniotic membrane reduces the healing process, during the construction of the ocular surface, preventing leukomas after removal of pterygia, or reducing corneal haze after refractive surgery (8). The stroma also suppresses the expression of certain inflammatory cytokines which originate in the ocular surface epithelium, including interleukin 1, alpha 1, 1-beta, interleukins 2 and 8, interferon and tumor necrosis factor. The suppression of inflammation is the key element in preventing conjunctival healing, neovascularization and fibrosis.

The cryopreserved AM is currently the most widely used in ophthalmological surgeries, and many papers have already been published on the use of this tissue. Although this method is widely used and is part of the ophthalmologists' therapeutic armamentarium, it presents the inconvenience of needing a special -80° freezer for the tissue storage. Moreover, it must be transported for the shortest time at 4°C until it is used. The maximum time by which cryopreserved AM can be used is two years (9). Another potential problem is the possibility of contamination, since tissues processed this way cannot be sterilized.

Lyophilization appears as an alternative preservation method in which the membrane can be stored for a longer time at room temperature making it easier to distribute and transport, at a reduced cost, and AM may become easier for more surgeons to obtain, especially in developing countries. The possibility of sterilization

of the lyophilized membrane with gamma radiation likewise provides greater biological safety to prevent possible infections in the recipient (1,10).

Few studies in the literature have used lyophilized AM, but all of them showed encouraging results (11-15).

The purpose of this study is to compare cryopreserved vs lyophilized AM in healing epithelial defects in rabbits.

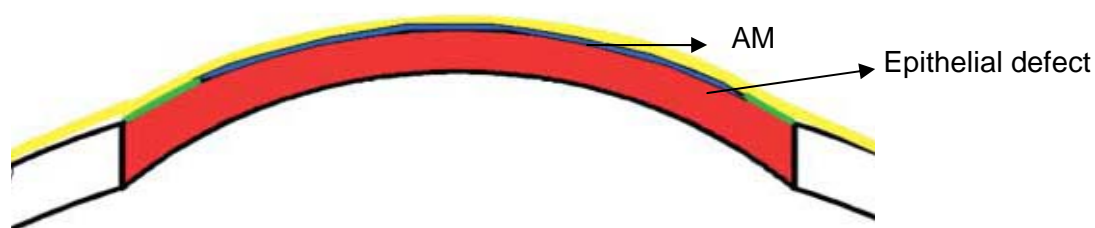
## **6.2 MATERIALS AND METHODS**

This experimental study followed the standards approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for animal surgery. Twenty-six eyes of 26 *oryctolagus cuniculus* rabbits of the New Zealand strain were used. They were albino, male, aged four to six months, weight 2500 to 3500 grams. The animals were kept in individual cages at the Center for Animal Experiments (CEA- Centro de Experimentação Animal), at the HCPA Research Center, treated with standardized chow and water *ad libitum*, and also followed by veterinaries. They remained in the animal experimental unit for a seven-day period before the surgeries, in order to acclimatize them and also to serve as an isolation period against possible diseases.

For the procedures, all animals received intramuscular general anesthesia with Xylazine and Ketamine, 1 ml of each, before surgical manipulation. Topical anesthesia (Anestalcon® eyedrops) was also used to reduce painful stimulus.

After the anesthesia, one eye of each rabbit was submitted to trephine-guided manual deepithelialization, about 7 mm in diameter. Immediately after, the epithelial

defect was covered by human amniotic membrane (trephined 0.5 mm larger), placed over the cornea with the epithelial side upwards (Figure 1). The fixation of the membrane to the cornea was performed with fibrin glue (Beriplast<sup>®</sup>). Then a therapeutic contact lens was placed on the cornea, which was removed on the first day postoperatively. The whole procedure was performed under sterile conditions and with a surgical microscope. The procedure was documented by a video attached to the microscopy in the VHS system.



**Figure 1:** Illustration of how AM is placed over the corneal epithelial defect.

The rabbits were randomized into two groups of 13 rabbits each. The eyes in group 1 were transplanted with human cryopreserved amniotic membrane and the eyes in group 2 were transplanted with lyophilized human amniotic membrane that was hydrated with BSS solution at the time of the procedure.

Immediately after the procedure, all the rabbits received systemic analgesia with sodium dipyrone (0.5 mL) and they were treated with dexamethazone and tobramycin eyedrops twice a day for seven days. The rabbits were followed with external examinations and photographs on the first, fourth and seventh day postoperatively. At each review, the animals were examined using anesthetic

eyedrops and fluorescein eyedrops to look at the reepithelialized corneal area and to photograph the corneas. All therapeutic contact lenses were removed on the first day postoperatively'. On the seventh postoperative day the rabbits were euthanized, and for this purpose systemic anesthesia was used at the same dosages cited before, followed by a 3 ml intracardiac injection of lidocaine. The eyes were then enucleated, and the corneas were preserved in a sterile environment using the same technique and instruments as in humans. After this the material was cut into sections and the slides were stained appropriately for anatomopathological and immunohistochemical examination.

### **6.2.1 Preparation and preservation of the human amniotic membrane**

#### **a) Frozen at -80°C (Group 1)**

The preparation and preservation of AM followed the protocol of Kim and Tseng, proposed in 1995. The placenta was obtained by elective cesarean from a patient in the Obstetrics and Gynaecology Service of HCPA, after they signed a letter of consent. (Annex A), according to the Helsinki Declaration. The pregnant woman who donated the placenta was tested serologically and was negative for syphilis, AIDS, hepatitis B and C.

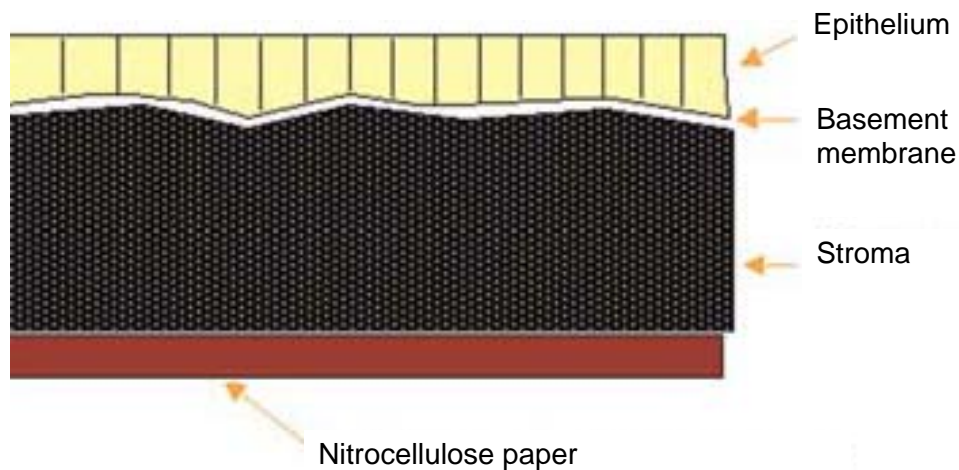
In a sterile environment and with aseptic conditions, the placenta was washed several times, initially with saline solution to remove most of the clots, and, then with a solution containing penicillin, streptomycin and amphotericin-B. The amnion was separated from the chorion by dissection, on the existing cleavage plane, with the help of cellulose sponges, leaving a debris-free transparent membrane. Pieces of



nitrocellulose paper measuring approximately 4x3 cm were adhered to the chorionic side of the membrane, and the borders of the membrane were cut with a 15 scalpel blade. The ensemble of paper and membrane was immersed in a solution containing antibiotics and amphoterycin B before being placed in sterile flasks containing glycerol and modified Dulbecco medium (culture medium for tissues obtained by *Life Technologies*®), at a ratio of 1:1 and stored at -80°C. The membranes were used after being preserved for six months (after the negative serology tests that were repeated in the donor patient).

#### **b) Lyophilized AM (Group 2)**

The placenta was obtained in the same way described in group 1. Cellulose paper was not used for these membranes, since the 4x3 cm fragments were placed directly in sterile flasks containing distilled water. Immediately after this, these tissues were removed from the flasks, placed on a glass platform and submitted to lyophilization in a an Edwards Lyophilizer, model MODYLIO, 99608 (with camera, a condenser in 304L steel, two hermetic compressors with a minimum temperature of -70°C, for 24 hours) After lyophilization, the tissues were vacuum packed and sterilized with gamma radiation at a dose of 24 kGy, according to the dose advocated for amnion sterilization (16,17). Thirty minutes before surgery, the package was opened and the membranes were hydrated in a balanced salt solution (BSS).



**Figure 2:** Histological representation of AM in nitrocellulose paper

### 6.2.2 Surgical technique

All the surgical procedures were performed by two surgeons (a Masters student and an advisor), using a surgical microscope (DF Vasconcellos<sup>®</sup>, BR), with appropriate instruments and aseptic techniques. General anesthesia was used as previously described. All exams in the postoperative period, with an analysis of the cornea under the microscope using fluorescein and photographs, were performed by the Masters student and documented by a professional photographer.

### 6.2.3 Evaluated criteria

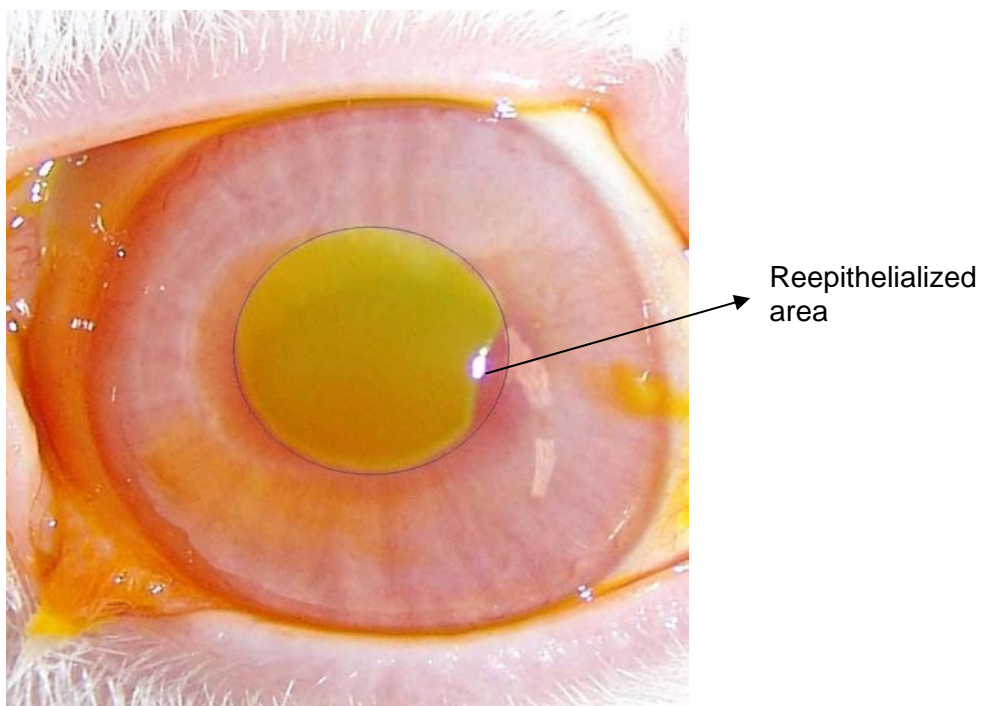
#### 6.2.3.1 Corneal reepithelialization rate

The healing rate was evaluated in days, until the complete epithelialization of the cornea. External images were obtained through photographs taken on the first,

fourth and seventh day postoperatively (days 1, 4 and 7), using fluorescein eye drops (Figure 3). Later, with the digital images of the corneas, the reepithelialized area was measured using a computational program and then AutoCAD software was used to calculate the percentages of epithelialized area (Figure 4).



**Figure 3:** External image of the rabbit cornea obtained for the photographs.



**Figure 4:** Image of the epithelialized area that was calculated in AutoCad

### 6.2.3.2 Anatomopathological exam

Anatomopathological studies of the corneas were performed with the cryopreserved and freeze-dried membranes for comparison purposes. The corneas were fixed in formalin, buffered at 10%, and included in paraffin to be cut in a Zeiss tx-40. The sections in paraffin were submitted to routine methods with hematoxylin-eosin (HE) and period acid- Schiff (for PAS). Tables 1 and 2 show how analysis of the basement membrane was performed by PAS, the degree of epithelial vacuolization and the degree of autolysis by HE with optical microscopy.

**Table 1:** Anatomopathological grading for autolysis and epithelial vacuolization

For slides stained with HE	Grade	Description
Autolysis (AUT)	0	Absence of autolysis
	1	Discrete autolysis
	2	Moderate autolysis
	3	Intense Autolysis (AUT)
Epithelial vacuolization (EV)	0	Absence of epithelial vacuolization
	1	Discrete epithelial vacuolization
	2	Moderate epithelial vacuolization
	3	Intense epithelial vacuolization

**Table 2:** Anatomopathological grading for basement membrane integrity

For slides stained with PAS	Grade	Description
Basal membrane Integrity (BMI)	0	Absence of basement membrane
	1	Basement membrane with defects
	2	Basement membrane without defects

### 6.2.3.3 Immunohistochemistry analysis

Immunohistochemical analysis was performed in the Pathology Department of the Veterinary School of UFRGS using the indirect method of the streptavidin-biotin-peroxidase complex for cytokeratins, and alkaline phosphatase streptavidin-biotin for cytokeratins and streptavidin-biotinphosphatase for vimentin. The following antibodies were used to search and locate the antigens:

- a) mouse monoclonal antibody of human antivimentin diluted 1:200 (Zimed) – as a marker of mesenchymal tissue;
- b) rabbit polyclonal antibody of primary anticytokeratin diluted 1:200 (Dako) – as a marker of epithelial tissue.

Table 3 shows how the samples were classified:

**Table 3:** Classification of immunohistochemical analysis

IHC Expression	Grade	Description
For the antibodies studied	0	When no cell presented a reaction to the marker
	1	Less than 50% of the cells presented a positive reaction to the marker
	2	50% or more cells presented a positive reaction to the marker
	3	100% of the cells presented a positive reaction to the marker

Cytokeratin was used in order to mark epithelial cells present in the corneal epithelium. Vimentin is a marker of mesenchymal cells. These cells are usually not present in the corneal tissue and their presence may indicate an inflammatory reaction or fibroses because it induces conjunctivalization.

#### 6.2.3.4 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was performed on two samples of amniotic membrane, one freeze-dried and the other cryopreserved for illustrative morphological analysis.

The samples collected were stored individually and kept immersed in a glutaraldehyde 2.5% solution with sodium cacodylate 0.1 buffer at a 7.4 pH for eight hours, at a temperature of 4°C and room temperature for seven days.

The samples were prepared and analyzed at the Electron Microscopy Center (CME-Centro de Microscopia Eletrônica ) at UFRGS.

After the samples were fixed, they were washed again in a buffer solution of sodium cacodylate and dehydrated at increasing concentrations of ethylic alcohol (30,50,70,85,90,95 and 100%) and acetone PA (100%), and kept in each concentration solutions for 15 minutes. This protocol was repeated three times at a concentration of 100%.

Then, they were immediately dried utilizing a critical point drier with liquid carbon dioxide. They were fixed in a sample holder with a conductive tape of carbon glue and metalized, using a metalizer with a 35-nm thick layer of gold and palladium, in an ion sputter coater, for two minutes. Next, each sample was evaluated under the scanning electron microscope operated with 15 kv. Three electromicrographs of surface scanning, with 35 to 55 magnifications of the peri-incisional region of the amniotic membrane were obtained from each sample. Occasionally, images were obtained at other magnifications. The images were recorded on a digital file

#### 6.2.4 Study design and statistical analysis

An interventional experimental study was performed. The results of the re-epithelialization rate were analyzed quantitatively, using the Student t test, and ANOVA was used for repeated means (p of time – to evaluate whether a change has occurred over time within the group, p of interaction - to evaluate variation over time between the groups, and p of group – to evaluate the mean in the three days of examination). In descriptive analysis, mean, median, standard deviation, minimum and maximum values, and percentiles were used. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant and there was a confidence interval of 95%. For the groups analysis as to the histological parameters, the Mann-Whitney test was used (for non-parametric samples). The statistical program SPSS was used to analyze all data.

#### 6.3 RESULTS

Both the lyophilized and the cryopreserved membrane were easy to handle after they were hydrated. The lyophilized AM was a bit thinner than the cryopreserved one. All the grafts maintained their integrity postoperatively. The contact lens fell out before the first examination was performed in ten rabbits, four from group 1 and six from group 2. No case of infectious keratitis occurred. ,

### 6.3.1 Corneal reepithelialization rate

In group 1 (cryopreserved AM) all the rabbits had their corneas completely reepithelialized on the last day of postoperative examination, while in group 2 (lyophilized AM), twelve of the thirteen rabbits had their corneas completely reepithelialized on the last day of postoperative examination. An example of one eye fromf each group on the different postoperative days can be seen in Figures 5 and 6.



**Figure 5:** Deepithelialized area marked with an AutoCAD program for calculation - rabbit 1 from Group 1 on the first (A) ,fourth (B) and seventh (C) days postoperatively.



**Figure 6:** Deepithelialized area marked with an AutoCAD program for calculation - rabbit 6 from Group 2 on the first (A) ,fourth (B) and seventh (C) days postoperatively



The mean ( $\pm$ sd) and the median of reepithelialization rate in Group 1, on the first day of postoperative examination, were 67.6% ( $\pm$ 9.70) and 66.9%; on the fourth day postoperatively, 96.9% ( $\pm$  5.3) and 100%; and, on the seventh day postoperatively, 100% with a standard deviation of 0 and median of 100%.

In Group 2, the mean reepithelialization rate on the first day, was 65.8% ( $\pm$ 12.8), with a median of 66%; on the fourth day it was 96.6% ( $\pm$ 8.9) and a median of 100% and, on the seventh day postoperatively, 99.8% ( $\pm$ 0.5) and median of 100%.

More details of the results are shown in Tables 4 and 5.

#### a) Group 1 (cryopreserved AM)

**Table 4:** Results of measurements of central tendency and dispersion of Group 1

	Day 1	Day 4	Day 7
N	13	13	13
Mean	67.5677	96.8692	100.0000
Median	66.8700	100.0000	100.0000
Standard deviation	9.69552	5.35977	.00000
Minimum	51.12	82.56	100.00
Maximum	82.02	100.00	100.00
Percentiles			
25	60.3500	94.6850	100.0000
75	77.7200	100.0000	100.0000

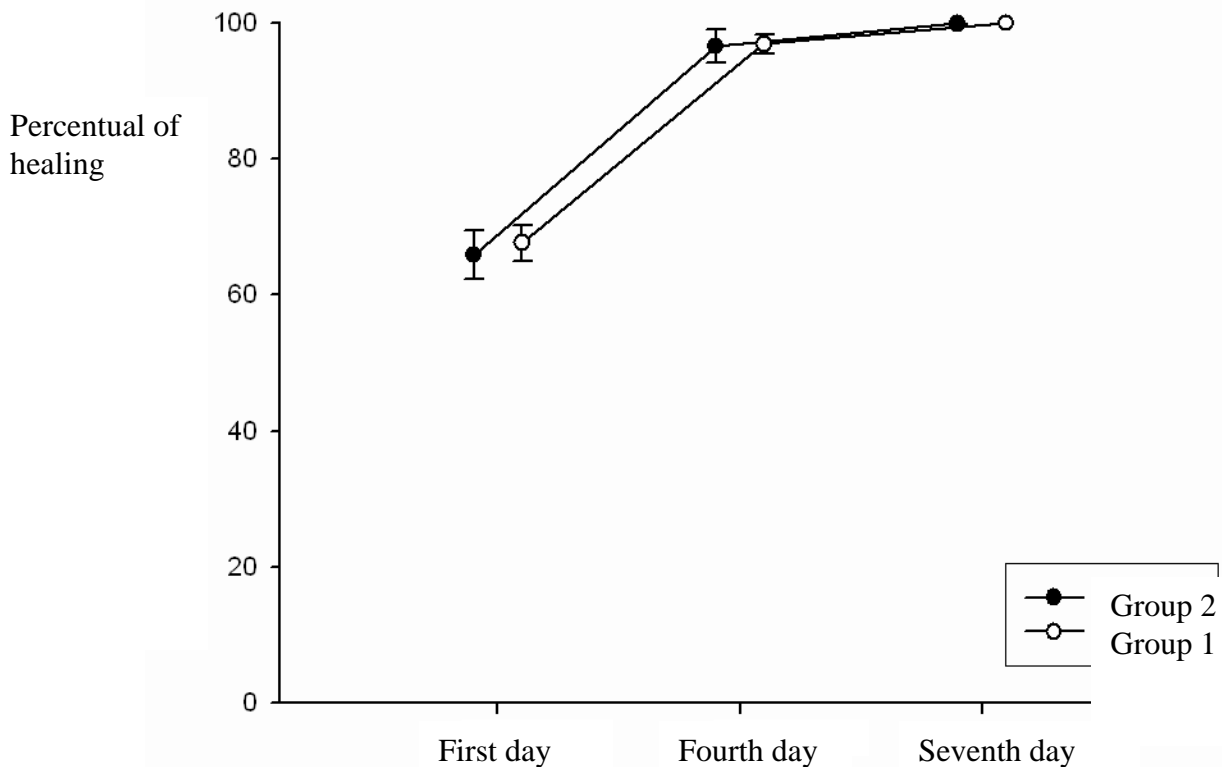
#### b) Grupo 2 (Lyophilized AM)

**Table 5:** Results of measurements of central tendency and dispersion of group 2

	Day 1	Day 4	Day 7
N	13	13	13
Mean	65.8700	96.6362	99.8585
Median	65.9600	100.0000	100.0000
Standard deviation	12.78203	8.89016	.51032
Mínimum	37.32	69.55	98.16
Maximum	83.60	100.00	100.00
Percentiles			
25	57.3550	99.8450	100.0000
75	77.6100	100.0000	100.0000

In each group the percentage of corneal reepithelialization was significantly higher between the first and seventh day postoperatively ( $p < 0.001$ ). There was no statistically significant difference between the groups ( $p = 0.867$ ), nor between the postoperative days when analyzed against each other – mean of the three moments ( $p = 0.726$ ).

The comparative distribution of the means and standard deviations of corneal reepithelialization between the groups is shown in the following graph (Figure 7).



**Figure 7:** Graph of the comparative distribution of means and standard deviations in the two groups.

### 6.3.2 Anatomopathological exams

The findings of the HE and PAS anatomopathological exams of the two groups are described in Tables 6 and 7.

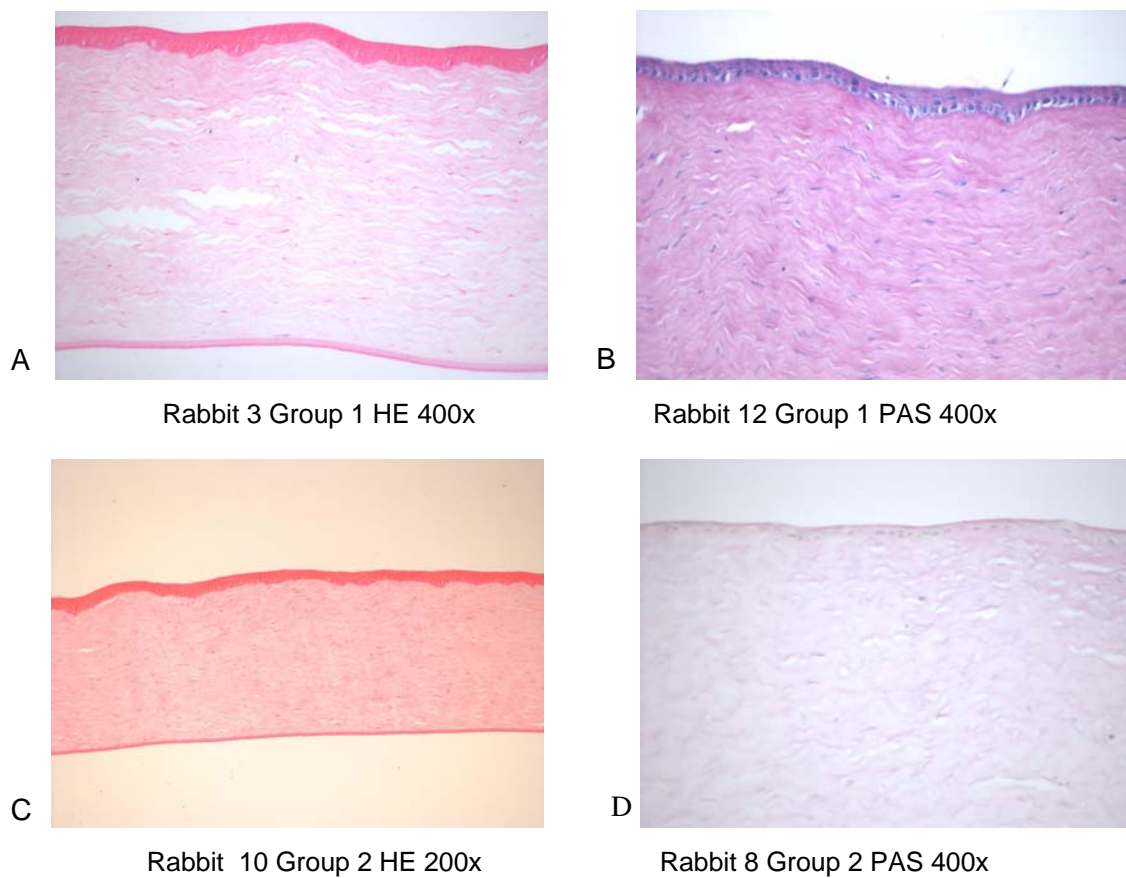
**Table 6:** Results for the histopathological analysis of Group 1 (cryopreserved) according to grading.

Animal	Epithelial vacuolization (0-3)	Autolysis (0-3)	Inner Membran (0-2)
Rabbit 1	0	0	2
Rabbit 2	0	0	2
Rabbit 3	1	1	2
Rabbit 4	1	0	2
Rabbit 5	1	2	2
Rabbit 6	3	2	2
Rabbit 7	3	0	2
Rabbit 8	1	2	2
Rabbit 9	1	0	2
Rabbit 10	2	2	2
Rabbit 11	1	2	2
Rabbit 12	0	0	2
Rabbit 13	2	2	2

**Table 7:** Results for the histopathological analysis of Group 2 (lyophilized) according to grading

Animal	Epithelial Vacuolization (0-3)	Autolysis (0-3)	Inner Membrane (0-2)
Rabbit1	1	0	2
Rabbit 2	1	1	2
Rabbit 3	1	3	2
Rabbit 4	2	2	2
Rabbit 5	2	1	2
Rabbit 6	1	1	2
Rabbit 7	1	3	2
Rabbit 8	2	3	2
Rabbit 9	1	3	2
Rabbit 10	2	1	2
Rabbit 11	3	2	2
Rabbit 12	2	2	2
Rabbit 13	3	2	2

In rabbits 4 6 and 8 from Group 1 (cryopreserved) the proliferation of corneal epithelium was seen. Comparing them, no significant difference was found between autolysis and epithelial vacuolization between the groups ( $p=0.064$  and  $p=0.204$ , respectively). As to the basal membrane integrity, when seen under PAS, all the samples were classified as 2 (integral basal membrane) (Figure 8).



**Figure 8:** Examples of histological sections of rabbits from Group 1, with HE stain (A) and PAS (B), and of rabbits from Group 2 with HE(C) stain and PAS (D).

### 6.3.3 Immunohistochemistry

Analysis with cytokeratin and vimentin antibodies for the two groups is described in Table 8 and 9.

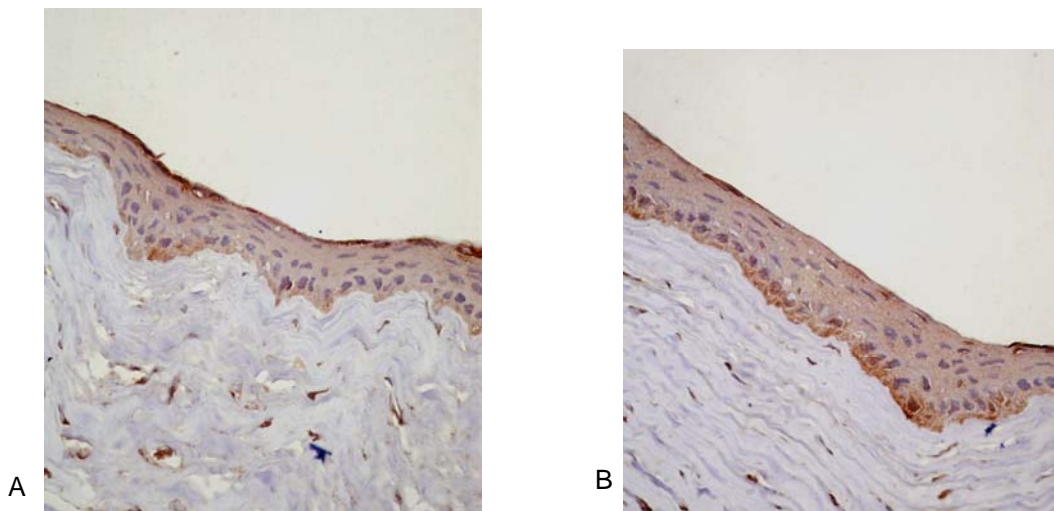
**Table 8:** Grading for the presence of a positive staining in Group 1 (cryopreserved)

<b>Animal</b>	<b>Cytokeratin IHC</b>	<b>Vimentin IHC</b>
Rabbit 1	2	1
Rabbit 2	2	1
Rabbit 3	2	1
Rabbit 4	2	2
Rabbit 5	2	1
Rabbit 6	2	1
Rabbit 7	2	1
Rabbit 8	2	1
Rabbit 9	2	1
Rabbit 10	2	1
Rabbit 11	2	1
Rabbit 12	2	1
Rabbit 13	2	1

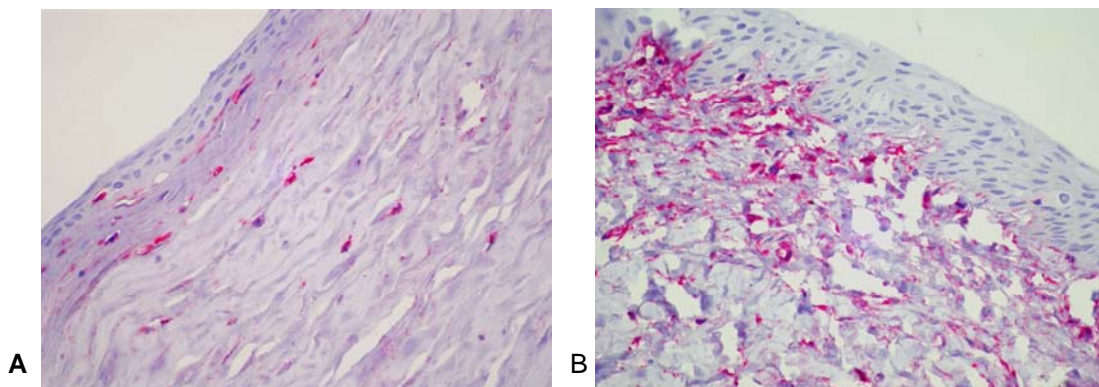
**Table 9:** Grading for the presence of a positive staining in Group 2 (lyophilized)

<b>Animal</b>	<b>Cytokeratin IHC</b>	<b>Vimentin IHC</b>
Rabbit 1	2	1
Rabbit 2	2	1
Rabbit 3	2	1
Rabbit 4	2	1
Rabbit 5	2	1
Rabbit 6	2	1
Rabbit 7	2	1
Rabbit 8	2	1
Rabbit 9	2	1
Rabbit 10	2	1
Rabbit 11	2	1
Rabbit 12	2	1
Rabbit 13	2	1

In rabbit 4 from Group 1 (cryopreserved), there was a positive staining for vimentin in the middle of the corneal stroma (Figure 9 and 19). Clinically, however, no difference was observed in the healing rate.



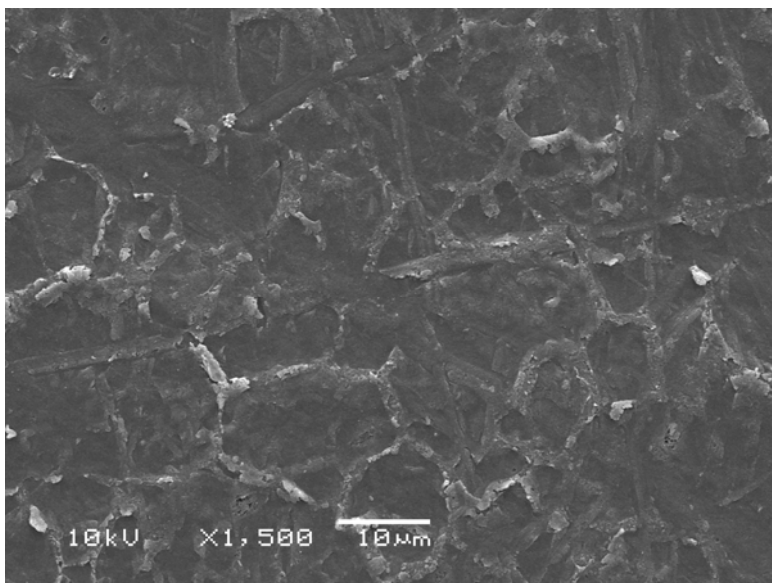
**Figures 9 A and B:** Examples of cyokeratin positive stainings (brownish color) observed in the corneal epithelium of rabbit 6 from Group 1 (A) and of rabbit 5 from Group 2 (B)



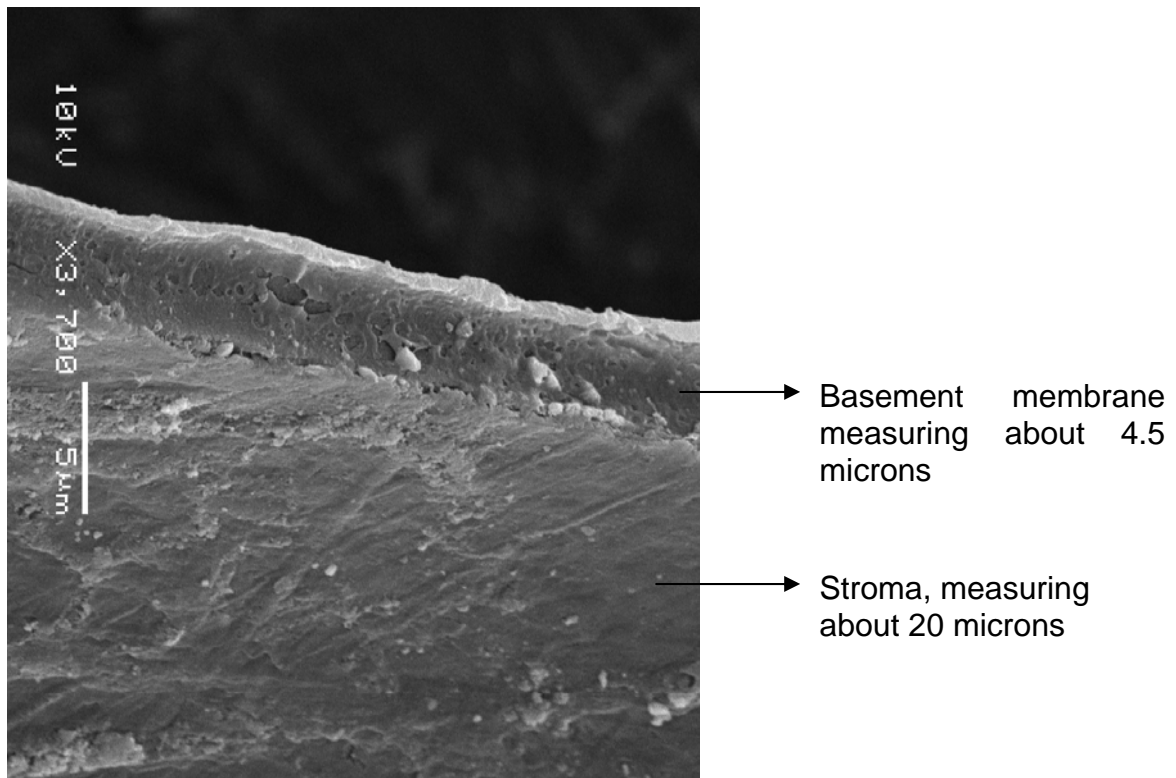
**Figures 10 A and B:** Examples of positive vimentin staining (reddish color) observed in the region close to the conjunctiva, connective tissue and muscle fibers of the ciliary body in the corneas of rabbit 4 from Group 2 (A) and of rabbit 4 from Group 1 (B).

### 6.3.4 Scanning electron microscopy

The ultrastructural analysis by scanning electron microscopy showed the absence of the amniotic membrane epithelium in both samples. The preservation of basement membrane, with a homogeneous and continuous characteristic, also occurred in both membranes (lyophilized and cryopreserved). The chorionic side showed a typical appearance of collagen fibers in the two membranes (Figure 11). As to thickness, the lyophilized membrane was thinner, on average 25 microns (Figure 12), while the cryopreserved one measured around 35 microns.



**Figure 11:** Chorionic surface of cryopreserved amniotic membrane



**Figure 12:** Lateral view of lyophilized amniotic membrane .

#### 6.4 DISCUSSION

Rabbits were used as an experimental model due to the anatomical similarity between their corneas and the human cornea (18). Except for Bowman's membrane, which does not exist in rabbit cornea, the other structures are very similar to those of the human cornea.

Thus, like several authors (5,10,13,14,19-22), in this study human AM was used in rabbits, which characterizes a xenograft, because it has been described that AM does not present any immunogenicity.

The AM transplantation is often used in ophthalmology, since it presents unique properties that are extremely useful to treat several diseases of the ocular



surface. However, there are also some problems related to the processing and distribution of this biological tissue, which limit its use. Lack of Brazilian legislation regulating its use, dependence on donations and availability of tissue banks that make it difficult to obtain and distribute the material, limit its use to few research centers in Brazil (23-25).

The fact that cryopreservation requires a  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer makes this preservation method expensive and unfeasible for many centers, because of the cost of equipment and also because of high energy consumption, particularly in developing countries.

Another factor to be considered is the constant energy swings in these countries which may make it necessary to rule out the use of the grafts due to their loss of viability (10).

The use of fresh AM, or AM that has been kept in a refrigerator at  $4^{\circ}\text{C}$  presents disadvantages such as the short validity period, so that part of the material available is ruled out because it is considered improper for use (26).

The most serious problem in fresh AM however is the lack of biological safety. In this type of preservation, there is a high risk of transmitting diseases due to the short time between obtaining it and using it, making it impossible to test the donor serologically. Although this risk is small due to the careful selection of the donor, a risk still remains. Freezing the tissue allows repeating tests for HIV and hepatitis in the donor, six months after collecting the tissue, effectively reducing this risk. With the frozen fragments, more than 30 samples can be prepared from a single placenta, reducing the cost of preservation (26,27).

Kruse (2000) compared fresh AM to the one cryopreserved in glycerol 50%. The histological analysis did not show significance in the morphological changes

after cryopreservation. However, the fresh AMs contained predominantly viable epithelial cells that were not found in the cryopreserved AMs. While the epithelial and fibroblastic cells grew in culture in the fresh AMs, no growth was observed in the cryopreserved ones. The results suggested that the preservation method used (cryopreservation) significantly diminishes the proliferation capacity and viability of cell cultures. However, the short validity period, the high risk of diseases transmission, the waste of material, among others, are disadvantages of the fresh AMs (28).

There are case reports in the literature, of ocular infection after using non-preserved AM, but there is no confirmation of previous contamination (29). Souza, in 2004, evaluated contamination of the amniotic liquid and the non-preserved AMs to prove the safety of AM use. The amniotic liquid and AM were analyzed at time zero, 30 and 60 minutes after childbirth. He also demonstrated that, even with complete asepsis, bacterial contamination was shown in all AMs. This contamination did not vary significantly at the different times studied. Due to the high prevalence of contamination of the non-preserved AMs, the author suggests that they be irrigated with antibiotic solution (30).

In the processing used in this study (20), the fragments were immersed in antibiotics and antifungal agents, which diminished the chance of tissue contamination. The lyophilized AM, furthermore, can be sterilized with gamma rays, increasing the safety of this process.

The AM sterilization, as a tissue that is to be transplanted, and thus a possible vector of contamination, is one of the main concerns when one thinks about means to process and preserve AM, especially at this time, when it is known that any biological material can carry agents causing pathologies, which are often even unknown, such as viral particles, for instance. Lyophilized AM, being vacuum

packaged and later irradiated with gamma rays, provides the tissue with much greater asepsis than the cryopreserved one. ANVISA, in public consultation number 46, which regulates the use of organs and tissues, recommends the greatest possible sterility of the biological material (31).

Dias, in a study comparing lyophilized and cryopreserved AM in a histological and immunohistochemical analysis, did not find a significant difference between them (32). Nakamura, in a comparative study comparing physicochemical properties between cryopreserved and lyophilized AM also did not find statistically significant differences (10).

Although the mechanical properties of AMs were not evaluated in this study, it was perceived that the lyophilization process made the AM slightly thinner, and a bit more difficult to handle than the cryopreserved one, but not making it impossible to perform the procedure. It is possible that the methodology of the lyophilization process is responsible for these differences.

Concerning the fixation of membranes on the cornea, it was decided to use fibrin glue instead of sutures, since glue reduces surgical time and also prevents possible complications involving the suture, such as a tear in the AM, infection and tissue necrosis (3,33). The lyophilized AM, being thinner and more fragile, is more appropriate for biological glue use than for sutures.

There is no literature consensus about the time of validity of the cryopreserved membranes. A few authors suggest a validity of three months (34, 35) to two years (9). After vacuum packaging, the lyophilized AMs last longer, since they can be used in up to five years, which is the validity period of gamma ray sterilization (17). Concerning validity regulations, ANVISA advocates up to two years for

cryopreserved soft tissues and up to five years for vacuum packaged lyophilized tissues (31).

The present study evaluated the reepithelialized corneal area using serial photographs and later analyzing them using a computer program. Besides, the change in epithelium and their basement membrane were evaluated. The basement membrane integrity was verified by PAS stain and immunohistochemical staining, using vimentin as a stromal marker and cytokeratin to mark epithelial cells. Analyzing the results, no significant differences were found between the two groups in any of the criteria evaluated. In the histochemical analysis, a positive staining with vimentin was found in areas close to the camerular angle, which can be explained by the fact that it is the site of iris insertion which contains smooth muscles. On the other hand, in the stroma, the site of greatest interest, there was a staining in only one rabbit (4 from Group 1). However, no clinical changes were found that could justify this finding.

The results found in this study prove that both methods are efficient, suggesting that the lyophilized AMs can be an alternative to the frozen ones. There are few reports in the national and international literature comparing the two AMs. The findings of this paper were compatible with the currently existing studies. (10,11,32).

As to the scanning electron microscopy in this research, the finding about the thickness of both membranes were also compatible with the literature, the lyophilized one being thinner than the frozen one.

The next step would be to perform a study comparing the two membranes in humans, which currently does not exist in the literature.

The results obtained here suggest that lyophilization as an alternative method to cryopreservation, does not make a difference in corneal healing, nor does it

change its anatomopathological and immunohistochemical characteristics. Besides, it has the advantage of making this biological tissue sterile, with a possibility of storing for a longer time at room temperature.

All these advantages could create a more democratic access, allowing more ophthalmologists to use the amniotic membrane. It is believed that in future, when the Brazilian legislation regulates the obtaining, preparation and distribution of AM in the tissue banks, this processing should be strongly considered.

## 6.5 REFERENCES

1. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940;23:522–5.
2. Fernandes M, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic Membrane Transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005 Aug; 24(6):643-53.
3. Sekiyama E, Nakamura T, Kurihara E, Copeer LJ, Fullwood NJ, Takaoka M. et al. Novel sutureless transplantation of bioadhesive-coated freeze-bried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Apr; 48(4):1528-34.
4. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, et al. Adhesion of regenerating corneal epithelium and the role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 1968;65:339-48.
5. 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 Jun; 179(3):325-35.
6. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-12.
7. Bourne G.L. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 1960;79:1070-3.
8. Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan V. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. *Cell Tissue Bank* 2004 Nov; 5:161-75.

9. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004 Jan-Feb;49(1):51-77.
10. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Shimizu Y, Kinoshita S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:93-9.
11. Libera RD, Melo GB, Lima AS, Haapalainen EF, Cristovam P, Gomes JAP. Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (A.M) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. *Arq Br Oftalmol* 2008; 71(5):669-73.
12. Kim JY, Choi YM, Jeong SW, Willians DL. Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BA) on uncomplicated canine corneal erosion. *Vet Ophthalmol* 2009 Jan-Feb;12(1):36-42.
13. Jang IK, Ahn JI, Shin JS., Kwon YS, Ryu YH, Lee Jk et al. Transplantation of reconstructed corneal layer composed of corneal epithelium and fibroblasts on a lyophilized amniotic membrane to severely alkali-burned cornea. *Artif Organs* 2006 Jun; 30(6):424-31.
14. Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S. Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 2006 Jun; 84(3):401-5.
15. Koh JW, Shin YJ, Oh Jy, Kim MK, Ko JH, Hwang JM. The expression of TIMPs in cryo-preserved and freeze-dried amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2007, Jul-Aug; 32(7-8):611-16.
16. Djefal A, Tahtat D, Khodja AN, Bouzid SS, Remane NI. Validation and substantiation of 25 KGy as sterilization dose for lyophilized human amnion membrane. *Cell Tissue Bank* 2007; 8(1):9-12.
17. Hilmy N, Febrida A. Basril A. validation of radiation sterilization dose for lyophilized amnion and bone grafts. *Cell Tissue Bank* 2000 June1;(2):143-8.
18. Prince JH, Diesen CD, Eglitis I. The Rabbit. In: Prince JH, Diesen CD, Eglitis I. *Anatomy and histology of the eye and orbit in domestic animals*. Springfield: Charles Thomas; 1960: p. 260-301.
19. Marinho D, Hofling-Lima AL, Kwitko S, Tseng SCG. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation *Cornea* 2003 Jun; 22(4):338-42.
20. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995 Sep 14;(5):473-84.
21. Solomon A, Meller D, Prabhasawat PI. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocoeles and deep ulcers. *Ophthalmology* 2002;109:694-703.

22. Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol* 2001 Dec; 85(12):1455-63.
23. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45:221-9.
24. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004 Jan-Feb;49(1):51-77.
25. Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank* 2004;5:73-80.
26. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JKG. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol*. 2001;85:905-7.
27. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83:748-52.
28. Kruse FE, Jousen 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 Jan. 238(1):68-75.
29. Khokhar S, Sharma N, Kumar H, Soni A. Infection after use of nonpreserved human amniotic membrane for reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 2001;20:773-4.
30. Souza CEB, Engel DP, Branco BC, Hofling-Lima AL, Freitas D, Gomes JAP, Souza LB. Avaliação da contaminação microbiana da membrana amniótica e líquido amniótico. *Arq Bras Oftalmol* 2004;67:709-12.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RDC nº 46 de 18 de maio de 2000. Normatiza os processos de produção e Controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano.
32. Dias, Ana Beatriz Toledo. Liofilização como alternativa à preservação de membrana amniótica para uso oftalmológico. Avaliação histológica e imunohistoquímica. 2007. Tese (Doutorado em Ciências visuais) - Universidade Federal de São Paulo.
33. Szurman P, Warga M, Grisanti S, Roters S, Rohbac HJ, Aisembry S. et al. Sutureless amniotic membrane fixation using fibrin glue for ocular surface reconstruction in a rabbit model. *Cornea* 2006 May; 25(4):460-5.
34. Chuck RS, Graff JM, Bryant MR, Sweet PM. Biomechanical Characterization of Human Amniotic Membrane Preparations for Ocular Surface Reconstruction. *Ophthalmic Res* 2004; 36:341-8.
35. Maharajan VS, Shanmuganathan V, Currie A, Hopkinson A, Powell-Richards A, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: indications and outcomes. *Clin Exper Ophthalmol* 2007; 35:140-7.

# **ANEXOS**



## ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA DOAÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Transplante de Membrana Amniótica Humana em Oftalmologia  
GPPG 98263

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, portadora da Carteira de Identidade nº \_\_\_\_\_, venho, por meio deste TERMO, declarar que concordo em doar minha PLACENTA aos médicos do serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a fim de que a mesma possa ser utilizada em projetos de pesquisa e/ou procedimentos médicos.

Concordo, também, com o fornecimento de amostra de sangue para a realização de exames laboratoriais necessários para a testagem de certas doenças potencialmente transmissíveis, como SÍFILIS, HEPATITE B e C e HIV, comprometendo-me a repeti-los em seis meses.

Estou ciente de que os resultados dos exames serão anexados ao meu prontuário no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e de que os médicos manterão sigilo sobre minha identidade, de acordo com as normas que regem a Ética Médica.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Contato:

\_\_\_\_\_  
Assinatura da doadora

Placenta nº

\_\_\_\_\_  
Assinatura testemunha

---

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: DIANE MARINHO  
HCPA – SERVIÇO DE OFTALMOLOGIA  
SETOR DE CórNEA E DOENÇAS EXTERNAS – RAMAL 8247

## ANEXO 2: IMUNOHISTOQUÍMICA - PREPARAÇÃO

### Imunohistoquímica Vimentina

1. Xilol I e II por 20 minutos cada;
2. Álcool 100% 2min;
3. Álcool 96% 2min;
4. Álcool 80% 2min;
5. Álcool 70% 2min;
6. Água destilada;
7. Lavar com TBS Tween (ou água destilada);
8. **Recuperação antigênica:** colocar as lâminas em tampão citrato (pH 6). Deixar por 2 minutos em microondas na potência máxima; evitar evaporar; controlar, colocar PBS, quando ferver. Deixar esfriar (colocar PBS para completar o tampão que evaporou);
9. **Bloqueio de reações inespecíficas:** Leite desnatado 5% (diluir em PBS ou água destilada) por 15 minutos;
10. Lavar com TBS Tween (ou água destilada);
12. **Anticorpo primário Vimentina (Zimed):** 1/200 diluído em PBS; **por 1 hora a 37°C;**
  - Usar 100ul/lâmina
  - 10 lâminas = 1000ul total (vol. necessário para 10 lâminas)
  - 1000 (volume total)/200 = 5ul de Ac
  - 5ul de Ac em 995ul de PBS**
13. Lavar com TBS Tween (ou água destilada);
14. **Gotas amarelas** (LSAB + AP Link) anticorpo secundário por 20 minutos temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
15. Lavar com TBS Tween (ou água destilada);
16. **Gotas vermelhas** (LSAB + AP Link) (streptavidina) por 20 minutos em temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
17. Lavar com TBS Tween (ou água destilada);
18. Cobrir com Permanent Red – DAKO (vermelho permanente 3ml Buffer kit + 1 tablete de Permanent Red Code 0695), no mínimo, 15 minutos (média 15-30 minutos).
19. Lavar com água destilada;
20. Contracorar com hematoxilina (até um minuto);
21. Desidratar em álcool 80%, 96% e 100% por 2 minutos cada;
22. Xilol III e IV;
23. Montar a lâmina.

## Imunohistoquímica Citoqueratina

1. Xilol I e II por 20 minutos cada;
2. Álcool 100% 2 min;
3. Álcool 96% 2 min;
4. Álcool 80% 2 min;
5. Álcool 70% 2 min;
6. Água destilada;
7. Peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos (diluir em água destilada até uma concentração final de 3%=3ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 97 ml água destilada);
8. Lavar com TBS Tween (ou água destilada);
9. **Recuperação antigênica:** colocar as lâminas em tampão citrato (pH 6); deixar por dois minutos em microondas na potência máxima; evitar evaporar; controlar colocando PBS, quando ferver. Deixar esfriar (colocar PBS para completar o tampão que evaporou);
10. Lavar com TBS Tween (ou água destilada);
11. **Bloqueio de reações inespecíficas:** leite desnatado 5% (diluir em PBS) por 15 minutos;
12. Lavar com TBS (ou água destilada);
13. **Anticorpo primário citoqueratina (Dako):** 1/200 diluído em PBS por 1 hora a 37°C;  
Usar 200ul/lâmina:  
10 lâminas = 1000ul total (vol. necessário para 10 lâminas)  
1000 (volume total)/200 = 5ul de Ac  
1000-5 = 995 ul  
**5ul de Ac em 995ul de PBS**
14. Lavar com TBS Tween;
15. **Gotas amarelas** (anticorpo secundário) 20 minutos temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
16. Lavar com TBS Tween;
17. **Gotas vermelhas** (streptavidina) por 20 minutos em temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
18. Lavar com TBS Tween;
19. Cobrir com DAB (0.6ml de DAB + 0.4ml PBS + 25 microlitros H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Deixar por 5-10 minutos ou até ficar marrom;
20. Lavar com TBS Tween e enxaguar em água destilada;
21. Contracorar com hematoxilina (até um minuto);
22. Desidratar em álcool 80%, 96% e 100% por 2 minutos cada;
23. Xilol III e IV;
24. Montar a lâmina.