

UFFRJ
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

TESE DE DOUTORADO

**Imunomarcção dos componentes da matriz extracelular da
membrana amniótica equina sob diferentes métodos de
conservação e sua aplicação clínica**

Maurílio Rosa

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

IMUNOMARCAÇÃO DOS COMPONENTES DA MATRIZ
EXTRACELULAR DA MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA SOB
DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E SUA APLICAÇÃO
CLÍNICA

MAURÍLIO ROSA

Sob a Orientação do Professor

Paulo de Tarso Landgraf Botteon

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas.

Seropédica/RJ

2022

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R788i Rosa, Maurilio, 1957-
IMUNOMARCAÇÃO DOS COMPONENTES DA MATRIZ
EXTRACELULAR DA MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA SOB
DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E SUA APLICAÇÃO
CLÍNICA / Maurilio Rosa. - Rio de Janeiro, 2022.
94 f.: il.

Orientador: Paulo de Tarso Landgraf Botteon.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS, 2022.

1. Membrana Amniótica equina como biomaterial. 2.
Estudo morfológico e imunohistoquímico da Membrana
amniótica equina. 3. Composição de proteínas da Membrana
amniótica. 4. Cicatrização de córnea equina com Membrana
amniótica equina. I. Landgraf Botteon, Paulo de Tarso
, 1964-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS III. Título.

“Quem não sabe o que procura, não reconhece
o que encontra”.
(Dito popular)



TERMO Nº 195 / 2023 - DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)

Nº do Protocolo: 23083.012972/2023-74

Seropédica-RJ, 08 de março de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA (PATOLOGIA
E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

MAURÍLIO ROSA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas, área de Concentração Ciências Clínicas).

TESE APROVADA EM 10/06/2022

Paulo de Tarso Landgraf Botteon (Dr.) UFRRJ
(Orientador/Presidente da Banca)

Marta Fernanda Alvuquerque da Silva (Dra.) UFRRJ

Vivian de Assunção Nogueira Carvalho (Dra.) UFRRJ

Alexandre Lima de Andrade (Dr.) UNESP

Cláudia Helena Pellizzon (Dra.) UNESP

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 18:12)
MARTA FERNANDA ALBUQUERQUE DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matrícula: 387386

(Assinado digitalmente em 08/03/2023 13:31)
PAULO DE TARSO LANDGRAF BOTTEON
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matrícula: 2181699

(Assinado digitalmente em 08/03/2023 14:46)
VIVIAN DE ASSUNCAO NOGUEIRA CARVALHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: 2606155

(Assinado digitalmente em 08/03/2023 14:51)
ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 108.372.958-66

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 07:52)
CLAUDIA H PELLIZZON
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 139.315.628-24

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **195**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **08/03/2023** e o
código de verificação: **c857e12f63**

A todos que acreditam e trabalham em Ciência e Educação, ferramentas importantes para a construção de uma sociedade mais justa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maximiano Rosa Filho e Elisa Gonçalves Rosa (*in memoriam*), pelos Ensinamentos e pela Vida.

A minha esposa Nilza Carlos Dias Rosa e meu filho Maximiano Dias Rosa pelo carinho e apoio, apesar da minha ausência durante este período de trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo de Tarso Langraf Botteon pela amizade, confiança e orientação demonstrados durante esse longo e difícil período de quatro anos.

Ao amigo, irmão, orientador Dennis E. Brooks, eterna gratidão pelos ensinamentos em oftalmologia e em membrana amniótica equina.

Aos Dr. Keren Possidente e Sérgio Viana, médicos veterinários e todos os colegas que ajudaram na difícil tarefa de coleta de material para esse projeto.

Ao meu filho Marcos Vinicius Dias Rosa pela ajuda em várias fases do projeto. Que tenhas foco e perseverança para concluir o trabalho magnífico que começamos.

À Dra. Luciana Rodrigues e toda equipe da Cellen, Aline Pimentel, Adilea Cavalcanti Marques, pela ajuda inestimável.

Aos egressos e orientados atuais do LBMEC, Camila Hocman-Mendez, Raphael Siqueira Santos, Marcos Assis, Cristiane Lima, Raquel Silveira, Olavo Borges Franco, Eliel Leite, Livia Viviani de Abreu, Renata Cristina Lopes Lichtenberger e Cintia pela inestimável ajuda e troca de experiências.

À Profa. Dra. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio, primeiramente por abrir as portas do seu laboratório e me receber, e pela orientação irrefutável e a ajuda ilimitada, sem o quais esse estudo não se concretizaria.

RESUMO

ROSA, Maurílio. **Caracterização morfológica de biomateriais utilizando a membrana amniótica equina como substrato.** 2022. 81p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária. Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2022.

Neste trabalho, buscou-se estabelecer e validar protocolos para coleta, preparo e preservação da membrana amniótica equina que possibilitem a obtenção de um biomaterial viável e livre de contaminação para utilização com fins terapêuticos. Foram testados e estudados os processos de preparo de três diferentes tipos de biomateriais, a membrana restituída de congelamento (AMNn), a membrana desidratada (AMNd) e a membrana descelularizada (AMNTx). Cada um desses materiais também foi caracterizado morfológicamente por imunofluorescência. Complementando o estudo, foi realizada a avaliação clínica pela utilização de cada biomaterial através do tratamento de reparo de lesões corneais em queratomalacia. O resultado do estudo dos processos de coleta, preparo e preservação, demonstrou ser eficiente para produção dos biomateriais. Os materiais AMNTx e AMNn foram os que demandaram mais recursos na sua produção e métodos de armazenamento. O biomaterial AMNd foi o que despendeu menores recursos de produção e armazenamento, demonstrando ser um material versátil capaz de ser utilizado em locais com pouca infraestrutura. Os resultados da caracterização morfológica por imunofluorescência de cada biomaterial culminaram com a comprovação da manutenção dos componentes laminina, fibronectina e dos colágenos I e IV na estrutura da maioria das amostras dos biomateriais estudados, com exceção da AMNd para colágeno I, que apresentou resultado inconclusivo. A avaliação dos tratamentos mostrou que a utilização desses biomateriais foi capaz de reduzir a formação de tecido cicatricial nas lesões. A comparação desses resultados também demonstrou que a membrana desidratada obteve o melhor desempenho clínico perante as membranas congeladas e descelularizadas, quando observadas a quantidade de formação de tecido cicatricial, vascularização e área de córnea clara preservada. Essas informações obtidas tornam-se de suma importância, uma vez que estes biomateriais demonstraram que podem ser utilizados como bandagens curativas, servindo como arcabouço para migração, adesão, multiplicação celular, estímulo à angiogênese e controle da inflamação, durante o processo de cicatrização tecidual.

Palavras-chave: Biomateriais. Membrana amniótica. Equinos.

ABSTRACT

ROSA, Maurílio. **Morphological characterization of biomaterials using the equine amniotic membrane as substrate.** 2022. 81p. Doctoral Thesis in Veterinary Medicine. Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2022.

In this work, we sought to establish and validate protocols for the collection, preparation and preservation of the equine amniotic membrane that make it possible to obtain a viable and contamination-free biomaterial for use with therapeutic purposes. The processes of preparation of three different types of biomaterials were tested and studied, the frozen-restituted membrane (AMN_n), the dehydrated membrane (AMN_d) and the decellularized membrane (AMN_{Tx}). Each of these materials was also morphologically characterized by immunofluorescence. Complementing the study, a clinical evaluation was performed using each biomaterial in the repair treatment of corneal lesions in keratomalacia. The result of the study of the collection, preparation and preservation processes proved to be efficient to produce biomaterials. AMN_{Tx} and AMN_n were materials that demanded more resources in their production and storage methods. The AMN_d biomaterial required less production and storage resources, proving to be a versatile material capable of being used in places with little infrastructure. The results of the morphological characterization by immunofluorescence of each biomaterial resulted in proof of the maintenance of the components laminin, fibronectin, and collagens I and IV in the structure of most samples of the studied biomaterials, except for AMN_d for collagen I, which showed inconclusive results. The evaluation of the treatments showed that the use of these biomaterials was able to reduce the scar tissue formation in the lesions. The comparison of these results also showed that the dehydrated membrane had the best clinical performance against the frozen and decellularized membranes, when observing the amount of scar tissue formation, vascularization and preserved clear corneal area. This information obtained becomes of paramount importance, since these biomaterials have demonstrated that they can be used as curative bandages, serving as a scaffold for migration, adhesion, cell multiplication, stimulation of angiogenesis and control of inflammation during the tissue healing process.

Keywords: Biomaterials. Amniotic membrane. Equine.

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|---------|
| Figura 1: Representação esquemática da estrutura da membrana fetal a termo, apontando os componentes da matriz extracelular de cada camada..... | 8 |
| Figura 2: Fotografias do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com biomaterial descelularizado..... | 27 |
| Figura 3: Imagens do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com o biomaterial congelado..... | 28 |
| Figura 4: Fotografias do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com o biomaterial desidratado | 29 |
| Figura 5: Fotografias do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento apenas com a terceira pálpebra..... | 29 |
| Figura 6: Detalhes da anestesia geral volátil e do decúbito lateral dos animais que receberam o biomaterial descelularizado..... | 30 |
| Figura 7: Detalhes da anestesia geral volátil e do decúbito lateral dos animais que receberam a membrana AMNn..... | 31 |
| Figura 8: Detalhes do procedimento cirúrgico..... | 32 |
| Figura 9: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com âmnio descelularizado oriundo da MAE | 33 |
| Figura 10: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com âmnio congelado..... | 34 |
| Figura 11: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com âmnio desidratado..... | 35 |
| Figura 12: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia apenas com recobrimento da terceira pálpebra | 36 |
| Figura 13: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio descelularizado versus âmnio congelado..... | 37 |
| Figura 14: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio descelularizado versus âmnio desidratado..... | 38 |
| Figura 15: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio descelularizado versus o controle..... | 38 |
| Figura 16: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio congelado versus âmnio desidratado versus o controle..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 17: Arranjo tridimensional do âmnio desidratado | 40 |
| Figura 18: Imagens tridimensional e plana de âmnio congelado | 41 |
| Figura 19: Distribuição de proteína em âmnio congelado | 42 |
| Figura 20: Imagem tridimensional de âmnio descelularizado | 43 |
| Figura 21: Distribuição da proteína em âmnio descelularizado..... | 43 |
| Figura 22: Imagem tridimensional de âmnio desidratado..... | 44 |
| Figura 23: Arranjo da distribuição da laminina em âmnio desidratado | 45 |
| Figura 24: Imagem tridimensional do arranjo de distribuição da FN no tecido. | 46 |
| Figura 25: Distribuição de fibronectina em âmnio congelado | 47 |
| Figura 26: Imagens tridimensional e plana de âmnio descelularizado..... | 48 |
| Figura 27: Distribuição de fibronectina em âmnio descelularizado..... | 48 |
| Figura 28: Distribuição da fibronectina em âmnio desidratado | 49 |
| Figura 29: Distribuição de colágeno 1 em âmnio congelado | 50 |
| Figura 30: Distribuição de colágeno 1 em âmnio descelularizado..... | 51 |
| Figura 31: Distribuição de colágeno IV em âmnio congelado..... | 52 |
| Figura 32: Reconstrução tridimensional da distribuição de colágeno IV em âmnio congelado..... | 53 |
| Figura 33: Distribuição de colágeno IV em âmnio descelularizado..... | 54 |
| Figura 34: Imagem tridimensional de distribuição de colágeno IV em âmnio desidratado | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | Páginas |
|--|---------|
| Tabela 1: Organização dos grupos de biomateriais e respectivos tratamentos..... | 23 |
| Tabela 2: Proteínas da MEC avaliadas e anticorpos utilizados | 24 |
| Tabela 3: Avaliação subjetiva da distribuição das proteínas em função do tipo de tratamento do biomaterial | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| AMNd: | Membrana amniótica desidratada |
| AMNn: | Membrana amniótica congelada |
| AMNTx: | Membrana amniótica descelularizada |
| AMSCs: | Células amnióticas do estroma |
| b-FGF: | Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico |
| BM-MSCs: | Células Mesenquimais da Medula Óssea |
| COL I: | Colágeno I |
| COL IV: | Colágeno IV |
| CTMs: | Células tronco mesenquimais |
| DPP-IV: | Dipeptidilpeptidase IV |
| eAMCs: | CTMs amnióticas equinas |
| EGF: | Fatores de Crescimento Epidérmico |
| EDGF: | Fator de Crescimento Derivado da Epiderme |
| EVs: | Vesículas extracelulares |
| FN: | Fibronectina |
| HA: | Ácido Hialurônico |
| KGF: | Fator de Crescimento de Queratinócitos |
| LM: | Laminina |
| MAE: | Membrana amniótica equina |
| MB: | Membrana basal |
| MEC: | Matriz extracelular |
| miRNAs: | MicroRNAs |
| MPP: | Metalopeptidase |
| NGF: | Fator de Crescimento de Nidogênio |
| PBS: | Solução tampão fosfato salino |
| PCR: | Reação em Cadeia da Polimerase |
| RT-qPCR: | Retrotranscrição PCR Quantitativa |
| SLPI: | Protease Secretada por Leucócitos |
| TGF- β : | Fator de Crescimento Transformador-Beta |
| TIMP: | Inibidores Teciduais de Metaloproteinases |
| TNF α : | Fator de Necrose Tumoral- α |
| TNT: | Tecido não tecido |

SUMÁRIO

| | Páginas |
|---|---------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 5 |
| 3 OBJETIVOS | 5 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 5 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 5 |
| 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 6 |
| 4.1 ENGENHARIA DE TECIDOS..... | 6 |
| 4.2 MEMBRANA AMNIÓTICA..... | 7 |
| 4.2.1 Definição e características da membrana amniótica | 7 |
| 4.2.2 Membrana amniótica como fonte de células tronco mesenquimais | 11 |
| 4.2.3 Membrana amniótica como substrato para cultivos celulares e biomateriais para reparação tecidual | 12 |
| 4.3 COMPONENTES FIBROSOS DA MEMBRANA BASAL E MATRIZ EXTRACELULAR IMPORTANTES NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL | 17 |
| 4.3.1 Laminina | 17 |
| 4.3.2 Fibronectina | 18 |
| 4.3.3 Colágenos I e IV | 19 |
| 5 METODOLOGIA | 21 |
| 5.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO..... | 21 |
| 5.2 AQUISIÇÃO DA PLACENTA PARA PROCESSAMENTO | 21 |
| 5.3 MANEJO E PREPARO DOS BIOMATERIAIS SUBSTRATOS DA MAE..... | 21 |
| 5.3.1 Congelamento | 22 |
| 5.3.2 Desidratação | 22 |
| 5.3.3 Descelularização | 22 |
| 5.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA | 22 |

| | |
|---|----|
| 5.5 CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS DE BIOMATERIAIS | 24 |
| 5.6 ANÁLISE DAS IMAGENS | 25 |
| 5.7 COMPARAÇÃO DOS BIOMATERIAIS COM BASE NA ANÁLISE DAS IMAGENS | 26 |
| 5.8 ANIMAIS E DESCRIÇÃO DA TÉCNICA CIRÚRGICA UTILIZADA NOS CASOS CLÍNICOS | 26 |
| 5.8.1 Tratamento 1 | 27 |
| 5.8.2 Tratamento 2 | 28 |
| 5.8.3 Tratamento 3 | 28 |
| 5.8.4 Tratamento 4 | 29 |
| 5.8.5 Protocolo para utilização da membrana AMNTx e AMNn | 30 |
| 5.8.6 Protocolo de recobrimento de pálpebras para utilização das membranas AMNd e controle | 31 |
| 6 RESULTADOS | 33 |
| 6.1 REPARO CORNEANO COM A UTILIZAÇÃO DA AMTx | 33 |
| 6.2 REPARO CORNEANO COM A UTILIZAÇÃO DA AMNn | 34 |
| 6.3 REPARO CORNEANO COM A UTILIZAÇÃO DA AMNd | 34 |
| 6.4 REPARO CORNEANO APENAS COM O RECOBRIMENTO DE TERCEIRA PÁLPEBRA, CONTROLE | 35 |
| 6.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE OS GRUPOS | 36 |
| 6.5.1 Uso de AMNTx comparado ao uso de AMNn | 36 |
| 6.5.2 Uso de AMNTx comparado ao uso de AMNd | 37 |
| 6.5.3 Uso de AMNTx comparado ao controle | 38 |
| 6.5.4 Uso de AMNn e AMNd comparados ao controle | 39 |
| 6.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS | 39 |
| 6.6.1 DAPI e faloidina em AMNd e AMNn | 39 |
| 6.6.2 Distribuição da laminina | 40 |
| 6.7 EXPRESSÃO DA FIBRONECTINA | 45 |

| | |
|--|----|
| 6.7.1 Observação de fibronectina em âmnio congelado – AMNn | 45 |
| 6.7.2 Observação de fibronectina em âmnio descelularizado – AMNTx..... | 47 |
| 6.7.3 Observação de fibronectina em âmnio desidratado – AMNd | 49 |
| 6.8 EXPRESSÃO DE COLÁGENO I..... | 49 |
| 6.8.1 Observação de colágeno I em âmnio congelado – AMNn..... | 49 |
| 6.8.2 Observação de colágeno I em âmnio descelularizado – AMNTx..... | 50 |
| 6.8.3 Observação de colágeno I em âmnio desidratado – AMNd..... | 51 |
| 6.9 DISTRIBUIÇÃO DE COL IV | 52 |
| 6.9.1 Observação de colágeno IV em âmnio congelado – AMNn..... | 52 |
| 6.9.2 Observação de colágeno IV em âmnio descelularizado – AMNTx | 53 |
| 6.9.3 Observação de colágeno IV em âmnio desidratado – AMNd..... | 54 |
| 6.9.4 Comparação entre os biomateriais estudados | 55 |
| 7 DISCUSSÃO | 57 |
| 8 CONCLUSÕES..... | 62 |
| 9 REFERÊNCIAS | 63 |

1 INTRODUÇÃO

A Medicina moderna tem buscado na Bioengenharia soluções para as mais variadas doenças que afetam a saúde humana e animal. A Bioengenharia é uma área de conhecimento que movimentou bilhões de dólares em desenvolvimento, venda e treinamento de pessoal no mundo inteiro. Materiais, tanto de origem orgânica (tal como o colágeno) e inorgânica (a exemplo da hidroxiapatita e do titânio), representam parte do universo de materiais que estão disponíveis para uso terapêutico nas mais diversas áreas como ortopedia, odontologia, oncologia e cirurgia reparadora em queimaduras, bem como na reparação tecidual, óssea, composição de próteses ou como suporte para transplante de órgãos (CHOPRA; THOMAS, 2013).

Uma das subáreas da Bioengenharia, a Engenharia de tecidos tem evoluído nos últimos trinta anos com o objetivo de construir materiais que possam servir de substitutos ou imitar tecidos doentes ou feridos. Apesar da introdução de tecnologias de ponta, como a microfabricação e a impressão 3D, o trabalho de consolidação de um produto clínico final de fácil utilização é lento (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011).

É necessária a discussão de questões que limitam o desenvolvimento de biomateriais com vistas a atender as necessidades dos usuários finais e médicos a campo, que procuram avidamente por produtos que apresentem soluções com eficácia, confiabilidade, facilidade de uso e economia de custos (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011; FERENCZY; SOUZA, 2020).

Nesse cenário, o uso de biomateriais é o alvo de estudos farmacológicos no que diz respeito à criação de novos tratamentos ou a otimização dos existentes. A utilização de materiais com baixa ou nenhuma toxicidade e imunogenicidade torna-se imperativo, como é o caso da membrana amniótica. Conforme explicam Oliveira e Alvarenga (1998) e Niknejad et al. (2008) explorar a potencialidade dessas membranas é um dos campos mais promissores das Ciências Biológicas, tendo em vista serem parte integrante do desenvolvimento dos organismos. Ainda de acordo com esses autores, a complexidade biológica das membranas amnióticas exige esforços conjuntos de diversas linhas de pesquisa, objetivando principalmente seu uso terapêutico.

Contudo, apesar do grande número de trabalhos publicados, aspectos importantes da caracterização da membrana amniótica ainda permanecem em aberto.

São inúmeras as doenças e condições (agudas ou crônicas) na saúde humana e animal que têm suscitado a necessidade de novas terapias, além do fato de que algumas doenças se

mostram resistentes aos tratamentos convencionais. Nesses casos, o estudo de medidas alternativas como o tratamento pela utilização de biomateriais derivados da membrana amniótica vem se destacando na Medicina Veterinária. Pesquisas vêm sendo conduzidas visando oferecer soluções para o tratamento de uma série de condições patológicas em animais, com resultados bastante promissores (CHOPRA; THOMAS, 2013; ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2018).

Diante disso, a Biotecnologia desponta como um novo campo de estudo, com enorme potencial em relação ao tratamento de variadas doenças, recebendo denominações como Medicina Regenerativa. Sendo assim, essa matéria vem despertando enorme interesse, pois pode resultar em contribuições significativas na Medicina Regenerativa e na engenharia de tecidos (FERENCZY; SOUZA, 2020).

Nesse cenário, a membrana amniótica equina (MAE) merece mais estudos para avaliá-la como fonte de biomateriais que possam ser utilizados na Medicina Regenerativa, verificando suas diferenças de forma comparativa em função dos resultados das análises morfológicas e complexidade de obtenção e métodos de armazenamento de cada biomaterial.

A membrana amniótica é um dos biomateriais mais antigos utilizados para a recuperação de tecidos. A primeira documentação de seu uso foi feita por Davis, em 1910, quando foi utilizada em transplantes de pele. Desde então, adquiriu importância por sua capacidade de reduzir cicatrizes e inflamação, melhorando a cicatrização de feridas e auxiliando a proliferação e diferenciação celular como resultado das suas propriedades antimicrobianas. Além disso, trata-se de um biomaterial de fácil obtenção, processamento e transporte (NIKNEJAD et al., 2008).

Estudos recentes, em diversas espécies, demonstraram que a MAE é uma boa fonte de células potencialmente capazes de serem utilizadas para promover a reconstrução de tecidos e órgãos. Paralelamente, durante as últimas décadas, vários projetos de pesquisa fundamentaram o conhecimento da biologia da membrana amniótica (PLUMMER et al., 2009). Várias doenças na área da Medicina Veterinária já podem ser tratadas com o auxílio de biomateriais, entre elas as lesões oculares. Nesse cenário, o uso da membrana amniótica vem se destacando e é o objeto de estudo do presente trabalho, por ser uma fonte de substratos estruturais, tais como a Laminina, Fibronectina e os Colágenos I e VI (FUKUDA et al., 1999; LASSALINE et al., 2005)

Em equinos, o bulbo do olho apresenta-se totalmente inserido na órbita, com a forma ligeiramente achatada em sua dimensão anteroposterior. Os olhos estão posicionados

lateralmente na cabeça, com campo visual monocular total de 292 graus (146 graus para cada olho), e um campo binocular de 65 graus, com a cabeça erguida, o que lhes permite uma visão estereoscópica com perfeita percepção quanto à profundidade, distância, posição e tamanho dos objetos. A córnea equina é composta por cinco camadas. A primeira, mais externa, é composta por 10 a 15 camadas de epitélio pavimentoso pseudoestratificado, com aproximadamente 60µm de espessura. Logo abaixo vem uma delgada membrana basal epitelial, o estroma, a membrana de Descemet e, por último, o endotélio, formado por uma única camada de células epiteliais hexagonais. A espessura da córnea do equino está entre 0,8 e 1,0mm (BROOKS; MATTHEWS, 2007; GILGER, 2016).

A camada mais espessa da córnea, o estroma, mede aproximadamente 700µm e é formada por um mosaico tridimensional de ceratócitos interconectados na matriz extracelular (MEC) de proteoglicanos associados a fibras colágenas de pequeno diâmetro. O endotélio, com 7µm de espessura, é composto de camada única de células epiteliais associada a uma delgada membrana basal, membrana de Descemet, de origem colágena, com espessura variando entre 14µm e 21µm. Com relação à resposta da córnea a injúrias, as lesões do epitélio corneal do equino ocorrem na maioria das vezes por trauma ou abrasão. A deficiência na quantidade de água no filme lacrimal, associada à colonização do epitélio da córnea por patógenos como fungos, bactérias e micoplasmas – especialmente adaptados ao ambiente onde o animal habita, ou presentes na flora do saco conjuntival – são os responsáveis diretos pela contaminação e agravamento do estado da ferida (BROOKS; MATTHEWS, 2007; GILGER, 2016).

As lesões mais comuns encontradas no olho equino são as do tipo abrasivas, causadas por corpos estranhos, cílios ectópicos, ou má formação de pálpebras, como nos casos de entrópios. Lesões causadas por brigas ou acidentes com cercas, portas de baias também constituem uma possibilidade. Em resposta adaptativa às lesões, as células corneais podem sofrer edema, como resultado da absorção osmótica do excesso de água do filme corneano ou humor aquoso. A metaplasia é também uma das respostas das células do epitélio à lesão superficial, em que essas mudam sua estrutura pela queratinização, pigmentação, neovascularização e, finalmente, a formação de tecido cicatricial (BROOKS; MATTHEWS, 2007; GILGER, 2016).

A regeneração da córnea no equino é particularmente problemática e difícil, pois suas células apresentam limitado repertório de resposta a injúrias, principalmente quando infectadas. Apresentam poucos recursos fisiológicos que permitam reagir a determinados tipos de injúrias, o tratamento dessas afecções corneanas em queratomalácia com a utilização da membrana

amniótica apresenta-se como uma opção viável. O restabelecimento da superfície do epitélio corneal com a restauração de claridade óptica, e a eliminação ou diminuição da formação de tecido cicatricial são particularmente importantes em termos de reconstrução da superfície ocular, e é um desafio a ser superado na oftalmologia veterinária (FUKUDA et al., 1999; BROOKS; OLLIVIER, 2004; LASSALINE et al., 2005; OLLIVIER et al., 2006; BROOKS, 2008; PLUMER et al., 2009).

Em equinos, a migração do epitélio celular durante a reparação para úlceras não infectadas, as quais atingem até a metade da espessura do estroma em profundidade, é de aproximadamente 0,6 milímetros/dia (NEADRLAND, 1987). Já a reparação de úlceras com o estroma infectado, manifesta-se tipicamente pela grande infiltração de leucócitos polimorfonucleares, o que atrasa o processo reepitelização, deflagra crescimento de vasos episclerais e vascularização, que podem invadir a córnea de forma sutil ou severa (WELCH, 2000; BROOKS, 2004). Essa condição geralmente é seguida da deposição de colágeno e, conseqüentemente, de formação de tecido cicatricial (STRUBBE et al., 2000).

O *melting*, derretimento e necrose da córnea, mais comumente chamado de queratomalácia na literatura veterinária, é particularmente a condição mais severa associada à superfície ocular e impõe um grande desafio devido à má qualidade do tecido da córnea. O estroma necrótico é frequentemente inflamado e infectado, e apresenta baixa resistência à tração, o que dificulta a sua sutura (BROOKS, 2008).

O objetivo do tratamento da superfície ocular lesionada é preservar a integridade do globo, extinguir a infecção, prover suporte para o crescimento das células na área afetada e restaurar a sua transparência minimizando a formação de cicatriz. A córnea do equino apresenta a capacidade de lentamente se automodelar diminuindo assim o tamanho das cicatrizes, muito embora o mecanismo envolvido ainda não esteja completamente elucidado. O endotélio da córnea não parece sofrer mitose, porém se mostra capaz de auto reparação a partir de uma lesão celular (BROOKS, 2008). O interesse de estudo é voltado para área de Biomateriais, tendo como referência os estudos da regeneração tecidual pela utilização de bandagens oriundas da membrana amniótica.

Existe interesse particular, por tratar-se de assunto pouco estudado no país, havendo necessidade de maiores pesquisas sobre os meios de preparo, estoque e utilização, bem como sobre os mecanismos de reparação tecidual, introduzindo conhecimentos com a perspectiva de melhora futura nas condições de tratamento clínico das afecções oculares em equinos.

2 JUSTIFICATIVA

Existe interesse particular no estudo de Biomateriais, por tratar-se de assunto carente de pesquisa no Brasil quanto aos processos de preparação, meios de conservação, estoque e utilização, bem como sobre os mecanismos de reparação tecidual.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi de descrever o desenvolvimento e caracterizar diferentes biomateriais, provenientes da membrana amniótica equina, com potencial terapêutico para utilização em afecções oculares de equinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer e validar um protocolo para coleta, preparo e preservação da membrana amniótica equina, congelada e desidratada, que possibilite a obtenção de biomateriais viáveis e livres de contaminação para tratamento de lesões oculares;
- Caracterização morfológica e estrutural de biomateriais preparados a partir da MAE, restituída de congelamento (AMNn) da membrana desidratada (AMNd), comparando-os com os resultados da membrana descelularizada (AMNTx), previamente descrita na literatura, através de análises por imunofluorescência da presença dos principais constituintes da MEC.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

Durante as últimas décadas, o campo da Medicina regenerativa evoluiu rapidamente graças ao grande progresso feito no desenvolvimento de substitutos biológicos, aplicando os princípios de transplante de células, ciência de materiais e bioengenharia. A medicina regenerativa é um campo interdisciplinar que visa desenvolver abordagens para regeneração e reparo de tecidos e órgãos danificados (CHOI et al., 2010, CHOPRA; THOMAS, 2013).

Historicamente, a primeira tentativa de substituição de tecidos foi a enxertia de pele, estabelecendo as bases para o que viria a ser uma cirurgia plástica e reconstrutiva. Desde a virada do milênio, o campo da medicina regenerativa tem evoluído rapidamente junto com o desenvolvimento de técnicas de criopreservação celular, uso de materiais biocompatíveis, bioimpressão 3D e geração de tecido derivado de células-tronco (WASSMER; BERISHVILI, 2020).

Há necessidade do incremento do uso dessas tecnologias ainda desconhecidas ou pouco utilizadas no Brasil. Atualmente, a identificação de novas fontes de biomateriais com potencial regenerativo é alvo de muitas pesquisas. Devido à diversidade e às diferentes características biológicas das células que a compõem, a membrana amniótica é considerada uma fonte promissora para a engenharia de tecidos (FAVARON et al., 2015).

Diante disso, a engenharia de tecidos vem ganhando destaque na medicina regenerativa, que se refere ao desenvolvimento de tecidos capazes de substituir ou restaurar tecidos nativos que se encontram ausentes, perdidos ou danificados em decorrência de defeito congênito, envelhecimento, doença ou lesão. Contudo, essa definição abrange uma vasta gama de terapias (DAHLGREN, 2018).

A engenharia de tecidos é definida como o desenvolvimento de substitutos biológicos com o propósito de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido e requer a aplicação de princípios e métodos tanto da engenharia quanto das ciências da vida. Nesse cenário, um componente importante é a matriz de suporte sobre a qual as células e os tecidos crescem, também conhecida como “*scaffolds*” ou arcabouços. Estes substratos tridimensionais porosos utilizados como suporte, necessários à proliferação celular e organização tecidual, devem

integrar-se facilmente com o tecido do hospedeiro e fornecer um ambiente adequado para o crescimento e diferenciação celular (NIKNEJAD et al., 2008).

Destacam-se em engenharia de tecidos as células-tronco mesenquimais (CTMs), por serem consideradas umas das principais populações de células que podem apresentar importante papel na mediação das diversas fases do processo de cicatrização de feridas: fase inflamatória, proliferativa e de remodelação. Devido a essa constatação, a terapia com CTMs emerge como uma poderosa ferramenta capaz de gerar substitutos biológicos e regenerar tecidos danificados com alta capacidade de proliferação, diferenciabilidade e função (CHOPRA; THOMAS, 2013; FARHADIHOSSEINABADI et al., 2018).

A maioria dos materiais utilizados como arcabouços são derivados de tecidos naturais de mamíferos e são desenvolvidos para apoiar as células hospedeiras, promovendo sua diferenciação e proliferação ao longo de sua formação em um novo tecido. Portanto, o projeto e a seleção dos biomateriais usados para o *scaffold* é uma etapa crítica da engenharia de tecidos, sendo a semeadura de células nestes arcabouços a primeira etapa no estabelecimento de uma cultura tridimensional, desempenhando um papel crucial na determinação da progressão da formação do tecido. Não obstante, o sucesso da semeadura celular depende do tipo e da fonte das células vivas, bem como dos componentes da MEC da estrutura (NIKNEJAD et al., 2008; FARHADIHOSSEINABADI et al., 2018).

Ressalta-se que para a efetividade dessas terapias celulares, uma das principais preocupações dos pesquisadores é identificar fontes confiáveis que não representem risco para o doador ou para o indivíduo que receberá as células. Além disso, é importante que as células sejam de fácil obtenção e apresentem alto potencial de expansão e proliferação. Atualmente, a identificação de novas fontes de células com potencial regenerativo é alvo de diversas pesquisas, inclusive a própria membrana amniótica, considerada uma das mais promissoras, originando células com potencial de utilização em terapia celular e engenharia de tecidos (FAVARON et al., 2015).

4.2 MEMBRANA AMNIÓTICA

4.2.1 Definição e características da membrana amniótica

Entre as membranas fetais encontra-se o âmnio, que corresponde à membrana extraembrionária mais interna, que envolve o feto, formando o saco amniótico que contém o

líquido amniótico (FAVARON et al., 2015). A membrana amniótica é composta por três camadas: uma fina camada epitelial, uma membrana basal espessa e um tecido mesenquimal (estroma) avascular (Figura 1). Essencialmente, o âmnio contém uma matriz rica em colágeno que inclui proteoglicanos, ácido hialurônico (HA), laminina, fatores de crescimento e sulfato de heparina (DAHLGREN, 2018).

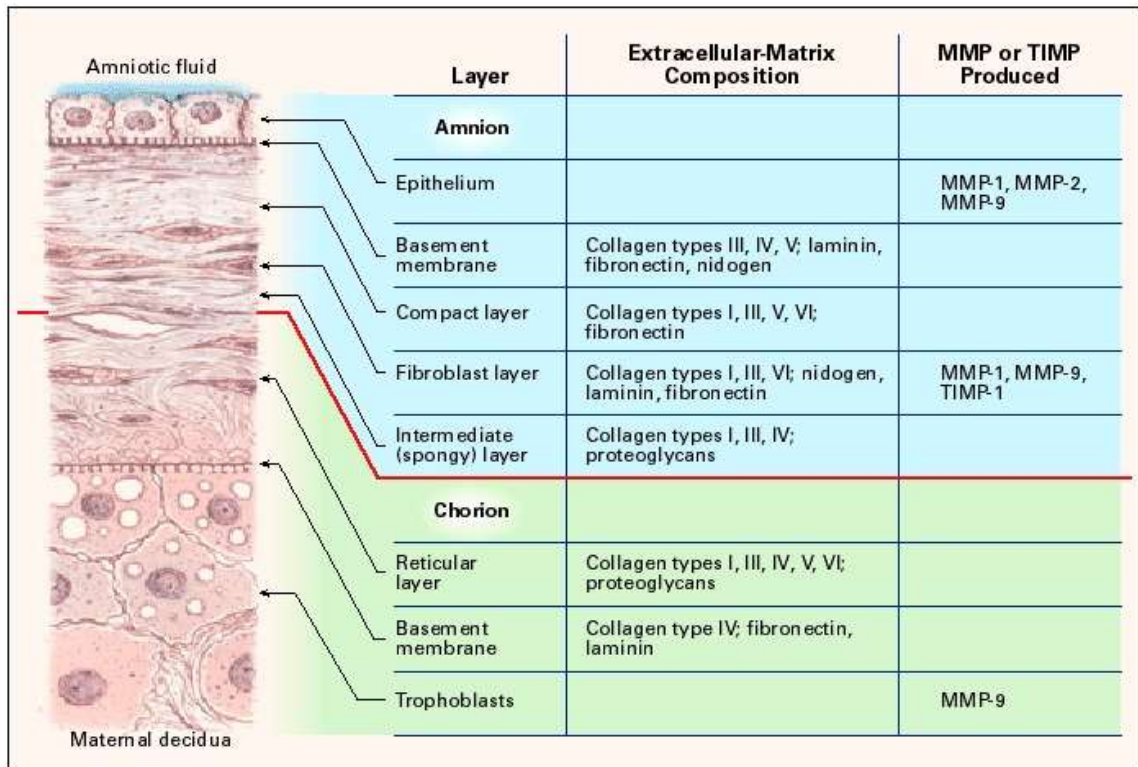


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da membrana fetal a termo, apontando os componentes da matriz extracelular de cada camada.

Fonte: NIKNEJAD et al., 2008 (Adaptado de Parry e Strauss, 1998).

A membrana amniótica possui dois tipos principais de células com diferentes origens embriológicas: células epiteliais do âmnio derivadas do ectoderma embrionário e células mesenquimais do âmnio do mesoderma embrionário – não estão presentes nervos, músculos ou vasos linfáticos. Estruturalmente, a MAE é uma membrana avascular, fina, resistente e transparente. A camada de células epiteliais amnióticas é uma camada única de células planas, cuboidais e colunares que estão em contato direto com o líquido amniótico. Abaixo da camada epitelial se encontram as CTMs amnióticas, as quais podem ser isoladas e armazenadas para uso terapêutico na regeneração de tecidos. Estas células expressam pluripotência e são potentes reservatórios fatores de crescimento. A camada amniótica do mesoderma consiste em macrófagos e células mesenquimais semelhantes a fibroblastos (CHOPRA; THOMAS, 2013).

No epitélio amniótico os filamentos do citoesqueleto celular de actina, α -actinina, espectrina, ezrina, citoqueratinas, vimentina e desmoplacina formam um arranjo especializado que desempenha um papel na integridade estrutural. Em sua camada esponjosa, na porção estromal, o âmnio contém uma abundância de proteoglicanos e glicoproteínas hidratadas que formam uma rede não fibrilar junto com o colágeno. As células epiteliais amnióticas também secretam colágeno tipo III e IV e glicoproteínas não colágenas como lamininas, nidogênio, fibronectina e vitronectina dentro da membrana basal, as quais servem como ligantes de adesão, transmitindo sinais e interagindo com os receptores da superfície celular. A laminina e suas isoformas contribuem significativamente para a diferenciação celular, forma e movimento celular, manutenção de fenótipos de tecido e promoção da sobrevivência do tecido por meio de receptores de superfície celular, como integrinas e distroglicanos (CHOPRA; THOMAS, 2013).

No estudo de Fukuda et al. (1999), os pesquisadores compararam as distribuições de cadeias de colágeno tipo IV e laminina na membrana amniótica com aquelas na córnea e conjuntiva. Foram utilizados anticorpos anticadeias de colágeno alfa2 (IV) e alfa5 (IV), laminina-1, laminina-5, fibronectina e colágeno tipo VII. De acordo com os resultados encontrados, na membrana basal da conjuntiva e na membrana amniótica, a fluorescência foi evidente para o colágeno alfa2 (IV), mas não para o colágeno alfa5 (IV). Em contrapartida, na membrana basal da córnea, a fluorescência era aparente para a cadeia alfa5 (IV) do colágeno, mas não para a cadeia alfa2 (IV). Laminina-1, laminina-5, fibronectina e colágeno tipo VII estavam presentes em todas as membranas basais examinadas. Os autores afirmam que a distribuição das cadeias alfa do colágeno tipo IV na membrana amniótica foi idêntica à da conjuntiva, mas diferente da córnea. Nenhuma diferença no padrão de distribuição de outros componentes da membrana basal foi observada. Com isso, propuseram que a membrana basal da membrana amniótica e a conjuntiva podem compartilhar componentes; portanto, a membrana amniótica poderia ser útil como substituto à membrana basal da conjuntiva (FUKUDA et al., 1999).

Tem sido mostrado que o estroma da membrana amniótica contém fatores mitogênicos, proteínas antiangiogênicas e anti-inflamatórias, inibidores naturais de proteases e propriedades antifibróticas que permitem o reparo tecidual de forma mais rápida e eficiente. As células epiteliais amnióticas expressam proteína inibidora de protease secretada por leucócitos (SLPI - ou antileucoprotease) e elafina, que possuem propriedades anti-inflamatórias. Tanto o SLPI quanto a elafina fazem parte do sistema imunológico inato do âmnio, que evita a infecção durante a fase fetal. As células estromais produzem β -defensinas que são peptídeos

antimicrobianos. Contêm ainda catelicidina LL-37, um polipeptídeo dotado de propriedade antibacteriana inata cuja atividade pode ser potencializada nas células após a exposição ao sinal inflamatório IL-1b. Outra característica positiva das células estromais é o rendimento dos processos de isolamento para cultivo e posterior uso em terapia celular. Estima-se que cerca de 100 milhões de células possam ser obtidas do âmnio de um único animal (FARHADIHOSSEINABADI et al., 2018).

A matriz da membrana amniótica contém fatores de crescimento abundantes como fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento de fibroblastos básicos (b-FGF), fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), fator de crescimento de nervos (NGF) e fator de crescimento derivado da epiderme (EDGF). Esses peptídeos fornecem um ambiente natural de cura, acelerando o processo (CHOPRA; THOMAS, 2013). Essa matriz exibe características de um arcabouço ideal e substituto de pele por meio de vários tipos de proteínas extracelulares, como colágenos, lamininas e fibronectinas, que servem como âncora para fixação e proliferação celular, leito para distribuição de células e reservatório de drogas e fatores de crescimento envolvidos no processo de reparo tecidual (FARHADIHOSSEINABADI et al., 2018).

Os benefícios do âmnio incluem propriedades anti-inflamatórias, bacteriostáticas, epitelizantes e de redução da formação de tecido cicatricial. Já se comprovou que a matriz estrutural da membrana preservada, independentemente do processamento e armazenamento, retém potenciais propriedades benéficas dos arcabouços de tecido quando usada como curativo biológico. Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais esse biomaterial age sobre os organismos e promove o reparo de feridas ainda não estão completamente elucidados e são foco de estudos (DAHLGREN, 2018). Outra questão diz respeito ao processamento do âmnio e sua adequação ao uso final. Uma última questão, não menos importante, é o fato de, a despeito do reconhecido benefício de seu uso, bancos de membrana amniótica ainda são escassos globalmente e há carência de estudos de custo-benefício relativo à produção, armazenamento e distribuição desse biomaterial, observando-se diferentes realidades nacionais e locais.

A membrana amniótica tem sido usada há décadas, tanto em humanos como em animais, para promover a cicatrização em diversas condições diferentes, demonstrando ser segura e eficaz. Sua administração leva ao local da ferida fatores de crescimento que proporcionam efeitos desejáveis na proliferação de fibroblastos, queratinócitos e vasos sanguíneos, despertando o interesse científico em seu uso para a cura de tecidos córneos, pele e outros tecidos. Além disso, o âmnio já se mostrou promissor devido a fatores antimicrobianos,

promoção da epitelização e fornecimento de uma ampla variedade de fatores de crescimento (MURPHY et al., 2017; MOYER, 2018).

4.2.2 Membrana amniótica como fonte de células tronco mesenquimais

No estudo de Lange-Consiglio et al. (2016), examinou-se a hipótese de que o processo de recuperação *in vivo* de lesões espontâneas de tendão equino, bem como a inibição da proliferação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico, utilizando CTMs da MAE, poderiam envolver microvesículas como um componente integral da comunicação célula a célula, durante a regeneração do tecido. Assim, os autores analisaram a presença e o tipo de microvesículas secretadas por CTMs da MAE, bem como a resposta de células de tendões equinos às microvesículas, por meio de curvas dose-resposta em diferentes concentrações e tempos. Além disso, a capacidade das microvesículas de neutralizar a *in vitro* a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo foi estudada através da expressão de alguns genes pró-inflamatórios, como metalopeptidases (MPP) 1, 9 e 13, fator de necrose tumoral- α (TNF α) e expressão do fator de crescimento transformador- β .

Os resultados mostraram que as CTMs da MAE secretam microvesículas variando em tamanho de 100-200nm. Uma relação inversa entre concentração e tempo foi encontrada em sua captação pelas células do tendão, onde a captação máxima ocorreu após 72 horas na concentração específica de 40×10^6 microvesículas/ml. Constatou-se que as microvesículas induziram uma regulação negativa da expressão de MMP1, MMP9, MMP13 e TNF α , sem, contudo, afetar a proliferação de células mononucleares do sangue periférico, ao contrário do meio condicionado e do sobrenadante. Coletivamente, esses achados sugerem que microvesículas contribuem para a resolução *in vivo* de lesões tendíneas, ao lado de fatores solúveis em seu meio condicionado (LANGE-CONSIGLIO et al., 2016).

Perrini et al. (2016) relataram que as microvesículas secretadas pelas CTMs da MAE reduzem a taxa de apoptose, aumentam os valores de proliferação celular, diminuem a expressão de genes pró-inflamatórios e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, seus dados sugerem que alguns microRNAs podem contribuir para neutralizar a inflamação *in vivo* do tecido endometrial.

Lange-Consiglio et al. (2018) identificaram que microvesículas secretadas por CTMs da MAE estão envolvidas na regulação negativa de genes pró-inflamatórios em tendões equinos e que contêm microRNAs (miRNAs) envolvidos na inflamação. O estudo sugeriu que esses miRNAs e microvesículas poderiam estar envolvidos tanto na regulação do sistema imunológico, por meio da modulação da sinalização da interleucina, quanto no processo inflamatório. Os autores verificaram um papel significativo das CTMs da MAE na modulação da resposta imune, por meio da comunicação célula-célula via miRNAs de transporte de microvesículas.

Muito em função das propriedades características supracitadas, a membrana amniótica ressurgiu como uma ferramenta candidata para aplicações clínicas em Medicina Veterinária e tem sido usada principalmente para estimular a cicatrização de doenças da pele e da córnea. Na Medicina humana também tem sido usada em cirurgia de reconstrução vaginal, reparo de hérnia abdominal, prevenção de aderências cirúrgicas, fechamento de pericárdio (FAVARON et al., 2015), úlceras varicosas, queimaduras, reconstrução da bexiga urinária, lesão nervosa e feridas orais, traumatismo cutâneo, lesões oculares, controle de aderência e cicatrizes de estrutura peritoneal (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014).

Mais recentemente, a membrana amniótica tem sido empregada na Medicina regenerativa, uma vez que as células-tronco derivadas da membrana amniótica e células derivadas do líquido amniótico exibem plasticidade celular, propriedades angiogênicas, citoprotetoras, imunossupressoras, potencial antitumoral e capacidade de gerar células-tronco pluripotentes induzidas. Essas características tornam a membrana amniótica uma fonte promissora de células para uso em terapia celular ou produção de biomateriais (FAVARON et al., 2015).

4.2.3 Membrana amniótica como substrato para cultivos celulares e biomateriais para reparação tecidual

A membrana amniótica pode ser usada de duas maneiras: intacta, com sua camada epitelial; ou descelularizada com seu epitélio removido. A membrana amniótica intacta seria simplesmente destacada do córion, cortada no tamanho ideal para uso e preservada para as próximas aplicações. A monocamada de epitélio e a matriz extracelular permaneceriam intocadas. As membranas intactas são normalmente usadas para curativos em aplicações clínicas, enquanto as membranas amnióticas descelularizadas são suportes ideais para

construções de engenharia de tecidos. As células epiteliais precisam ser removidas para não interferir com as novas células semeadas na estrutura. A descellularização objetiva remover as células epiteliais e obter uma membrana basal uniforme e lisa (ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2018).

Os produtos derivados de membranas amnióticas têm sido usados há décadas, em vários campos da medicina, como biomaterial para o tratamento de feridas e reposição de tecidos. Além disso, as células epiteliais amnióticas e mesenquimais têm sido intensamente estudadas quanto às suas capacidades imunomoduladoras. Afinal, as células amnióticas possuem duas características principais, já previamente descritas: i) sua capacidade de modular e suprimir as imunidades inata e adaptativa, tornando-as um verdadeiro trunfo para doenças inflamatórias crônicas e para a indução de tolerância em modelos de transplante; ii) sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, constituindo-se em uma fonte de células para a engenharia de tecidos. Esta última, combinada com o uso da membrana amniótica como suporte, oferece os componentes necessários para criar um ambiente ideal para a regeneração de células e tecidos (WASSMER; BERISHVILI, 2020).

De acordo com Lacorzana (2020), entre as vantagens da membrana amniótica pode-se citar: i) promoção da proliferação tecidual por meio de fatores de crescimento epidérmico (EGF), Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF) e Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (sb-FGF); ii) promoção da migração celular através da glicoproteína específica de lumican e ácido hialurônico, os quais exibem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores; iii) indução da migração específica de queratinócitos através do inibidor de protease serina (serpina 1) e dipeptidilpeptidase IV (DPP-IV); iv) inibição da cicatrização de feridas pela supressão do TGF- β ; v) regulação negativa da expressão de marcadores da superfície celular, como CD80, CD86 e MHC de classe-2; e vi) inibição da inflamação e neovascularização via secreção de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) e citocinas (interleucina-10, interleucina anti-inflamatória e antagonistas do receptor de interleucina-1; 7).

Com relação às CTMs, há vários aspectos importantes relacionados ao perfil de expressão dos fatores de crescimento, citocinas e marcadores de pluripotência, bem como as propriedades imunossupressoras e os efeitos antitumorais que têm sido investigados nas células-tronco amnióticas (FAVARON et al., 2015). As populações de CTMs na membrana amniótica são facilmente acessíveis, não tumorigênicas e capazes de se diferenciar em uma variedade de tipos celulares. Tais células possuem a capacidade de estimular o reparo de tecidos

lesados por meio de ações parácrinas e agindo como vetores para a bioentrega de fatores exógenos (CHOPRA; THOMAS, 2013).

Essas células, quando cultivadas *in vitro*, têm potencial para originar ossos, músculos, nervos, gordura e vasos sanguíneos. Portanto, a membrana amniótica, que geralmente é descartada após o parto, pode ser preservada e usada como uma fonte alternativa de células-tronco para pesquisas básicas e aplicações clínicas. Devido a essas características, as células derivadas do âmnio com capacidade de diferenciação multipotente têm atraído atenção em engenharia de tecidos e terapia de transplante celular (CHOPRA; THOMAS, 2013).

Além das já conhecidas aplicações com resultados positivos em reconstrução da superfície ocular, aplicações na pele e engenharia de tecidos, a membrana amniótica também pode ser aplicada em oncologia. Nesta área, ela pode prevenir a oferta de nutrientes e oxigênio às células tumorais e, conseqüentemente, interferir na angiogênese, crescimento e metástase (MAMEDE et al., 2012).

Recentemente, o isolamento de exossomos de células amnióticas, a construção de nanocompósitos à base de âmnio e a impregnação de âmnio com nanopartículas, construção de hidrogel de âmnio e processo de micronização promoveram suas propriedades para a engenharia de tecidos (FARHADIHOSSEINABADI et al., 2018).

Para além das CTMs, outro componente importante da engenharia de tecidos é a matriz de suporte sobre a qual as células e os tecidos crescem. Nesse caso, como já dito, a membrana amniótica destaca-se como uma importante fonte potencial de material de arcabouço. Sua estrutura especial e viabilidade biológica permitem que seja uma candidata ideal para a criação de material de suporte usado em engenharia de tecidos. Os componentes da matriz extracelular da membrana basal da membrana amniótica criam um arcabouço quase nativo para a semeadura de células em engenharia de tecidos. Outras propriedades biológicas importantes incluem as suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifibrose, redutora da formação de tecido cicatricial, bem como sua baixa imunogenicidade (NIKNEJAD et al., 2008).

No caso do uso da membrana amniótica como a matriz de suporte, tratamentos enzimáticos e tratamentos químicos são necessários para solubilizar as membranas celulares citoplasmáticas e nucleares restantes. Os tratamentos enzimáticos para a descellularização incluem digestão por protease, agentes quelantes de cálcio e nucleases (ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2018). A maioria dos protocolos geralmente usa EDTA, dispase, tripsina ou termolisina. Já foi relatado o uso de hidróxido de sódio para desepitelizar a membrana amniótica de forma eficiente. Nucleases como DNases e RNases também são vantajosas para remover

nucleotídeos após uma lise celular inicial. Por fim, o dodecil sulfato de sódio é um dos detergentes mais populares usados para tratar a membrana amniótica, pois permite a remoção completa dos restos celulares sem danificar o colágeno do tecido (ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2018).

Especificamente, a MAE já foi utilizada em estudos em Medicina Veterinária para tratar doenças oculares, como úlcera de córnea e uveíte, em cães e gatos (BARROS et al., 1998; ARCELLI et al., 2009; BARACHETTI; GIUDICE; MORTELLARO, 2010; CHOI et al., 2010; ECHEVERRY; TORO; GIRALDO, 2018), em equinos (LASSALINE et al., 2005; OLLIVIER et al., 2006; BROOKS, 2008; PLUMMER et al., 2009), e em animais silvestres, como o leopardo das neves (*Panthera uncia*) (KNOLLINGER et al., 2018). Também foi usada no tratamento de feridas, especialmente em equinos – tanto de pele (BIGBIE et al., 1991; OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998; GOODRICH et al., 2000) como de tendões (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013).

Um dos artigos explorando a MAE como fonte de células para engenharia de tecidos é o de Seo et al. (2013), em que as células-tronco foram isoladas e caracterizadas com sucesso. A proliferação dessas células foi medida com base no nível cumulativo de duplicação da população. A imunofenotipagem por citometria de fluxo mostrou que a maior população era de origem mesenquimal. De forma a confirmar o potencial de diferenciação, foi realizado ensaio de diferenciação de linhagem múltipla e, sob condições apropriadas, as CTMs da MAE foram capazes de diferenciação em múltiplas linhagens. Esses resultados indicaram que a MAE constitui boa fonte de células-tronco, tornando-a potencialmente útil para a medicina regenerativa veterinária e terapia baseada em células.

Violini et al. (2012) também exploraram o potencial da MAE como ferramenta para a engenharia de tecidos, investigando aplicações nas Ciências Veterinárias como fonte alternativa para células-tronco mesenquimais da medula óssea e células-tronco adiposas. A expressão de marcadores de células-tronco como Oct-4, Nanog, Sox-2 e CD105 foi avaliada por PCR quantitativo (RT-qPCR) e a diferenciação em adipócitos, osteócitos e precursores de condrócitos foi analisada por coloração citoquímica. Demonstrou-se que as células do estroma do âmnio que expressam marcadores de células-tronco podem se diferenciar em linhagem mesoderme e podem ser uma fonte alternativa às células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e da medula óssea para uso no reparo tecidual.

Lange-Consiglio et al. (2013) desenvolveram um estudo experimental *in vitro* para avaliar as características das CTMs equinas derivadas do âmnio e da medula óssea. As células

foram analisadas quanto à proliferação (curva de crescimento, tempo de duplicação, unidade formadora de colônia), quanto à plasticidade multilinhagem e quanto à expressão gênica de marcadores de pluripotência. Os resultados demonstraram que as células amnióticas do estroma (AMSCs) e células mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs) exibiram diferenças substanciais em seu potencial de proliferação e diferenciação. O tempo médio de duplicação para AMSCs foi significativamente menor do que o observado para BM-MSCs.

Em comparação com BM-MSCs, as AMSCs também demonstraram uma capacidade clonogênica significativamente superior. As BM-MSCs não foram capazes de se diferenciar em células gliais enquanto as AMSCs sim. Além disso, o processo de diferenciação osteogênica foi mais lento nas BM-MCs. Os pesquisadores concluíram que a membrana amniótica pode ser uma fonte valiosa de CTMs a serem usadas em terapias alogênicas e/ou autólogas. A natureza não invasiva e o baixo custo de coleta, a rápida proliferação juntamente com um maior potencial de diferenciação e o potencial de preparação para pronto uso tornam as AMSCs atraentes para terapia celular (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013).

Mais recentemente, Desants et al. (2019) partiram da premissa que as CTMs amnióticas equinas (eAMCs) estão envolvidas em muitos mecanismos nos processos regenerativos de tecidos, onde suas vesículas secretadas são importantes efetores em uma ampla gama de processos biológicos, contribuindo para a cura *in vivo* de lesões de tendão equino e inflamação endometrial. Como os glicoconjugados estão envolvidos no reconhecimento celular e na captação eficiente de vesículas extracelulares pelas células receptoras, os pesquisadores avaliaram o padrão de glicosilação de superfície de eAMCs e suas vesículas extracelulares (eAMC-EVs) liberadas em meio condicionado. Para isso, utilizaram um procedimento de microarray tecidual em que eAMCs e eAMC-EVs foram incubadas com um painel composto por 14 lectinas biotiniladas e estreptavidina conjugada com Cy3. A intensidade do sinal foi detectada usando o leitor de microarray Nanosight LM10 instrument.

Ambos os microarrays eAMCs e eAMC-EVs revelaram interações com todas as lectinas, indicando a presença de glicanos ligados a N e O. Foi reportado que eAMCs, eAMC-EVs são: i) enriquecidas em Gal β 1-3GalNAc, O-glicanos, sialoglicanos ligados a α 2,3 e N-glicanos de alta manose (Con A); ii) reduzidas em N-acetilactosamina, GalNAc, Gal, GlcNAc e glicanos de terminação de fucose; e iii) inalterada quanto ao conteúdo de sialoglicanos ligados a α 2,6. Esses resultados sugerem que eAMC-EVs emergem de um microdomínio de eAMC específico e que a presença simultânea de altas concentrações de Gal β 1-3GalNAc, ácido siálico α 2,3 e glicanos ligados a N com alta manose podem constituir marcadores de eAMC-EVs.

Contudo, o papel desses açúcares na medicina regenerativa equina ainda requer investigação adicional (DESANTIS et al., 2019).

Galera et al. (2015) objetivaram identificar em MAE proteínas relacionadas à cura de lesões na córnea. Os pesquisadores mapearam a identificação de referência das proteínas presentes na MAE, e 149 proteínas diferentes foram identificadas. A partir desse mapa de referência, foi possível avançar na compreensão dos resultados positivos encontrados no tratamento de ceratopatas ulcerativas, lesões cutâneas e reparos músculo esqueléticos equinos utilizando esse biomaterial.

Os resultados obtidos por Fukuda et al. (1999), Agren e Werthén (2007) e Pompili et al. (2021) serviram de base para a identificação das principais proteínas integrantes da composição da membrana basal e matriz extracelular presentes na membrana amniótica equina, além de demonstrarem que são capazes de exercer função ativa no processo de cicatrização tecidual, direcionando os esforços para a detecção de laminina, fibronectina e colágenos tipos I e IV.

4.3 COMPONENTES FIBROSOS DA MEMBRANA BASAL E MATRIZ EXTRACELULAR IMPORTANTES NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

Membrana basal e MEC são estruturas dinâmicas, compostas por diversas proteínas e polissacarídeos, os quais participam ativamente dos processos de morfogênese, cicatrização, inflamação, resposta imune, metástase e morte celular. Os colágenos, além de outras proteínas, estão presentes na composição de ambas. Destacam-se no processo de reparação celular as glicoproteínas laminina e fibronectina e os colágenos I e IV. A laminina e a fibronectina são proteínas ubiquitárias e exercem várias funções importantes, dentre elas a de organização, adesão, proliferação, diferenciação celular, ligando-se a vários componentes da membrana basal da e MEC; são produzidas por células epiteliais, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (KLEIMAN; BANKER; STEWARD, 1993; AUMAILLEY; SMITH, 1998).

4.3.1 Laminina

A laminina, uma glicoproteína de alto peso molecular, é um dos principais componentes na formação da membrana basal. Tem sido relacionada diretamente a estágios avançados de diferenciação celular, sendo pré-requisito para diferenciação terminal e execução de funções especializadas, por interagir com as integrinas e outros componentes da superfície celular, assim

como por controlar e modular várias funções celulares, entre elas a polarização, proliferação, apoptose, adesão celular, migração e diferenciação. No período embrionário, a laminina é encontrada tanto nas estruturas que darão origem às lâminas basais do adulto, como em agregados dispersos na matriz extracelular, especialmente no sistema nervoso central (MENEZES et al., 2010).

As lamininas formam um polímero reticulado, que se liga a outras moléculas de matriz e têm interações celulares únicas ou compartilhadas, mediadas por integrinas, distroglicanos e outros receptores. Através dessas interações, a laminina contribui criticamente para a diferenciação, forma e movimento celular, manutenção dos fenótipos teciduais e promoção da sobrevivência tecidual, além de contribuir para a coesão da lâmina basal e a arquitetura molecular resultante desta. É capaz de participar ativamente da regeneração e cicatrização tecidual (KLEIMAN; BANKER; STEWARD, 1993; AUMAILLEY; SMITH, 1998, MENEZES et al., 2010).

4.3.2 Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína encontrada na MEC que se liga às integrinas e outros componentes como colágeno e fibrina. Em condições fisiológicas normais, a fibronectina é um fator importante na adesão, crescimento, diferenciação e migração celular. A ligação dos receptores de integrina à fibronectina a converte em uma forma ativa que, por meio de interações com outros dímeros de fibronectina, leva à formação de uma matriz em rede. A formação desta matriz facilita a migração e proliferação das células epidérmicas, que é necessária para uma série de processos, incluindo a cicatrização de feridas. A forma celular da fibronectina é uma proteína insolúvel com aproximadamente 550 kDa (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2000; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

A fibronectina celular é produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e células da medula óssea. Esta se associa a superfícies celulares, membranas basais, matrizes pericelulares e componentes da MEC, como colágeno, fibrina, heparina e proteoglicanas, via domínios específicos, e às células, via receptores de integrinas (MORLA; RUOSLAHTI, 1992). As proteínas fibronectina e laminina têm sido relacionadas ao controle de migração celular (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2000; KUNZ-SCHUGHART et al., 2001). Proteínas como CD44 participam de processos moleculares relacionados à migração celular desencadeada pela fibronectina. Além disso, o envolvimento de uma enzima proteolítica catepsina D tem sido

associado à expressão de fibronectina e laminina (JAHKOLA et al., 1999; KAYISLI et al., 2005).

4.3.3 Colágenos I e IV

Os colágenos do tipo I e IV estão entre os colágenos mais importantes presentes nos tecidos, sendo o tipo I o mais abundante e o tipo IV o componente majoritário da membrana basal. Os colágenos I e IV participam ativamente do processo de reparação tecidual. É de grande importância a participação dos colágenos interagindo com vários tipos celulares, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteinases resultando na manutenção das fases de maturação, granulação e remodelação da cicatrização (HENRIKSEN; KARSDAL, 2016; SAND; GENOVESE; KARSDAL, 2016)

Todos os tipos de colágeno são constituídos de três cadeias polipeptídicas chamadas de tropocolágeno, que apresentam cerca de 300 nm e 360 nm de comprimento para colágenos tipo I e IV, respectivamente. A estrutura do colágeno tipo IV é diferente do colágeno I, pois ele não forma fibras, mas sim uma rede plana, estabilizada por um arranjo de domínios N-terminais de quatro tropocolágenos (HENRIKSEN; KARSDAL, 2016; SAND; GENOVESE; KARSDAL, 2016).

O colágeno tipo I é uma das proteínas mais abundantes em mamíferos e é o componente estrutural chave de vários tecidos. É encontrado em todas as camadas dérmicas da pele em alta proporção (85–90%). O colágeno tipo I é um colágeno do tipo fibrilar, formando uma fibra muito resistente. Isso contribui para a grande resistência à tração e permite suportar a deformação da derme. É a principal proteína do osso, pele, tendão, ligamento, esclera, córnea e vasos sanguíneos. É expresso em quase todos os tecidos conjuntivos e é o componente predominante da matriz intersticial (HENRIKSEN; KARSDAL, 2016).

O colágeno tipo IV é o principal componente estrutural da membrana basal, está localizado na junção dermoepidérmica. Este constituinte é crucial para manter a integridade, a estabilidade e a funcionalidade desta membrana muito fina. É um colágeno formador de rede que sustenta as células epiteliais e endoteliais e funciona como uma barreira entre os compartimentos do tecido. O colágeno tipo IV interage com as células, fatores de crescimento e outros componentes da membrana basal, como laminina, nidogênio e perlecan. Essas interações específicas resultam em uma membrana basal especializada, única para cada tecido, que está envolvida em vários processos biológicos importantes, incluindo adesão e migração

celular, desenvolvimento, regeneração de tecidos e cicatrização de feridas (SAND; GENOVESE; KARSDAL, 2016).

5 METODOLOGIA

5.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO

O experimento, foi aprovado pela CEUA/UFRRJ4803260617, e foi realizado nos seguintes locais:

1. HDM Horse Service Clínica Veterinária – Cachoeiras de Macacu/RJ.
2. Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular – UFRJ/CCS/ICB/LBMEC.

5.2 AQUISIÇÃO DA PLACENTA PARA PROCESSAMENTO

O substrato para a análise ora proposta foi a MAE. O material foi coletado a partir da placenta de animais nascidos de partos normais a campo, em propriedades especializadas em reprodução de equinos ou de cesarianas, no interior de centros cirúrgicos. Foram utilizadas placentas frescas, coletadas até as primeiras 12 horas após o parto. A placenta foi separada e apenas a porção da membrana amniótica foi utilizada.

Primeiramente, as membranas foram lavadas em água destilada para a limpeza e separação de debris, à temperatura de aproximadamente -10°C e depois acondicionadas em *container* refrigerado para o devido transporte. Em seguida, no laboratório, foi realizado o tratamento de limpeza, desinfecção e lavagem em banhos de imersão, por três vezes durante 15 minutos em uma solução tampão fosfato salino, contendo o antibiótico sulfato de amicacina e o antifúngico anfotericina na concentração de 1%v/v e depois por uma hora em solução salina a 0,9%. A separação das membranas âmnio e córion se deu pela utilização de dissecação manual por arrancamento, conforme técnica descrita na literatura por Lassaline e Brooks (2005).

5.3 MANEJO E PREPARO DOS BIOMATERIAIS SUBSTRATOS DA MAE

Após a separação das camadas da membrana amniótica, apenas o âmnio, a porção avascular da membrana amniótica, foi utilizado como substrato para análise. O material foi colocado em um pano de campo estéril de dimensões 50x50 cm. Os biomateriais a serem processados foram cortados em dois padrões diferentes: pedaços retangulares com dimensões de 10x20 centímetros foram utilizados para a desidratação e descelularização. Já os tecidos preparados para congelamento, foram cortados em pedaços quadrados de 5x5 cm.

5.3.1 Congelamento

Para congelamento, as membranas em cortes de 5x5cm foram estendidas em folha de papel filtro 0,2 μ m de nitrocelulose Novex™ Invitrogen, em cortes de 7x7cm. O congelamento rápido se deu pelo contato do biomaterial com o vapor de nitrogênio líquido, à temperatura de aproximadamente -100°C, durante 60 segundos. Após congelamento, cada amostra foi acondicionada em envelope de grau cirúrgico e armazenada à temperatura de -20°C, em *freezer*, para posterior utilização.

5.3.2 Desidratação

Para a obtenção da membrana desidratada, utilizaram-se cortes de 10x20 cm do biomaterial. Inicialmente a membrana foi estendida sobre folhas de 50x50cm de tecido não tecido (TNT), estéril de padrão hospitalar, com o objetivo de diminuir a umidade por 15 minutos. Logo após foram embaladas e colocadas para desidratar no interior de uma sala refrigerada, em temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ *overnight*. No dia seguinte, os envelopes contendo o biomaterial desidratado foram acondicionados em caixa plástica com tampa hermética a vácuo.

5.3.3 Descelularização

A parte destinada a descelularização também utilizou cortes de 10x20 cm e seguiu o protocolo descrito por Lassaline et al. (2005), pelo qual membrana é tratada com solução de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS por uma hora, depois lavada com PBS tamponado, pH 7,2 por 15 minutos, escovada para remoção da camada de células epiteliais e posteriormente lavada em solução salina NaCl 0,9%, por 15 minutos.

5.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

As três amostras da MAE congeladas, desidratadas e descelularizadas foram colocadas em solução de fixação constituída por paraformaldeído 4% por 48 horas, depois lavadas por 15 minutos em solução salina tamponada e posteriormente acondicionadas em sacarose a 30% por 24 horas até serem cortados os espécimes para estudo com a utilização de um *punch* de biópsia

de diâmetro 5 mm. Esses biomateriais foram separados em três grupos experimentais denominados MAE congelada AMNn, MAE desidratada AMNd e MAE descclularizada AMNTx.

Cada espécime foi colocado dentro de uma placa de 96 poços para receber os respectivos tratamentos com os anticorpos específicos, de acordo com a Tabela 1. Na Tabela 2, encontram-se elencadas as proteínas da MEC avaliadas e os respectivos anticorpos utilizados.

Tabela 1: Organização dos grupos de biomateriais e respectivos tratamentos

| Organização dos grupos | Expressão de Proteínas |
|-------------------------------|-------------------------------|
| MAE Congelada | Laminina |
| | Fibronectina |
| | Colágeno I e IV |
| AMNn | DAPI (núcleo) |
| | Faloidina (citoesqueleto) |
| MAE Desidratada | Laminina |
| | Fibronectina |
| | Colágeno I e IV |
| AMNd | DAPI (núcleo) |
| | Faloidina (citoesqueleto) |
| MAE Descclularizada | Laminina |
| | Fibronectina |
| | Colágeno I e IV |
| AMNTx | DAPI (núcleo) |
| | Faloidina (citoesqueleto) |

Tabela 2: Proteínas da MEC avaliadas e anticorpos utilizados

| Proteína | Anticorpo (Ac) e Função |
|-------------------------|--|
| Laminina (LM) | Anticorpo primário: Anti-laminina policlonal / coelho (Sigma® LM9393) Ac secundário: Anticorpo anti-imunoglobulina de coelho conjugado a Alexa® Fluor 488 produzido em jumento (Life Technologies A-21206). Visualização da distribuição da LM no tecido |
| Filamentos de Actina | Faloidina na cor vermelha Alexa® Fluor 568 (Life Technologies A-12380). Faloidina na cor verde Alexa® Fluor 488 (Life Technologies A-12379). Visualização dos filamentos da actina do citoesqueleto. |
| (DNA) nuclear | DAPI 4'-6'-Diamino-2-phenil-indol, Merck/Sigma® n° de catálogo 28718-90-3) na cor azul. Visualização do núcleo celular. |
| Fibronectina (FN) | Anticorpo primário: Anti- Fibronectina policlonal / coelho (Abcam ® Ab23751). Ac secundário: Anti-imunoglobulina policlonal de coelho conjugado a Alexa® Fluor 488 produzido em jumento (Life Technologies A-21206). Visualização da distribuição da fibronectina no tecido. |
| Colágeno I (Col I) | Anticorpo primário: Anti Col I policlonal / coelho Abcan® Ab-34710 Ac secundário: Anti-imunoglobulina policlonal/coelho conjugado a Alexa® Fluor 555 produzido em jumento (Life Technologies A-31572) |
| Colágeno IV (Col IV) | Anticorpo primário: Anti-Col IV policlonal / coelho Abcan® Ab-6586 Ac secundário: Anti-imunoglobulina policlonal de coelho conjugado a Alexa Flúor 555 produzido em jumento (Life Technologies A-31572) |

5.5 CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS DE BIOMATERIAIS

A caracterização de cada amostra foi realizada no Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular do Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciência da Saúde, Universidade

Federal do Rio de Janeiro (CCS/UFRJ). Foram realizadas análises por microscopia confocal plana dos três diferentes tratamentos do âmnio; o desidratado, o congelado e o descelularizado para identificação de suas composições e características estruturais.

Foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta. O protocolo descrito a seguir foi aplicado para todas as imunomarcações de acordo com os anticorpos primário e secundário listados na Tabela 1. O primeiro passo incluiu três lavagens de cinco minutos dos cortes histológicos com solução salina tamponada (pH 7,4), seguido da permeabilização com Triton 0,3%, por 10 minutos e nova lavagem com solução salina tamponada por 15 minutos.

Logo após a lavagem foi realizado o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos, com solução salina contendo albumina sérica bovina 10% por uma hora. Posteriormente foi adicionado o anticorpo primário diluído na mesma solução e incubado *overnight* a 4°C. Em seguida, foi retirada a solução do anticorpo primário, sendo os tecidos lavados três vezes por cinco minutos com solução salina tamponada e incubados por 12 horas a temperatura de 4°C com o anticorpo secundário IgG anti-camundongo Alexa-488 conjugado®, Faloidina vermelha Alexa-555® para visualização dos filamentos de actina do citoesqueleto e DAPI (4'-6' Diamino-2 fenil-indol, Sigma®), para contraste nuclear. Em seguida, os tecidos foram montados em lâminas especiais para imunofluorescência e montadas com N-propil-galato (Sigma®).

5.6 ANÁLISE DAS IMAGENS

Os tecidos oriundos de biomaterial foram montados em lâmina para imunofluorescência com poço demarcado para amostra com 5,3 mm de diâmetro, sempre com o epitélio voltado para o lado da lamínula. As primeiras imagens foram analisadas no microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TE200®, com filtros padrões DAPI/FITC/TRITC acoplados a uma câmera colorida CCD (Evolution vf, Media Cybernetics®). Para a obtenção final das imagens foram utilizados dois microscópios: o microscópio óptico Zeiss Elyra PS1® de super resolução por localização de molécula única e por iluminação, que possui módulo para microscopia confocal LSM 710 com detector espectral de 32 canais e o microscópio Leica CTR4000 CTC/SPE®. Para aquisição e reconstrução das imagens confocais em três dimensões, obtidas no microscópio Elyra PS1®, foi utilizado o programa Zeiss ZEN®. Para demonstração do padrão das imunomarcações em todo o corte histológico foi feita uma reconstrução das imagens (fotomontagem) obtidas em baixo aumento (40x), e os programas ZEN. Para o

Microscópio Leica CTR4000 CTC/SPE® utilizou-se o software Leica LAS Montage and Montage Viewer®.

5.7 COMPARAÇÃO DOS BIOMATERIAIS COM BASE NA ANÁLISE DAS IMAGENS

Com o objetivo de observar a distribuição de cada proteína laminina, fibronectina e colágenos I e IV - e verificar a influência dos tratamentos sobre cada uma delas nos biomateriais estudados, (congelamento, desidratação e descelularização) estabeleceu-se uma escala de gradação, a partir das imagens obtidas.

A escala proposta tomou como referência o padrão de impregnação de cada proteína avaliada em cada exame de imunofluorescência dos respectivos biomateriais AMNn, AMNd e AMNTx. Conforme o padrão estabelecido, as amostras foram classificadas como contendo baixa, média ou alta concentração de presença da proteína avaliada ao longo de toda estrutura do biotecido.

5.8 ANIMAIS E DESCRIÇÃO DA TÉCNICA CIRÚRGICA UTILIZADA NOS CASOS CLÍNICOS

Ao longo deste estudo, para que o potencial de utilização dos biomateriais oriundos da membrana amniótica seja mais bem compreendido, serão descritas quatro situações, derivadas de casos clínicos que já receberam tratamentos distintos. O primeiro foi realizado em Gainesville no ano de 2002 pelo Dr. Dennis E. Brooks, os outros foram realizados pelo Dr. Maurilio Rosa e a Dra. Gabriela Arroyo ao longo do ano de 2019.

Foram utilizados neste estudo um total de quatro animais: um garanhão da raça Hanoveriana, utilizado em provas de adestramento no Estados Unidos, com 12 anos de idade; dois garanhões da raça Sela Espanhola, ambos de Quito no Equador, sendo o primeiro com 10 anos de idade utilizado em provas de adestramento e o segundo com oito anos de idade, utilizado em provas de salto; o último animal foi um cavalo da raça Quarto de Milha com três anos de idade do interior do estado da Bahia utilizado em corridas e vaquejadas. Os animais submetidos aos tratamentos com os biomateriais foram distribuídos de acordo com os grupos experimentais citados na Tabela 1, a saber, AMNTx, AMNn, AMNd e acrescidos do grupo controle, ou seja, o animal que não recebeu a membrana. Os distintos protocolos encontram-se descritos a seguir.

No Tratamento 1 foi utilizado o biomaterial âmnio descelularizado restituído de congelamento (AMNTx). No Tratamento 2 o material utilizado foi a membrana amniótica normal restituída de congelamento (AMNn). No Tratamento 3 foi utilizada a membrana amniótica desidratada (AMNd). Finalizando o último Tratamento considerado como controle, onde não se utilizou biomaterial.

5.8.1 Tratamento 1

O Tratamento relatado a seguir, representa a abordagem desenvolvida por Dennis Brooks (LASSALINE et al., 2005) para tratar úlceras de córnea em equinos, com a finalidade de promover suporte, redução do crescimento de tecido de cicatricial na área afetada por queratomalácia. A técnica consistiu na retirada do tecido necrótico, deposição do âmnio descelularizado sobre a área afetada com sua posterior sutura. O procedimento foi realizado em Gainesville, (FL, EUA), no ano de 2002.

A Figura 2 exibe a utilização do âmnio descelularizado no reparo de uma lesão do tipo *melting* em córnea de equino da raça Hanoveriana, com oito anos de idade. A seta na Figura 2a denota a área de liquefação enzimática, resultado da contaminação associada entre *Pseudomonas* spp. e fungos. A Figura 2b indica o momento do imediato após retirada do material necrótico e reconstrução com o biomaterial suturado com fio absorvível 7.0, sobre a área lesionada.

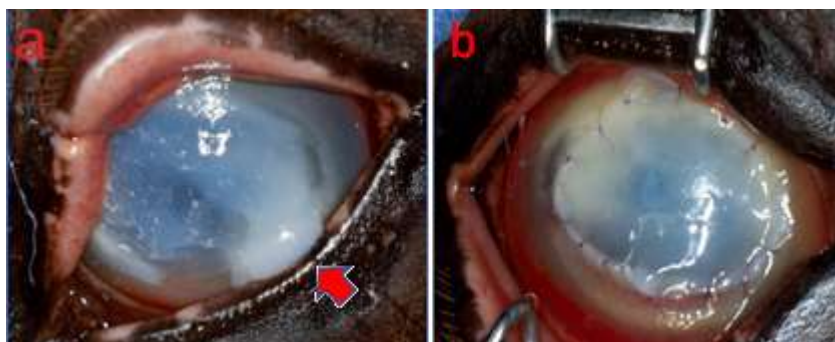


Figura 2: Fotografias do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com biomaterial descelularizado: a) apresentação do caso, seta demonstra a degeneração liquefativa do *melting* b) momento do pós-cirúrgico, com a membrana já suturada sobre a área lesionada.

Fonte: LASSALINE et al., 2005.

5.8.2 Tratamento 2

A Figura 3 exibe as imagens do tratamento utilizando a membrana amniótica restituída de congelamento (AMNn) em equino da raça Sela Espanhola com 10 anos de idade. A seta na figura 3a denota a área de liquefação enzimática com prolapso de íris, resultado da contaminação associada entre *Streptococcus* spp. e fungos. A Figura 3b indica o momento do pós-operatório, após a excisão do prolapso e posterior sutura da córnea com fio absorvível 6.0 e posterior cobertura da área lesionada com o biomaterial e recobrimento de terceira pálpebra como suporte.

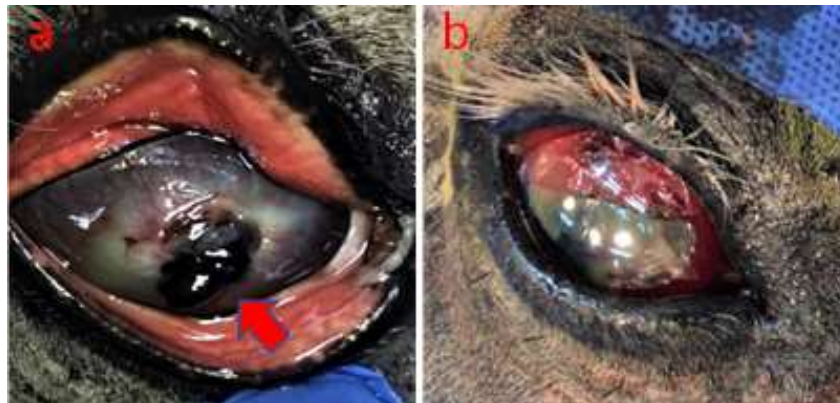


Figura 3: Imagens do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com o biomaterial congelado: a) apresentação do caso, presença de edema de córnea, vascularização em padrão arborizado, hipopion e a seta indicando o prolapso de íris; b) momento do pós-cirúrgico, com recobrimento da membrana suturada.

5.8.3 Tratamento 3

A Figura 4 exibe as imagens do tratamento utilizando a membrana amniótica desidratada, (AMNd) em cavalo da raça Sela Espanhola com idade de oito anos. A seta na figura 4a denota a área de liquefação enzimática, resultado da contaminação associada entre bactérias e fungos. A Figura 4b indica o momento do posicionamento da membrana (seta) sobre a ferida. A Figura 4c apresenta o recobrimento feito com a terceira pálpebra.



Figura 4: Fotografias do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com o biomaterial desidratado: a) apresentação do caso, presença de edema de córnea, vascularização em padrão arborizado em todo perímetro, região corada por fluoresceína denota a área de necrose liquefativa; b) momento do transcirúrgico com o posicionamento da membrana sobre a área lesionada; c) recobrimento com a terceira pálpebra.

5.8.4 Tratamento 4

A Figura 5 exibe as imagens do tratamento controle em que não foi utilizada a membrana amniótica como biomaterial. Animal da raça Quarto de Milha com três anos de idade, foi acometido por lesão corneana em queratomalácia decorrente de contaminação associada entre fungos e bactérias do saco conjuntival. A Figura 5a (seta) mostra a lesão. A Figura 5b indica o momento do pós-operatório pelo recobrimento com a terceira pálpebra, sem a colocação de biomaterial para tratamento.

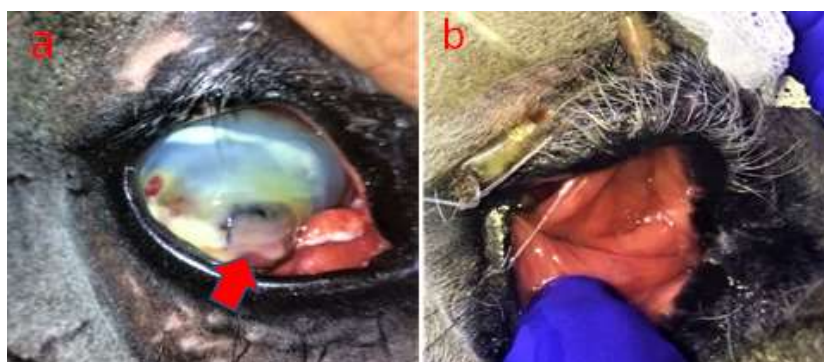


Figura 5: Fotografias do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento apenas com a terceira pálpebra: a) presença de edema de córnea, hipopion, hifema e sinéquia anterior indicada pela seta; b) momento do transcirúrgico com apenas a realização do recobrimento da terceira pálpebra.

5.8.5 Protocolo para utilização da membrana AMNTx e AMNn

Nos protocolos AMNTx, as cirurgias foram realizadas em centro cirúrgico. Os animais receberam anestesia geral inalatória e foram colocados em decúbito lateral. Naqueles que receberam o biomaterial descelularizado (AMNTx), o posicionamento do cirurgião é visto na figura 6a. A membrana foi fixada à córnea por meio de sutura sobre a lesão, utilizando-se um fio de sutura absorvível Ethicon Vicryl® 7.0, como observado na Figura 6b. As Figuras 6c e 6d demonstram os detalhes da anestesia geral volátil e do decúbito lateral do animal, respectivamente.



Figura 6: Detalhes da anestesia geral volátil e do decúbito lateral dos animais que receberam o biomaterial descelularizado: a) posicionamento do cirurgião; b) detalhe da fixação da membrana com fio de sutura absorvível 7.0; c) detalhe do sistema de anestesia volátil; d) detalhe do decúbito lateral do animal na mesa cirúrgica.

Nos animais que receberam a membrana AMNn, o posicionamento do cirurgião é visto na figura 7a. A Figura 7b demonstra os detalhes da anestesia geral volátil e do decúbito do animal.



Figura 7: Detalhes da anestesia geral volátil e do decúbito lateral dos animais que receberam a membrana AMNn: a) posicionamento do cirurgião; b) posicionamento do animal em decúbito lateral e detalhe do sistema de anestesia.

5.8.6 Protocolo de recobrimento de pálpebras para utilização das membranas AMNd e controle

Todos os animais que receberam o tratamento com as membranas AMNd e controle utilizaram o mesmo tipo de procedimento cirúrgico. O procedimento foi realizado na estação quadrupedal, com os animais recebendo sedação endovenosa, bloqueio regional dos nervos auriculopalpebral, supraorbitário e anestesia local da terceira pálpebra e da córnea. A membrana foi colocada recobrindo todo o bulbo do olho, sem a utilização de sutura. Detalhes do procedimento nas Figuras 8a e 8b. A seta da imagem da Figura 8c demonstra o posicionamento da membrana e a Figura 8d o recobrimento com a terceira pálpebra. No animal controle, a diferença é que este não recebeu membrana, só o recobrimento da terceira pálpebra.

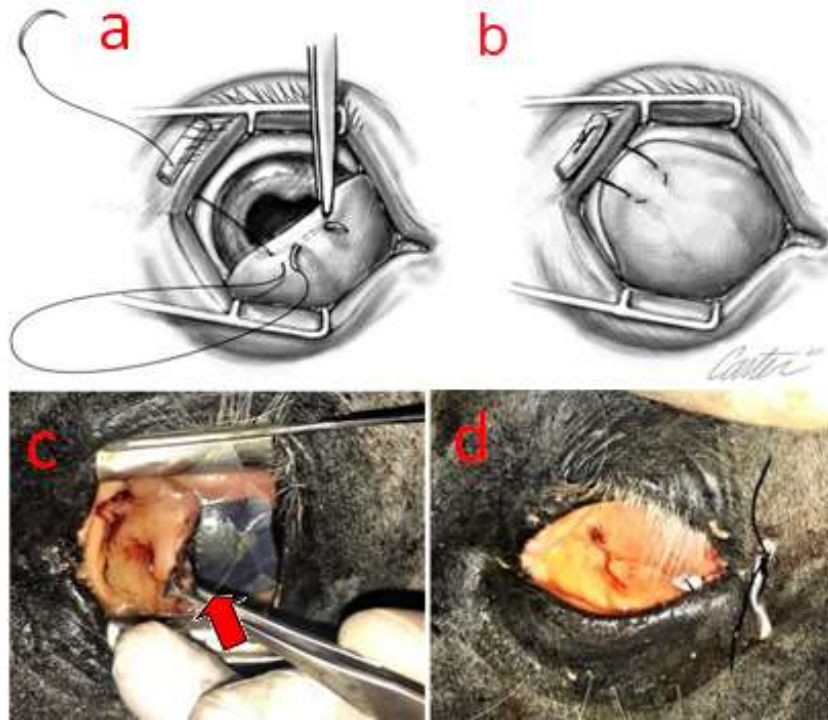


Figura 8: Detalhes do procedimento cirúrgico: a e b) Imagens esquemáticas da técnica de recobrimento (Fonte: Ollivier, 2005); c) Fotografia do preparo do recobrimento e posicionamento da membrana (seta vermelha); d) Fotografia do recobrimento concluído.

6 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir tratam da caracterização macroscópica pelo tipo de reparo utilizado em cada um dos tratamentos utilizando-se os três tipos de biomateriais estudados, a membrana descelularizada (AMNTx), a membrana normal congelada (AMNn), a membrana desidratada (AMNd) e com o caso controle, que não recebeu tratamento com membrana. Em seguida, são observadas comparações entre os resultados de cada olho reparado, com os tempos de reparo de sete semanas. Foram observados o tamanho e a localização da área de tecido de cicatrização formado, quantidade e localização de neovascularização e superfície de córnea normal preservada.

6.1 REPARO CORNEANO COM A UTILIZAÇÃO DA AMTx

A Figura 9 exhibe o resultado da utilização do âmnio descelularizado no reparo da lesão. A Figura 9a denota a imagem do olho do animal logo após a cirurgia. A Figura 9b apresenta o registro temporal da evolução da recuperação da área lesionada decorridas sete semanas. Pode-se observar um olho calmo, apresentando a área central da córnea com tecido de granulação em fase ativa, com neovascularização partindo do limbo na região entre 4 e 9 horas. A região do entorno apresenta leucoma cicatricial organizado periférica da região da córnea transparente.

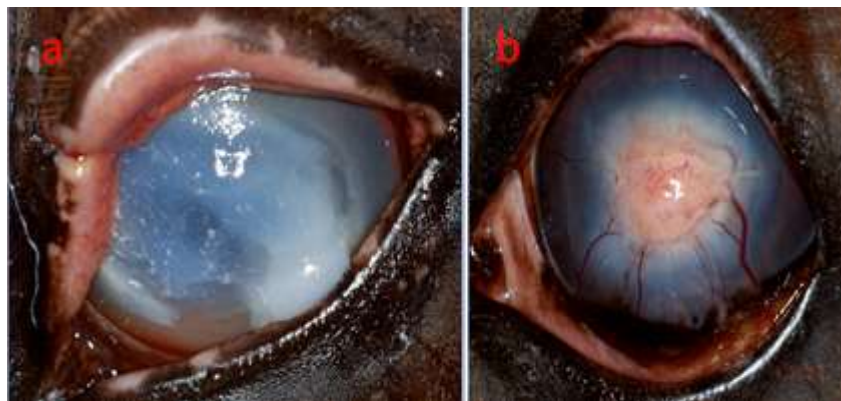


Figura 9: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com âmnio descelularizado oriundo da MAE: a) apresentação do caso. Nota-se presença de área de tecido corneano em necrose liquefativa, b) imagem da recuperação decorrido o período de sete semanas. Nota-se, leucoma na porção axial da córnea e presença de vasos superficiais em padrão arborizado. Observar área periférica transparente, com visualização da íris, que remete à organização estromal no padrão ortogonal e fisiológico da córnea.

6.2 REPARO CORNEANO COM A UTILIZAÇÃO DA AMNn

A Figura 10 representa o Tratamento 2, que teve a utilização do âmnio AMNn, como biomaterial utilizado no reparo da superfície afetada. A Figura 10a exibe a lesão inicial da córnea com o prolapso de íris e circundado por área afetada por *melting* (seta). A Figura 10b apresenta o registro temporal da evolução da recuperação da área lesionada decorridas sete semanas. Observa-se um olho calmo, apresentando a área central da córnea com tecido de granulação subepitelial em fase ativa, na região onde foi realizado o reparo da córnea. A região do entorno apresenta tecido cicatricial já resolvido e a região mais externa próxima ao limbo com aparência normal, com o detalhe da pupila dilatada farmacologicamente para prevenção de sinéquia posterior. Presença de neovascularização em todo o perímetro da lesão, com os vasos partindo do limbo para o centro do olho.

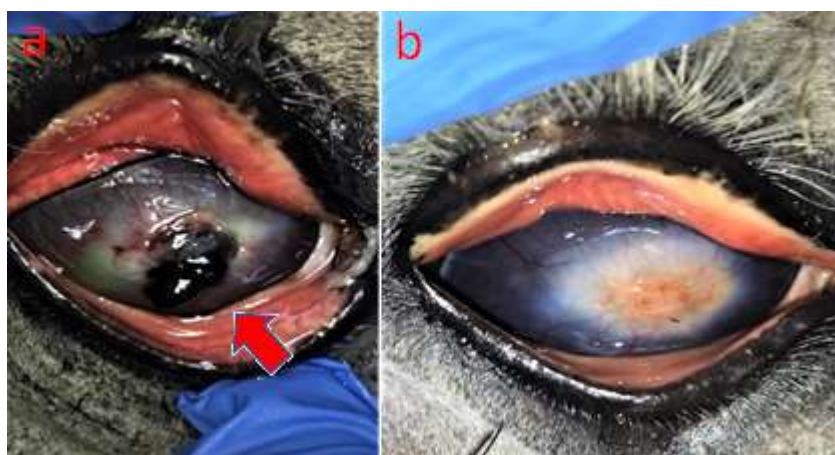


Figura 10: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com âmnio congelado: a) imagem do olho a apresentação e detalhe (seta) do prolapso de íris; b) resultado após sete semanas, reparo da córnea, com presença de cicatriz na região axial da córnea e vasos superficiais (padrão arborizado) em todo perímetro. Pode-se observar que a área periférica está transparente, com visualização da íris, apresentando-se no padrão ortogonal e fisiológico da córnea.

6.3 REPARO CORNEANO COM A UTILIZAÇÃO DA AMNd

A Figura 11 exibe o caso clínico 3 de ulceração de córnea, também com a presença de *melting*, no qual o biomaterial AMNd foi empregado. Utilizou-se a técnica de recobrimento com a terceira pálpebra sobre a região lesionada para estabilizar a membrana na posição. A Figura 11a mostra o olho com a lesão inicial e o recobrimento com a membrana. A Figura 11b

mostra o detalhe da recuperação decorridas sete semanas. Observa-se um olho calmo, com a área da córnea central com presença de tecido cicatricial em fase ativa, presença de pouca neovascularização no perímetro da lesão nas posições de 12, 2, 6 e 7 horas. A região da córnea que circunda a lesão mantém sua aparência normal com o epitélio preservado e transparente.

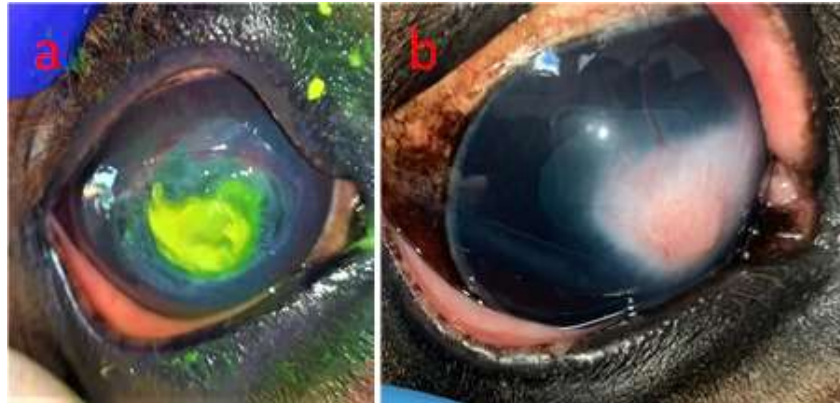


Figura 11: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia por recobrimento com âmnio desidratado: a) imagem do olho a apresentação com o detalhe da lesão realçada por fluoresceína; b) imagem da recuperação decorridas sete semanas. Nota-se, leucoma na porção axial da córnea e presença de poucos vasos superficiais. Observar área periférica transparente que remete à organização estromal no padrão ortogonal e fisiológico da córnea.

6.4 REPARO CORNEANO APENAS COM O RECOBRIMENTO DE TERCEIRA PÁLPEBRA, CONTROLE

A Figura 12 apresenta o tratamento 4. A lesão era caracterizada por ulceração de córnea e presença de áreas de *melting*, em que nenhum tipo de biomaterial foi utilizado no tratamento, apenas o recobrimento com a terceira pálpebra sobre a região lesionada. A Figura 12a apresenta a lesão inicial. A imagem mostrada na Figura 12b foi obtida com sete semanas após procedimento, denota-se a extensa área de metaplasia onde o tecido cicatricial substituiu a região recoberta anteriormente pelo epitélio corneano.



Figura 12: Fotografia do tratamento de lesão ocular em queratomalácia apenas com recobrimento da terceira pálpebra: a) reparo controle, sem membrana, imagem do olho a apresentação; b) imagem da recuperação decorridas sete semanas, detalhe do crescimento de tecido cicatricial sobre toda superfície da córnea.

6.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE OS GRUPOS

6.5.1 Uso de AMNTx comparado ao uso de AMNn

Comparando-se os resultados obtidos na reparação tecidual do olho que recebeu a membrana descelularizada AMNTx em contraste àquele obtido com o uso de membrana congelada AMNn, percebe-se que nos dois casos há presença de área da córnea central, coberta por tecido cicatricial, e área de córnea normal preservada no entorno. Há também, em ambos, a presença de neovascularização no entorno da lesão, como se vê nas Figuras 13a (AMNTX) e Figura 13b (AMNn).

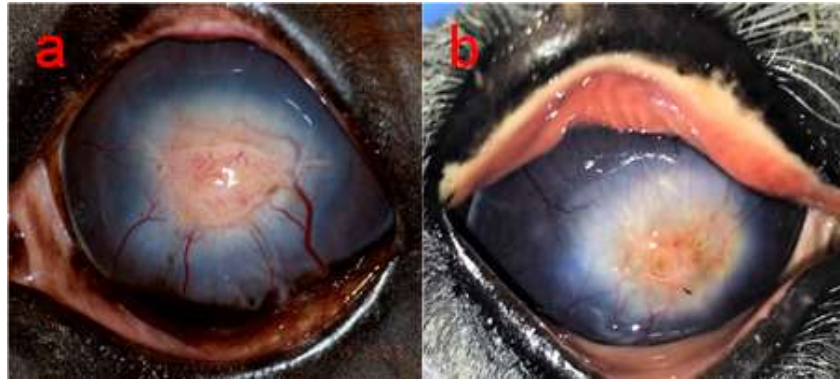


Figura 13: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio descelularizado versus âmnio congelado: a) reparo com AMNTx com sete semanas. Nota-se, leucoma na porção axial da córnea e presença de vasos superficiais (padrão arborizado em todo o perímetro. A área periférica da córnea é transparente, com visualização da íris. b) Fotografia da recuperação com âmnio congelado, decorridas sete semanas do reparo com AMNn. Pode-se observar também a presença de leucoma na porção central da córnea, vasos superficiais com o mesmo padrão arborizado. A área de córnea periférica também se apresenta transparente no padrão ortogonal e fisiológico da córnea com a visualização da íris.

6.5.2 Uso de AMNTx comparado ao uso de AMNd

A comparação entre os resultados obtidos com utilização da membrana descelularizada e a desidratada demonstra, em ambos os casos, área central coberta por tecido cicatricial com a presença de neovascularização no perímetro da lesão e área de córnea normal no entorno que se estende até o limbo. A Figura 14a (AMNTX) evidencia uma quantidade maior de vasos que na Figura 14b (AMNd).

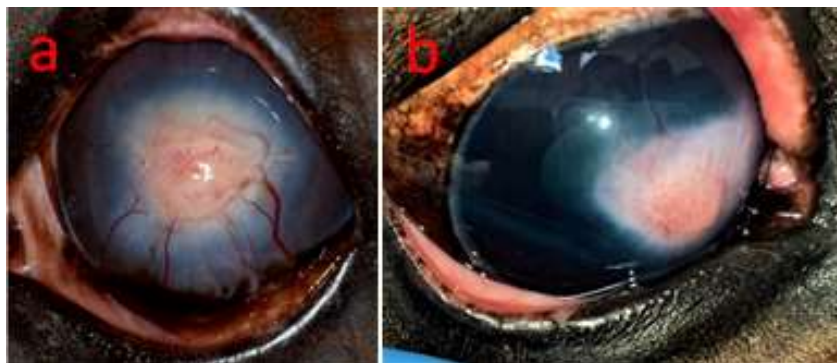


Figura 14: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio descelularizado versus âmnio desidratado: a) reparo com AMNTx com sete semanas. Nota-se, leucoma na porção axial da córnea e presença de vasos superficiais (padrão arborizado em todo o perímetro). Área periférica da córnea transparente, com visualização da íris. b) recuperação com âmnio desidratado, decorridas sete semanas do reparo com AMNn. Pode-se observar a presença de leucoma na porção central da córnea, presença de poucos vasos superficiais. A área de córnea periférica se apresenta transparente no padrão ortogonal e fisiológico da córnea com a visualização da íris.

6.5.3 Uso de AMNTx comparado ao controle

A comparação entre os resultados obtidos com a utilização da membrana descelularizada e o controle demonstra na utilização da membrana (AMNTX) que a área central foi coberta por tecido cicatricial com a presença de neovascularização e área de córnea normal no entorno até o limbo figura 15a. Por outro lado, o controle (sem membrana) mostra que a área total da córnea foi afetada por metaplasia e está recoberta por tecido cicatricial figura 15b.



Figura 15: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio descelularizado versus o controle: a) reparo com AMNTx com sete semanas. Nota-se, leucoma na porção axial da córnea e presença de vasos superficiais (padrão arborizado em todo o perímetro). Área periférica da córnea transparente, com visualização da íris. b) recuperação do controle, decorridas sete semanas do reparo com AMNn. Presença da cobertura total da córnea por tecido cicatricial.

6.5.4 Uso de AMNn e AMNd comparados ao controle

A comparação entre os resultados obtidos com a utilização da membrana normal congelada (AMNn), a membrana desidratada (AMNd) e o controle é descrita a seguir. Observou-se que os biomateriais foram capazes de produzir reparos recobertos por tecido cicatricial com a presença de neovascularização e área de córnea normal no entorno até o limbo na área das lesões (Figuras 16a e 16b). No entanto, no controle (sem membrana) evidencia-se área total da córnea acometida de metaplasia e recoberta por tecido cicatricial (Figura 16c).



Figura 16: Fotografia da comparação dos tratamentos com âmnio congelado versus âmnio desidratado versus o controle: a) reparo com AMNTx com sete semanas. Nota-se, leucoma na porção axial da córnea e presença de vasos superficiais (padrão arborizado em todo o perímetro). A área periférica da córnea é transparente, com visualização da íris. b) Fotografia da recuperação com âmnio desidratado, decorridas sete semanas do reparo com AMNn. Pode-se observar também a presença de leucoma na porção central da córnea, presença de poucos vasos superficiais. A área de córnea periférica também se apresenta transparente no padrão ortogonal e fisiológico da córnea com a visualização da íris) reparo com AMNn; b) reparo com AMNd; c) reparo controle.

6.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

6.6.1 DAPI e faloidina em AMNd e AMNn

A primeira amostra analisada e utilizada para a validação dos protocolos foi de membrana amniótica desidratada (AMNd) e outra congelada (AMNn), a partir da coloração com DAPI (visualização de núcleos) e faloidina (marcação de filamentos de actina do citoesqueleto). As imagens captadas pelo microscópio de fluorescência invertido (epifluorescência), com objetiva de 20 vezes, revelaram que as estruturas celulares se mantêm na membrana, mesmo após o tratamento para obtenção do biomaterial, isto é, foi possível observar a integridade tanto do citoesqueleto quanto dos núcleos.

Nas Figuras 17a e 17c é possível observar o arranjo tridimensional do citoesqueleto das células epiteliais e dos fibroblastos, na AMNn e AMNd, respectivamente. As Figuras 17b e 17d mostram o detalhe dos núcleos das células epiteliais e dos fibroblastos.

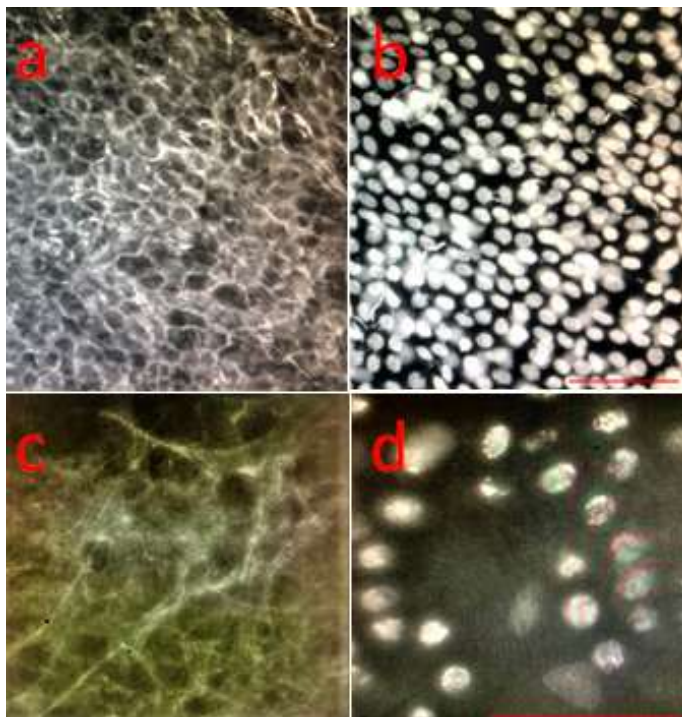


Figura 17: Arranjo tridimensional do âmnio desidratado: a) imagem do arranjo do citoesqueleto da camada plana de células epiteliais; b) imagem dos núcleos da camada celular mostrada em “a”; c) imagem do arranjo tridimensional do citoesqueleto dos fibroblastos; d) imagem tridimensional, no detalhe, dos núcleos dos fibroblastos. Barra vermelha 50 microns.

6.6.2 Distribuição da laminina

As imagens a seguir são representativas dos resultados das análises das amostras da membrana amniótica para presença da laminina. As imagens foram capturadas por microscopia de fluorescência, utilizando-se objetiva de 63 vezes. As proteínas apresentam-se coradas em verde e o citoesqueleto em vermelho, enquanto os núcleos encontram-se em azul, de acordo com os anticorpos já listados na Tabela 2 anterior.

6.6.2.1 Observação de laminina em âmnio congelado – AMNn

As imagens capturadas das amostras da MAE congelada podem ser observadas na Figura 18. A imagem tridimensional da Figura 18a mostra o arranjo em forma de lençol junto ao epitélio, região de maior concentração de laminina ao longo de todo o tecido. Observa-se ainda expressão difusa de laminina no restante do tecido (Figura 18b). O detalhe da organização do epitélio e da distribuição do restante das células e citoesqueleto do tecido pode ser visto na Figura 18c.

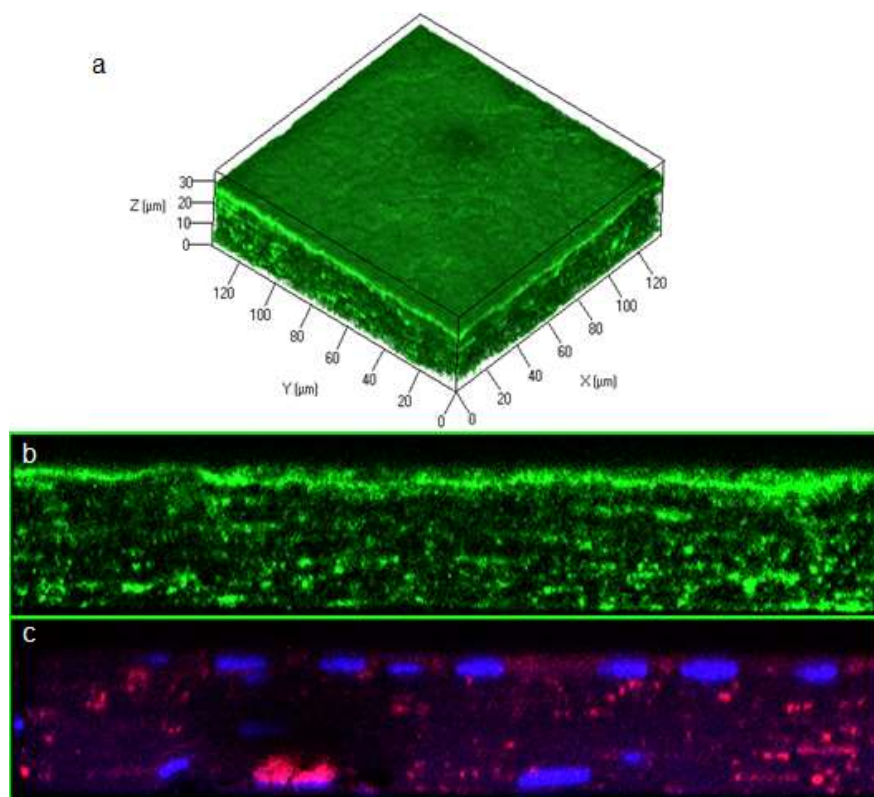


Figura 18: Imagens tridimensional e plana de âmnio congelado: a) imagem tridimensional do arranjo de distribuição da laminina ao longo do tecido; b) imagem plana do arranjo de distribuição da laminina ao longo de todo tecido, demonstrando maior concentração superficial próximo ao epitélio; c) imagem plana demonstrando arranjo de distribuição das células; citoesqueletos em vermelho, núcleos em azul ao longo do tecido.

A Figura 19 apresenta maiores detalhes da distribuição da proteína com imagens do topo, meio e fundo do tecido. Essa distribuição é justificada pela maior concentração de células, na região do topo onde está o epitélio, e menor ao longo do restante do biomaterial pela distribuição difusa de células. A Figura 19a é a representação da expressão da laminina isoladamente em verde. Pode-se observar a variação da quantidade da proteína ao longo da

espessura de todo o tecido. A Figura 19b, é a imagem do corte relativo ao topo do biomaterial, com o detalhe da distribuição maciça da proteína. A Figura 19c apresenta a imagem na região central onde a diminuição da quantidade da proteína é evidente. Já a Figura 19d apresenta a distribuição difusa na região do fundo do tecido. Os núcleos das células estão corados em azul pelo DAPI, o citoesqueleto pela Faloidina, em vermelho e a proteína laminina em verde.

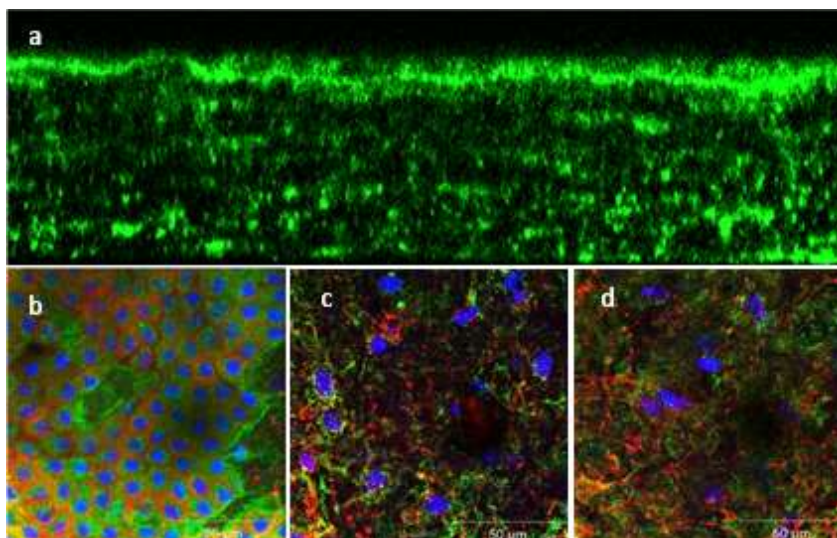


Figura 19: Distribuição de proteína em âmnio congelado: a) Montagem plana mostrando o arranjo de distribuição da laminina no tecido. Observa-se maior concentração da proteína no topo, junto ao epitélio e difusa ao longo do biomaterial; b) imagem do arranjo superficial do lençol de laminina com o núcleo das células e citoesqueleto; c) imagens do arranjo de distribuição da laminina no meio do material também com detalhes do citoesqueleto e núcleos; d) imagem da distribuição da proteína no fundo do biomaterial com detalhe para o citoesqueleto e núcleos das células.

6.6.2.2 Observação de laminina em âmnio descelularizado – AMNTx

A imagem tridimensional da amostra de âmnio descelularizado (Figura 20) revelou não haver formação de tapete homogêneo, como nas amostras anteriores de laminina na região do topo do biomaterial. Essa deformação na arquitetura superficial é resultado do tratamento de descelularização do biomaterial para a extração do epitélio, o que certamente interferiu na distribuição na placa de laminina. O detalhe desta distribuição pode ser observado na Figura 20 a seguir.

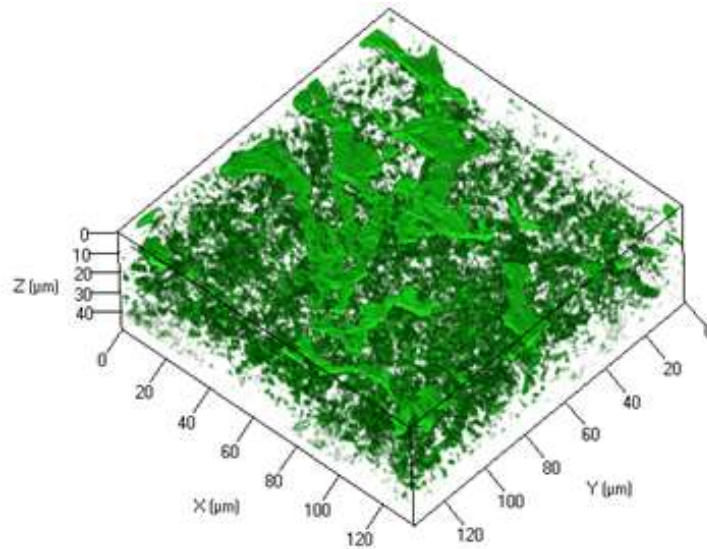


Figura 20: Imagem tridimensional de âmnio descclularizado. Arranjo de distribuição da LM demonstrando a concentração superficial irregular devido ao processo de descclularização, sem a presença de células epiteliais (topo).

A Figura 21a demonstra a distribuição da proteína ao longo de todo o tecido. Observar a falha na região superficial. A Figura 21b representa a imagem da falha na distribuição de laminina no topo do tecido. Por outro lado, as Figuras 21c e 21d apresentam a distribuição difusa no fundo e no meio e do tecido, respectivamente.

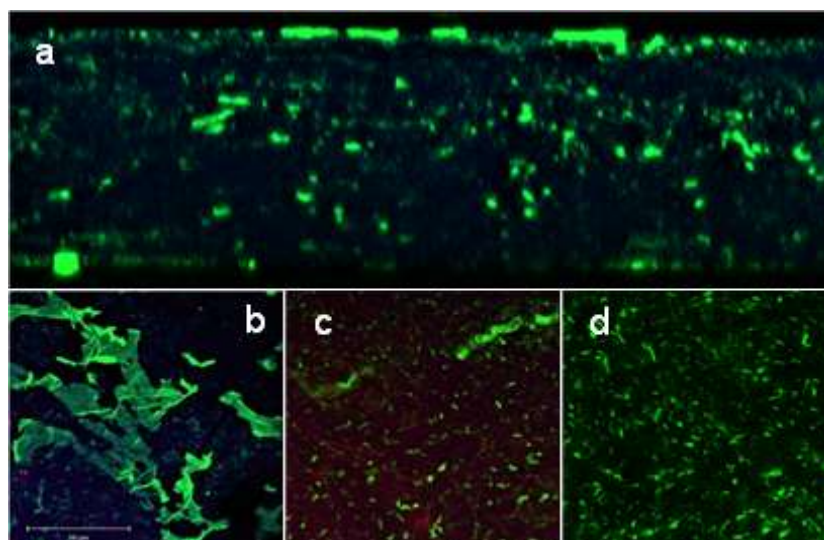


Figura 21: Distribuição da proteína em âmnio descclularizado: a) imagem do arranjo de distribuição da LM ao longo do tecido; b) imagem plana do arranjo de distribuição da LM, demonstrando a concentração superficial irregular devido ao processo de descclularização, sem a presença de células epiteliais, (topo); c) imagem da distribuição difusa da LM na parte inferior do tecido; d) imagem da distribuição difusa da LM na parte intermediária do tecido.

6.6.2.3 Observação de laminina em âmnio desidratado – AMNd

A imagem tridimensional (Figura 22) mostra em detalhe a distribuição no topo do tecido, marcada pela presença de sulcos. A presença desses sulcos na parte superficial do tecido é atribuída ao padrão presente na estrutura do TNT utilizado no preparo do biomaterial (Figuras 22a e b). A maior concentração é observada no topo, no entorno do epitélio. A distribuição torna-se difusa ao longo do restante do tecido, o que pode ser observado na Figura 22c.

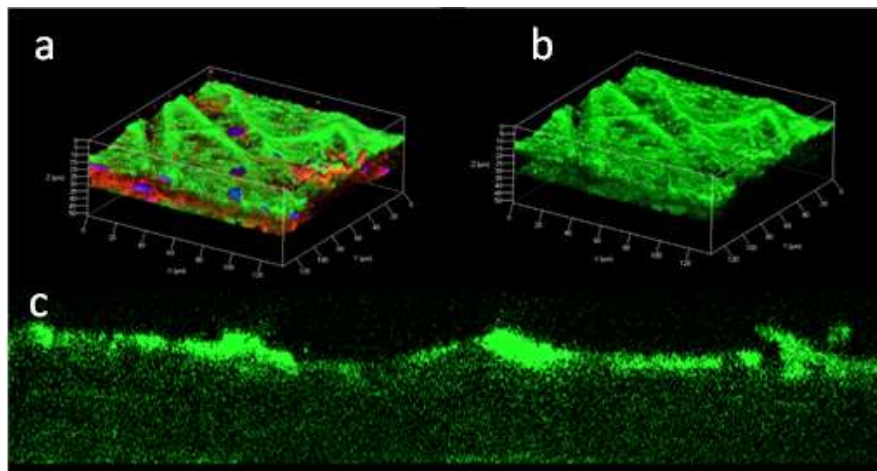


Figura 22: Imagem tridimensional de âmnio desidratado: a) Arranjo de distribuição da laminina no tecido, com os núcleos das células (em azul) e os filamentos de actina do citoesqueleto (em vermelho); b) imagem tridimensional do arranjo de distribuição da laminina ao longo de todo o tecido isoladamente; c) imagem plana do arranjo da laminina ao longo da espessura do tecido demonstrando a maior concentração na região superficial, próximo ao epitélio. Nas imagens também é possível observar-se o padrão de sulcos escavados na superfície, resultado do processo de desidratação utilizando o TNT.

Outros detalhes dos sulcos, a estruturas do citoesqueleto e núcleos e o arranjo da laminina ao longo de todo o tecido podem ser vistos na figura 23. A Figura 23a mostra o arranjo da LM na superfície do tecido e a disposição dos núcleos das células. A Figura 23b mostra, no detalhe, a arquitetura dos sulcos no topo do tecido, modificada pelo tratamento de desidratação utilizando o TNT. Nas Figuras 23c e 23d é possível observar os detalhes característicos dos arranjos das células com a laminina e da laminina isoladamente, respectivamente, a partir da região subepitelial até o fundo do tecido.

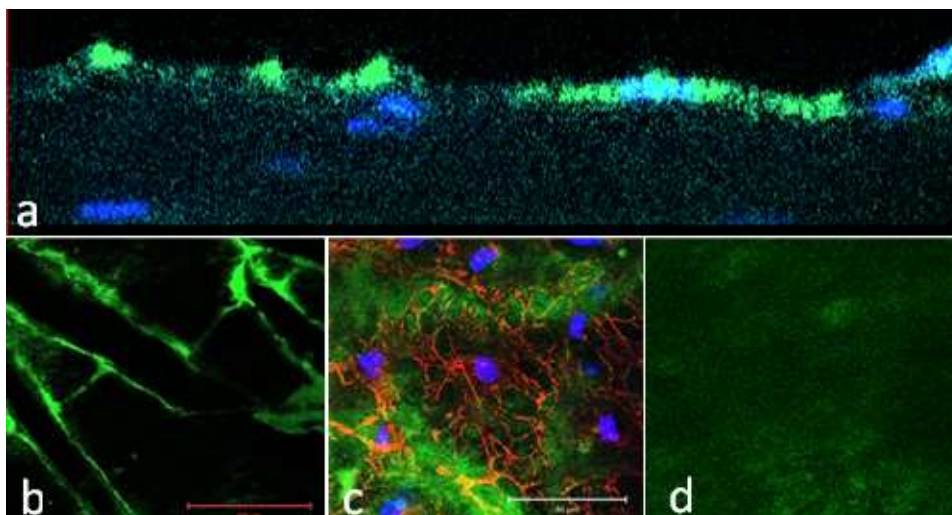


Figura 23: Arranjo da distribuição da laminina em âmnio desidratado: a) observa-se maior concentração na região superficial próximo ao epitélio e distribuição difusa a partir da região subepitelial; b) imagem do arranjo de distribuição da laminina na região superior do tecido, denotam-se os detalhes dos sulcos formados pelo processamento em TNT; c) detalhe característico da distribuição da laminina em verde, os filamentos de actina do citoesqueleto, em vermelho, e núcleo das células epiteliais, em azul nas regiões média e profunda do tecido; d) detalhe apenas da distribuição difusa da laminina à partir da região subepitelial do tecido.

6.7 EXPRESSÃO DA FIBRONECTINA

Nas amostras da MAE analisadas para presença da fibronectina, a proteína se apresenta corada em verde, o citoesqueleto em vermelho e o núcleo das células em azul.

6.7.1 Observação de fibronectina em âmnio congelado – AMNn

Na imagem tridimensional da amostra de âmnio congelado (Figura 24), observa-se a formação de lençol de FN na região do topo do biomaterial na região do epitélio. Não são vistas alterações atribuíveis ao processamento para obtenção do material. A distribuição ao longo do restante do tecido também pode ser observada. Os detalhes desta distribuição também são exibidos na Figuras 25 a, b, c e d.

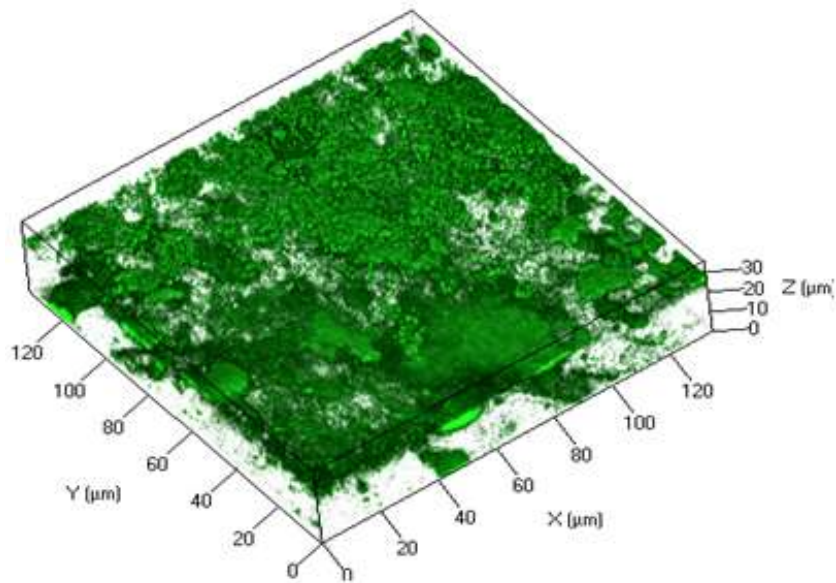


Figura 24: Imagem tridimensional do arranjo de distribuição da FN no tecido.

A montagem plana da Figura 25a demonstra a distribuição da proteína Fibronectina, com o detalhe para o posicionamento dos núcleos das células ao longo de todo o tecido. A Figura 25b apresenta o detalhe da distribuição de fibronectina no topo do tecido, demonstrando a concentração superficial no entorno do epitélio. A imagem da Figura 25c apresenta a distribuição escassa e difusa de fibronectina no meio do tecido. A imagem da Figura 25d apresenta a distribuição escassa de fibronectina no fundo do tecido onde observa-se pouca proteína.

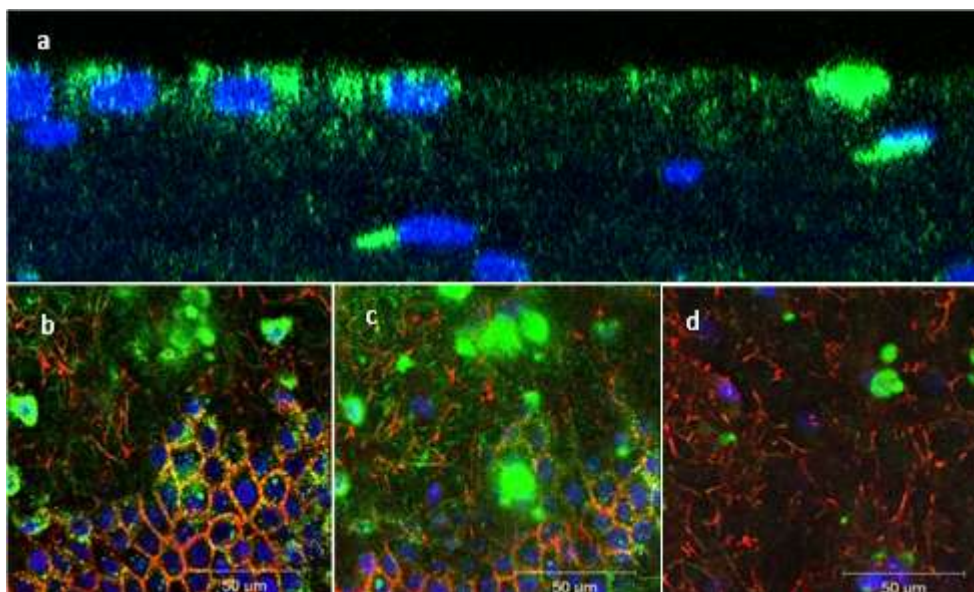


Figura 25: Distribuição de fibronectina em âmnio congelado: a) imagem plana do arranjo de distribuição de fibronectina ao longo da espessura do tecido, demonstrando a concentração superficial no entorno do epitélio, pouca distribuição na região central e fundo, em detalhe a posição dos núcleos das células em azul; b) imagem do arranjo de distribuição de fibronectina em verde no topo do tecido, demonstrando a concentração no entorno do epitélio, núcleos em azul, citoesqueleto em vermelho; c) imagem da distribuição da proteína na parte intermediária do tecido em verde, com a demarcação do núcleo das células em azul, citoesqueleto em vermelho; d) imagem da distribuição de fibronectina na parte inferior do tecido, detalhes dos núcleos e citoesqueleto.

6.7.2 Observação de fibronectina em âmnio descelularizado – AMNTx

As imagens tridimensional e plana da amostra de âmnio descelularizado (Figuras 26a e 26b) demonstram a distribuição da proteína no topo e ao longo de todo o tecido, observar a falha na região superficial, o que é característico do preparo do biomaterial, pelo procedimento de extração do epitélio com o uso da protease tripsina.

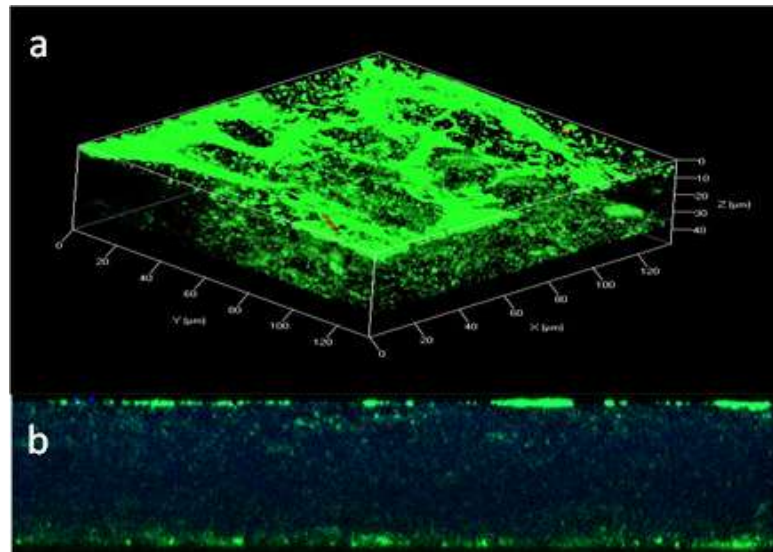


Figura 26: Imagens tridimensional e plana de âmnio descelularizado: a) imagem tridimensional do arranjo de fibronectina no tecido, observa-se a distribuição desordenada devido ao processo de descelularização do tecido; b) imagem da distribuição difusa da FN ao longo do tecido

As imagens planas seguintes complementam os detalhes da distribuição no tecido. As falhas na distribuição de fibronectina no topo do tecido podem ser observadas nas Figuras 27a. Na imagem do painel 27b observa-se com clareza o padrão fibrilar de disposição da fibronectina, evidenciado pela remoção das células. As Figuras 27c e 27d apresentam a distribuição difusa no fundo e no meio e do tecido, respectivamente.

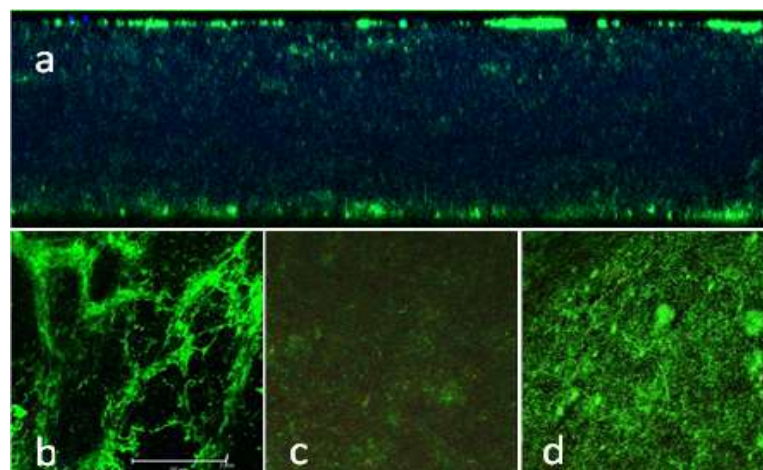


Figura 27: Distribuição de fibronectina em âmnio descelularizado: a) imagem do arranjo de distribuição da FN ao longo do tecido; b) imagem da distribuição da FN na região do topo; c) imagem da distribuição da FN na região média do tecido; d) imagem da distribuição no fundo do tecido.

6.7.3 Observação de fibronectina em âmnio desidratado – AMNd

A imagem tridimensional (Figura 28a) revela a formação de um tapete homogêneo de FN no topo do biomaterial, contendo sulcos em sua estrutura devido ao tratamento de desidratação utilizando o TNT. O detalhe desta distribuição e a deformação na estrutura da matriz extracelular pode ser observado na Figura 28b. A Figura 28c mostra a imagem plana do arranjo de distribuição de FN ao longo da espessura do tecido, demonstrando a concentração superficial na região do epitélio e distribuição difusa de FN a partir da região subepitelial até o fundo do biomaterial.

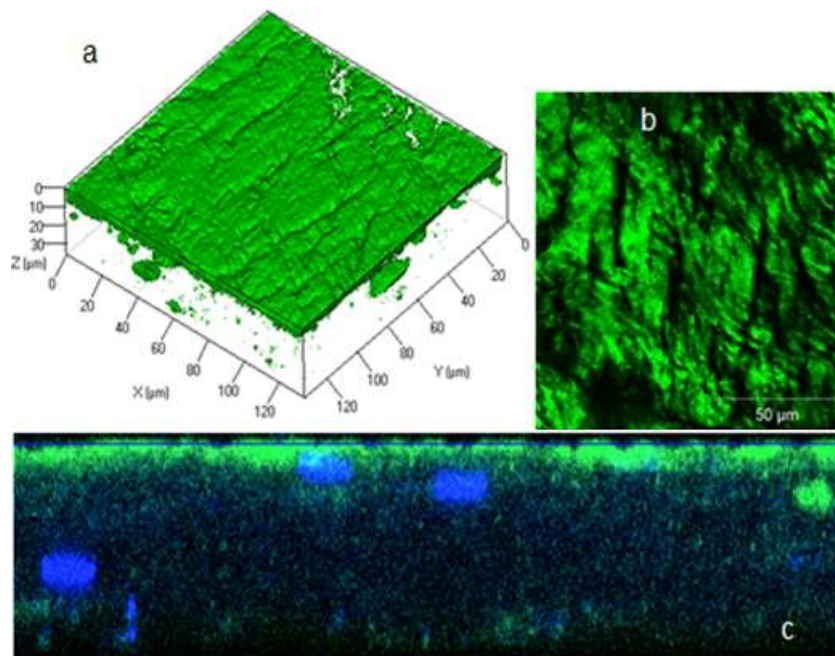


Figura 28: Distribuição da fibronectina em âmnio desidratado: a) imagem espacial do arranjo de distribuição da FN (verde), ao longo do tecido; b) imagem em detalhe do arranjo da FN na superfície, observar formação de sulcos; c) imagem plana do arranjo de distribuição de FN ao longo da espessura do tecido, demonstrando a concentração superficial na região do epitélio e distribuição difusa de FN a partir da região subepitelial até o fundo do biomaterial.

6.8 EXPRESSÃO DE COLÁGENO I

6.8.1 Observação de colágeno I em âmnio congelado – AMNn

A imagem tridimensional da amostra de âmnio congelado (Figura 29a) demonstra a formação do bloco homogêneo de COL I a partir da região do topo do biomaterial. Detalhes do

posicionamento das células e dos filamentos do citoesqueleto (em verde), bem como dos núcleos do epitélio (em azul) também podem ser observados. A arquitetura não foi afetada pelo tratamento para obtenção do biomaterial. A conformação do bloco uniforme pode ser vista no detalhe da Figura 29b.

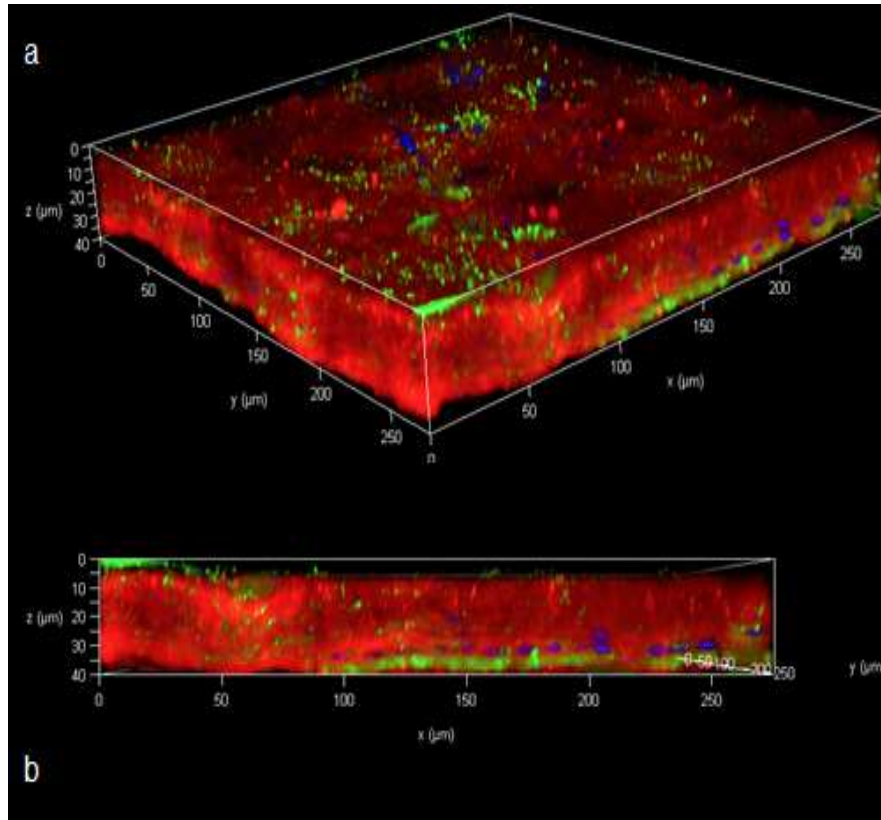


Figura 29: Distribuição de colágeno 1 em âmnio congelado: a) imagem tridimensional do arranjo de distribuição do COL I (em vermelho); b) imagem do arranjo de distribuição de COL I ao longo da espessura do tecido, demonstrando o bloco de distribuição a partir da região abaixo do epitélio até no fundo do biomaterial. Observar os núcleos das células em azul, filamentos de actina do citoesqueleto em verde.

6.8.2 Observação de colágeno I em âmnio descelularizado – AMNTx

A imagem tridimensional da amostra de âmnio descelularizado (Figura 30a) revela a formação de um bloco homogêneo de COL I na região a partir do topo até a base do biomaterial. A arquitetura superficial foi afetada pelo tratamento de descelularização do biomaterial para a extração do epitélio. A Figura 30b apresenta o detalhe da irregularidade superficial formada durante o preparo. Na Figura 30c pode-se observar que há uma distribuição praticamente uniforme de COL I e, também, a formação do bloco da proteína ao longo do biotecido.

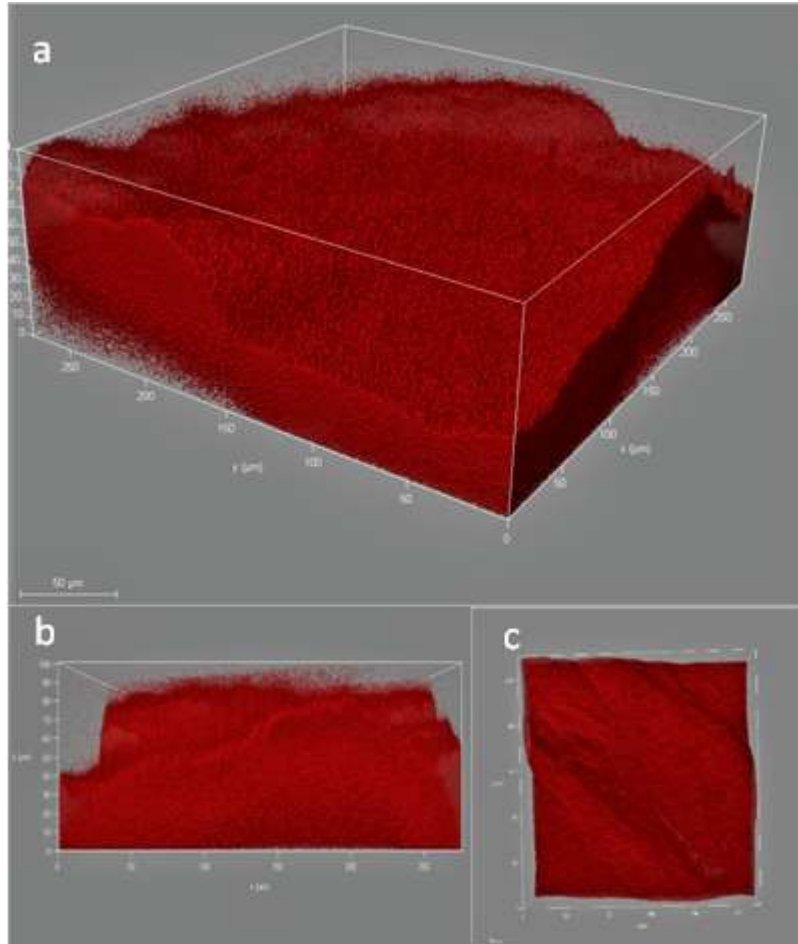


Figura 30: Distribuição de colágeno 1 em âmnio descelularizado: a) imagem espacial do arranjo de distribuição do COL I (em vermelho) b) imagem do arranjo e distribuição uniforme de COL I ao longo da espessura do tecido, demonstrando o bloco de distribuição a partir da região abaixo do epitélio até no fundo do biomaterial. c) imagem em detalhe do topo do biomaterial, denota-se as ondulações que correspondem a deformações do tecido durante o preparo.

6.8.3 Observação de colágeno I em âmnio desidratado – AMNd

As imagens da amostra de âmnio desidratado marcado para COL I por questões técnicas não foram obtidas. As possíveis explicações estão descritas na seção de Discussão.

6.9 DISTRIBUIÇÃO DE COL IV

6.9.1 Observação de colágeno IV em âmnio congelado – AMNn

As imagens 31a e 31b mostram o arranjo em formação de camadas homogêneas de COL IV em toda a extensão do biomaterial. Esta distribuição em camadas é esperada uma vez que o colágeno IV é um típico componente da lâmina basal, cuja estrutura supramolecular apresenta uma formação laminar ao invés de fibrilar. Há distribuição difusa na região central enquanto é possível observar-se a formação de um segundo tapete na região do fundo do tecido. Essa formação está localizada próximo a interseção entre as duas membranas, âmnio e córion.

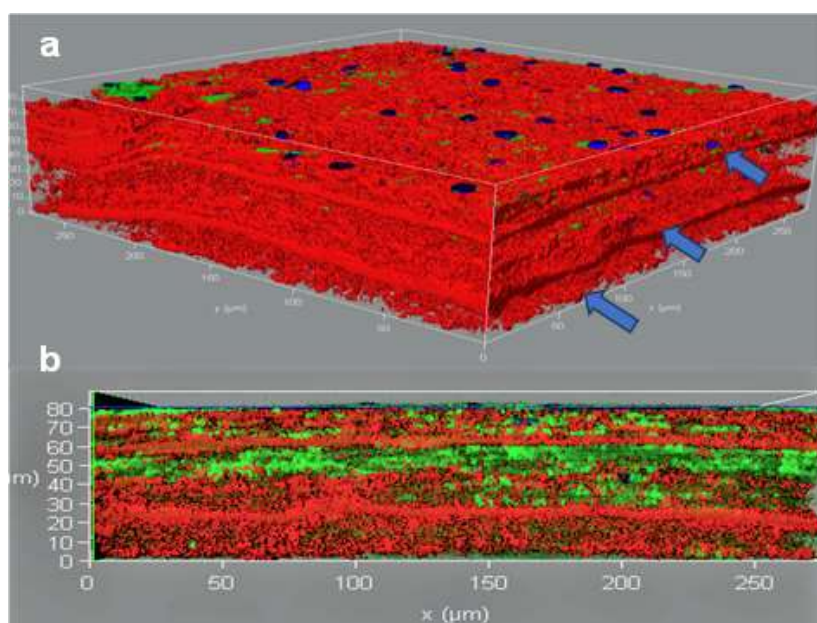


Figura 31: Distribuição de colágeno IV em âmnio congelado: a) imagem espacial e o arranjo da distribuição do COL IV (em vermelho), ao longo do tecido. As setas demonstram a distribuição da proteína em camadas estratificadas à partir do epitélio, b) imagem do arranjo de distribuição de COL IV ao longo da espessura do tecido, distribuição difusa na região central e formação de tapete homogêneo no fundo do biomaterial. Observar os núcleos das células em azul, filamentos de actina do citoesqueleto em verde.

A seguir são mostradas imagens do topo de uma reconstrução tridimensional de uma pilha de fatias ópticas confocais. A mesma pilha pode ser visualizada com a superposição das três cores ou apenas com o colágeno IV (vermelho). É possível perceber a continuidade e homogeneidade da camada laminar de colágeno IV à direita. Comparando-se com a imagem

das cores superpostas nota-se que a camada celular (núcleos e citoesqueletos) está posicionada sobre a lâmina de matriz extracelular. Na Figura 32a, os núcleos das células estão marcados em azul, o citoesqueleto em verde e colágeno em vermelho. Na Figura 32b é possível observar em detalhe o arranjo do colágeno IV.

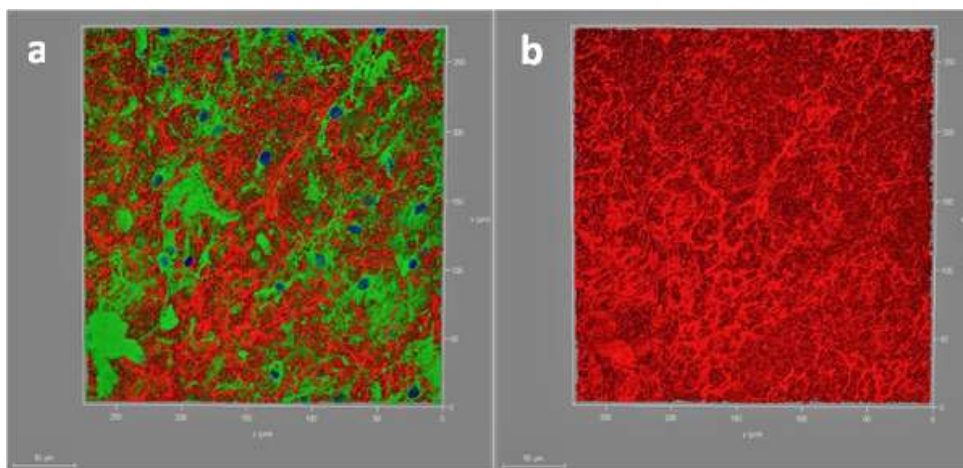


Figura 32: Reconstrução tridimensional da distribuição de colágeno IV em âmnio congelado: a) detalhes da distribuição de COL IV, em vermelho, no topo com o núcleo das células em azul e os filamentos de actina do citoesqueleto em verde; b) detalhe do COL IV (em vermelho) isoladamente no mesmo plano da imagem anterior.

6.9.2 Observação de colágeno IV em âmnio descelularizado – AMNTx

A imagem tridimensional da amostra de âmnio descelularizado (Figura 33a) não revela a formação de um tapete homogêneo de COL IV na região do topo do biomaterial, embora um padrão de distribuição laminar ainda possa ser observado. A arquitetura superficial foi afetada pelo tratamento de descelularização do biomaterial para a extração do epitélio. A degradação de parte das proteínas da matriz extracelular é esperada, uma vez que o processo de descelularização inclui o uso de uma protease (Tripsina). Inexiste formação aparente de um segundo tapete na região do fundo do tecido. Pode-se observar uma maior concentração da distribuição de COL IV na região central com relação ao topo e o fundo (Figura 33b) A Figura 33c evidencia o detalhe da localização do citoesqueleto da célula na região central, ausentes tanto no topo quanto no fundo do tecido.

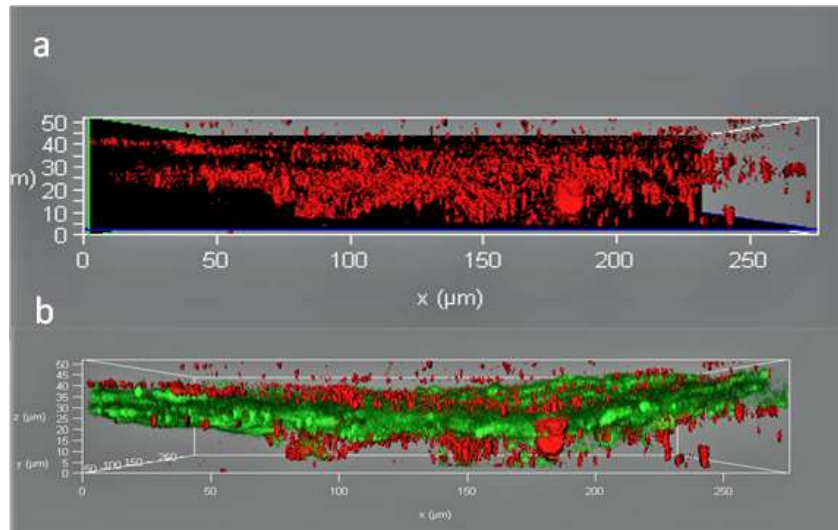


Figura 33: Distribuição de colágeno IV em âmnio descelularizado: a) imagem plana do arranjo de distribuição do COL IV (em vermelho); b) imagem da distribuição ao longo do material, observa-se as regiões do topo, central e formação no fundo do biomaterial. Detalhe em verde dos filamentos de actina do citoesqueleto

6.9.3 Observação de colágeno IV em âmnio desidratado – AMNd

A imagem tridimensional da amostra de âmnio desidratado, Figura 34a, mostra a formação de um tapete homogêneo de COL IV, na região do topo do biomaterial. A arquitetura não foi afetada pelo tratamento de desidratação sofrido para obtenção do biomaterial. Apresenta, ainda, a formação de um segundo tapete localizado próximo a interseção entre as duas membranas, âmnio e córion, na região do fundo do tecido. Na região central a distribuição se apresenta de forma bem difusa (Figura 34b).

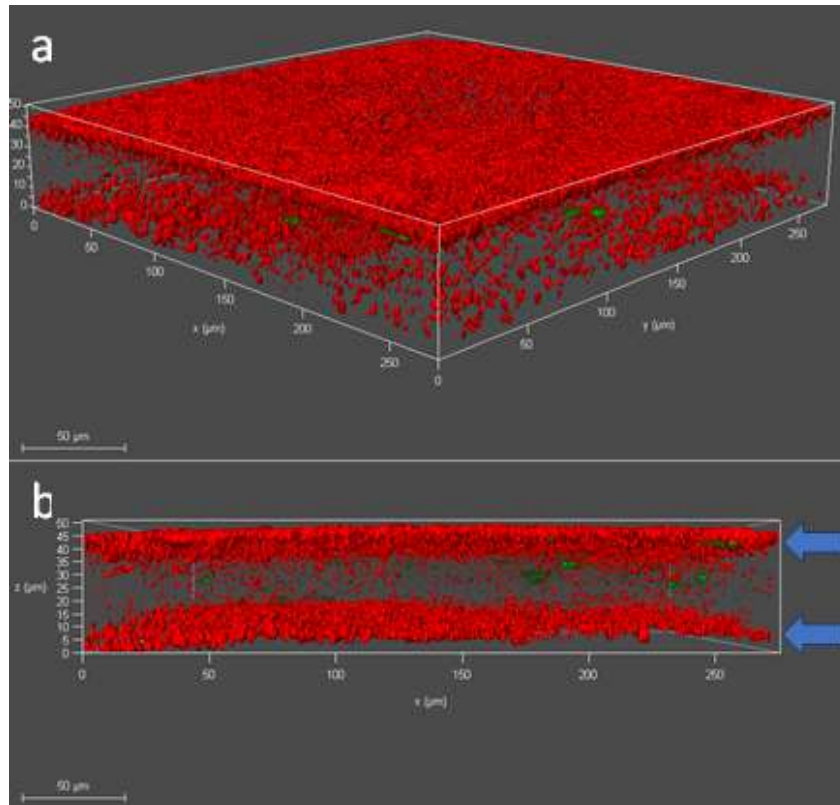


Figura 34: Imagem tridimensional de distribuição de colágeno IV em âmnio desidratado: a) imagem espacial do arranjo em tapete da distribuição do COL IV na superfície, b) imagem do arranjo de distribuição de COL IV ao longo da espessura do tecido, demonstrando a placa superficial junto ao epitélio, distribuição bem difusa na região central e formação de tapete homogêneo no fundo do biomaterial.

6.9.4 Comparação entre os biomateriais estudados

Com base nos critérios estabelecidos no item 5.6, foi criada uma tabela para representação dos resultados das concentrações da distribuição das proteínas analisadas ao longo da estrutura de cada tecido em função do tratamento de obtenção recebido por cada biomaterial. Os resultados do critério de avaliação foram categorizados como alta, média ou baixa concentração e são apresentados na Tabela 3. Com relação à concentração de laminina, a membrana AMNn foi classificada como alta quando comparada com as outras duas. A AMNd foi classificada como média e a AMNTx como apresentando baixa concentração.

Tabela 3: Avaliação subjetiva da distribuição das proteínas em função do tipo de tratamento do biomaterial

| Proteína avaliada | Congelamento | Desidratação | Descelularização |
|--------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| Laminina | alta | média | baixa |
| Fibronectina | média | alta | média |
| Colágeno I | alta | – | alta |
| Colágeno IV | alta | média / baixa | média / baixa |

Em relação à presença de fibronectina, a AMNd apresenta alta concentração quando comparada com as outras duas fontes, AMNn e AMNTx, que se apresentam com média concentração de fibronectina em suas estruturas.

O resultado da avaliação do colágeno tipo I foi semelhante aos achados supracitados e classificados como alta concentração da presença da proteína, para ambos os tecidos – AMNn e AMNd. A avaliação da AMNTx apresentou resultado inconclusivo e, portanto, não foi classificado.

O resultado da análise do colágeno tipo IV apresentou-se alta para a AMNn e classificada como média / baixa nos outros dois biomateriais – AMNd e AMNTx.

7 DISCUSSÃO

Um achado importante nesse trabalho foi a manutenção da integridade das estruturas teciduais, tanto na região da membrana basal quanto da MEC, onde se observa a presença dos núcleos e citoesqueletos celulares, mesmo após os biomateriais AMNn e AMNd terem sofrido os tratamentos para sua obtenção e o posterior congelamento e desidratação, respectivamente.

A membrana basal e a matriz extracelular exercem papel importante no suporte, homeostase e manutenção da característica de cada tecido, isto ocorre graças à presença de vários componentes como laminina, fibronectina e os colágenos fibrilar e microfibrilar I e IV respectivamente (AGREN; WERTHÉN, 2007; NIKNEJAD et al., 2008, FAVARON et al., 2015). Os biomateriais analisados diferiram em sua estrutura quanto à presença de componentes da membrana basal. As amostras de tecido congelado AMNn e desidratado AMNd mantiveram essa estrutura intacta, já o tecido descelularizado AMNTx, sofreu alterações em decorrência do tratamento para retirada do epitélio. Não foram observadas alterações na MEC dos biomateriais avaliados. Com relação ao colágeno tipo I, todos os biomateriais analisados mantiveram suas estruturas inalteradas.

Conforme relatam Galera et al. (2015) e McCoy, Arrington e Yau (2019), já haviam caracterizado a composição química da membrana AMNTx e verificado a permanência dos constituintes Laminina, Fibronectina, Col I e Col IV, após tratamento de descelularização. No entanto, tais estudos não investigaram a organização estrutural destas proteínas na membrana. Além disso, estes estudos não fizeram uma comparação entre os vários tipos de processamento membrana como realizados nesta tese. Os resultados representados pelas imagens, das Figuras 30 e 33, obtidas nesse estudo de imunofluorescência demonstram a presença desses constituintes não só na região da superfície do biomaterial (superfície apical oposta ao córion), como também nas regiões mais profundas, representados pela matriz extracelular e estroma.

A comprovação da manutenção dos componentes, Laminina, Fibronectina e dos Colágenos I e IV em todas as amostras dos biomateriais estudados foi de suma importância, uma vez que estes elementos exercem um relevante papel na promoção de suporte, estímulo à angiogênese, controle da inflamação, migração e adesão celular durante o processo de reparação tecidual. Também são constituintes necessários ao reparo de córnea e esclera, de acordo com Fukuda et al. (1999) e demonstrados nos estudos de Lassaline et al. (2005), Ollivier et al. (2006), Plummer et al. (2009) e Galera et al. (2015).

O resultado da avaliação das imagens das imunofluorescências para Laminina, Fibronectina, COL I e IV, nos biomateriais, no que tange a suas estruturas individuais, revelam que a AMNn demonstra uma estrutura celular mais compacta sem alterações provenientes do processamento e/ou reconstituição. O que não se confirma nas imagens da AMNd e AMNTx, que apresentam suas estruturas alteradas pelo processamento, desidratação e descelularização, para obtenção de cada biomaterial respectivamente. O resultado da avaliação da distribuição para presença de cada constituinte estudado revelou informações importantes relativas à sua distribuição em cada biomaterial avaliado.

As imagens da amostra da membrana desidratada AMNd para a presença do componente COL I, não puderam ser obtidas. É possível que o biotecido tenha sido minimamente modificado pelo processamento, mas que tal modificação possa ter provocado um mascaramento dos epítomos de reconhecimento do COL I. Além disso, o processamento pode ter limitado seletivamente a penetração do anticorpo. Independentemente da causa desta limitação técnica, a falta de informações na literatura atual sobre o preparo de tecidos com a mesma característica para imunofluorescência, impediu que uma solução fosse encontrada até aqui.

Na AMNn foi possível observar que a distribuição da Laminina se apresentava em forma de placa uniforme na região da membrana basal. Já nas camadas mais inferiores do biomaterial a distribuição era difusa, porém uniforme. Nas membranas AMNd e AMNTx o processamento alterou a distribuição tecidual da laminina, como pode ser observado tanto nas imagens planas quanto nas tridimensionais de ambas as amostras. Houve presença de ondulações e sulcos na amostra da AMNd. Na AMNTx foram observadas falhas na distribuição superficial de laminina, provavelmente propiciadas pela ação da tripsina e da fase mecânica de escovamento para retirada do epitélio (MENEZES et al. 2010; FAVARON et al., 2015; GHOLIPOURMALEKABADI et al., 2020; GODDI et al., 2021; MCCOY; ARRINGTON; YAU, 2019).

A distribuição de Fibronectina não foi afetada na AMNn e AMNd, ambas apresentaram em forma de placa, com detalhes para as ranhuras provocadas pelo TNT na AMNd. A AMNTx apresenta falhas causadas pela ação da tripsina e pelo escovamento do epitélio. Uma possível explicação para essa deformação é o tratamento de descelularização do biomaterial para a extração do epitélio, o que certamente interferiu na distribuição na placa. Todas as amostras de biomaterial apresentam em comum a escassez de fibronectina nas camadas mais inferiores

(FAVARON et al., 2015; GALERA et al., 2015; GHOLIPOURMALEKABADI et al., 2020; MCCOY; ARRINGTON; YAU, 2019).

A distribuição do colágeno fibrilar e estrutural do tipo I apresentou-se na forma de um bloco contínuo a partir do limite da membrana basal, que vai do topo até o fundo do biomaterial. Nas amostras AMNTx e AMNn pode ser observado o detalhe das ranhuras presentes no material descelularizado. Na membrana desidratada AMNd, não foi possível avaliar a presença do componente devido a possíveis problemas no protocolo de imunofluorescência, conforme discutido acima.

Diferentemente do colágeno tipo I, a distribuição do colágeno microfibrilar do tipo IV na amostra de AMNn apresentou-se na forma de placas justapostas, a primeira placa correspondendo à composição da membrana basal. Até o fundo do biomaterial, essa disposição se manteve na organização de placas. O material desidratado, AMNd, apresentou uma distribuição em forma de placas apenas na região abaixo do epitélio e outra no fundo do biomaterial. Na região intermediária do tecido apresenta-se de forma difusa.

Diferentemente das outras, na membrana desidratada AMNTx a distribuição se mostrou de forma difusa, com concentração na região média do biomaterial, conforme relatam Favaron et al. (2015), Galera et al. (2015), Gholipourmalekabadi et al. (2020) e McCoy, Arrington e Yau (2019).

De um modo geral, esse estudo avaliou os resultados do processo de reparação com a utilização de bandagens de biomateriais da membrana amniótica e a avaliação morfológica desses compostos. Isoladamente, os resultados da observação da evolução das feridas demonstraram que a utilização das membranas era capaz de recuperar a lesão e parte da funcionalidade da córnea, diminuindo consideravelmente a formação de tecido cicatricial. Por outro lado, as evidências do estudo morfológico realizado nos biomateriais estudados comprovam não só a presença, como a distribuição da laminina, fibronectina e os colágenos I e IV, compostos reconhecidamente capazes de participar, promover e facilitar a reparação tecidual.

Os resultados desta tese indicaram que os três diferentes tipos de biomateriais estudados, AMNTx, AMNn e AMNd, apresentaram-se de forma semelhante, mostrando-se capazes de promover suporte para regeneração e facilitar o reparo tecidual das lesões. Foram também capazes de reduzir o tempo de permanência de tecido de granulação na região da lesão, quando comparados com o controle, que não recebeu nenhum tipo de membrana considerando o período de sete semanas de recuperação. Os tratamentos apresentados servem como fonte de

informações para balizar a decisão para a escolha da utilização de cada biomaterial, quer seja em função da qualidade da recuperação, bem como na utilização do protocolo que melhor se adequa à necessidade da região onde será utilizado, tendo em vista a disponibilidade ou não de infraestrutura de laboratório.

Reiteramos que os tratamentos clínicos com a utilização das membranas AMNTx, AMNn e AMNd, independentemente do tipo de membrana utilizada ou protocolo cirúrgico, o resultado foi similar. A preservação do globo ocular e a redução da formação de tecido cicatricial foi evidente em todos os casos, principalmente quando comparados ao tratamento em que não se utilizou a membrana e o resultado foi a metaplasia total da superfície corneana em tecido cicatricial.

Uma vez que a regeneração da córnea no equino é difícil, apresentando poucos recursos fisiológicos que permitam reagir a determinados tipos de injúrias, principalmente quando infectadas, o tratamento dessas afecções corneais em queratomalácia com a utilização da membrana amniótica apresenta-se como uma opção viável. O restabelecimento da superfície do epitélio corneal com a restauração de claridade óptica, e a eliminação ou diminuição da formação de tecido cicatricial são particularmente importantes em termos de reconstrução da superfície ocular, e é um desafio a ser superado na oftalmologia veterinária (FUKUDA et al., 1999; BROOKS; OLLIVIER, 2004; LASSALINE et al., 2005; OLLIVIER et al., 2006; PLUMER et al., 2009).

Conforme explicam Oliveira e Alvarenga (1998) e Niknejad et al. (2008) explorar a potencialidade dessas membranas é um dos campos mais promissores das Ciências Biológicas, tendo em vista serem parte integrante do desenvolvimento dos organismos. Ainda de acordo com esses autores, a complexidade biológica das membranas amnióticas exige esforços conjuntos de diversas linhas de pesquisa, objetivando principalmente seu uso terapêutico. Com essa linha de raciocínio este trabalho desenvolveu três tipos diferentes de biomateriais a partir da membrana amniótica, com diferentes tipos de tratamento: o congelamento, a desidratação e a descélularização.

Cada biomaterial com uma característica diferente de preparo e armazenamento. A membrana desidratada, AMNd, apresenta-se como um biomaterial viável por dois aspectos: primeiramente, pela simplicidade que envolve o seu processamento, sem a necessidade de utilização de produtos e processos dispendiosos para sua produção; em segundo lugar, pela facilidade de utilização em locais com dificuldades de armazenamento refrigerado, enquanto as outras duas AMNn e AMNTx, têm processos de obtenção que dependem de produtos e

procedimentos mais caros e elaborados e, ainda, necessitam ser acondicionadas em locais com facilidades para armazenamento criogênico. Tais aspectos e serão determinantes na escolha do material a ser utilizado quando observadas as características socioeconômicas de cada microrregião do Brasil. Complementando é importante ressaltar que, independentemente da técnica de preparo de cada um dos biomateriais, os componentes, Laminina, Fibronectina e os Colágenos I e IV foram preservados.

Considerando-se os resultados dos tratamentos das lesões em queratomalácia observados neste trabalho, pode-se verificar que os biomateriais tiveram desempenho adequado e uniforme. Todos foram capazes de promover reparos nas superfícies das córneas, tendo como característica marcante a produção reduzida de tecido de granulação quando comparados ao controle.

No tocante à presença de vascularização e área de granulação, o biomaterial desidratado apresentou menores quantidades de vasos e área de formação de tecido cicatricial, bem como maior área de córnea clara. Este fato pode ser relacionado aos resultados da análise morfológica do biomaterial que revelaram a integridade dos tipos celulares, da estrutura da membrana basal e MEC. Outro fator que deve ser considerado é que a AMNd é o biomaterial com o processamento mais simples comparado aos demais, o que favorece a manutenção das proteínas da MEC em sua estrutura. Esses resultados quando comparados indicam que a membrana desidratada foi o material de melhor desempenho no reparo das lesões.

O impacto dos resultados quando avaliados coletivamente é bastante promissor. O conhecimento específico da estrutura de cada biomaterial, associado ao resultado de tratamento com melhor preservação da função tecidual, indicam os próximos passos a seguir. É importante relatar que os resultados obtidos dos tratamentos cirúrgicos não são provenientes de estudos randomizados e, portanto, podem estar confundidos por questões como idade, raça, comorbidade, *status* nutricional, grau e tipo de lesões e tratamentos prévios, bem como outros fatores. Ressalta-se que esses resultados preliminares carecem de estudos futuros que possam aprofundar as descobertas deste estudo.

8 CONCLUSÕES

As respostas das avaliações morfológicas de cada biotecido, com a constatação da presença e/ou manutenção dos microconstituintes da Membrana Basal e Matriz Extracelular, e importantes promotores do reparo tecidual, associados aos resultados obtidos na avaliação da evolução do reparo de lesões de cada biomaterial indicam que a utilização das membranas é promissora.

Todos os biomateriais utilizados, AMNn, AMNd e AMNTx, mantiveram a presença dos constituintes Laminina, Fibronectina, Colágenos I e IV preservados em suas estruturas, fato que já os qualifica para a utilização como arcabouços, contendo elementos capazes de promover suporte e benefícios ao processo de reparo das feridas.

Apesar da AMNn apresentar a maior concentração de proteínas, a AMNd que ficou em segundo lugar obteve o melhor resultado clínico de utilização no reparo das lesões. Esse fato associado à facilidade de produção, estocagem e utilização, credenciam a membrana desidratada a posição de melhor biomaterial quando observados os critérios de utilização e custo-benefício.

O conhecimento da estrutura individual, dos processos de obtenção, métodos de acondicionamento de cada biomaterial, associados a informações do processo de recuperação das lesões são informações que permitirão adequar sua aplicabilidade na rotina clínica em medicina veterinária futuramente.

Os resultados positivos deste estudo foram capazes de provar que o desenvolvimento de tecnologias alternativas para o tratamento de feridas é promissor e carece de atenção.

O próximo passo será, com certeza, um estudo mais abrangente, de utilização clínica com maior número de casos, que permita uma avaliação mais ampla de dados relativos ao desempenho clínico, da praticidade e adequação ao uso de cada um desses biomateriais.

9 REFERÊNCIAS

- AGREN, M.S.; WERTHÉN, M. The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v.6, n.2, p.82-97, 2007.
- ARCELLI, R.; TIBALDINI, P.; ANGELI, G.; BELLEZZA, E. Equine amniotic membrane transplantation in some ocular surface diseases in the dog and cat: a preliminary study. **Veterinary Research Communications**, v.33, Supl 1, p.169-171, 2009.
- ARMSTRONG, P.B.; ARMSTRONG, M.T. Intracellular invasions and the organizational stability of tissues a role for fibronectin. **Biotech et biophys Acta**, v.1470, p.90-20, 2000.
- ARRIZABALAGA, J.H.; NOLLERT, M.U. Human amniotic membrane: a versatile scaffold for tissue engineering. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v.4, n.7, p.2226-2236, 2018.
- AUMAILLEY, M.; SMITH, N. The role of laminins in basement membrane function. **Journal of Anatomy**, v.193, Pt.1, p.1-21, 1998.
- BARACHETTI, L.; GIUDICE, C.; MORTELLARO, C.M. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.5, p.326-330, 2010.
- BARROS, P.S.; GARCIA, J.A.; LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L.; SALLES GOMES, T.L. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, n.2-3, p.119-123, 1998.
- BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T.J.; YARMUSH, M.L. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v.2, p.403-430, 2011.
- BIGBIE, R.B.; SCHUMACHER, J.; SWAIM, S.F.; PUROHIT, R.C.; WRIGHT, J.C. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.8, p.1376-1382, 1991.
- BROOKS, D.E. Inflammatory stromal keratopathies: medical management of stromal keratomalacia, stromal abscesses, eosinophilic keratitis, and band keratopathy in the horse. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v.20, n.2, p.345-vi, 2004.
- BROOKS, D.E. Complications of ophthalmic surgery in the horse. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v.24, n.3, p.697-734, 2008.
- BROOKS, D.E.; MATTHEWS, A.G. Equine ophthalmology. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 4.ed. Ames: Blackwell, 2007. Cap.25, p.1165-1274.

BROOKS, D.E; OLLIVIER, F.J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice**, v.34, p.611-622, 2004.

CHOI, U.S.; LABELLE, P.; KIM, S.; KIM, J.; CHA, J.; LEE, K.C.; LEE, H.B.; KIM, N.S.; KIM, M.S. Successful treatment of an unusually large corneal epithelial inclusion cyst using equine amniotic membrane in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.2, p.122-125, 2010.

CHOPRA, A.; THOMAS, B.S. Amniotic membrane: a novel material for regeneration and repair. **Journal of Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering**, v.18, n.1, 106, p.1-8, 2013.

DAHLGREN, L.A. Regenerative medicine therapies for equine wound management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.34, n.3, p.605-620, 2018.

DESANTIS, S.; ACCOGLI, G.; ALBRIZIO, M.; ROSSI, R.; CREMONESI, F.; LANGE CONSIGLIO, A. Glycan profiling analysis of equine amniotic progenitor mesenchymal cells and their derived extracellular microvesicles. **Stem Cells and Development**, v.28, n.12, p.812-821, 2019.

DUARTE, I.G.L.; DUVAL-ARAUJO, I. Amniotic membrane as a biological dressing in infected wound healing in rabbits. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.29, n.5, p.334-339, 2014.

ECHEVERRY, LF.G.; TORO, S.P.A.; GIRALDO, J.L.V. Implante de membrana amniótica en la corrección de úlceras corneales profundas de caninos y felinos. **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá (Colombia), n.36, p.109-120, 2018.

FARHADIHOSSEINABADI, B.; FARAHANI, M.; TAYEBI, T.; JAFARI, A.; BINIAZAN, F.; MODARESIFAR, K.; MORAVVEJ, H.; BAHRAMI, S.; REDL, H.; TAYEBI, L.; NIKNEJAD, H. Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, v.46, sup.2, p.431-440, 2018.

FAVARON, P.O.; CARVALHO, R.C.; BORGHESI, J.; ANUNCIACÃO, A.R.; MIGLINO, M.A. The amniotic membrane: development and potential applications - a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n.6, p.881-892, 2015.

FERENCZY, P.A.H.; SOUZA, L.B. Comparação dos meios de preparação e preservação de membrana amniótica humana para uso no tratamento de doenças da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v.79, n.1, p.71-80, 2020.

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**, v.18, n.1, p.73-79, 1999.

GALERA, P.D.; RIBEIRO, C.R.; SAPP, H.L.; COLEMAN, J.; FONTES, W.; BROOKS, D.E. Proteomic analysis of equine amniotic membrane: characterization of proteins. **Veterinary Ophthalmology**, v.18, n.3, p.198-209, 2015.

GHOLIPOURMALEKABADI, M.; FARHADIHOSSEINABADI, B.; FARAJI, M.; NOURANI, M.R. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? **Burns**, v.46, n.6, p.1254-1271, 2020.

GILGER, C.B. **Equine ophthalmology**. 3.ed. New Jersey: Willey-Blackwell, 2016.

GODDI, A.; SCHROEDL, L.; BREY, E.M.; COHEN, R.N. Laminins in metabolic tissues. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v.120, n.154775, p.1-10, 2021.

GOODRICH, L.R.; MOLL, H.D.; CRISMAN, M.V.; LESSARD, P.; BIGBIE, R.B. Comparison of equine amnion and a nonadherent wound dressing material for bandaging pinch-grafted wounds in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.3, p.326-329, 2000.

HENRIKSEN, K.; KarsdalKARSDAL, M.A. Collagen Tipe I. In: KARSDAL, M.A. (Ed.). **Biochemistry of collagens, laminins and elastin: Structure, function and biomarkers**. Amsterdam: ScienceDirect, 2016, Chap.1., p.1-11.

JAHKOLA, T.; TOIVONEN, T.; SMITTEN, V.K.; VIRTANEN, L.; WASENIUS, V-M.; BLOMQVIST, C. Cathepsin-D, urokinase plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in early breast cancer: an immunohistochemical study of prognostic value and relations to tenascin-C and other factors. **British Journal of Cancer**, v.80, p.167-174, 1999.

KAYISLI, U.A.; KORGUN, E.T.; AKKOYUNLU, G.; ARICI, A.; DEMIR, R. Expression of integrin alpha5 and integrin beta4 and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation. **Acta Histochemica**, v.107, n.3, p.173-185, 2005.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L. **Histologia e biologia celular - uma introdução à patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier/ Medicina Nacionais, 2012. p.122-124.

KLEIMAN, R.; BANKER, G.; STEWARD, O. Inhibition of protein synthesis alters the subcellular distribution of mRNA in neurons but does not prevent dendritic transport of RNA. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.23, p.11192-11196, 1993.

KNOLLINGER, A.M.; MCDONALD, J.E.; CARPENTER, N.A.; CROOK, E.K. Use of equine amniotic membrane free-island grafts for treatment of a midstromal corneal ulcer and descemetocele in a snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.253, n.12, p.1623-1629, 2018.

KUNZ-SCHUGHART, L.A.; HEYDER, P.; SCHROEDER, J.; KNUECHEL, R. A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. **Experimental Cell Research**, v.266, n.1, p.74-86, 2001.

LACORZANA, J. Membrana amniótica, aplicaciones clínicas e ingeniería tisular. Revisión de su uso oftalmológico. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v.95, n.1, p.15-23, 2020.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; PEREGO, R.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment. **Equine Veterinary Journal**, v.45, n.6, p.737-744, 2013.

LANGE-CONSIGLIO, A.; PERRINI, C.; TASQUIER, R.; DEREGIBUS, M.C.; CAMUSSI, G.; PASCUCCHI, L.; MARINI, M.G.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; DE VITA, B.; ROMELE, P.; PAROLINI, O.; CREMONESI, F. Equine amniotic microvesicles and their anti-inflammatory potential in a tenocyte model in vitro. **Stem Cells and Development**, v.25, n.8, p.610-621, 2016.

LANGE-CONSIGLIO, A.; LAZZARI, B.; PERRINI, C.; PIZZI, F.; STELLA, A.; CREMONESI, F.; CAPRA, E. MicroRNAs of equine amniotic mesenchymal cell-derived microvesicles and their involvement in anti-inflammatory processes. **Cell Transplantation**, v.27, n.1, p.45-54, 2018.

LASSALINE, M.E.; BROOKS, D.E. Equine glaucoma. In: GILGER, B.C. (Ed.). **Equine ophthalmology**. St Louis: Elsevier, 2005. p.323-339.

LASSALINE, M.E.; BROOKS, D.E.; OLLIVIER, F.J.; KOMAROMY, A.M.; KALLBERG, M.E.; GELATT, K.N. Equine amniotic membrane transplantation for corneal ulceration and keratomalacia in three horses. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.5, p.311-317, 2005.

MAMEDE, A.C.; CARVALHO, M.J.; ABRANTES, A.M.; LARANJO, M.; MAIA, C.J.; BOTELHO, M.F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell and Tissue Research**, v.349, n.2, p.447-458, 2012.

MCCOY, A.M.; ARRINGTON, J.; YAU, P.M. Effect of preparation method on the protein profile of equine amnion dressings. **Journal of Proteome Research**, v.18, n.6, p.2676-2685, 2019.

MENEZES, K.; DE MENEZES J.R.; NASCIMENTO; M.A. SANTOS, R.S.; COELHO-SAMPAIO T. Polylaminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. **FASEB Journal**, v.24, n.11, p.4513-4522, 2010.

MORLA, A.; RUOSLAHTI, E. A fibronectin self-assembly site involved in fibronectin matrix assembly: reconstruction in a synthetic peptide. **The Journal of Cell Biology**, v.118, n.2, p.421-429, 1992.

MOYER, C.T. **Evaluation of lyophilized human amnion for equine wound management.** 48p. Thesis (Master of Science in Biomedical and Veterinary Sciences) – Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Leesburg, Virginia, 2018.

MURPHY, S.V.; SKARDAL, A.; SONG, L.; SUTTON, K.; HAUG, R.; MACK, D.L.; JACKSON, J.; SOKER, S.; ATALA, A. Solubilized amnion membrane hyaluronic acid hydrogel accelerates full-thickness wound healing. **Stem Cells Translational Medicine**, v.6, n.11, p.2020-2032, 2017.

NEADERLAND, M.H.; RIIS, R.C.; REBHUN, W.C.; ERB, H.N. Healing of experimentally induced corneal ulcers in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, n.3, p.427-430, 1987.

NIKNEJAD, H.; PEIROVI, H.; JORJANI, M.; AHMADIANI, A.; GHANAVI, J.; SEIFALIAN, A.M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells & Materials**, v.15, p.88-99, 2008.

OLIVEIRA, V.A.; ALVARENGA, J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores e equinos. **Ciência Rural**, v.28, n.4, p.623-628, 1998.

OLLIVIER, F.J. Medical and surgical management of melting corneal ulcers exhibiting hyperproteinase activity in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, n.1, p.50-71, 2005.

OLLIVIER, F.J.; KALLBERG, M.E.; PLUMMER, C.E.; BARRIE, K.P.; O'REILLY, S.; TAYLOR, D.P.; GELATT, K.N.; BROOKS, D.E. Amniotic membrane transplantation for corneal surface reconstruction after excision of corneolimbic squamous cell carcinomas in nine horses. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.6, p.404-413, 2006.

PARRY, S.; STRAUSS, J.F.^{3rd}. Premature rupture of the fetal membranes. **The New England Journal of Medicine**, v.338, n.10, p.663-670, 1998.

PERRINI, C.; STRILLACCI, M.G.; BAGNATO, A.; ESPOSTI, P.; MARINI, M.G.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; IDDA, A.; LEDDA, S.; CAPRA, E.; PIZZI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CREMONESI, F. Microvesicles secreted from equine amniotic-derived cells and their potential role in reducing inflammation in endometrial cells in an in-vitro model. **Stem Cell Research & Therapy**, v.7, n.1, p.1-15, 2016.

PLUMMER, C.E.; OLLIVIER, F.; KALLBERG, M.; BROOKS, D.; BARRIE, K.; UTTER, M.; GELATT, K. The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008). **Veterinary Ophthalmology**, v.12 Suppl 1, p.17-24, 2009.

POMPILI, S.; LATELLA, G.; GAUDIO, E.; SFERRA, R.; VETUSCHI, A. The charming world of the extracellular matrix: A dynamic and protective network of the intestinal wall. **Frontiers in Medicine**, v.8, n.610189, p.1-19, 2021.

SAND, J.M.B.; GENOVESE, F.; KARSDAL, M.A. Collagen IV. In: KARSDAL, M.A. (Ed.). **Biochemistry of collagens, laminins and elastin: Structure, function and biomarkers.** Amsterdam: ScienceDirect, 2016, Chap.4, p.31-41.

SEO, M.S.; PARK, H.S.; KANG, J.G.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v.14, n.2, p.151-159, 2013.

STRUBBE, D.T.; BROOKS, D.E.; SCHULTZ, G.S.; WILLIS-GOULET, H.; GELATT, K.N.; ANDREW, S.E.; KALLBERG, M.E.; MACKAY, E.O.; COLLANTE, W.R. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v.3, n.2-3, p.111-119, 2000.

VIOLINI, S.; GORNI, C.; PISANI, L.F.; RAMELLI, P.; CANIATTI, M.; MARIANI, P. Isolation and differentiation potential of an equine amnion-derived stromal cell line. **Cytotechnology**, v.64, n.1, p.1-7, 2012.

WASSMER, C.H.; BERISHVILI, E. Immunomodulatory properties of amniotic membrane derivatives and their potential in regenerative medicine. **Current Diabetes Reports**, v.20, n.8, 31, p.1-10, 2020.

WELCH, P.M.; GABAL, M.; BETTS, D.M.; WHELAN, N.C.; STUDER, M.E. In vitro analysis of antiangiogenic activity of fungi isolated from clinical cases of equine keratomycosis. **Journal of Veterinary Ophthalmology**, v.3, p.145-151, 2000.