

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ROSÂNGELA K. S. WELLING

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MEMBRANA AMNIÓTICA
UTILIZADA NA RECONSTRUÇÃO DO PERICÁRDIO EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Cirurgia da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná como requisito parcial para
obtenção do grau de mestre.**

Curitiba

2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ROSÂNGELA K. S. WELLING

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MEMBRANA AMNIÓTICA
UTILIZADA NA RECONSTRUÇÃO DO PERICÁRDIO EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Cirurgia da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná como requisito parcial para
obtenção do grau de mestre.**

ALUNA: Rosângela K. S. Welling

ORIENTADOR: Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague

CO-ORIENTADOR: Julio Cesar Francisco

Curitiba

2012

ROSANGELA K.S.
WELLING

ANÁLISE HISTOLÓGICA DA
MEMBRANA AMNIÓTICA
UTILIZADA NA
RECONSTRUÇÃO DO
PERICÁRDIO EM RATOS

CURITIBA
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rosângela K. S. Welling

Análise histológica da membrana amniótica utilizada na reconstrução do pericárdio em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

Aprovado em

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho ao meu filho, pelo exemplo de dedicação e perseverança.

Ao meu marido, pela paciência e companheirismo.
Aos meus pais, pela educação e formação de caráter.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague, orientador, pela paciência e incentivo.

Ao Julio Cesar Francisco, co-orientador, pelo tempo dispensado e dedicação durante a pesquisa.

À Prof^a Dra. Lucia de Noronha, pela atenção e orientações na avaliação histológica.

À Prof^a Msc Marcia Olandoski, pela competência e ajuda na análise estatística.

ÍNDICE

RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 OBJETIVOS	04
2 REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 BIOMATERIAIS	05
2.2 USO DE BIOMATERIAIS EM CARDIOLOGIA	06
2.3 COMPLICAÇÕES E FALÊNCIAS DAS BIOPRÓTESES	07
2.4 MEMBRANA AMNIOTICA	09
2.5 DESCELULARIZAÇÃO	16
3 MÉTODOS	23
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	23
3.2 AMOSTRA	23
3.3 LOGÍSTICA	24
3.3.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	24
3.3.2 IMPLANTAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA SUPERFÍCIE DO CORAÇÃO.....	25
3.3.3 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO DO CORAÇÃO.	27
3.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS	27
3.4.1 ESTUDO BACTERIOLÓGICO	27
3.4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA	27
3.5 ESTUDO HISTOLÓGICO	28
3.5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA	28
3.5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4 RESULTADOS	30
4.1 AVALIAÇÃO DA DESCONTAMINAÇÃO	30
4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA	31
4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA	32
4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOMÉTRICA	34

5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO 1	52
ANEXO 2	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. (A) Manobra digitiforme de separação do âmnio e do córion, (B) Lavagem exaustiva do material para retirada de resíduos de sangue e córion...	24
FIGURA 2. (A) Membrana, (B) Punch, (C) e (D) Exposição do coração para procedimento de transplante da membrana.....	26
FIGURA 3 - (A) – Cultura negativa em ágar-sangue após descontaminação com dióxido de cloro, (B) – Cultura negativa em BHI após descontaminação com dióxido de cloro, (C) – Cultura positiva em ágar-sangue após descontaminação com antibióticos, (D) – Cultura positiva em BHI após descontaminação com antibióticos	31
FIGURA 4 – Fotomicrografia do grupo GDIOX mostra área focal e pouca reação inflamatória (HE 20X).....	32
FIGURA 5 – Fotomicrografia do grupo GATB mostra área focal com presença de fio de sutura (seta) e intenso infiltrado inflamatório (HE 20X).....	33
FIGURA 6 – Fotomicrografia de um pericárdio normal (HE 20X).....	33
Figura 7- (A) e (B) Membranas descontaminadas com antibióticos e coradas pela Alizarina-Red pH 4,2 (10X e 40X), (C) e (D) Membranas descontaminadas com antibióticos e coradas pela Alizarina-Red pH 7,0.....	34
Figura 8 – (A) e (B) Membranas descontaminadas com dióxido de cloro e coradas pela Alizarina-Red pH 4,2 (10X e 40X), (C) e (D) Membranas descontaminadas com dióxido de cloro e coradas pela Alizarina-Red pH 7,0.....	35
Gráfico 1 - Comparação entre o grupo GATB e o GDIOX.....	36
Gráfico 2 - Comparação entre o grupo GN e o GDIOX.....	36
Gráfico 3 - Comparação entre o grupo GN e GATB.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
BHI	Brain Heart Infusion
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EGTA	Ácido etilnoglicoltetra-acético
FDA - CVM	Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine
GATB	Grupo de ratos tratados com antibióticos
GDIOX	Grupo de ratos tratados com dióxido de cloro
GN	Grupo de ratos normais
HE	Hematoxilina - eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
MA	Membrana amniótica
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SD	Desoxicolato de sódio
SDS	Duodecil sulfato de sódio
TBP	Fosfato - tributil

RESUMO

Introdução: a membrana amniótica possui propriedades que a tornam quase uma bioprótese ideal, sendo usada intacta ou descelularizada para reconstrução de tecidos ou órgãos em várias áreas da medicina. **Objetivos:** avaliar duas técnicas de descontaminação de membrana amniótica e comparar as suas reações quando implantadas sobre corações de ratos. **Métodos:** em um n = 10 ratos foram implantadas membranas amnióticas tratadas com antibióticos (penicilina + estreptomicina + anfotericina-B) e em outro n = 10, membranas descontaminadas com dióxido de cloro e descelularizada com duodecil sulfato de sódio e desoxicolato de sódio. O terceiro grupo eram ratos normais. De todos os fragmentos foram retiradas amostras para cultura e análise microbiológica. Após a eutanásia realizada no trigésimo dia da implantação, foi realizada análise macroscópica para avaliar aderências e microscópica para estudo histológico e morfométrico, utilizando-se coloração pela hematoxilina-eosina e Alizarina-Red. **Resultados:** a descontaminação mostrou-se adequada no grupo tratado com dióxido de cloro. Macroscopicamente, o grupo tratado com dióxido de cloro mostrou aderências leves enquanto o grupo tratado com antibióticos apresentou aderências moderadas e/ou importantes. Microscopicamente verificou-se que os dois grupos apresentaram infiltrado mononuclear e presença de neovasos, porém mais intensos no grupo com antibióticos, sendo $p = 0,007$. A incorporação dos implantes foi eficaz sem diferenciação entre o pericárdio parietal e a membrana implantada nos dois grupos. Na morfometria, verificou-se que o grupo tratado com antibióticos apresentava espessura maior que o grupo de dióxido de cloro com diferença significativa ($p = 0,008$), assim como com o pericárdio normal ($p = 0,008$). Entretanto, na comparação entre grupo de dióxido de cloro e o pericárdio normal não houve diferença significativa ($p = 0,420$). Nenhum dos implantes apresentou calcificações. **Conclusões:** o grupo tratado com dióxido de cloro apresentou descontaminação eficiente, assim como adequada descelularização após tratamento com duodecil sulfato de sódio e desoxicolato de sódio. Menor aderência aos tecidos adjacentes, menos infiltração de células mononucleares e menor espessura foram observadas nos corações com membranas

descelularizadas. Todos os implantes apresentaram adequada incorporação no hospedeiro e sem calcificações.

DESCRITORES: membrana amniótica, biomaterial, descelularização, dióxido de cloro.

SUMMARY

Introduction: The amniotic membrane has features that turn it into an almost ideal bioprosthesis that can be used intact or decellularized for the reconstruction of tissues or organs in various areas of medicine. **Aims:** the aims of the study are to evaluate 2 decontamination techniques for amniotic membranes and compare their reactions when implanted on rat hearts. **Methods:** a n = 10 rats received the implant of amniotic membranes treated with antibiotics (penicillin, streptomycin, and amphotericin-B) and another n = 10 received the implant of decontaminated membranes treated with chlorine dioxide and decellularized with sodium dodecyl sulfate and sodium deoxycholate. The third group was made of ordinary rats. Samples from all the fragments were collected for culture and microbiological analysis. After the euthanasia on the 30th day after the implant, a macroscopic analysis evaluated the adhesions and a microscopic analysis was done for histological and morphometric studies; the second analysis was done using hematoxylin-eosin and Alizarin Red. **Results:** decontamination was adequate in the group treated with chlorine dioxide. From a macroscopic view, the group treated with chlorine dioxide presented fewer adhesions while the group treated with antibiotics presented moderate and/or severe adhesions. Microscopically it was demonstrated that the two groups presented mononuclear infiltration and neovascularization, although more intense in the group treated with antibiotics, the result was $p = 0,007$. The incorporation of the implants was efficient and there were no major differences between the parietal pericardium and the implanted membrane in the two groups. Morphometrics showed that in the group treated with antibiotics the adhesions were thicker than those in the group treated with chlorine dioxide; there was a significant difference ($p = 0,008$), as well as in the normal pericardium ($p = 0,008$). Nevertheless, the comparison between the chlorine dioxide group and the normal pericardium showed no significant difference ($p = 0,420$). None of the implants presented calcifications. **Conclusions:** the group treated with chlorine dioxide presented efficient decontamination, and demonstrated adequate decellularization after treatment with sodium dodecyl sulfate and sodium deoxycholate. In hearts with decellularized membranes there has been noticed less adhesion in adjacent

tissues, less infiltration of mononuclear cells and the adhesions were less thick. All the implants presented adequate incorporation in the host and had no calcifications.

KEYWORDS: amniotic membrane, biomaterial, decellularization, chlorine dioxide.

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças congênitas, as de origem cardíaca são as mais prevalentes e fatais que existem, sendo resultantes de predisposição genética e fatores ambientais. Outras condições, como doenças degenerativas e infecciosas, principalmente a moléstia reumática, são adquiridas¹. Todas podem acometer as valvas cardíacas nativas, prejudicando sua funcionalidade e de alguma forma, essas necessitarão ser substituídas por próteses².

Além disso, para a perda aguda da função cardíaca como a causada por infarto agudo do miocárdio, o único tratamento disponível é o transplante cardíaco ou a instalação de dispositivos mecânicos de assistência ventricular. Isso tem sido a motivação para a vasta pesquisa em engenharia cardíaca durante a última década³.

Sabe-se que a função e a durabilidade das próteses até então disponíveis estão aquém do ideal e, nesse contexto há um crescente interesse, com auxílio da bioengenharia, no desenvolvimento de uma valva cardíaca a partir de novos biomateriais⁴.

O pericárdio bovino preservado em glutaraldeído é um dos tecidos biológicos mais amplamente utilizados na forma de enxerto em cirurgia cardiovascular. Nesta forma, tem sido utilizado para correção de inúmeras cardiopatias como substituto das paredes atrial, ventricular e reconstrução do saco pericárdico⁵.

O comportamento desse retalho na cirurgia cardiovascular depende da superfície de contato, da tensão a que é submetido e da exposição à corrente sanguínea. Independente da localização, os retalhos não sofrem alteração estrutural, porém com a evolução do tempo, ocorre a formação de uma camada de tecido conjuntivo fibroso na superfície lisa do pericárdio bovino implantado. Além disso, essa aposição interna sofre calcificações e também ocorre neoformação de fibras elásticas que sofrem aumento de acordo com o tempo e o local do implante⁵.

A calcificação é uma das maiores causas de disfunção de tecidos conjuntivos naturais como as válvulas cardíacas e os vasos sanguíneos, assim

como de muitos biomateriais implantados como valvas cardíacas, além dos enxertos vasculares de poliuretano⁶.

Um aspecto para implantação desse tecido seria a descelularização, que é uma técnica atrativa para preparação de estruturas em engenharia tecidual, pois o material resultante pode potencialmente reter a arquitetura do tecido original incluindo aspectos funcionais da microvasculatura ativa. As potenciais aplicações de matrizes descelularizadas em engenharia tecidual têm sido demonstradas em numerosos tecidos incluindo bexiga, artérias, esôfago, pele, traquéia e fígado⁷.

Um bom método de descelularização é a combinação da remoção completa de células e núcleos para diminuir a imunogenicidade enquanto se mantém a estrutura natural da matriz extracelular com máximo das propriedades mecânicas para funcionamento *in vivo*⁸.

O método de descelularização de cada tecido e/ou órgão depende de muitos fatores, incluindo a celularidade dos tecidos (ex: fígado x tendão), densidade (ex: derme x tecido adiposo), conteúdo lipídico (ex: cérebro x bexiga urinária) e espessura (ex: derme x pericárdio)⁹.

Descelularização de valvas cardíacas tem sido testada com a finalidade de eliminar a imunogenicidade dos tecidos e ainda aumentar a durabilidade dos implantes¹⁰.

Entretanto, resíduos de cada produto podem permanecer no tecido descelularizado e induzir importante resposta inflamatória após implantação em um receptor⁸.

Um tecido de particular interesse é a membrana amniótica (MA), pois suas células possuem características de células-tronco, com habilidade multipotente de diferenciação e baixa imunogenicidade¹¹. Sabe-se que a membrana amniótica humana sobrevive por longos períodos em animais imunocompetentes, e nesses, as células enxertadas criam um ambiente microharmônico, especialmente na medula óssea, pulmão e timo¹².

A membrana amniótica é a mais interna camada da membrana fetal. Ela consiste de um fino epitélio, uma camada basal e um estroma de tecido conjuntivo avascular chamado mesoderma amniótico. O epitélio é formado por uma simples, contínua e ininterrupta linha de células cubóides, em contato com o líquido amniótico. Esse epitélio se situa sobre uma resistente e bem definida camada basal conectada com o mesoderma amniótico¹³.

Portanto, o âmnio é um tecido de origem fetal composto de células epiteliais na camada basal mais espessa contendo colágeno e camada de tecido esponjoso que contém células de linhagem mesenquimal. O âmnio tem sido aplicado na medicina, em tratamento de queimaduras, cobertura de ferimentos cirúrgicos para evitar aderências e reconstrução de superfície ocular. As células do epitélio amniótico humano parecem ser relativamente resistentes à rejeição, principalmente depois de transplantes homólogos por causa da expressão de fatores imunossupressivos¹⁴.

A membrana amniótica apresenta várias propriedades como efeito antiadesivo, antibacteriano, proteção de feridas, redução da dor e re-epitelização por facilitar a adesão e migração das células epiteliais basais, prevenir a apoptose e restaurar o fenótipo epitelial¹³.

Além disso, a membrana amniótica apresenta características que a tornam quase uma bioprótese ideal: fácil de obter, baixo custo, pouco antigênica, atividade antibacteriana, pode ser estocada, permite crescimento epitelial quando usada no tubo digestivo e sua nutrição se faz através de difusão e permite ser usada como enxerto livre¹⁵.

Apesar de a membrana amniótica ter uma disponibilidade ilimitada, fácil obtenção e baixo custo de processamento, ela tem também propriedades benéficas próprias. Ela é bacteriostática, antiangiogênica, reduz dor, suprime inflamação, inibe cicatrizes e promove a cura de ferimentos e epitelização¹⁶⁻²⁰. Anteriormente a membrana amniótica mostrou baixa ou ausência de imunogenicidade e uma barreira anatômica^{21,12,17}. Além disso, sabe-se que as células isoladas da membrana amniótica são multipotentes e podem diferenciar-se em neurônios, hepatócitos, cardiomiócitos, células pancreáticas e condrócitos^{14,22,23,24}.

Acredita-se que a membrana amniótica desempenhe importante papel na tolerância materno-fetal durante a gestação normal. É possível que as células da membrana amniótica sejam imunoprivilegiadas²⁵.

Além disso, o uso de membrana amniótica como um tratamento para doenças isquêmicas do miocárdio oferece a evidente vantagem de ter oferta abundante e poder ser aplicada imediatamente sem a necessidade de isolamento celular, seleção ou passos de cultura. Ela também tem boa preservabilidade e é

imunologicamente tolerada em condições autólogas e heterólogas, tanto *in vitro* como *in vivo*²⁶.

O uso de remendo de membrana amniótica pode prolongar a sobrevivência de células transplantadas, dado que elas estão embebidas de uma matriz estromal rica em colágeno, que pode preservar sua integridade pela prevenção do contato direto com tecidos cardíacos isquêmicos e necróticos, que poderiam por outro lado, acelerar a sua morte²⁶.

Atualmente tem sido utilizada para a reconstrução da superfície ocular substituindo o tecido conjuntival nas doenças cicatríciais da córnea e conjuntiva. O seu emprego tem se estendido a outras áreas da medicina como na reparação de queimaduras de pele, onfalocele e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdômen, pélvis, vagina e laringe¹³.

Baseados em todas essas propriedades da membrana amniótica propusemo-nos a um estudo de implante desse biomaterial em coração de ratos.

1.1 OBJETIVOS

Geral:

Análise da descontaminação e do implante de membrana amniótica humana sobre o coração de ratos.

Específico:

Comparação do processo de descontaminação com duas técnicas diferentes.

Análise macroscópica da aderência do coração durante a retirada do órgão.

Análise microscópica qualitativa da celularidade do tecido.

Análise morfométrica da espessura da membrana amniótica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

Biomateriais são substitutos biológicos com habilidade para crescer, reparar e remodelar, sem provocar resposta imunológica e sem a necessidade de anticoagulação. O maior objetivo da engenharia tecidual atualmente é a reconstrução de valvas cardíacas viáveis²⁷.

Ao se utilizar estruturas reabsorvíveis, elas fornecem um perfil biomecânico temporário para a substituição tecidual até as células produzirem sua própria matriz. A matriz gerada acabará fornecendo integridade estrutural e força biomecânica para o novo tecido desenvolvido²⁷.

Atentos ao desenvolvimento de novos materiais biológicos implantáveis, tem-se pesquisado um número de diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. Modelos *in vivo* têm sido aceitos como um método preditivo para avaliação do potencial de calcificação dos biomateriais, que normalmente são a causa principal de complicações. O uso de animais para a triagem de novos biomateriais é um método caro e que consome tempo devido à necessidade de testes confiáveis. Modelos *in vitro* são importantes métodos alternativos para investigação do processo de calcificação e um significativo número de investigações tem sido proposto. Apesar de que fatores biológicos, bioquímicos, mecânicos ou patológicos podem iniciar ou controlar a calcificação, ela pode ser considerada basicamente um processo fisicoquímico⁶.

Dessa forma, o princípio básico da engenharia tecidual é criar substitutivos com as propriedades do tecido beneficiado²⁸.

Após o implante, frequentemente ocorre uma reação inflamatória conhecida como reação de corpo estranho. Essa inflamação pode ser benéfica causando a cicatrização de uma lesão, mas também pode levar à falência do implante. Reação de corpo estranho provoca estimulação de células gigantes e macrófagos que, por sua vez produzem citocinas e atraem fibroblastos levando à

formação de fibroses. Por isso, possuir baixo risco de imunogenicidade é um importante componente para um material biocompatível²⁹.

Em resumo, a engenharia tecidual visa o desenvolvimento de substitutos biológicos (biomateriais) com a finalidade de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido e requer aplicação de princípios e métodos de engenharia assim como de biologia. Estruturas são desenvolvidas para sustentar células do hospedeiro promovendo sua diferenciação e proliferação na formação de um novo tecido²⁹.

A medicina regenerativa tem por objetivo ajudar nos processos de cicatrização tornando-os mais eficientes ou, propiciar o uso de materiais especiais para diminuir os danos teciduais. Há um emergente interesse na medicina regenerativa como potencial alternativa aos complicados transplantes de órgãos ou tecidos. Alguns métodos são baseados no uso de células-tronco para gerar substitutos biológicos de tecidos/órgãos, evitando assim, algumas das dificuldades associadas com o transplante, como a falta de doadores disponíveis ou o risco da rejeição imunológica pelo receptor³⁰.

2.2 USO DE BIOMATERIAIS EM CARDIOLOGIA

Sabemos que as doenças cardíacas valvares podem ter origem congênita ou serem adquiridas ao longo da vida por patologias reumáticas, degenerativas ou infecciosas, atingindo todas as faixas etárias e necessitando na maior parte dos casos de substituição por próteses. Hoje a troca da válvula cardíaca é um procedimento cirúrgico padrão e mais de oitenta tipos de próteses têm sido propostas nas últimas décadas²⁸.

Diferentes tecidos biológicos foram usados na manufatura de valvas cardíacas como fásia lata autóloga ou homóloga, peritônio, dura-máter, pericárdio bovino, valva cardíaca porcina, enxertos de valva aórtica e valva pulmonar autóloga³¹.

Carpentier *et al.* em 1969, desenvolveram um trabalho pioneiro que resultou no desenvolvimento de próteses biológicas de valvas cardíacas derivadas de tecidos não-humanos utilizando glutaraldeído como fixador. Esse produto tem a vantagem de aumentar a resistência do tecido, reduzir a sua antigenicidade além de ser também efetivo na esterilização^{31,32}.

O pericárdio bovino preservado em glutaraldeído e o enxerto de politetrafluoroetileno são os materiais atualmente utilizados nos remendos ou próteses cardíacas. Entretanto, os enxertos bovinos, a longo prazo têm sido associados com calcificações e adesões, enquanto os enxertos de politetrafluoretileno ainda não provaram ser ideais pois estão associados à formação de fibroses, adesões e reações epicárdicas³³.

A alta taxa de falência das valvas cardíacas biológicas decorrentes de ruptura ou degeneração é o maior empecilho desse tipo de implante nos seres humanos e o seu uso vem diminuindo na maioria dos serviços de cirurgia cardíaca. Nas crianças o uso de biopróteses foi quase completamente abandonado e implantes mecânicos tem sido também a escolha na maioria dos adultos³⁴.

Atualmente, existem dois tipos de próteses cardíacas: as mecânicas e as biológicas. As mecânicas são duráveis, porém necessitam de anticoagulação para o resto da vida por serem altamente trombogênicas. Em contrapartida, as próteses biológicas não requerem anticoagulação permanente, mas degeneram-se precocemente, principalmente nos pacientes jovens³⁵.

A calcificação, infecção ou degeneração da válvula e/ou a necessidade de terapia anticoagulante são os principais fatores que influenciam a durabilidade dessas próteses. Por isso, o campo de engenharia tecidual tem emergido como uma alternativa para um enxerto valvar ideal que poderia superar essas limitações²⁸.

Fica evidente que a função e a durabilidade das próteses até então disponíveis estão aquém do ideal e, nesse contexto há um crescente interesse, com auxílio da bioengenharia, no desenvolvimento de uma valva cardíaca a partir de novos biomateriais^{35,4}.

2.3 COMPLICAÇÕES E FALÊNCIAS DAS BIOPRÓTESES

Embora não sendo universalmente aceito devido ao medo de ocorrer tamponamento cardíaco e seus efeitos compressivos, o fechamento do pericárdio nas cirurgias cardíacas tem sido recomendado, no sentido de reduzir a formação de adesões mediastinais e consequentes complicações pós-operatórias. Nas reoperações, o aumento do tempo cirúrgico devido à formação de adesão e

sangramento associado, provoca elevação da morbidade e mortalidade desses procedimentos³³.

A principal desvantagem do pericárdio bovino ou da valva cardíaca porcina, apesar do tratamento com glutaraldeído, é sua limitada durabilidade por causa de degeneração ou ruptura. Por causa dos estudos histológicos revelarem a presença de uma densa reação inflamatória, a falência foi pensada ser o resultado de uma resposta imune ao implante³⁴.

Degeneração de valva cardíaca deve ser distinguida de ruptura de tecidos. Após curto período do implante, ocorre degradação de fibras e fragmentação, com ausência de infiltrados celulares nas valvas bovinas e principalmente nas valvas porcinas. O mecanismo fisiopatológico responsável por isso parece ser completamente diferente daquele responsável pela ruptura tecidual³⁴.

Os aspectos fisiopatológicos da falência dos tecidos ainda permanecem não definidos. Achados de estudos histológicos de valvas explantadas têm levado à hipótese de que as reações imunológicas podem desempenhar papel na degeneração tecidual dos implantes. A presença de infiltrados inflamatórios de histiócitos, macrófagos e a formação de células gigantes com degradação de colágeno indicam que os biomateriais podem provocar esses processos, a despeito de reivindicações específicas de que o tratamento químico torna o material não-imunogênico. Infiltrados inflamatórios podem ser detectados em associação com fragmentação de colágeno por causa de ruptura de folhetos. Porém, poucos estudos têm sido conduzidos para investigar a relevância dessas reações imunológicas³⁴.

A maioria de valvas explantadas por outras razões e todas as biopróteses removidas de pacientes humanos por causa de degeneração, especialmente as valvas porcinas, mostraram características difusas ou focais de fragmentações e degradações da estrutura do colágeno com pouco infiltrado inflamatório. Essas mudanças foram mais intensas nas áreas onde haviam lesões mecânicas das superfícies. Estudos imunohistológicos demonstraram que a maioria das células eram macrófagos. O rompimento do colágeno poderia ser um importante co-fator, senão a causa da falência primária que ocorre nas valvas cardíacas biológicas³⁴.

O tratamento com o glutaraldeído não torna o biomaterial não-imunogênico já que ocorre formação de lesões na superfície, desenvolvimento de infiltrados celulares e mudanças na estrutura das fibras colágenas. Provavelmente, uma

lesão mecânica na superfície desencadeia uma reação imunológica, e a combinação do estresse mecânico mais a resposta imune que eles causam, levam o implante a falir. Sabe-se que lesões mecânicas são mais prováveis de desenvolver em alguns tipos de valvas bovinas. Os pobres resultados associados com esses tipos de substitutos poderiam ser explicados pela provável antigenicidade e a maior suscetibilidade de desenvolver lesões de superfície³⁴.

A formação de depósitos de fosfato de cálcio no tecido cardiovascular levando à mineralização da cúspide, é uma significativa limitação do sucesso a longo prazo, acometendo mais de 60% das falências. O exato mecanismo entre a calcificação e a falência do implante da bioprótese ainda não está bem conhecido, e até agora, não há terapia efetiva³².

2.4 MEMBRANA AMNIÓTICA

O primeiro relato do uso de um tecido fino e quase transparente que foi utilizado como material cirúrgico data de 1910. Davis descreveu o uso da MA em quinhentos e cinquenta casos de transplantes de pele³⁶.

Poucos anos depois, foi relatado o uso da MA para tratar peles queimadas e ulceradas³⁷. Em 1940 foi reportado o sucesso do uso de MA em defeitos conjuntivais³⁸. Cinquenta e cinco anos depois, o âmnio foi redescoberto por Kim e Tseng para uso oftalmológico¹³.

Desde então tem sido reportado numerosos trabalhos de transplante de MA humana para reconstrução de córneas ou conjuntivas¹⁶.

O âmnio ou membrana amniótica é uma fina e resistente membrana extra-embriônica que reveste o córion e contém o embrião e mais tarde o feto, com líquido amniótico em torno desse. Para contextualizar a formação do âmnio, devemos remontar que a placenta é um órgão mamífero que conecta o feto à parede uterina materna, enquanto o cordão umbilical liga o feto à placenta³⁹.

A placenta (do grego *plakuos*, bolo achatado) é uma estrutura de origem materno-fetal com uma forma redonda ou discóide, possuindo 15 a 20 cm de diâmetro, 2 a 3 cm de espessura e pesa entre 500 e 600 g, em torno de um sexto do peso do feto. Ela tem dois lados: um é a lâmina coriônica que representa o compartimento fetal, forra a cavidade amniótica e é formada pelo âmnio e pelo córion. O outro lado, chamado de lâmina basal é de origem materna e é formada

pelas decíduas (basal e parietal). Na placenta, vilosidades coriônicas mantêm as duas lâminas juntas, conectando suas células trofoblásticas com a decídua basal. A membrana fetal (âmnio e córion) vai-se distanciando da placenta para encobrir o feto na cavidade amniótica, protegendo-o enquanto ele cresce sem sofrer distorções pela pressão das estruturas vizinhas³⁹.

A MA é pouco antigênica nem sofre rejeição, ambas considerações importantes para a substituição pericárdica. A MA tem a capacidade de sobreviver em ambiente potencialmente hostil e seu uso em situações clínicas, tem sido associado à mínimas reações mesmo após implante subcutâneo ou peritoneal. Estudos imunológicos para avaliar imunogenicidade e sobrevivência de implantes de epitélio amniótico em voluntários humanos mostraram somente um baixo grau de resposta imune que é crônica e não aguda. Foi também demonstrado que a resposta imune foi claramente inefetiva. A membrana amniótica provoca mínima adesão torácica quando usada como remendo pericárdico. Isso é uma importante vantagem, não havendo constrição na linha de sutura. A superfície interna da membrana amniótica não adere ao pericárdio facilitando os movimentos livres do coração. A pouca antigenicidade evoca uma mínima imunorreação do hospedeiro prevenindo adesões entre o pericárdio e a membrana remendada. Enquanto possuir as qualidades de um substituto pericárdico ideal, como baixas formações de adesões e reações epicárdicas, além de ser minimamente inerte, sua maior desvantagem é ter pouca força para segurar as suturas. Métodos para resolver esse problema são necessários antes que a MA possa ser usada clinicamente³³.

Em 1991, Muralidharan S *et al.*, apresentaram uma nova membrana biológica para fechamento do pericárdio, utilizando membrana amniótica fixada em glutaraldeído em substituição à membrana de politetrafluoretileno utilizada até então. Os exames histopatológicos das amostras revelaram que a integridade das membranas estavam preservadas. O desempenho da membrana amniótica como substituto do pericárdio foi satisfatório e superior ao enxerto de politetrafluoretileno. A falta de antigenicidade da membrana amniótica mostrou mínima reação do hospedeiro³³.

Em 1998, Bleggi-Torres LF *et al.*, apresentaram estudo morfológico da membrana amniótica humana utilizando microscópio eletrônico de transmissão pela primeira vez na América Latina. O epitélio amniótico era composto por uma

camada de células cuboidais ou colunares baixas com núcleos centralizados, gotículas lipídicas citoplasmáticas e inúmeras microvilosidades projetadas na superfície apical. As células eram firmemente aderidas à membrana basal subjacente por desmossomos e processos celulares. O córion era formado por fibrilas arranjadas em faixas formando uma rede frouxa⁴⁰.

O âmnio humano tem mostrado estimular granulação tecidual e formar novos vasos nas úlceras venosas crônicas de membros inferiores e tem sido usado como revestimento biológico para ferimentos e queimaduras, além de enxerto para ausência congênita de vagina. Propriedades bacteriostáticas, produção de fatores angiogênicos e regulação da síntese de pró-colágenos, são características possíveis que podem promover a efetividade do âmnio como um revestimento biológico. Entretanto, apesar da relativa simplicidade de composição e organização, a membrana amniótica humana tem uma complexa fisiologia. Ela desempenha um papel vital na manutenção da integridade intrauterina durante a gestação. O âmnio é capaz de liberar ácido araquidônico e sintetizar prostaglandina-E. Além disso, suas células epiteliais produzem certas enzimas lisossomais que são capazes de corrigir defeitos enzimáticos *in vitro*⁴⁰.

Zhao P *et al.*, em 2005, examinando o potencial de diferenciação das células mesenquimais da membrana amniótica em cardiomiócitos, verificou que ele realmente ocorria. A sobrevivência desses implantes em ratos sugere uma baixa imunogenicidade dessas células, mas muitos estudos ainda são necessários¹⁴.

Em 2007, Hennerbichler S *et al.*, avaliaram a influência de diferentes condições de armazenamento a curto e longo prazo na viabilidade da membrana amniótica. Até aquele momento, a membrana amniótica era usada principalmente como um biomaterial pouco viável após processamento e preservação ou como uma matriz descelularizada. Desde que os autores demonstraram no seu estudo a viabilidade das células da membrana amniótica que podem ser retidas sob certas condições, tem sido considerado que elas são viáveis e possuem certas propriedades com características de células-tronco, expressão de fatores de crescimento e aumento da imunogenicidade. A avaliação dos métodos de preservação mostrou a viabilidade da membrana amniótica suficiente para que no futuro seja investigado *in vivo*, os possíveis benefícios do âmnio como um biomaterial na cura de ferimentos de pele¹⁶.

Uma revisão detalhada do histórico e as indicações atuais das possíveis ações da membrana amniótica são descritas em outros trabalhos^{17,18,19,39,41}. Atualmente, além do uso em oftalmologia, a membrana amniótica é amplamente aplicada em cirurgia e tratamento de feridas como queimaduras de pele, escaras, úlceras, reconstrução de vagina artificial, cirurgias de cabeça e pescoço, assim como na prevenção de adesão tecidual em procedimentos cirúrgicos do abdômen, cabeça e pélvis^{16,42,43}.

A membrana amniótica continua sendo utilizada em oftalmologia nas afecções da superfície ocular beneficiando a epitelização, reduzindo os processos inflamatórios, angiogênicos e cicatriciais⁴⁴.

Os mecanismos envolvendo a tolerância materna ao feto intrigam os pesquisadores. A barreira anatômica entre mãe e feto formada pela placenta, a inércia imunológica da mãe e a imaturidade antigênica do feto poderiam ser as responsáveis. Contudo, vários estudos têm indicado que a barreira fetal placentária pode ser menos inerte ou impenetrável que antigamente se pensava, devido ao tráfego de células em ambas as direções através da interface feto-mãe. O sistema imunológico materno não é anérgico a todos os tecidos fetais, uma vez que pode responder e eliminar células fetais que entram na circulação materna⁴⁵.

Células derivadas da membrana amniótica têm recebido particular atenção por causa de sua potencialidade de célula-tronco e propriedades imunomoduladoras. Magatti M *et al.*, em 2007 descreveram que a região mesenquimal da membrana amniótica humana da placenta a termo contém células com características funcionais e imunomoduladoras similares às descritas para células-tronco mesenquimais derivadas de outros tecidos como medula óssea, tecido adiposo e sangue de cordão umbilical. Nesse estudo foram descritos propriedades imunomoduladoras de diferentes células de subpopulações isoladas de tecido mesenquimal da membrana amniótica com proliferação de células-T⁴⁵.

Na revisão de Niknejad H *et al.*, também publicada em 2008, os autores descreveram a estrutura básica e propriedades da membrana amniótica que a tornaram uma excelente candidata ao uso na engenharia tecidual. A membrana não contém vasos sanguíneos ou nervos e se nutre diretamente por difusão do fluido amniótico²⁹.

O maior pré-requisito para escolher uma estrutura é a sua biocompatibilidade. Essa é a propriedade de ser biologicamente compatível, não ser tóxica, não ser prejudicial, não ser carcinogênica nem produzir respostas imunológicas no tecido hospedeiro. Suas propriedades mecânicas devem incluir permeabilidade, estabilidade, elasticidade, flexibilidade e plasticidade²⁹.

A membrana amniótica pode ser usada com o epitélio amniótico (MA intacta) ou sem ele (MA descelularizada). Está bem determinado que o detergente chamado SDS (duodecil sulfato de sódio) pode remover o epitélio amniótico da membrana enquanto mantém a histoarquitetura da matriz²⁹.

O uso da membrana amniótica como estrutura para engenharia tecidual parte do princípio que durante a gravidez não ocorreram complicações imunológicas de um material heterólogo, pois metade do zigoto é composto de DNA (ácido desoxirribonucléico) paterno. Há vários mecanismos protegendo o feto de uma resposta imune materna. A barreira placentária restringe o tráfego de células citotóxicas ao feto e anticorpos são removidos antes que caiam na circulação fetal²⁹.

Frequentemente um enxerto deve suportar cargas após o transplante. A membrana amniótica é uma fina estrutura e existe uma limitação técnica para sua sutura, podendo ser usado colas como substitutos de sutura²⁹.

A despeito de todas as vantagens da MA, ela é um material biológico e tem os riscos associados da transmissão de doenças infecciosas, necessitando ser investigada para HIV (vírus da imunodeficiência humana), hepatite B, hepatite C, citomegalovírus, sífilis e outras infecções. Se os testes forem negativos recomenda-se nova investigação após seis meses pela possibilidade de janela imunológica para infecção. Além disso, a placenta deve ser retirada de partos por cesáreas eletivas²⁹.

O âmnio é um fino tecido avascular que representa a mais interna camada do envoltório fetal. Procedimentos não invasivos obtêm o âmnio, já que a placenta é expelida logo após o parto⁴⁶.

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o transplante de membrana amniótica promove re-epitelização, diminui inflamação e fibrose, e modula a angiogênese. Vários fatores de crescimento estão envolvidos nesse processo⁴⁶.

O âmnio tem um sistema imunológico imaturo e tem sido considerado um tecido adequado para transplantes autólogos, baseado nos seus efeitos antiinflamatórios, baixa imunogenicidade e ausência de tumorigenicidade, quando células amnióticas humanas foram transplantadas em animais de laboratório ou em voluntários humanos⁴⁶.

Em 2009, Yu SJ *et al.*, publicaram uma revisão demonstrando a caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do âmnio com potencial terapêutico para várias doenças do sistema nervoso central, especialmente o acidente vascular cerebral⁴⁶.

Os estudos de Cargnoni A *et al.* em 2009, sugerem que o uso de membrana amniótica constitui um importante fornecimento de células produtoras de fatores cardioprotetores solúveis, e reforçam a noção de que este tecido constitui um tipo de célula com potencial clínico ainda a ser completamente revelado²⁶.

Considerando que os remendos de membrana amniótica podem atuar tanto como um tipo de células-tronco fetais e como um veículo para transferência de células locais às áreas isquêmicas, o seu uso após infarto do miocárdio poderia representar um novo potencial de tratamento para lesões isquêmicas²⁶.

Aplicação de um fragmento de MA para a lesão cardíaca isquêmica resulta em melhor preservação das dimensões cardíacas com respeito a ratos isquêmicos não tratados²⁶.

Em 2009, Cargnoni A *et al.*, investigando a possível utilidade da membrana amniótica para limitar lesão cardíaca pós-isquêmica, aplicaram um fragmento dessa membrana humana sobre o ventrículo esquerdo de ratos que tinham sofrido isquemia pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda. Esses animais foram acompanhados por um período de três meses e os autores demonstraram que a aplicação da membrana amniótica sobre o coração dos ratos reduziu significativamente a disfunção cardíaca pós-isquêmica. Eles tiveram as dimensões cardíacas preservadas e melhora da função contrátil. Essas melhorias apareceram após sete dias de enxerto persistindo por dois meses independentemente da gravidade da lesão cardíaca. Os resultados mostraram que o tratamento dos ratos isquêmicos com a membrana amniótica foi o responsável pela preservação da função contrátil cardíaca, além da ausência de taquicardia compensatória. E também mostrou que a proteção cardíaca após

aplicação desse material biológico, independe da gravidade da lesão induzida, prevendo-se efeitos benéficos em várias patologias isquêmicas graves²⁶.

Tem sido reportado que a membrana amniótica, assim como células derivadas dela, é capaz de liberar citocinas que possuem potencial imunomodulador e efeitos antiinflamatórios como interleucina-10 e interleucina-6. As células amnióticas também liberam fatores de crescimento associados à cura de ferimentos, fatores angiogênicos, assim como proliferação e diferenciação celular. O uso do enxerto da MA também prolonga a sobrevivência de células transplantadas pois elas estão embebidas numa matriz rica em colágeno preservando sua integridade e prevenindo o contato direto com tecidos cardíacos isquêmicos e ou necróticos que poderiam acelerar sua morte²⁶.

O uso da membrana amniótica como tratamento de doenças isquêmicas do miocárdio oferece a evidente vantagem de oferta abundante podendo ser aplicada imediatamente sem a necessidade de isolamento celular, seleção ou cultura o que torna o procedimento de baixo-custo, pois ela tem boa preservabilidade e é imunologicamente tolerada²⁶.

Em 2010, Schimidt LR *et al.*, buscando um novo material para o reparo de ferimentos duodenais, avaliaram o comportamento da membrana amniótica na parede duodenal de ratos. Ocorreu regeneração da mucosa e da camada muscular. A membrana fornece suficiente resistência para a manipulação cirúrgica devido à sua estrutura histológica, especialmente na camada matriz. Os autores concluíram que a MA serve como um selo temporário de lesões provocadas devido à cicatrização por segundas intenções ocorrida na parede duodenal dos ratos pesquisados¹⁵.

Murphy S *et al.*, em 2010, descreveram um eficiente e efetivo método de isolamento, cultura e criopreservação de células epiteliais da MA, de acordo com protocolos vigentes na preparação de células para uso clínico. As células epiteliais da MA têm propriedades similares às células-tronco embrionárias e não são fonte de embrião humano. O âmnio é usualmente descartado como resíduo médico com outros tecidos placentários após o nascimento. Em teoria, as células epiteliais da MA poderiam ser isoladas de cada placenta e estocadas, sendo possível criar bancos de células amnióticas que poderiam ser usadas em várias aplicações clínicas, podendo ser usadas em terapias regenerativas *in vivo*³⁰. A membrana fetal tem de suportar a pressão do líquido amniótico em repetitivas

cargas menores como as contrações uterinas. Sua força mecânica faz dela um atrativo a ser usado como enxerto cirúrgico, pois ela também demonstra viscoelasticidade que é uma importante propriedade³⁰.

A membrana amniótica tem uma população heteróloga de células cujo potencial pode diferenciar-se em endoderma (fígado e epitélio pulmonar), mesoderma (osso e tecido adiposo) e ectoderma (células neurais). Eles têm baixo perfil imunogênico e possuem propriedades imunossupressivas potentes³⁰.

Finalmente, a membrana amniótica tem atraído a atenção como um potencial para terapias regenerativas, pela habilidade multipotente de diferenciação, baixa imunogenicidade e função antiinflamatória³⁰.

2.5 DESCELULARIZAÇÃO

Com a finalidade de diminuir ainda mais a antigenicidade e criar uma prótese biocompatível e resistente a longo prazo, tem-se estudado os processos de descелularização. Esses métodos promovem a remoção de células e proteínas estruturais que funcionam como antígenos. De uma maneira simplista, remove-se o material nuclear e citoplasmático com alteração mínima na composição, atividade biológica e integridade mecânica da matriz extracelular. Para tal processo é necessário uma combinação de métodos físicos, químicos e enzimáticos abaixo descritos⁹.

Um processo de descелularização necessita que todas as células sejam removidas, evitando respostas imunes adversas após o implante. Esse processo de descелularização deve preservar os componentes da matriz extracelular fornecendo uma estrutura biomecânica suficiente e promovendo uma eficiente ressemeadura²⁷.

Várias técnicas para extração de componentes celulares foram desenvolvidos para a preparação de enxertos descелularizados. Valvas cardíacas biológicas e condutos são largamente usados por causa da sua alta elasticidade e compatibilidade com os órgãos receptores em comparação aos sintéticos. Em 2003, Uchimura E *et al.*, publicaram um novo conceito para preparação de enxertos biológicos. Até então, a maioria dos componentes celulares eram lavados para fora do tecido original enquanto a matriz extracelular permanecia no enxerto. Entretanto, enxertos acelulares produzem uma resposta imunológica

fraca quando implantado no organismo. Nesse trabalho foi proposto um novo método de extração dos componentes celulares na presença de polietilenoglicol, um polímero biocompatível. A vantagem desse método é não utilizar detergentes tóxicos, sendo útil na preparação de enxertos de vasos cardiovasculares e valvas cardíacas⁴⁷.

Schenke-Layland K *et al.*, em 2003 publicaram uma pesquisa multidisciplinar cujo objetivo era investigar o impacto de diferentes protocolos de descélularização na integridade da matriz extracelular de enxertos heterólogos utilizando-se de microscopia a laser, análises bioquímicas e histológicas. Diferenças distintas nos vários componentes da matriz extracelular foram observadas após a descélularização, revelando a necessidade de mais estudos com a finalidade de se evitar respostas imunológicas que comprometam a força biomecânica do material²⁷.

Na pesquisa por uma prótese biocompatível e resistente, verificou-se que o processo de descélularização torna o tecido menos antigênico, com menor reação inflamatória e conseqüentemente, menor degeneração tecidual. A descélularização surgiu como uma alternativa para eliminar células e restos celulares com a intenção de retardar o processo de calcificação. A presença de células nos tecidos implantados funciona como um início de calcificação. A descélularização remove o material nuclear e celular, promovendo mínimos danos na composição, atividade biológica e integridade da matriz extracelular⁴⁸.

Em função de obter uma estrutura que poderia se assemelhar à forma anatômica, tamanho e hemodinâmica da válvula cardíaca normal, vários protocolos de descélularização para o tratamento das valvas têm sido propostos. Um pré-requisito para reduzir a imunogenicidade do tecido é preservar a resistência biomecânica da estrutura e remover as células enquanto simultaneamente se preserva os componentes da matriz extracelular. A implantação de válvulas descélularizadas já demonstrou várias melhorias sobre o uso de homoenxertos criopreservados, no que diz respeito à imunogenicidade e à calcificação dos folhetos. Ainda não há dados suficientes para determinar qual dos protocolos usados para descélularização é superior em manter as características biomecânicas da estrutura²⁸.

Mello GB *et al.*, em 2007, após avaliarem as características da MA descélularizada por diferentes técnicas, concluíram que o tratamento com tripsina

e dispase causava completa retirada do epitélio e da membrana basal, enquanto o ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) preservava áreas com epitélio intacto e destruía parcialmente a membrana basal em outras⁴⁴.

A principal limitação clínica no uso de biopróteses cardíacas é a calcificação que eventualmente leva à falência do dispositivo. Depósitos iniciais de cálcio surgem em volta e vão coalescendo, resultando em nódulos mineralizados grosseiros que enrijecem e enfraquecem o tecido dando origem a um funcionamento inapropriado da prótese. Esse evento tem sua hipótese na descelularização induzida pelo glutaraldeído no pericárdio bovino. Vários agentes têm sido testados para se propor uma inibição da calcificação. As estratégias consistem em remoção ou modificação dos componentes calcificáveis, modificação da fixação do glutaraldeído, uso de outros fixadores além do uso de outros materiais⁴⁹.

Há vários artigos descrevendo métodos de preservação, esterilização e descelularização da MA. Cada técnica tem sido reportada, levando a diferentes efeitos nas propriedades físicas e biológicas da MA. Portanto, é difícil estabelecer um procedimento padrão. Riau AK *et al.*, em 2009 apresentaram uma revisão de várias técnicas na preparação da MA para uso na reconstrução da superfície ocular e o seu impacto na estrutura e na sua atividade biológica⁵⁰.

A preservação da complexa composição de uma matriz extracelular é altamente desejável, mas sabe-se que todos os métodos de descelularização resultam numa ruptura da arquitetura e potencial perda da estrutura da superfície e composição. Métodos físicos e químicos, além de agentes biológicos são usados em combinação para lesar células, seguido pela lavagem para remover as células remanescentes. A metodologia de uma efetiva descelularização é ditada por fatores como a densidade do tecido e sua organização, propriedades biológicas e geométricas para o produto final e o alvo da aplicação clínica. A descelularização tecidual com preservação da integridade e da bioatividade da matriz extracelular pode ser otimizada pela escolha correta dos agentes e técnicas utilizadas durante o processo⁹.

Estudos têm mostrado que alguns detergentes rompem o colágeno de certos tecidos diminuindo a sua força mecânica. Entretanto, o mesmo produto não altera o colágeno em tecidos bastante similares (tendões e ligamentos). Outra

variável que pode afetar as propriedades mecânicas dos enxertos é a duração da exposição aos agentes descelularizantes⁹.

É necessário esterilizar estruturas biológicas da matriz extracelular antes da implantação ou do uso *in vitro*, com a finalidade de eliminar endotoxinas e DNA (ácido desoxirribonucleico) intacto de vírus e bactérias que possam estar presentes⁹.

Cada descelularização tipicamente envolve exposição para selecionados agentes químicos e biológicos como detergentes, enzimas e forças físicas que inevitavelmente causam ruptura da matriz extracelular associada. Para a escolha do método de descelularização há necessidade de se ter um completo conhecimento e entendimento do seu mecanismo de ação. A resposta do tecido hospedeiro após implante *in vivo* do material é dependente do método de descelularização e da remoção de células remanescentes. Até que mais dados estejam disponíveis em relação aos efeitos das células remanescentes sobre a resposta do hospedeiro, é razoável estabelecer protocolos de descelularização baseados prontamente em determinados critérios quantitativos do material nuclear remanescente dentro da estrutura biológica⁹.

Crapo PM *et al.*, publicaram em 2011 uma revisão de métodos de descelularização, seus efeitos sobre a estrutura e composição da matriz extracelular e descreveram técnicas para se descelularizar órgãos inteiros⁹.

São os seguintes agentes descelularizantes:

1. Agentes químicos

1.1 Ácidos e bases - causam ou catalisam degradação de biomoléculas. São: ácido peracético, ácido acético, hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio e sulfureto de sódio.

1.2 Soluções hipertônicas e hipotônicas - a salina hipertônica dissocia o DNA das proteínas, enquanto as soluções hipotônicas podem causar lise celular por efeitos osmóticos simples com mínimas trocas nas moléculas e arquitetura da matriz; essas soluções também ajudam a lavar os resíduos de células após a lise tecidual.

1.3 Detergentes - iônicos e não-iônicos solubilizam a membrana celular e dissociam o DNA das proteínas, sendo efetivos na remoção de material celular dos tecidos, mas também rompem e dissociam proteínas na matriz extracelular. A remoção dessas proteínas e do DNA pelos detergentes aumenta com o tempo de

exposição e varia com o órgão, tipo de tecido e idade do doador. Triton X-100 efetivamente remove resíduos celulares de tecidos espessos como os condutos valvares aonde métodos enzimáticos e osmóticos são insuficientes. Duodecil sulfato de sódio (SDS) aparenta ser mais efetivo que Triton X-100 para remoção nuclear de tecidos densos. A adição de um detergente como o SDS ao protocolo da descelularização pode fazer a diferença entre completa e incompleta remoção nuclear, mas tem a desvantagem do rompimento da ultra-estrutura e eliminação do fator de crescimento. O SDS é tipicamente mais efetivo para remoção de resíduos celulares de tecidos comparados a outros detergentes, mas também provoca mais rompimento da matriz extracelular.

Cuidados devem ser tomados para lavar resíduos químicos da matriz extracelular depois da descelularização particularmente com detergentes como SDS que penetram em tecidos espessos ou densos. Citotoxicidade é possível mesmo em reduzida concentração dos agentes e inibirá ou negará completamente as propriedades benéficas de uma estrutura livre de células. Tecidos finos como os folhetos valvares requerem múltiplas (mais de seis) lavagens para completa remoção dos detergentes.

1.4 Álcoois - como glicerol, ajudam na descelularização tecidual pela desidratação e lise celular. Fosfolipídeos nos folhetos valvares e condutos contribuem para calcificar e fracassar a prótese, e pode ser extraído usando álcoois. Esses como isopropanol, etanol e metanol são mais efetivos que as lipases em remover lipídeos dos tecidos. Metanol em combinação com clorofórmio tem sido usado durante a delipidação tecidual.

1.5 Outros solventes - acetona também pode ser usada para remover lipídeos durante a descelularização. O fosfato-tributil (TBP) é um solvente orgânico com propriedades viricidas. Para descelularização de tecidos densos como tendão, o TBP também aparenta ser mais efetivo que detergentes como Triton X-100 e o SDS.

2. Agentes biológicos

2.1 Enzimas – são as nucleases, tripsinas, colagenases, lipases, dispases, termolisinas e α -galactosidases. Seus resíduos podem prejudicar a recelularização ou evocar uma resposta imune adversa.

2.2 Agentes não-enzimáticos - quelantes como ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e ácido etilenoglicoltetraacético (EGTA) ajudam na dissociação de células

pelo sequestro de íons-metals. Os quelantes são insuficientes para a remoção celular superficial só com agitação, e eles devem ser usados em combinação com enzimas (como as tripsinas) ou detergentes

3. Agentes físicos

3.1 Temperatura - processo de congelamento e descongelamento que efetivamente lisa células de tecidos e órgãos, mas é um processo incompleto. Um simples ciclo de congelamento/descongelamento pode reduzir respostas imunes adversas como infiltração leucocitária. Múltiplos ciclos de congelamento/descongelamento podem ser usados durante a descélularização e não significa aumento da perda das proteínas da matriz extracelular.

3.2 Força e pressão - células nas superfícies de tecidos ou órgãos podem ser efetivamente removidas pela abrasão mecânica em combinação com enzimas, salinas hipertônicas ou agentes quelantes. A ultra-estrutura subjacente e a integridade da membrana basal são danificadas invariavelmente pela aplicação da força mecânica. Pressão hidrostática requer menor tempo e pode ser mais efetiva que detergentes ou enzimas para a remoção celular de vasos sanguíneos e tecidos corneanos.

3.3 Eletroporação não-térmica irreversível - são pulsos elétricos em microssegundos aplicados através de tecidos induzindo a formação de microporos na membrana celular que levam à perda da homeostasia causando a morte das células. O mecanismo de remoção celular não está claro.⁹

Técnicas de aplicação dos agentes descélularizantes:

1. Perfusão do órgão inteiro - perfusão anterógrada ou retrógrada usada para órgão que precisa preservar a arquitetura tridimensional.
2. Pressão de gradiente - a indução de uma pressão de gradiente através do tecido durante a descélularização pode ter um auxílio suplementar de enzimas resultando na preservação da ultra-estrutura.
3. Fluidos supercríticos - dióxido de carbono supercrítico remove resíduo celular quando passado através de tecidos em uma taxa controlada similar ao ponto crítico de secagem. A vantagem da descélularização pelo gás inclui o uso de uma substância inerte (dióxido de carbono) para remoção celular, alteração mínima das propriedades mecânicas da matriz extracelular, e eliminação da liofilização como um nível preparatório para processamento da matriz extracelular e estocagem.

4. Imersão e agitação - método de imersão e agitação descrito para uma larga variedade de tecidos incluindo válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, músculos e tendões, nervos periféricos, medula espinhal, cartilagens, traquéia, esôfago, derme e bexiga urinária. A duração do protocolo depende da espessura e densidade tecidual, do detergente usado e da intensidade da agitação.

Qualquer processo de descelularização é dependente de características teciduais como espessura e densidade e à aplicação clínica que se pretende do tecido descelularizado⁹.

Em resumo, o potencial efeito benéfico de uma estrutura biológica no campo da engenharia tecidual e em medicina regenerativa pode ser obtido desde que métodos ótimos de descelularização sejam empregados⁹.

3 MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para a realização desta pesquisa, delineou-se um estudo experimental em ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*. *Rodentia mammalia*) com idade entre 6 e 7 meses, e pesos variando entre 368 e 414 gr. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA PUCPR - Nº 596).

A membrana amniótica foi obtida de placentas cedidas por duas gestantes da Maternidade Victor Ferreira do Amaral (Curitiba, PR) após a assinatura do termo de livre esclarecimento. O processo de obtenção e tratamento da membrana amniótica está vinculado ao projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos do Hospital Pequeno Príncipe (Curitiba, PR) sob protocolo nº 427652 com parecer nº 0948-11. Todo o procedimento de preparo da membrana para implantação foi realizado no laboratório do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe do mesmo hospital.

3.2 AMOSTRA

Foram analisadas lâminas de corações de 20 ratos submetidos à eutanásia após 30 dias do procedimento cirúrgico, assim como de 10 ratos normais, do mesmo lote do início do estudo.

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

Analisou-se também a eficácia da descontaminação das membranas. As duas membranas amnióticas foram divididas em 12 fragmentos. Seis fragmentos foram tratados com dióxido de cloro e seis com antibióticos. Desses doze fragmentos foram coletadas amostras para análise microbiológica.

3.3 LOGÍSTICA

Este estudo foi realizado em três fases distintas: 1. Obtenção e o tratamento da membrana amniótica; 2. Implantação da membrana amniótica na superfície do coração; e 3. Estudo anatomopatológico do coração.

3.3.1 Obtenção e Tratamento da Membrana Amniótica

As membranas amnióticas foram obtidas de duas gestantes (25 e 37 anos), parto cesáreo, sem intercorrências clínicas durante a gestação, sem história de uso de drogas, álcool ou medicações de uso contínuo, com conceito único e normal. Os exames sorológicos para HIV, vírus da hepatite B e C e sífilis foram normais.

A coleta da membrana amniótica foi realizada dentro da sala cirúrgica, de maneira estéril logo após a dequitação da placenta. O âmnio foi descolado com tesoura e pinça do lado fetal da placenta. (figura 1A). Em seguida foi estendido sobre um filtro de nitrocelulose estéril (Millipore, Bedford, MA, EUA) com a face epitelial para cima e recortadas em amostras de 10x10 cm. Foram transportadas para o laboratório do Instituto Pelé Pequeno Príncipe onde foi realizada a descontaminação e a descellularização. (figura 1B)

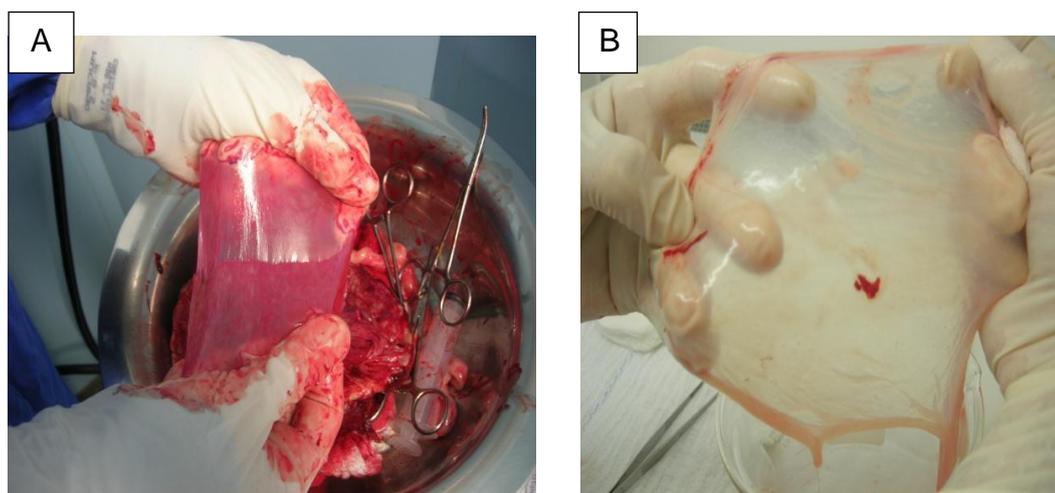


Figura 1. (A) Manobra digitiforme de separação do âmnio e do córion, (B) Lavagem exaustiva do material para retirada de resíduos de sangue e córion.

Em câmara com proteção de fluxo laminar, as membranas e os filtros foram lavados com soro fisiológico estéril. Após a remoção dos resíduos remanescentes

as membranas foram divididas em 12 fragmentos. Seis fragmentos foram suspensos em uma solução tampão-fosfato contendo dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa (8%) na concentração de 100 ppm e mantidas sob agitação em temperatura ambiente por 60 segundos. Os outros seis fragmentos foram colocados em solução contendo 1000 U/ml de penicilina, 20 µg/ml de estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina-B por 1 hora. Após esses procedimentos, efetuou-se a troca da solução por outra solução tampão PBS (*phosphate buffered saline* ou solução salina tamponada com fosfato) 7,2 em recipientes separados (Gibco). Em seguida as membranas foram apostas em papel filtro, com a porção epitelial voltada para cima e recortadas em mais fragmentos de aproximadamente 7x7 mm. Coletou-se, nesse momento, amostra para estudo microbiológico.

Para análise microbiológica, as amostras foram colocadas em meio de cultivo líquido, incubadas em estufa a 37°C por até 7 dias. Quando observado crescimento de microrganismos, as soluções eram replicadas em placas de ágar sangue, e Sabouraud para cultivo dos microrganismos. As soluções sem crescimento foram desprezadas após sete dias. A identificação das colônias de microrganismos foi realizada utilizando os métodos habituais de laboratório. Os testes foram realizados em triplicata para cada amostra de membrana.

A descelularização foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®). Para esse processo, as membranas foram retiradas do meio (PBS) tampão fosfato pH 7.2 (Gibco) e tratadas com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% por 24 horas a 37° C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109M, Nova Ética Ltda.). Depois foram conservadas em PBS a 4° C.

A efetividade da descelularização foi comprovada por amostragem e análise histológica utilizando coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

3.3.2 Implantação da Membrana Amniótica na Superfície do Coração

As cirurgias para implantação das membranas foram realizadas no Laboratório de Cirurgia Experimental e Técnica Operatória do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da PUCPR.

Os animais foram anestesiados com uma mistura volume/volume 1:1 de uma solução de 40-87 mg.kg de quetamina com 5-13 mg.kg de xilazina, administrada por via intramuscular de acordo com o Manual de Utilização de Animais\FIOCRUZ 2008.

Após antissepsia com PVPI (iodopovidona), foi realizada toracotomia lateral esquerda, por onde foi retirado o pericárdio e exposto o coração. Em seguida, implantou-se um segmento de 7 x 7 mm da membrana amniótica obtido por um *punch* (figura 2A e 2B). Foram suturadas as bordas da membrana no ventrículo esquerdo com fio polipropilene 7.0 (Ethicon®, Inc., Somerville, NJ). (figura 2C e 2D). Após verificada a hemostasia, os arcos costais e a pele foram suturadas com fio mononylon 5.0 (Ethicon®, Inc., Somerville, NJ). Ao término, foi realizada nova antissepsia com PVPI.

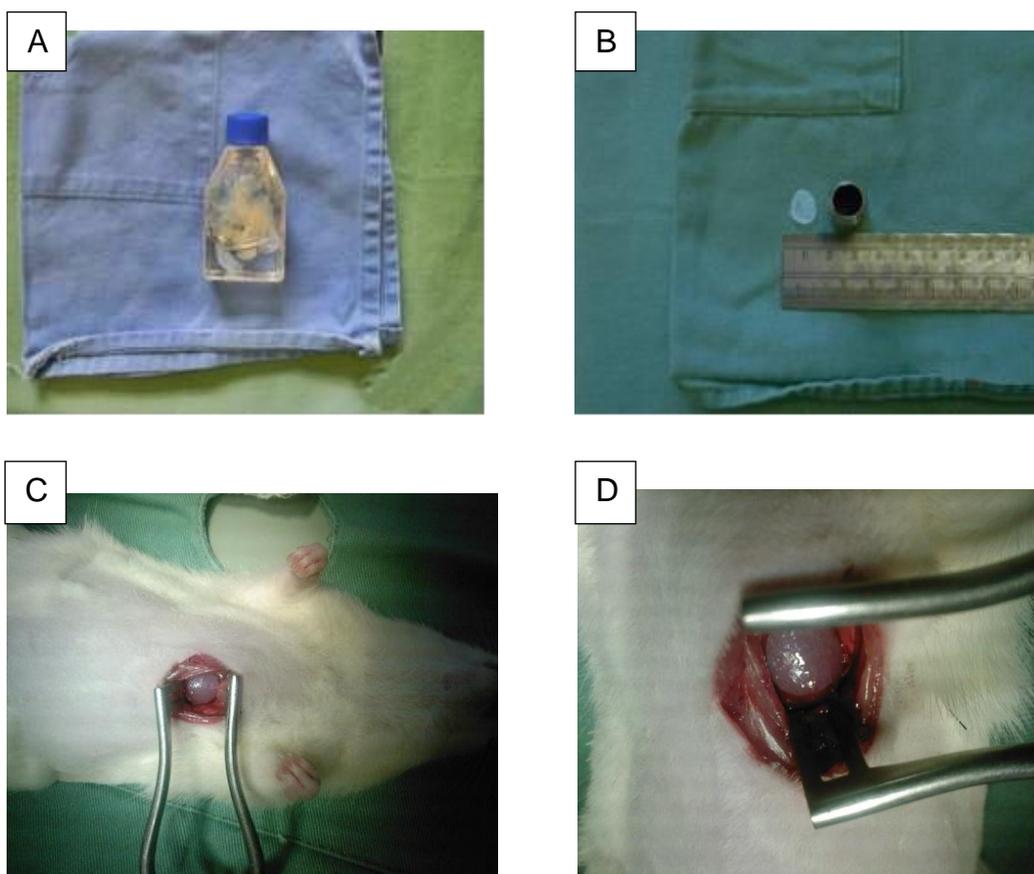


Figura 2. (A) Membrana, (B) Fragmento de MA, (C) e (D) Exposição do coração para procedimento de transplante da membrana.

Para analgesia foi utilizado antiinflamatório não esteroidal, Ibuprofeno oral 20 mg.kg Pfizer, com efeito de duração de 8 a 12 horas, fornecidos 1 x ao dia (FDA - CVM, 2009).

Todos os animais permaneceram no biotério central da PUC-PR, recebendo dieta composta por ração e água “*at libitum*”.

A eutanásia foi realizada após 30 dias do procedimento com a dose letal (DL50) (148 mg/kg) do anestésico quetamina.

Na retirada do coração foi realizada uma análise macroscópica para avaliação de aderências.

3.3.3 Estudo Anatomopatológico do Coração.

Os corações foram preservados em frascos contendo formol 10% durante 24 horas. Após este período os corações foram clivados em 4 partes iguais transversais no micrótomo (Leica modelo RM2145) com espessura de 5 µm.

Para desidratação dos cortes foi realizado banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90% e três banhos em álcool 100% no Leica (modelo TP1020), durante uma hora. Logo após, impregnada parafina líquida nos cortes através de três banhos a 65°C no mesmo aparelho. No final os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de HE e Alizarina-Red pH 4,2 e 7,0. De cada fragmento foram realizadas duas lâminas com os quatro cortes.

A análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica Experimental do CCBS da PUCPR.

3.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS

3.4.1 Estudo Bacteriológico

Foi realizada uma comparação do número de culturas positivas entre as membranas tratadas com dióxido de cloro e antibióticos. Estudou-se também o tipo de germe encontrado.

3.4.2 Análise Macroscópica

Foi realizada uma análise macroscópica durante a retirada do coração para avaliação de aderências. Foi classificada em ausente e presente. Se presente, foi graduada em: discreta (quando era facilmente desfeita, sem a necessidade da

secção de tecidos), moderada (quando era necessário seccionar algumas áreas de fibrose para individualização dos planos) ou importante (quando além da necessidade de seccionar áreas de fibrose, era difícil a individualização dos planos)⁵¹.

3.5 ESTUDO HISTOLÓGICO

O estudo histológico da membrana implantada na superfície ventricular do coração constituiu-se de análise por meio da microscopia óptica de lâminas de cortes histológicos coradas pela técnica de HE. Utilizou-se um microscópio óptico (Olympus® BX40), com aumento de 200 X, acoplado a uma câmera Sony® conectada a um computador.

Foi realizada análise qualitativa inicial e posteriormente análise morfométrica. A análise qualitativa foi realizada no programa Image Pro-plus® for Windows. Com a ferramenta “medidas de distância” selecionaram-se os pontos de interesse e o programa automaticamente gerou a medida entre o pericárdio visceral e parietal.

3.5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA

Foi observada a quantidade das células predominantes na reação inflamatória (polimorfonucleares e monomorfonucleares), o grau de formação de tecido de granulação e de fibrose, além da formação de neovasos nas lâminas coradas pela HE.

Nas lâminas coradas pela Alizarina-Red em pH 4,2 e 7,0 foram pesquisadas calcificações.

3.5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Foi medido o espessamento da membrana implantada, em duas regiões distintas em dez campos por cortes histológicos em cada lâmina. Portanto de cada implante foram realizadas 20 medidas e considerada a média para o cálculo estatístico.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar as amostras categóricas, positividade das culturas e aderências, utilizou-se o “teste exato de Fisher”. Na comparação das medidas das membranas, obtidas por meio de microscopia, foi utilizado o “teste não paramétrico de Mann Whitney”. O mesmo teste foi utilizado na comparação das membranas amnióticas implantadas com o pericárdio parietal normal. Adotou-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados no programa computacional Graphpad prisma v.5.0.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA DESCONTAMINAÇÃO

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

As culturas das seis amostras de membranas tratadas com dióxido de cloro mostraram-se negativas.

Quatro das seis amostras tratadas com antibióticos mostraram crescimento de germe, porém sem significância estatística, com $p = 0,06$. As bactérias mais prevalentes em ordem decrescente foram: *Staphylococcus coagulase negativo*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Enterobacter sp.* e *Neisseria SP.*

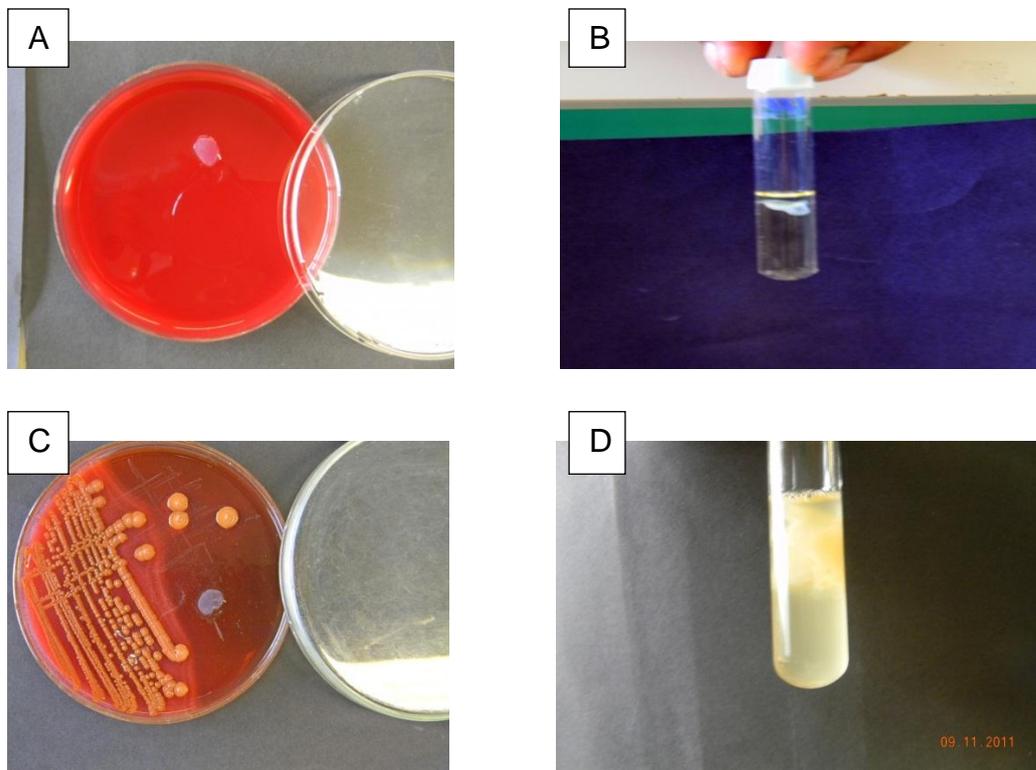


Figura 3 - (A) – Cultura negativa em ágar-sangue após descontaminação com dióxido de cloro, (B) – Cultura negativa em BHI após descontaminação com

dióxido de cloro, (C) – Cultura positiva em ágar-sangue após descontaminação com antibióticos, (D) – Cultura positiva em BHI após descontaminação com antibióticos.

4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Na dissecação para retirada do coração observou-se que todos os ratos que receberam membranas tratadas com antibióticos apresentavam aderências moderadas e/ou importantes com os tecidos adjacentes. Os ratos com membranas tratadas com dióxido de cloro e descelularizadas mostravam aderências discretas, significativamente diferentes entre os dois grupos, apresentando $p = 0,007$.

Em todos os ratos foi possível identificar a região do implante da membrana e observava-se que elas estavam fortemente incorporadas ao coração.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA

Na avaliação microscópica do grupo de ratos com implantação da membrana descelularizada observou-se infiltrado mononuclear moderado e presença de neovasos. (figura 4) Não se conseguiu evidenciar uma diferenciação entre o pericárdio parietal e a membrana implantada.

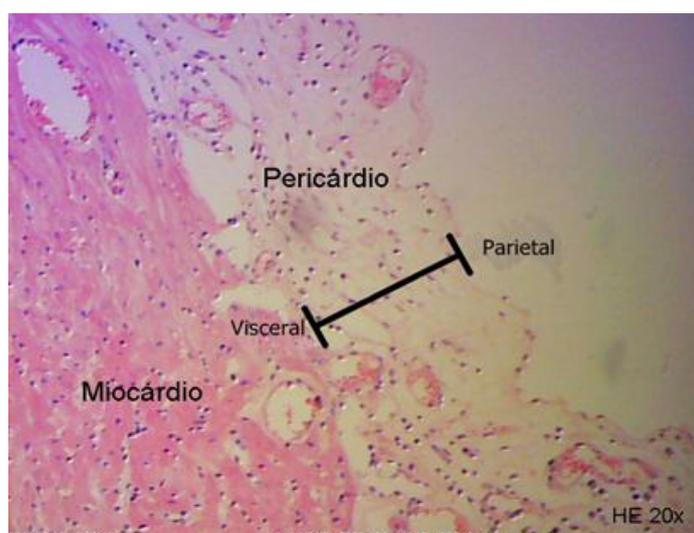


Figura 4 – Fotomicrografia do grupo GDIOX mostra área focal e pouca reação inflamatória (HE 20X)

No grupo com membrana amniótica tratada com antibióticos observou-se também incorporação, sem possibilidade de diferenciá-la do pericárdio parietal e a formação de neovasos. Mas diferente do grupo anterior, o infiltrado de células mononucleares mostrava-se mais intenso. (figura 5)

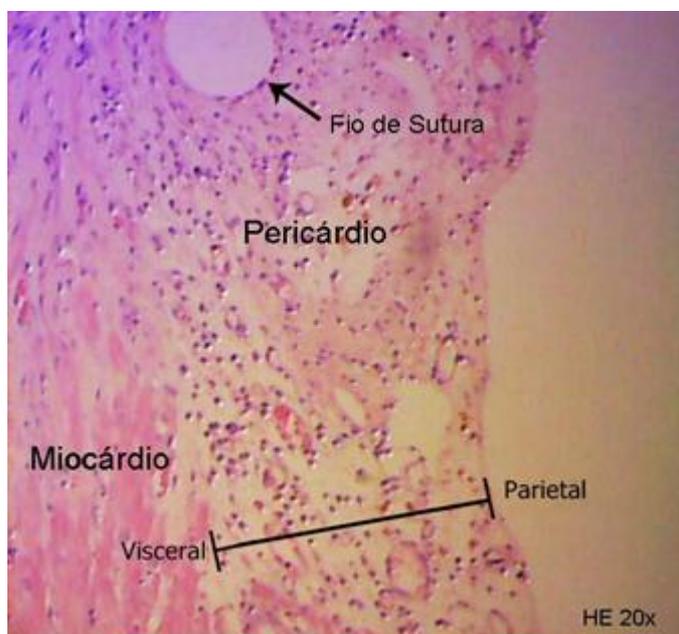


Figura 5 – Fotomicrografia do grupo GATB mostra área focal com presença de fio de sutura (seta) e intenso infiltrado inflamatório (HE 20X)

Nos grupos controle pericárdio, pôde-se observar presença de células normais com parede apresentando espessura normal. (figura 6)

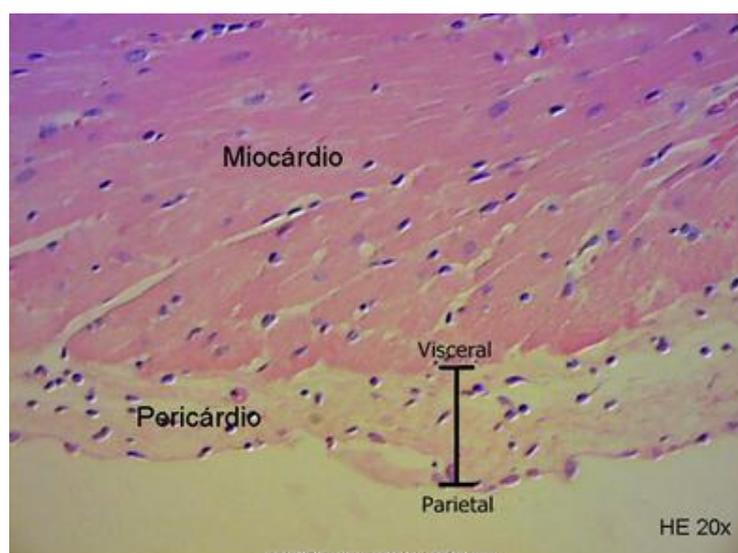


Figura 6 – Fotomicrografia de um pericárdio normal (HE 20X)

Pela coloração com Alizarina-Red pôde-se evidenciar a ausência de cálcio nos corações que receberam membranas descontaminadas com antibióticos e com dióxido de cloro. Não observamos a presença de fosfato de cálcio pela Alizarina-Red 4,2 nem oxalato de cálcio pela Alizarina-Red 7,0 em todas as amostras analisadas. (figura 7) (figura 8)

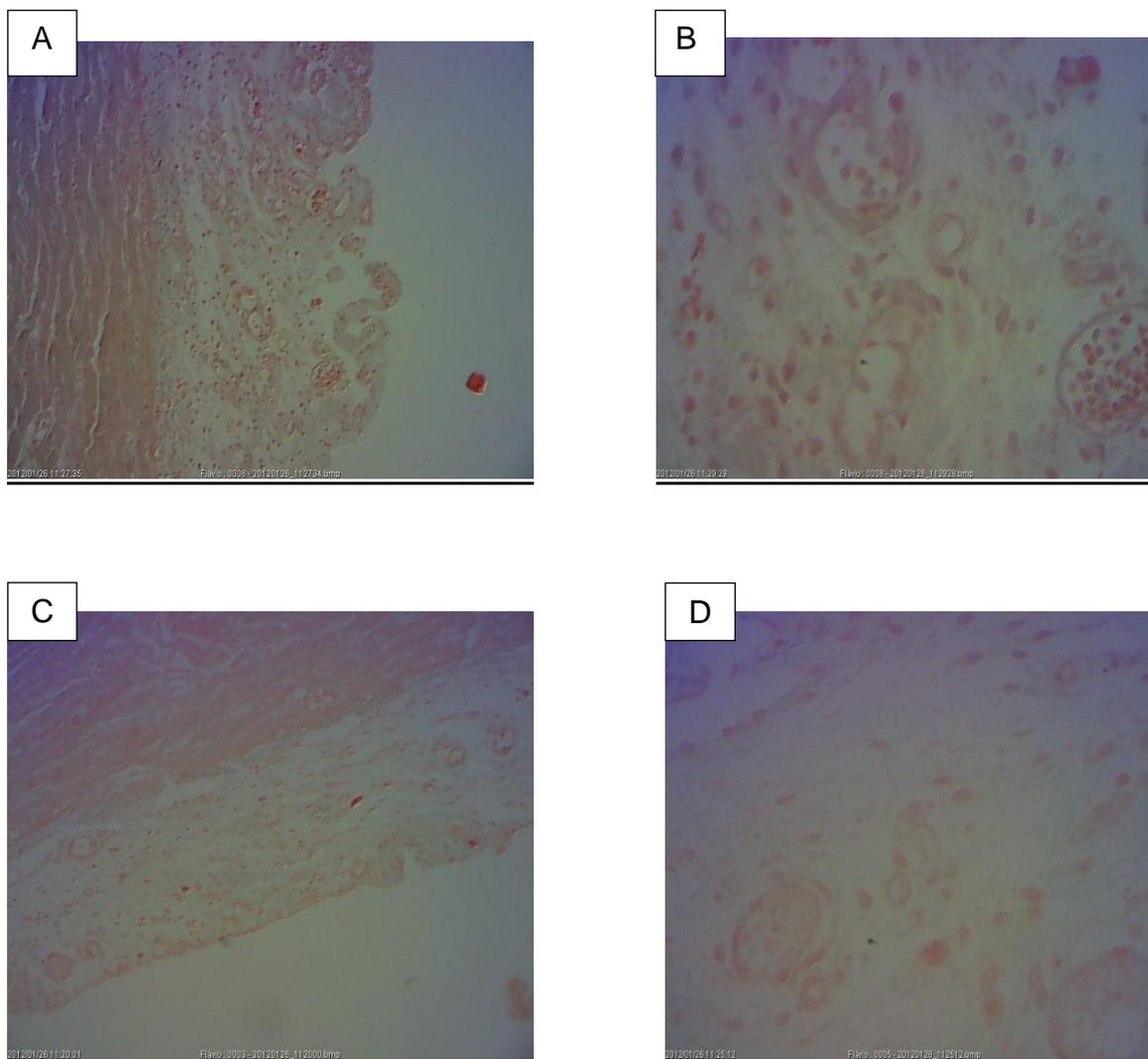


Figura 7- (A) e (B) Membranas descontaminadas com antibióticos e coradas pela Alizarina-Red pH 4,2 (10X e 40X), (C) e (D) Membranas descontaminadas com antibióticos e coradas pela Alizarina-Red pH 7,0 (10X e 40X).

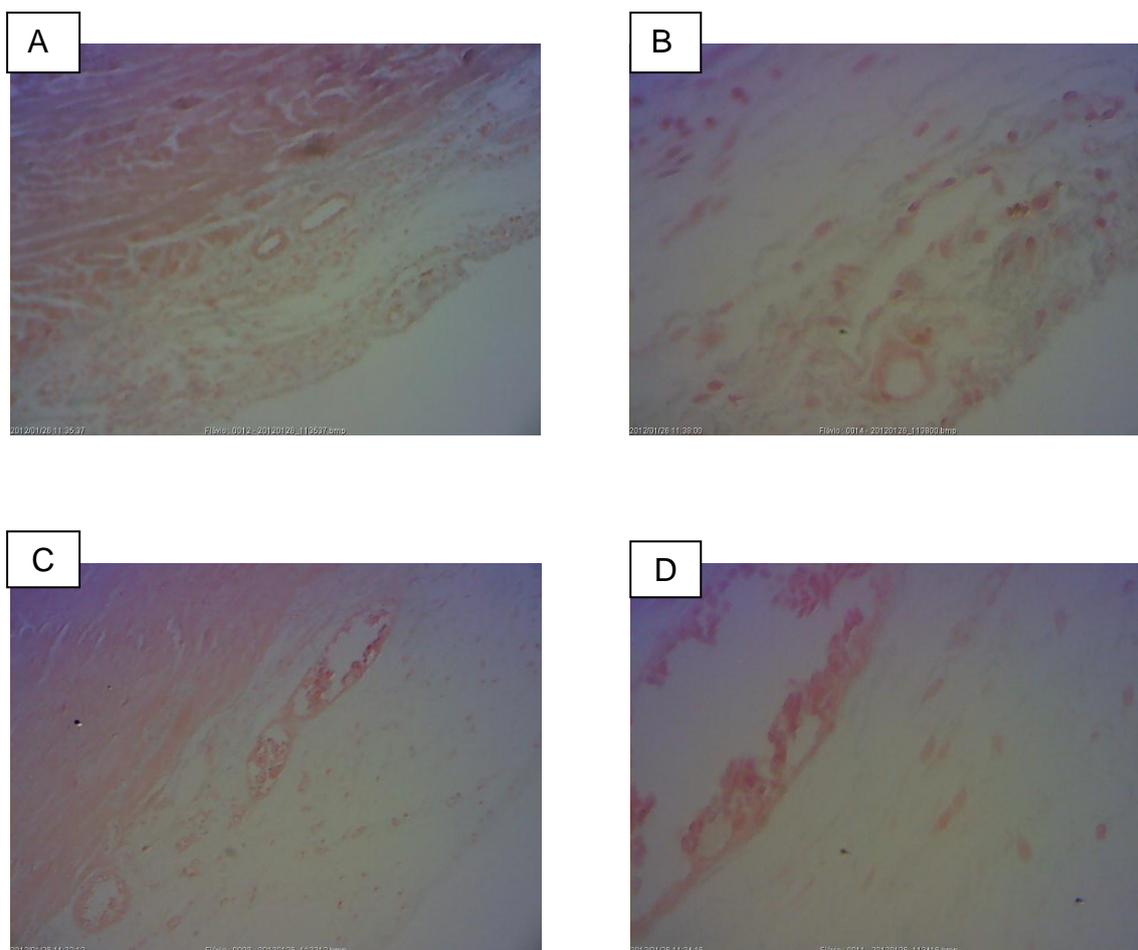
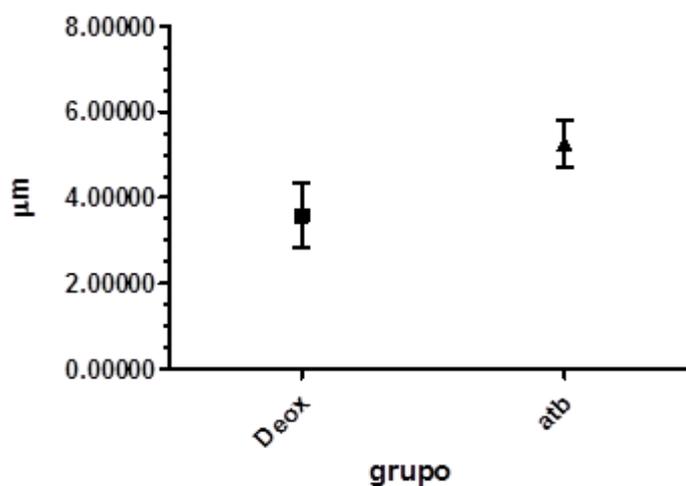


Figura 8 - (A) e (B) Membranas descontaminadas com dióxido de cloro e coradas pela Alizarina-Red pH 4,2 (10X e 40X), (C) e (D) Membranas descontaminadas com dióxido de cloro e coradas pela Alizarina-Red pH 7,0 (10X e 40X).

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOMÉTRICA

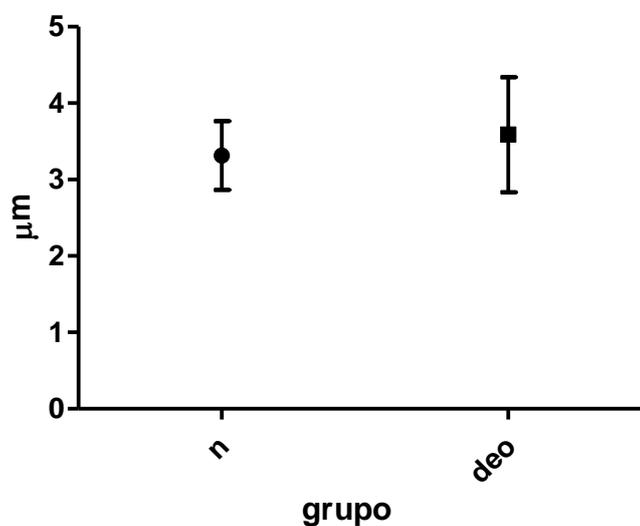
A média das medidas das membranas amnióticas tratadas com antibiótico ($5,263 \pm 0,5552 \mu\text{m}$) mostrou-se significativamente maior que a da membrana tratada com dióxido de cloro e descelularizada ($3,589 \pm 0,7522 \mu\text{m}$), sendo encontrado $p = 0,008$. (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Comparação entre o grupo GATB e o GDIOX



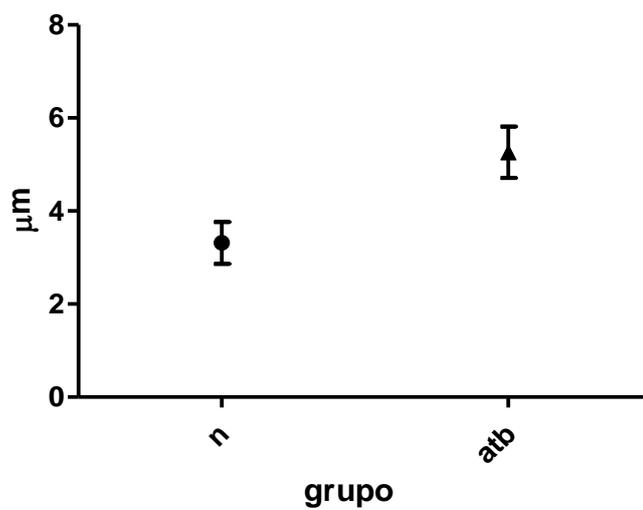
A média da membrana descelularizada ($3,589 \pm 0,7522 \mu\text{m}$) não mostrou diferença significativa com a média do pericárdio normal ($3,415 \pm 0,4501 \mu\text{m}$), sendo $p = 0,420$ (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Comparação entre o grupo GN e o GDIOX



Entretanto, a média da membrana tratada com antibiótico ($5,263 \pm 0,5552 \mu\text{m}$) foi significativamente mais espessa que o pericárdio normal, apresentando $p = 0,008$ (Gráfico 3)

Gráfico 3 - Comparação entre o grupo GN e GATB



5 DISCUSSÃO

Considerando-se que doenças cardíacas isquêmicas e insuficiência cardíaca congestiva são causas importantes de morbidade e mortalidade nas comunidades ocidentais, cada vez mais se buscam alternativas de tratamento, pois isso gera uma sobrecarga econômica substancial na maioria dos sistemas de saúde.

A falência cardíaca ocorre como resultado final da remodelação patológica do miocárdio em resposta à lesão isquêmica ou não-isquêmica desse órgão. A partir daí ocorre a morte dos cardiomiócitos e a perda de massa celular do miocárdio. Apesar de existirem amplas opções de tratamento, o manejo convencional para a falência cardíaca pouco repõe a perda de cardiomiócitos ou da cicatriz miocárdica com novas células contráteis. Essa deficiência é agravada pelo próprio coração por limitar sua capacidade de auto-regeneração²⁵. Conseqüentemente, novas condutas têm sido pesquisadas.

Uma dessas condutas consiste em usar um enxerto ou remendo no coração danificado. Para isso devemos considerar vários parâmetros que estão associados ao tecido cardíaco propriamente dito. Esse material deve ser funcional e morfológicamente similar ao tecido cardíaco nativo, integrar-se a ele, manter-se viável ao longo do tempo e ainda melhorar a função do coração danificado. Além disso, a construção deve ser contrátil, eletrofisiologicamente estável, flexível, permanecer mecanicamente forte e ser também de natureza autóloga³. Portanto, a biocompatibilidade é o maior requerimento para uma estrutura de engenharia tecidual.

O pericárdio é uma resistente estrutura membranosa encontrada em volta do coração. Através dos anos, muitos cirurgiões cardíacos e não cardíacos têm usado estruturas naturais para reparar e/ou reconstruir tecidos corporais defeituosos. Tecido pericárdico de origem heteróloga (bovinos e porcinos) tem sido usado para a fabricação de válvulas cardíacas assim como no tratamento de condições cardíacas adquiridas, como na reconstrução da válvula mitral, reconstrução de estenoses valvares e defeitos septais após infartos. Também tem

sido usado para reparar defeitos cardíacos congênitos. O pericárdio autólogo seria o preferido desde que estivesse livre de doenças derivadas do doador, que não provocasse resposta imune e mostrasse mínima fibrose como resposta após o implante. O pericárdio também tem sido usado no tratamento de condições não-cardíacas, como na traqueoplastia e na reparação da dura-máter. Entretanto, seu uso ainda é limitado devido às possibilidades inflamatórias após a pericardiotomia e por isso, substitutos biológicos e naturais têm sido desenvolvidos e usados⁵².

Com isso, os métodos de engenharia tecidual estão ganhando importância na criação e confecção de novas próteses valvares. O conceito da engenharia tecidual é baseado na ressemeadura *in vitro* de estruturas biológicas ou artificiais com células autólogas²⁸.

Ao se utilizar da bioengenharia para implantar uma estrutura, seja ela um órgão ou tecido, tem-se a finalidade de facilitar a sua integração no hospedeiro promovendo um ambiente harmônico para o crescimento e diferenciação celular. Por isso, a membrana amniótica mostra-se um tecido com grande potencial. Células epiteliais derivadas dela têm as vantagens das células-tronco e possuem também propriedades biológicas como antiinflamatória, antimicrobiana, cicatrizante, além de propriedades mecânicas e de baixa imunogenicidade. A membrana amniótica tem mostrado que possui o maior pré-requisito para a escolha de um material implantável que é a biocompatibilidade. Essa membrana pode ser usada intacta ou sem o epitélio (membrana amniótica descelularizada)²⁹.

Após implante, ocorre sempre uma reação inflamatória tipo “reação de corpo estranho”. Essa inflamação pode ser boa num primeiro momento, pois deflagra a cicatrização da lesão, mas pode também levar à falência do implante. Reação de corpo estranho estimula liberação de células gigantes e macrófagos que produzem citocinas e atraem fibroblastos gerando fibroses²⁹.

Ainda explorando as potencialidades da membrana amniótica, publicou-se revisão na qual as células derivadas da membrana amniótica mostraram habilidade multipotente de diferenciação, atraindo atenção para o transplante celular. Essas células têm capacidade de diferenciação em todas as três camadas germinativas, têm baixa imunogenicidade e função antiinflamatória, além de não requererem destruição do embrião humano para o seu isolamento. Dessa forma, não comprometem, portanto, os debates éticos no uso de células-tronco embrionárias⁴⁶.

Cargnoni A *et al.* em 2009 apresentaram resultados sugerindo que o uso de membrana amniótica pode ser um meio de fornecer fatores cardioprotetores solúveis. Nesse estudo eles demonstraram que, após aplicação de fragmentos de membrana amniótica nos corações de ratos infartados, havia uma redução significativa das alterações cardíacas pós-isquêmicas, assim como uma melhora da função miocárdica inclusive²⁶.

A membrana intacta possui alguns benefícios, já que as suas células epiteliais podem produzir neurotransmissores, neuropeptídeos e fatores neurotróficos. Por outro lado, a membrana amniótica descelularizada pode promover melhor proliferação e diferenciação celular, melhor adesão de células, assim como um crescimento mais uniforme do que a membrana intacta. A facilidade de cicatrizar feridas, considerada uma das mais importantes propriedades da membrana amniótica descelularizada, determina a maioria das suas indicações clínicas⁵⁰.

Murphy S *et al.* em 2010 publicaram trabalho demonstrando que, ao contrário de membrana amniótica descelularizada, poderiam obter apenas as células epiteliais dela, com propriedades similares às células-tronco embrionárias e suas conseqüentes possibilidades de uso na medicina regenerativa. Eles sugeriram também a possibilidade de criação de um banco de células amnióticas pela fácil obtenção, já que as placentas são descartadas após os partos, e que também não gerariam conflitos éticos³⁰.

Sabemos que a membrana amniótica é uma estrutura altamente contaminada, portanto devemos ter cuidados assépticos durante o manuseio para a sua utilização.

Hennerbichler S *et al.* em 2007 publicaram um estudo da influência de várias condições de armazenamento na viabilidade da membrana amniótica. Nesse trabalho as membranas foram descontaminadas utilizando-se penicilina, estreptomicina e anfotericina B. Depois foram armazenadas sob várias condições, inclusive congeladas e, posteriormente avaliadas quanto à viabilidade para uso futuro. Verificou-se que, após congelamento, elas se tornavam menos viáveis e, estocadas em temperaturas acima de 0° C, mantinham suas propriedades por um período curto de apenas 28 dias. A estocagem em glicerol a 4° C resultou em morte celular¹⁶.

Neste estudo, utilizamos duas técnicas diferentes para se avaliar o melhor método de descontaminação. Um grupo utilizou essa mesma associação de antibióticos (GATB) e outro grupo usou apenas dióxido de cloro (GDIOX). Observamos que no grupo tratado com dióxido de cloro (GDIOX) não houve crescimento bacteriano enquanto no grupo tratado com antibióticos (GATB) houve desenvolvimento de germes, porém sem significância. Ao contrário de Hennerbichler S *et al.*, não avaliamos condições de armazenamento, porém as membranas tratadas com dióxido de cloro armazenadas em geladeira por 30 dias, ainda mantinham-se isentas de germes⁵³.

Muito tem sido pesquisado no intuito de se encontrar uma estratégia que crie uma prótese biocompatível e resistente em longo prazo. Evidências anteriores apontam que a descelularização em biomateriais torna o tecido menos antigênico, induzindo menor resposta inflamatória e menor degeneração tecidual⁴⁸.

Satisfatória descelularização do pericárdio humano é obtida quando não se afeta o principal componente estrutural e a força da matriz extracelular⁴⁸.

Um processo de descelularização implicaria na remoção completa de componentes celulares e simultânea manutenção da matriz extracelular com mínima influencia na matriz de montagem. Se a matriz celular diminui a imunogenicidade do enxerto, é esperado que uma ótima preservação dos componentes da matriz extracelular resultaria na manutenção das propriedades biomecânicas da estrutura²⁸.

Tudorache I *et al.* em 2007 publicaram um estudo comparando três diferentes protocolos de descelularização das valvas pulmonares porcinas e as suas influências nas propriedades morfológicas e biomecânicas. Utilizaram separadamente desoxicolato de sódio (SD) a 1%, duodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% e tripsina a 0,05% / ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) a 0,02%. Os autores verificaram que a integridade morfológica e biomecânica, assim como a preservação das proteínas da matriz extracelular, foi claramente superior nos grupos tratados com os detergentes, enquanto que o grupo tratado com enzima resultou em destruição da membrana basal²⁸.

Neste trabalho utilizamos as duas primeiras substâncias juntas, porém em menor concentração, e obtivemos satisfatória descelularização das membranas amnióticas demonstrada pela análise histológica utilizando-se HE.

Existem vários métodos descritos para a descelularização de membrana amniótica. Cada método tem diferentes efeitos na estrutura da membrana e nas suas propriedades biológicas. Idealmente, o método de descelularização deveria ser eficiente e não alterar a integridade estrutural nem a função biológica. Na revisão de Riau AK *et al.*, em 2010, utilizou-se o ácido paracético como agente esterilizante⁵⁰.

Crapo PM *et al.*, em 2011 publicaram revisão dos vários métodos de descelularização para tecidos e órgãos inteiros⁹. O objetivo desse estudo foi atualizar as técnicas de descelularização e os efeitos esperados sobre a biomecânica da matriz extracelular remanescente, além de definir protocolos para se evitar resposta adversa do hospedeiro após implante.

Neste estudo apresentamos um resumo desses métodos para lembrar que, de acordo com o órgão ou tecido a ser descelularizado, utilizam-se técnicas diferentes.

Existem várias técnicas para a preparação de enxertos descelularizados. O processo de extração dos componentes celulares produz uma resposta imunológica mais fraca após o implante do enxerto no organismo⁴⁷.

Sabe-se que a descelularização de tecidos vascularizados efetivamente reduz o recrutamento de monócitos e linfócitos, enquanto a migração de polimorfonucleares, conhecidos por estar envolvidos numa resposta imune precoce, praticamente não é afetada. Neutrófilos são os mais abundantes leucócitos no corpo humano e liberam um complexo sortimento de agentes que podem destruir células normais e dissolver tecidos conjuntivos. Eles têm pequena habilidade intrínseca de diferenciar entre antígenos próprios ou alheios, e ainda contam com outras armas do sistema imune (por exemplo, complementos) para selecionar seus alvos¹⁰.

Neste trabalho também encontramos reação inflamatória após os implantes de membrana amniótica em corações de ratos, em maior grau no grupo GATB que havia sofrido apenas descontaminação com antibióticos. O outro grupo (GDIOX) tratado com dióxido de cloro, também apresentou reação inflamatória, porém em menor grau, assim como aderências menos intensas.

Muralidharan S *et al.* em 1991, ao procurarem um novo e melhor substituto para o pericárdio, avaliaram o uso da membrana amniótica tratada pelo glutaraldeído e compararam à membrana de politetrafluoretileno até então em

uso. Os autores utilizaram cachorros e após 18 semanas de implante, os animais foram sacrificados. As superfícies dos enxertos foram avaliadas macroscopicamente, assim como as aderências e as respectivas dificuldades de dissecação. As membranas amnióticas utilizadas haviam sido tratadas apenas pelo glutaraldeído previamente ao implante. Todos os animais sobreviveram sem complicações. Os implantes de politetrafluoretileno foram associados a aderências de moderado a intenso grau. Na liberação dessas aderências ocorreram sangramentos. Todos os implantes de MA tiveram mínimas formações de aderências e puderam ser facilmente separadas sem dificuldade. Não ocorreram fibroses. Os exames histopatológicos revelaram que as membranas estavam íntegras, embora os elementos celulares tivessem se degenerado. O maior problema citado por esses autores foram as falências ocorridas devido à dificuldade das membranas amnióticas segurarem os fios nas suturas realizadas³³.

Também avaliamos macroscopicamente as aderências em graus leve, moderado e importante de acordo com a dificuldade de serem desfeitas. Os animais que tiveram membranas amnióticas descontaminadas com antibióticos (GATB) apresentaram aderências moderadas a importantes com os tecidos adjacentes. O grupo que recebeu implante de membrana amniótica descontaminada com dióxido de cloro e descelularizada (GDIOX) também apresentou aderências, porém em menor grau. Nossos animais também sobreviveram sem complicações. Os estudos histopatológicos mostraram membranas íntegras com infiltrado inflamatório maior no grupo GATB cujo material havia sido apenas descontaminado.

Dahm M *et al.* em 1995 verificaram que o uso de próteses cardíacas biológicas fixadas em glutaraldeído vinha diminuindo por causa das falências, comprovando a relevância das reações imunológicas resultando na ruptura ou degeneração das mesmas. Seus estudos revelaram a presença de densa reação inflamatória interpretada como o resultado de uma resposta imune ao implante. Eles concluíram também que os pobres resultados obtidos nos implantes eram devidos à combinação de dois fatores negativos como a alta antigenicidade e a grande suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões de superfície³⁴.

Em nosso estudo, onde se implantaram membranas amnióticas descontaminadas com antibiótico ou tratadas com dióxido de cloro sobre o

pericárdio parietal do ventrículo esquerdo, observou-se após 30 dias infiltrado mononuclear mais intenso nas membranas não descelularizadas. Os dois tipos de membranas mostraram-se incorporadas ao pericárdio parietal sem possibilidade de diferenciá-la. A morfometria mostrou um diâmetro significativamente maior na membrana não descelularizada, o que pode indicar a ocorrência de um processo inflamatório mais intenso neste grupo.

Outra grande complicação da utilização de biopróteses ocorre como resultado de um processo interativo envolvendo três amplas categorias de determinantes, incluindo fatores do material implantado, fatores biológicos do hospedeiro e o estresse da localização. O mais importante fator hospedeiro é a idade mais jovem. O fator principal do implante é o pré-tratamento com glutaraldeído. Além disso, contribui também o estresse do material, a absorção do cálcio ligado às proteínas do soro, a porosidade da superfície e o conteúdo aquoso, assim como restos orgânicos ou celulares aderidos à superfície³².

Chandy T *et al.* em 1996 publicaram estudo em que utilizaram pericárdio bovino, dura-máter humana e fâscia-lata bovina tratadas pelo glutaraldeído e depois implantadas no subcutâneo de ratos que foram sacrificados após 21 dias. Todos os explantes de pericárdio bovino mantiveram sua arquitetura, porém estavam cercados de fibroblastos com infiltração de macrófagos. Os outros explantes haviam sofrido mineralização de cálcio em graus semelhantes³².

Sabemos que a fixação de tecidos de valvas cardíacas com glutaraldeído é largamente utilizada para reforçar as propriedades mecânicas e ainda reduzir antigenicidade na produção de próteses biológicas de valvas cardíacas. A prevenção de calcificação (deposição de fosfato de cálcio) é muito importante no desenvolvimento de próteses cardíacas, pois depósitos de cálcio podem levar à ruptura de tecidos cardíacos *in vivo*. As propriedades mecânicas (elasticidade, força e outras) são, certamente, muito importantes nos enxertos de próteses valvares. Enxertos sem adequada flexibilidade têm levado a resultados trágicos de falência do implante⁴⁷.

Mavrilas D, Kapolos J, Koutsoukos PG e Dougenis D em 2004, também demonstraram que a calcificação seria a maior causa de falência de biomateriais implantados. Eles utilizaram valva cardíaca porcina e pericárdio bovino e essas amostras foram implantadas no subcutâneo da parede abdominal de ratos.

Verificaram também a calcificação ocorrida *in vitro* dessas amostras, além da análise após o sacrifício dos ratos⁶.

Apesar de nosso estudo ter sido realizado com membrana amniótica, não encontramos calcificação demonstrando mais uma vantagem desse biomaterial. Observamos porém, reação inflamatória em graus variados.

A principal limitação clínica, portanto, no uso de biopróteses cardíacas é a calcificação que eventualmente leva à falência do dispositivo. Apesar da importância do problema, a patogênese dessa calcificação ainda não está bem entendida. O precoce evento na calcificação das biopróteses tem sua hipótese na descelularização induzida pelo glutaraldeído, levando à ruptura da regulação do cálcio celular. Depósitos iniciais de cálcio surgem em volta e vão coalescendo, resultando em nódulos mineralizados grosseiros que enrijecem e enfraquecem o tecido dando origem ao funcionamento inapropriado da prótese. Vários agentes têm sido testados para se propor inibição desse processo⁴⁹.

Apesar de tudo, o substituto biológico nas cirurgias cardíacas atualmente em uso é o pericárdio bovino fixado em glutaraldeído. Embora essa fixação reduza a imunogenicidade do tecido, existem muitas desvantagens como uma calcificação acelerada, além dos efeitos tóxicos do glutaraldeído residual⁵².

Muitos estudos necessitam ainda serem realizados no sentido de se prevenir esse processo de calcificação⁴⁹.

Em resumo, existem várias técnicas de descontaminação assim como vários processos de descelularização para a membrana amniótica. Todas têm suas vantagens e desvantagens que podem levar ao sucesso ou à falência do implante.

Portanto, muitas pesquisas serão ainda necessárias para se desvendar todo o potencial de uso da membrana amniótica, mas podemos prever que ela possa ter importantes aplicações clínicas.

6 CONCLUSÕES

O dióxido de cloro demonstra descontaminação eficaz da membrana amniótica.

O dióxido de cloro seguido por tratamento com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% promove uma adequada descelularização da membrana amniótica, comprovada pela análise histológica após coloração pela hematoxilina-eosina.

A aderência da membrana amniótica aos tecidos adjacentes ao coração dos ratos é menor no grupo tratado com dióxido de cloro e descelularizado em comparação com o tecido íntegro descontaminado com antibióticos.

A membrana amniótica íntegra e descontaminada com antibióticos e a descelularizada apresentam incorporação ao pericárdio parietal, porém o infiltrado de células mononucleares é mais intenso no grupo tratado com antibióticos.

A análise morfométrica da espessura das membranas amnióticas implantadas é significativamente maior no grupo tratado com antibióticos (GATB).

O teste com a coloração pela Alizarina-Red mostra que a membrana amniótica não apresenta calcificação após 30 dias do implante sobre o coração nos dois tipos de tratamento.

7 REFERÊNCIAS

1. Alsoufi B, Manlhiot C, McCrindle BW, Canver CC, Sallehudin A, Al-Oufi S, et al. Aortic and mitral valve replacement in children: is there any hole for biologic and bioprosthetic substitutes. *Eur J Cardiothorac.* 2009; 36: 84-90.
2. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevent. *Ann Thorac Surg.* 2005; 79(3): 1072-1080.
3. Eitan Y, Sarig U, Dahan N, Machluf M. Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: in vitro cell support, remodeling and biocompatibility. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010; 16(4): 671-683.
4. Taylor PM. Biological matrices and bionanotechnology. *Phil Trans R Soc B.* 2007; 362: 1313-1320. *Phil. Trans. R. Soc. B (2007) 362, 1313-1320*
5. Pires AC, Saporito WF, Leão LEV, Forte V, Cardoso SH, Ramaciotti O. Pericárdio bovino utilizado como remendo no sistema cardiovascular. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1997; 12(2); 176-187.
6. Mavrilas D, Kaposos J, Koutsoukos PG, Dougenis D. Screening biomaterials with a new in vitro method for potential calcification: porcine aortic valves and bovine pericardium. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(6): 699-704.
7. Uygun BE, Gutierrez AS, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Schulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature Medicine.* 2010; 16(7): 814-820.
8. Gui L, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010; 16(2): 174-184.
9. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011; 32: 3233-3243.
10. Bastian F, Stelzmüller ME, Kratochwill K, Kasimir MT, Simon P, Weigel G. IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the

activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue. *Biomaterials*. 2008; 29(12): 1824-1832.

11. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*. 2010; 25(1): 91-98.

12. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981; 2: 1003-1005.

13. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*. 1995; 14(5): 473-484

14. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation*. 2005; 79:528-535.

15. Schimidt LR, Cardoso EJ, Schimidt RR, Back LA, Schiazawa MB, d'Acampora AJ, et al. The use of amniotic membrane in the repair of duodenal wounds in Wistar rats / Uso da membrana amniótica no reparo de feridas duodenais em ratos Wistar. *Acta Cir Bras*. 2010; 25(1):18-23.

16. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. 2007; 8: 1-8.

17. Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. *J Pak Med Assoc*. 2003; 53:29-32.

18. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004; 49: 51-77.

19. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005; 16:233-240

20. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000; 19:348-352

21. Adinolfi M, Akle CA, McColl I, Fenson AH, Tansley L, Connolly P et al. Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature*. 1982;295:325-327
22. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct*. 2004; 29:73-84
23. Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol*. 2000; 165:27-34
24. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant*. 2003; 12: 545-552.
25. Psaltis,PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: Mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells*. 2008; (26): 2201-2210.
26. Cargnoni A, Di Marcello M, Campagnol M, Nassuato C, Albertini A, Parolini O. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. *Cell Transplantation*. 2009; 18(10): 1147-59.
27. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*. 2003; 143(3): 201-208.
28. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis*. 2007; vol 16 n 5; 567-573.
29. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and Materials*. 2008; 15: 88-99.
30. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. Chapter 1:Unit 1E.6, 2010 Apr.

31. Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1969; 58(4): 467-483.
32. Chandy T, Mohanty M, John A, Rao SB, Sivakumar R, Sharma CP, et al. Structural studies on bovine bioprosthetic tissues and their in vivo calcification: prevention via drug delivery. *Biomaterials.* 1996; 17(6): 577-585.
33. Muralidharan S, Gu J, Laub GW, Cichon R, Dalosio C, McGrath LB. A new biological membrane for pericardial closure. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25(10):1201-1209.
34. Dahm M, Husmann M, Mayer E, Prüfer D, Groh E, Oelert H. Relevance of immunologic reactions for tissue failure of bioprosthetic heart valves. *Ann Thorac Surg.* 1995; 60(Suppl 2): S348-352.
35. Brandão CMA, Pomerantzff PMA, Puig LB, Cardoso LF, Tarasoutchi F, Grimberg M, et al. Substituição valvar em idosos com biopróteses de pericárdio bovino: resultados tardios de 12 anos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1999; 14(1): 27-31.
36. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J.* 1910; 15: 307-396.
37. Stern W. The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated skin. *J Am Med Assoc.* 1913; 13: 973-974.
38. De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol.* 1940; 23: 522-525.
39. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol.* 1979; 134 (7): 833-845.
40. Bleggi-Torres LF, Werner B, Piazza MJ. Ultrastructural study of the normal human amniotic membrane. *J Bras Patol.* 1998; 34(3): 140-143.
41. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol.* 1999; 83(6): 748-752.

42. Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennett JP, Burgos H, His BL. Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet*. 1980; 1: 1156-1158.

43. Arora M, Jaroudi KA, Hamilton CJ, Dayel F. Controlled comparison of intercede and amniotic membrane graft in the prevention of postoperative adhesions in the rabbit uterine horn model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1994; 55: 179-182.

44. Melo GB, Gomes JAP, Glória MA, Martins MC, Haapalainen EF. Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da membrana amniótica humana / Morphological assessment of different amniotic membrane epithelial denuding techniques *Arq Bras Oftalmol*. 2007; 70(3): 407-411.

45. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Gibelli L, Wengler GS, Parolini O. Human amnion mesenchyme has bors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells*. 2008; 26: 182-192.

46. Yu SJ, Soncini M, Kaneko Y, Hess DC, Parolini O, Borlongan CV. Amnion: a potent graft source for cell therapy in stroke. *Cell Transplant*. 2009; 18(2): 111–118.

47. Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, Hara M; Matsuda H, et al. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with polyethyleneglycol. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 67(3): 834-837.

48. Costa JNL, Pomerantzeff PMA, Braile DM, Ramirez VA, Goisses G, Stolf NAG. Comparação entre o pericárdio bovino descelularizado e o pericárdio bovino tradicional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2005; 20; 14-22.

49. Döndas HA, Yilmaz N, Cömelekoglu U, Tamer L, Sucu N, Aytaçoglu BN, et al. Prevention of calcification with TPEN in pericardial bioprosthetic heart valve material. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2007; 7(4): 365-370.

50. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010; 31(2): 216-225.

51. Navarro FB, Costa FDA, Mulinari LA, Pimentel GK, Roderjan JG, Vieira ED et al. Avaliação do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares

descelularizados: estudo experimental em ovinos. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2010; 25(3): 377-387.

52 Mirsadraee S, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Hunt J, Fisher J et al. Biocompatibility of acellular human pericardium. Journal of Surgical Research. 2007; 43(2): 407-414.

53. Francisco JC de. Desenvolvimento de biomaterial a partir de matriz amniótica humana. 2012. 86 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ANEXO 1



Curitiba, 31 de agosto de 2011.

Julio Cesar Francisco
Pesquisador Responsável

Prezado Senhor,

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

Atenciosamente,

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



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

Cód. 318 - BAG

ANEXO 2



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 12 de maio de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 596 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Análise histológica da membrana amniótica utilizada na reconstrução do pericárdio de ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Nelson Itiro Miyague

EQUIPE DE PESQUISA:

Nelson Itiro Miyague, Rosangela Kiffer Soares Welling, Júlio Cesar Francisco

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Mestrado em Cirurgia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>)	Machos	6 – 7 meses	C	20

O colegiado do CEUA em reunião no dia 12/05/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Obs.: Ajustar cronograma.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser

Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Núcleo de Biotécnicas
Comitê de Ética no Uso de Animais

tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Profª Graçinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais

PARCELA DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 698 - 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Análise histológica da membrana amniótica

espécies de animais

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Nelson Tito Miyague

EQUIPE DE PESQUISA:

Nelson Tito Miyague, Rosângela Kötter Soares Welling, Júlio César Francisco

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Mestrado em Cirurgia

ESPECIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos (Rattus norvegicus)	Machos	8 - 12 meses	C	20

O colegiado do CEUA em reunião no dia 12/05/2017, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Obs.: Ajustar cronograma.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela, for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser

