

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Caio Costa Santos

**Análise estrutural de diferentes técnicas de preservação
de membrana amniótica para uso em oftalmologia.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
Médica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

**Botucatu
2025**

Caio Costa Santos

Análise estrutural de diferentes técnicas de
preservação de membrana amniótica para uso em
oftalmologia.

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia
Médica.

Orientador: Prof.Dr. Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa.Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2025

S237a	Santos, Caio Costa Análise estrutural de diferentes técnicas de preservação de membrana amniótica para uso em oftalmologia. / Caio Costa Santos. -- Botucatu, 2025 33 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu Orientadora: Matheus Bertanha Coorientadora: Elenice Deffune 1. Âmnio. 2. Curativos biológicos. I. Título.
-------	---

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CAIO COSTA SANTOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 15 dias do mês de maio do ano de 2025, às 14h, no(a) Sala de Reuniões 02 do Prédio da Administração da FMB/Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de CAIO COSTA SANTOS, intitulada **Análise estrutural de diferentes técnicas de preservação de membrana amniótica para uso em oftalmologia**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ELENICE DEFFUNE (Co-orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ALVIO ISAO SHIGUEMATSU (Participação Presencial) do(a) Depto. de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. CAROLINE NASCIMENTO BARQUILHA (Participação Virtual) do(a) Laboratório Nacional de Biociências / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. ELENICE DEFFUNE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Elenice Deffune", is written over a horizontal line.

RESUMO

Introdução: Membrana amniótica é a camada mais interna das três que constituem as membranas fetais e possui capacidade de gerar cicatrização, epitelização e antiinflamação quando utilizada como curativo biológico. A aplicação em oftalmologia tem crescido nos últimos anos, já sendo relatado seu uso para reconstrução de superfície ocular, cirurgias de pterígio, perfurações corneanas, defeitos epiteliais corneanos persistentes, ceratite infecciosa e em tratamento de queimadura ocular. O método de conservação mais empregado é a criopreservação com glicerol, mantendo a membrana armazenada a -80°C . O principal obstáculo deste método é a necessidade de um congelador caro e pouco disponível. Nosso objetivo neste estudo é avaliar diferenças estruturais de fragmentos de membrana amniótica submetidos a diferentes processos de preservação para uso em oftalmologia. **Material e métodos:** Foram coletadas três placentas de doadoras saudáveis e preparados fragmentos de membrana amniótica distribuídos em quatro grupos com três fragmentos cada, sendo um de cada doadora. Um dos grupos foi criopreservado, outro grupo liofilizado, terceiro grupo seco a vácuo com SpeedVac e quarto grupo mantida fresca. Após os processamentos, os fragmentos foram fixados, lâminas foram confeccionadas e a morfologia do tecido avaliada em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). Os tecidos foram avaliados a partir de seis indicadores: morfologia do núcleo, preservação da membrana basal e camada de colágeno, presença de desmossomos e organelas, integridade das vilosidades apicais. **Resultados e discussão:** Os seis indicadores estabelecidos na metodologia foram preenchidos em todas as amostras na análise de MET. Não houve diferença nos parâmetros avaliados entre as amostras estudadas, ou seja, a morfologia das membranas liofilizadas, criopreservada e seca a vácuo foi semelhante a membrana fresca. No entanto, a secagem à vácuo apresenta-se como a mais factível, tendo em vista a constante disponibilidade da membrana a qualquer momento e armazenamento à temperatura ambiente para uso oftalmológico. **Conclusão:** A secagem a vácuo com SpeedVacTM, liofilização e criopreservação mantêm características morfológicas da Membrana Amniótica semelhante a amostra fresca. Podemos estabelecer protocolo de uso de SpeedVacTM para secagem de membrana amniótica humana pelas razões de facilidade de armazenamento e facilidade de acesso.

Palavras-chave: Membrana amniótica, preservação de tecido, curativos biológicos, liofilização, criopreservação, microscopia eletrônica.

ABSTRACT

Introduction: Amniotic membrane is the innermost layer of the three that make up the fetal membranes and it has the capacity to generate healing, epithelialization and anti-inflammatory effects when used as a biological dressing. Its application in ophthalmology has grown in recent years, with reports of its use in ocular surface reconstruction, pterygium surgery, corneal perforations, persistent corneal epithelial defects, infectious keratitis and in the treatment of ocular burns. The most widely used preservation method is cryopreservation with glycerol, keeping the membrane stored at -80°C . The main obstacle to this method is the need for an expensive and unavailable freezer. The aim of this study was to evaluate structural differences in amniotic membrane fragments submitted to different preservation processes for use in ophthalmology. **Materials and methods:** Three placentas were collected from healthy donors and four amniotic membrane fragments were prepared from each placenta, divided into 4 groups with 3 fragments each. One of the groups was cryopreserved, another was freeze-dried, the third was vacuum-dried with SpeedVac and the fourth was kept fresh. After processing, the fragments were fixed, slides were prepared and the morphology of the tissue was assessed using scanning transmission electron microscopy. **Results and discussion:** The tissues were assessed for nuclear morphology, preservation of the basement membrane and collagen layer, presence of desmosomes and organelles. All the criteria were met in all the samples. There was no difference in the parameters assessed among the samples studied, the morphology of the freeze-dried and vacuum-dried membranes was similar to the cryopreserved and fresh membranes. However, vacuum drying appears to be the most feasible, given the constant availability of the membrane at any time, storage at room temperature, for ophthalmic use. **Conclusion:** Vacuum drying with SpeedVacTM, freeze-drying and cryopreservation maintain the morphological characteristics of the Mem similar to the fresh sample. We can establish a protocol for using SpeedVacTM to dry human amniotic membrane for reasons of ease of storage and ease of access.

Keywords: Amniotic membrane, biological dressings, tissue preservation, freeze drying, cryopreservation, microscopy electron

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Considerações gerais	
1.2 Revisão de literatura	
2. OBJETIVOS GERAIS	16
2.1 Objetivos específicos	
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	17
3.1 Local	
3.2 Análise ética	
3.3 Tipo de estudo	
3.4 Hipótese	
3.5 Obtenção de Mah in natura	
3.6 Amostras frescas	
3.7 Criopreservação a -80,0°C	
3.8 Secagem a vácuo com SpeedVac™	
3.9 Liofilização das amostras	
3.10 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão	
4. RESULTADOS	22
4.1 Avaliação morfológica das amostras	
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	31
7. REFERÊNCIAS	32

1. Introdução:

1.1 Considerações Gerais

A membrana amniótica humana (Mah) tem várias aplicações na medicina regenerativa. Historicamente, seu uso tem sido preconizado desde 1910 com a publicação de uma correspondência médica de Paliwal *et al* intitulada *Amniotic Membrane Transplantation–Role Redefined*¹. No ano seguinte, Hillenkamp, J *et al* publicaram, também sob a forma de carta ao editor, uma série de quatro casos de lesões de córnea em Porfíria Eritróide Congênita, conhecida como doença de Günther, nos quais usaram a Mah². Em 1913 Maximilian Stern publicou no JAMA o uso da membrana para úlceras de superfície e em 1920 WB West Jr relatou brevemente o uso da Mah em epiteliopatias e em deficiência de célula tronco limbar^{3,4}. No entanto, foi somente em 1940 que surgiu, de fato, o primeiro artigo completo publicado por Roth que descreveu o uso da Mah em reconstrução da superfície ocular⁵. Nestes cento e vinte e cinco anos a aplicabilidade da Mah tem crescido de forma exponencial como pode ser visto no número de artigos publicados.

Dentre as principais indicações do uso da Mah em oftalmologia, destacam-se sua aplicação em trabeculectomias e em enxertos utilizados para reparar vazamentos decorrentes de cirurgias filtrantes para glaucoma, bem como em casos de deficiência de células-tronco limbares. A Mah também é amplamente empregada na reconstrução conjuntival após excisão de neoplasias e pterígios, no fechamento de defeitos conjuntivais ou na prevenção de aderências durante cirurgias de estrabismo³. Além disso, é indicada no tratamento de úlceras corneanas refratárias e defeitos epiteliais persistentes, promovendo a cicatrização da superfície ocular em situações como queimaduras químicas ou térmicas, além de outras condições inflamatórias. O uso da Mah também foi descrito em cirurgias vítreo-retinianas, especificamente na reparação de buracos maculares. Em estruturas anexas, como pálpebras, fórnices, sistema lacrimal e órbita, a Mah tem sido empregada como alternativa ao enxerto de mucosa, principalmente em casos de má posição palpebral ou reconstrução de fórnices. Relatos também indicam seu uso em procedimentos como dacriocistorrinostomia e reparo de fraturas orbitais^{4, 5}.

Nos últimos 125 anos foram identificados, com pesquisa na base de dados do PubMed, 30.220 publicações científicas com unitermos: *amniotic membrane transplantation ocular surface*. Na tabela 1 listam-se os números de publicações do período. Como pode ser observado, o primeiro período analisado foi de 50 anos, posteriormente, as buscas foram a cada 10 anos para se identificar o período de maior crescimento e interesse

científico. Em 2025 foram repertoriados 522 artigos completos publicados.

Tabela 1 – Número de publicações, por período utilizando unitermos: *amniotic membrane transplantation ocular surface*

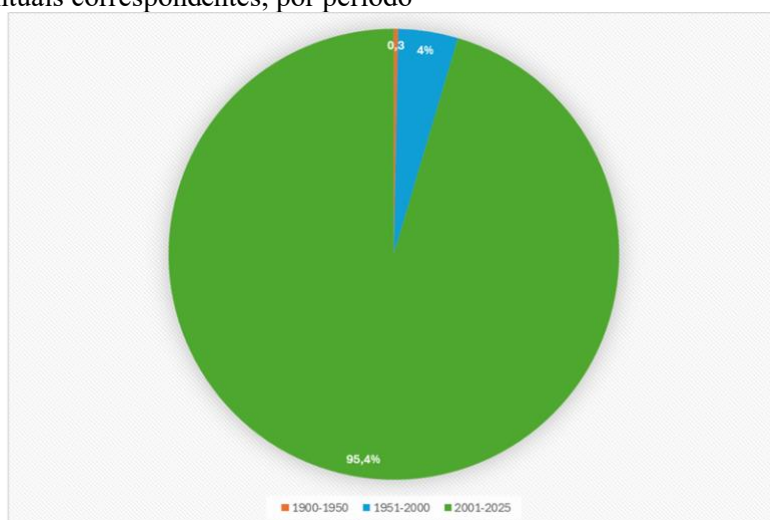
Período	Número de Publicações	%
1900-1950	93	0,31
1951-1960	95	0,31
1961-1970	85	0,28
1971-1980	84	0,27
1981-1990	198	0,65
1991-2000	835	2,76
2001-2010	6.960	23,03
2011-2020	13.500	44,67
2021-2025	8.370	27,7
125 anos	30.220	100

Fonte: dados extraídos do Pubmed Central (6).

Ao serem analisados os dados em períodos de 50 anos observa-se que nos dois primeiros períodos (100 anos) o número de publicações representa apenas 4,6 % do total encontrado no intervalo de tempo 1900-março de 2025. Ressalta-se que é de 2001 a 2025 que se encontram 95,4% dos trabalhos publicados (figura 1).

Figura 1 – Quadro de artigos publicados nos últimos 125 anos 1900-1950, 1951-2000 e 2001 a 2025, à esquerda e à direita gráfico dos percentuais correspondentes, por período

Período	número de publicações	%
1900-1950	93	0,3
1951-2000	1297	4,3
2001-2025	28.830	95,4
	30220	100



Fonte: Pesquisa realizada na base de dados do PubMed Central(6).

Listam-se abaixo, os principais trabalhos publicados no início do século passado (Quadro 1), de importância histórica, destacando ano de publicação, nome do autor, título do artigo e periódico publicado.

Quadro 1 – Primeiras publicações com uso de membrana amniótica em oftalmologia, por ano, autor(es), nome do artigo e periódico publicado

Ano	Autor(es)	Nome do artigo	Publicado em
1910	Paliwal, V., Midha, A., Jain, P., & Arora, I	Amniotic Membrane Transplantation–Role Redefined	Group 100.2/10 (1910): 10.
1911	Hillenkamp, J., Reinhard, T., Fritsch, C., Kersten, A., Böcking, A., & Sundmacher, R.	Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface in CEP	<i>Klin Med</i> , 105, (1911) 89-146 bjo. bmj. com
1913	Maximilian Stern, M.D.	Membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts a preliminary report	JAMA.1913;60(13):973-974. doi:10.1001/jama.1913.04340130021008
1920	WB West Jr	Advancing Wavelike Epitheliopathy: A subtype of partial limbal stem cell deficiency	www.healthcare.utah.edu/moran/morancore.utah.edu
1940	A De Rötth	Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes	Arch Ophthalmol. 1940;23(3):522-525. doi:10.1001/archopht.1940.00860130586006
1946	WJC Wells	Amniotic membrane for corneal grafting	British Medical Journal 2.4477 (1946): 624.
1946	Sorsby, HM Symons	Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye:(Burns of the second degree)	British journal of ophthalmology, 1946 - pmc.ncbi.nlm.nih.gov
1947	A Sorsby, J Haythorne, H Reed	Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye	Br J Ophthalmol. 1947 Jul;31(7):409–418. doi: 10.1136/bjo.31.7.409
1948	Spaeth, E. B., & Cappriotti, O. A	Heteroplastic And Isoplastic Skin Grafts: With Report Of Successful Repair By Isografts, Of Bilateral Ectropion Of Four Eyelids	Plastic and Reconstructive Surgery, 3(6), 707-712.
1948	John S McGavie	The Surgical Treatment of Recurrent Pterygia	Trans Am Ophthalmol Soc. 1948;46:608–632.
1950	C Maxwell Shafto	Two Cases of Acetic Acid Burns of the Cornea	Br J Ophthalmol. 1950 Sep;34(9):559–562. doi: 10.1136/bjo.34.9.559
1950	Shafto, C. Maxwell	A simple method of inserting amniotic membrane grafts into the conjunctival sac	<i>The British Journal of Ophthalmology</i> 34.7 (1950): 445.

Fonte: Pesquisa realizada na base de dados do PubMed Central(6).

Apesar da ampla aplicabilidade no campo da oftalmologia e em outras áreas de conhecimento, não há consenso estabelecido ou método padrão-ouro para a preparação dos fragmentos de membrana amniótica. Consequentemente, várias técnicas de preparação, preservação e esterilização tem sido empregadas, para se obter segmentos de Mah com alta eficácia terapêutica, sendo que cada etapa do processo de preparação é de importância crítica^{7,8}.

Diante do exposto, propõe-se a realização de uma revisão de literatura com o objetivo de avaliar as técnicas disponíveis para o processamento da Mah e identificar aquela que possibilite sua maior disponibilidade para uso oftalmológico no contexto nacional. A Mah desempenha um papel fundamental como arcabouço tridimensional, composto por diferentes tipos de colágeno, funcionando como um andaime natural altamente biocompatível. Além disso, atua como fonte de células-tronco e potentes fatores de crescimento. Fragmentos da Mah vêm sendo considerados como nano-reservatórios eficazes para a administração de medicamentos, devido à sua alta capacidade de retenção de diversas moléculas. Suas aplicações clínicas variam desde o uso em forma de folhas para aplicações tópicas no reparo da pele e da córnea, até formas mais avançadas, como membrana desidratada micronizada, extratos de citocinas amnióticas e injeções de pó solubilizado, utilizados na regeneração de músculos, cartilagens e tendões⁹.

1.2. Revisão de literatura: Membrana Amniótica.

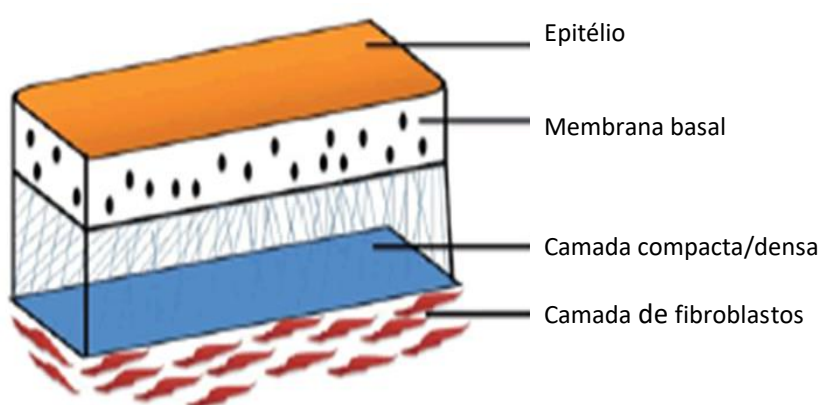
O feto humano em desenvolvimento é envolvido por uma membrana amniótica ou âmnio. O âmnio é um promissor tecido para aloenxerto humano em função de sua composição química, baseada em colágeno dos tipos I, III, IV, V e VI e propriedades mecânicas da matriz extracelular pela presença de proteoglicanos, laminina e fibronectina¹⁰.

Por essas razões, a Mah pode resolver alguns gargalos nas questões da medicina regenerativa, como engenharia de tecidos e terapia celular, em especial no campo da oftalmologia, como discutido anteriormente. Nas últimas décadas, as aplicações biomédicas da Mah evoluíram de uma simples folha para reparo da pele ou córnea para aplicações de alta tecnologia, como nanocompósitos, pó ou hidrogel para a regeneração de cartilagem, músculo, tendão e coração. Ademais, a Mah tem capacidade antineoplásica e de entrega de fármacos/células (excelente biodisponibilidade)¹⁰.

Além disso, o âmnio contém células e fatores de crescimento; portanto, atende aos parâmetros essenciais da engenharia de tecidos. Seu fácil processamento e armazenamento, o menor envolvimento de problemas éticos, suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas e não imunogênicas são outras vantagens do uso do âmnio¹¹.

A Mah é a camada mais interna das três camadas que constituem as membranas fetais. Trata-se de uma membrana avascular formada por cinco camadas com espessura entre 0,02mm e 0,5mm (figura 2)⁸. A camada epitelial da Mah é composta por uma única camada de células cuboidais e colunares, cujas superfícies apicais são dotadas de microvilosidades (figura 3). A substância própria da Mah apresenta uma camada colágena compacta, que confere força tensil, associada a uma camada fibroblástica, que constitui a porção mais espessa da membrana. Esta última é formada por fibroblastos imersos em uma rede reticular frouxa. A camada mais externa da Mah, conhecida como camada esponjosa, é rica em mucina. Entre o epitélio e a substância própria, encontra-se a membrana basal, que compartilha características semelhantes à membrana basal conjuntival. Essa semelhança torna a membrana basal da Mah um excelente enxerto para a superfície ocular¹². Foi utilizada pela primeira vez na oftalmologia em 1940, na reparação de defeitos conjuntivais, como dito anteriormente⁵.

Figura 2 – Representação esquemática da membrana amniótica



Fonte: Extraído e adaptado de Aditi Chopra and Betsy S Thomas. Amniotic Membrane: A Novel Material for Regeneration and Repair. *Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering* 2013, 18:1. <http://dx.doi.org/10.4172/1662-100X.1000106>



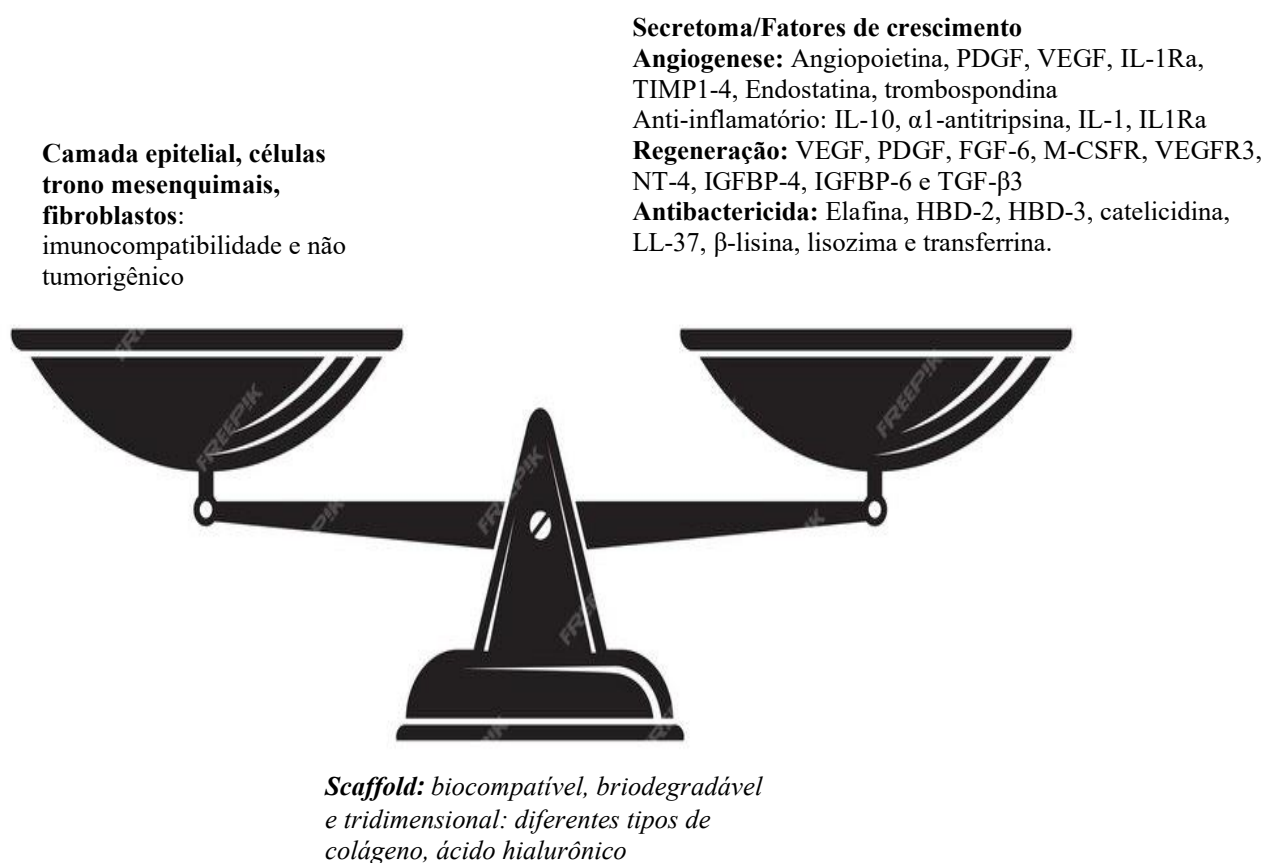
Figura 3: Coloração com hematoxilina-eosina de uma amostra de membrana amniótica. Observamos uma única camada de células epiteliais cubóides que recobrem a membrana basal e o tecido conjuntivo frouxo do estroma¹³. Fonte: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Cornea. 3rd ed. New York: Elsevier; 2011.

Parikh, Alomi O. *et al* publicaram em 2024, ampla revisão de literatura sobre o uso da Mah em transplantes/plásticas e cirurgias reconstrutivas oftalmológicas. Neste estudo, repertoriaram 516 publicações das quais, 62 foram selecionadas para análise criteriosa. Os autores concluíram que nestes 62 trabalhos o uso da Mah em transplantes é uma ferramenta útil, promissora e interessante nos casos de oculoplástica cirúrgica, nas reconstruções de lamela posterior, principalmente em pacientes com áreas transplantáveis indisponíveis¹⁴.

A partir do interesse, da aplicabilidade e dos resultados preliminares começaram a ser desvendados os vários fatores de crescimento presentes na membrana amniótica, como a interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA), fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFbeta), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), receptor de fator de crescimento de queratinócitos (KGFR), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), receptor de fator de crescimento de hepatócitos (HGFR), fator de crescimento transformador beta (TGFbeta), inibidores teciduais da metaloproteinase 1, 2, 3 e 4 (TIMP-1, -2, -3 e -4), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que são responsáveis pela capacidade de potencializar a cicatrização, epitelização e efeitos antiinflamatório¹⁵. Também possui beta-lisina, lisozima, transferrina e imunoglobulina que promovem efeito antimicrobiano¹⁶.

A Mah exerce influência significativa no processo de cicatrização por meio da ação integrada de suas camadas. A membrana basal da Mah, uma estrutura fina composta por fibras reticulares, está intimamente aderente ao epitélio amniótico. Por sua vez, a camada compacta adjacente, mais densa e desprovida de células, é formada por uma complexa rede reticular que facilita a passagem de diversos fatores de crescimento, devido à sua elevada permeabilidade. Os benefícios terapêuticos da membrana amniótica derivam da atuação sincronizada de seus fatores biológicos e citocinas, que desempenham um papel crucial nos processos de reparo de lesões (figura 4)^{17,18}.

Figura 4 – Ação coordenada e equilibrada do Scaffold da Mah, a membrana basal e seu secretoma (fatores de crescimento e citocinas)



Fonte: Arquivo próprio, 2025.

A aplicação em oftalmologia tem crescido nos últimos anos, já sendo relatado seu uso para reconstrução de superfície ocular, cirurgias de pterígio, perfurações corneanas, defeitos epiteliais corneanos persistentes, ceratite infecciosa e em tratamento de queimadura ocular e tumores oculares¹⁹.

Existem diversos métodos de preservação da Mah. O mais empregado no mundo é a criopreservação com glicerol misturado com meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) na proporção de 1:1 (vol/vol), mantendo a membrana armazenada a -80°C por até dois anos^{19,20}. A literatura sobre o uso da Mah na reconstrução da superfície ocular evidencia que os componentes e a estrutura biológica da Mah criopreservada em glicerol lembram a fresca²¹. Um detalhe importante é que o uso de concentração elevada de glicerol compromete a viabilidade das células da Mah²². Os principais obstáculos deste método são a necessidade de um ultrafreezer oneroso, backup de N_2 líquido ou CO_2 e software de controle de temperatura 24h/dia, o que o torna pouco disponível, além da dificuldade em manter a temperatura no transporte da Mah criopreservada^{20,23,24}.

Liofilização é um processo de desidratação do tecido por sublimação, inibindo reações químicas destrutivas que podem levar à alteração tecidual, e preservando os níveis de citocinas e resistência física das membranas amnióticas em relação à membrana fresca, além de permitir armazenamento em temperatura ambiente⁹. Seu transporte é fácil, eliminando um dos problemas da criopreservação²⁰.

A ProKeraTM (BioTissue) e a AmnioTekTM (ISP Surgical) são exemplos de produtos de membrana amniótica criopreservada e liofilizada, respectivamente, disponíveis no mercado (figura 5)²⁵. Ambos os produtos podem ser utilizados em contexto de cirurgia ou consultório. A ProKeraTM (BioTissue) possui anel de PMMA e pode ser colocada diretamente na superfície ocular. A AmnioTekTM (ISP Surgical) deve ser colocada na superfície ocular sob lente de contato terapêutica²⁴. No entanto, são produtos importados, caros e pouco disponíveis para uso em nosso país. No Brasil, temos a Amnio-AidTM (Hemocord), em que a empresa realiza a coleta e criopreservação de 8 fragmentos de Mah com custo de US\$565,00 mais anuidade de US\$90,00²⁵. Diante deste cenário, torna-se necessário o estudo de novas formas de preservação de Mah com o objetivo de reduzir os custos de preservação e facilitar a logística de estocagem, tornando o produto mais acessível em nosso país.

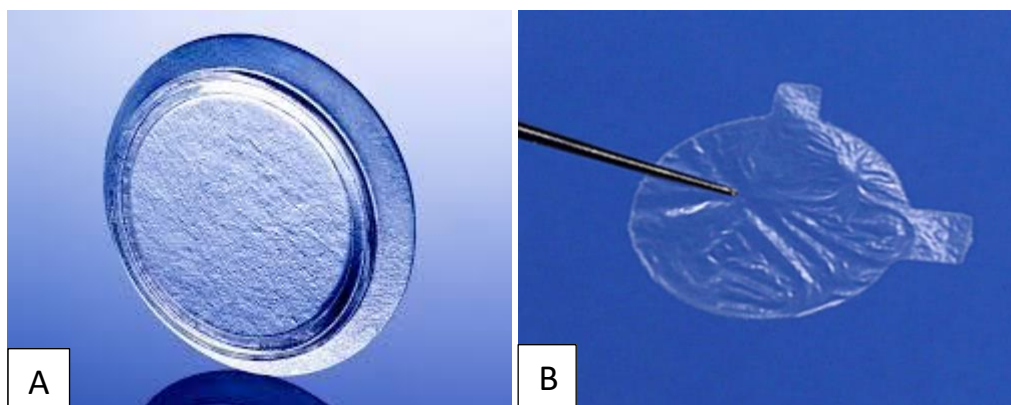


Figura 5: Produtos de Mah disponíveis no mercado. ProKera™ (5A) e AmnioTek™ (5B)

Uma nova alternativa é o processo de secagem da membrana amniótica com concentrador a vácuo *SpeedVac*™, ainda pouco discutido na literatura. A secagem a vácuo utilizando o concentrador *SpeedVac* é um processo eficiente para a remoção de solventes de amostras biológicas, químicas ou farmacêuticas. O princípio fundamental desse processo baseia-se na combinação de vácuo e calor controlado para evaporar solventes de amostras líquidas sem comprometer a integridade das substâncias sensíveis ao calor. O concentrador *SpeedVac* opera através da redução da pressão atmosférica dentro de uma câmara selada, diminuindo o ponto de ebulição dos solventes. Essa diminuição da pressão permite a evaporação rápida de solventes voláteis, como água, mesmo em temperaturas relativamente baixas. Como resultado, o processo de secagem ocorre de forma eficiente e suave, evitando a degradação térmica das moléculas da amostra. O uso do vácuo também minimiza a possibilidade de contaminação externa, uma vez que o sistema é fechado durante todo o processo, proporcionando um ambiente controlado para a secagem²⁶.

Propõe-se neste estudo realizar avaliação da estrutura morfológica (estrutural) da Mah por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET) da Mah por diferentes metodologias: fresca, criopreservada a -80°C, desidratada pela técnica de *SpeedVac*™ e liofilizada²⁷.

2. Objetivo Geral

Avaliar de forma qualitativa a morfologia e estrutura de Mah criopreservada, liofilizada e seca a vácuo com *SpeedVac*.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a morfologia e estrutura da Mah fresca em microscopia eletrônica de varredura e transmissão
- ✓ Comparar qualitativamente os três métodos de processamento e as amostras de Mah “in natura”

3. Casuística e Métodos:

3.1 Local

O estudo foi conduzido na Divisão de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da UNESP, no Banco de Olhos do Hospital das Clínicas da UNESP e no Laboratório de Engenharia Celular/Laboratório de Biotecnologia Aplicada da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

3.2 Análise ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, parecer nº 6.528.308.

3.3 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental controlado, com grupos paralelos, inclui uma análise descritiva das características morfológicas das membranas amnióticas, avaliadas por microscopia eletrônica, após aplicação dos diferentes métodos de preservação.

3.4 Hipótese

A tecnologia por SpeedVac™ apresenta vantagens sobre os demais métodos tornando a disponibilização de membranas para uso oftalmológico mais universal.

3.5 Obtenção da Mah *in natura*

Todos os procedimentos foram feitos em concordância com as orientações do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) local e após as doadoras assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. Os grupos de estudo foram constituídos por membranas amnióticas obtidas de doadoras maiores de 18 anos que realizaram no mínimo duas consultas de pré-natal, idade gestacional igual ou superior a 35 semanas, trabalho de parto sem anormalidades ou complicações, submetidas a cesariana eletiva, que não fizeram uso de drogas passíveis de depósito nos tecidos, sem história de doença no trato genital ou em outras partes que possam representar risco ao receptor, ausência de história pessoal e familiar para doenças hereditárias. Foi incluído no estudo apenas paciente com testes negativos para detecção de HIV, hepatite B, hepatite C e sífilis. Os fetos tinham peso igual

ou superior a 2000g, sem anormalidade congênita e sem história de sofrimento fetal grave^{28,29}.

Para a preparação da membrana amniótica, a placenta foi retirada da doadora selecionada, após seu consentimento, colocada em recipiente estéril e transportada até o banco de tecido mantendo temperatura entre 2°C e 8°C. Em ambiente estéril, a placenta foi lavada com solução salina e com auxílio de compressa para remoção de coágulos e excesso de sangue. Foi realizado um corte próximo ao cordão umbilical e realizado dissecação com tesoura de ponta romba para separar o âmnio do córion (figura 6). Grandes pedaços de Mah foram removidos e lavados novamente com solução salina para remoção de qualquer resto de sangue. Os segmentos de Mah eram com coloração amarelo claro, semitranslúcida e de espessura regular. Em seguida, foi realizado lavagem da Mah com solução de antibiótico contendo penicilina benzatina 10.000 UI/ml (Teuto), ceftazidima 10mg/ml (Blau Farmacêutica S.A.) e anfotericina B 25mg/ml (Cristália). A Mah foi então colocada em um transportador (papel de nitrocelulose) com o epitélio para cima e cortada em dimensões 2x2cm. Identificamos o lado epitelial com facilidade devido ao brilho característico desta face. Obtivemos placentas de três doadoras, sendo divididas em quatro grupos contendo um fragmento de cada doadora: Mah frescas (*in natura*), Mah criopreservadas, Mah liofilizadas e Mah secas com SpeedVac™ (total: 12 amostras). O número de placentas restrito a três se deveu aos fatos: 1) falta de entrosamento entre as equipes da maternidade e da pesquisa, pela ausência de uma equipe especializada na coleta; 2) incompatibilidade de tempo entre o parto ocorrendo e o pesquisador, tendo em vista o modelo da pós graduação. Muitas vezes, no momento do parto, o pesquisador estava em atividades que o impediam de comparecer para coleta do material; 3) número relativamente baixo de cesarianas eletivas em parturientes saudáveis e que se enquadravam nos critérios de seleção da doadora para a pesquisa; 4) dificuldade de entendimento por parte das gestantes da importância da doação.



Figura 6 – Dissecção da placenta para retirada da Mah com tesoura de ponta romba

3.6 Amostras frescas (grupo controle)

As amostras do grupo de Mah frescas foram, logo após a obtenção da placenta e preparação da Mah, colocados em fixador de Karnovsky (mistura de paraformaldeído 8%, glutaraldeído 25% e tampão fosfato) e enviados ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP para confecção das lâminas para análise em microscopia eletrônica.

3.7 Criopreservação a -80°C

As amostras de Mah do grupo da criopreservação foram colocados em frasco com solução de glicerol e DMEM na proporção 1:1 e armazenados em freezer a -80°C (Ultrafreezer Thermo Scientific EXF40086D, EUA, 2012). Após 24h, foram descongelados a 22,0°C (temperatura ambiente local) em aproximadamente cinco minutos, colocados em fixador de Karnovsky e enviados ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP para confecção das lâminas para análise em microscopia eletrônica.

3.8 Secagem da amostra a vácuo com SpeedVac™

Imediatamente após confecção dos fragmentos Mah, as amostras foram colocadas em recipiente fenestrado e posicionadas dentro do concentrador plus com bomba de vácuo de diafragma integrada (Concentrator 5301, Eppendorf, Alemanha) para secagem da membrana amniótica (figura 7). As amostras foram processadas a 45°C por 24h, tempo mínimo observado em teste piloto para desidratar completamente a amostra. Ao serem

removidas do aparelho, foram observadas amostras totalmente desidratadas (figura 8), permanecendo desta forma em ar ambiente até ser reidratada. Para utilizá-la, cada amostra foi banhada com cinco gotas de água destilada e aguardou-se cinco minutos. Após este período, foi notado segmento de membrana amniótica de coloração amarelo claro semitranslúcida com consistência discretamente menos elástica do que a Mah fresca. As amostras foram colocadas em fixador de Karnovsky e direcionadas ao Centro de Microscopia Eletrônica para confecção das lâminas.



Figura 7 – Aspecto do Concentrador a vácuo SpeedVac™

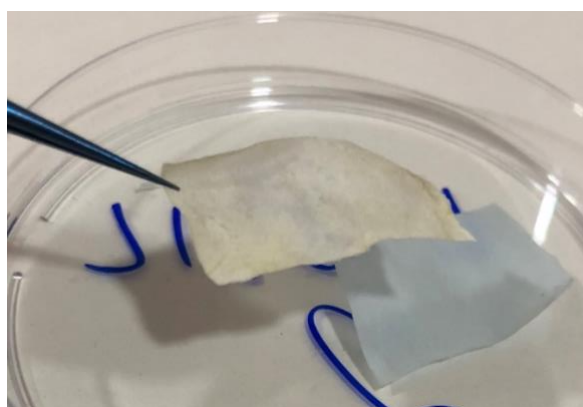


Figura 8 – Membrana amniótica após processamento em SpeedVac™

3.9 Liofilização da amostra

A partir do fragmento processado *in natura*, foi utilizado liofilizador (Alpha 2-4 LDplus, Martin Christ, Alemanha, 2017), após etapa de congelamento de 30 minutos em ultrafreezer a $-80,0^{\circ}\text{C}$, para processamento das amostras por 24h, tempo necessário para desidratar completamente a amostra observada em teste piloto (figura 9). Foi utilizado vácuo 0,040 mbar a $-50,0^{\circ}\text{C}$ por 20h na etapa de secagem primária e vácuo 0,0026 mbar

a $-70,0^{\circ}\text{C}$ por 4h na secagem secundária. As amostras foram removidas do liofilizador após ter sido observado aspecto macroscópico seco (figura 10) e permaneceram secas em ar ambiente até serem reidratadas. Para utilizá-la, cada amostra foi banhada com cinco gotas de água destilada e aguardado cinco minutos. Após este período, foi notado membrana amniótica de coloração amarelo claro semitranslúcida com consistência discretamente menos elástica do que a Mah fresca. O aspecto macroscópico das amostras secas à vácuo e liofilizadas eram muito semelhantes, tanto antes quanto após a hidratação. As amostras foram colocadas em fixador de Karnovsky e direcionadas ao Centro de Microscopia Eletrônica para confecção das lâminas.



Figura 9 – Aspecto do Equipamento de Liofilização Utilizado

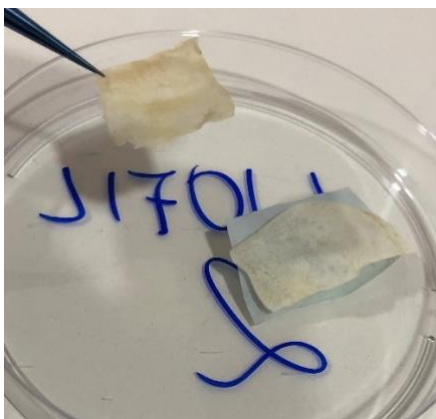


Figura 10 – Amostra de Mah liofilizada

3.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura

As análises em microscopia eletrônica foram realizadas em conjunto com a Professora Doutora Daniela Carvalho dos Santos. As amostras foram estudadas quanto à manutenção da estrutura morfológica celular e matriz extracelular em microscopia

eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). A MEV nos permitiu análise geral da integridade do tecido e a MET foi utilizada para análise detalhada do tecido e comparação entre os grupos. A fim de tornar avaliação objetiva, foram estabelecidos seis indicadores, considerados pela literatura importantes para prática clínica, a serem observados/monitorados qualitativamente na MET para comparação entre as Mah submetidas a diferentes formas de preservação e a *in natura* (fresca). Foram eles:

- 1- membrana basal intacta,
- 2- camada de colágeno íntegra,
- 3- núcleo celular íntegro e com presença da dupla membrana em seu envoltório,
- 4- presença de desmossomos e filamentos intermediários no citoplasma,
- 5- preservação das projeções e vilosidades apicais e
- 6- presença de organelas ou complexos vesiculares citoplasmáticos.

Dado a semelhança entre a membrana basal da Mah e da conjuntiva, a integridade da membrana basal foi considerado o critério de análise mais importante. Da forma descrita acima, foram constituídos quatro grupos de estudo, para análise estrutural das MAh, segundo a metodologia de processamento (figura 11):



Figura 11 – Constituição dos Grupos de Estudo

4. Resultados

4.1 Avaliação morfológica das amostras

A análise estrutural do tecido com MEV da Mah fresca evidenciou células epiteliais de tamanhos e formatos variados sobre camada espessa de colágeno com fibras em diferentes sentidos e arranjos. É possível observar as projeções apicais (vilosidades) na superfície das células epiteliais. A análise das amostras submetidas a criopreservação, liofilização e secagem a vácuo mantiveram a mesma estrutura tecidual em relação a Mah fresca, sem áreas de fragmentação, regiões desnudas de epitélio ou descompactação da matriz extracelular. A figura 12 ilustra uma imagem de cada grupo de amostra vista em MEV sendo possível observar camada única de células epiteliais e extensa camada de colágeno com fibras compactadas e em diversos sentidos. A figura 13 ilustra uma imagem da superfície das células epiteliais de cada grupo de amostra vista em MEV, sendo possível notar as vilosidades apicais intactas.

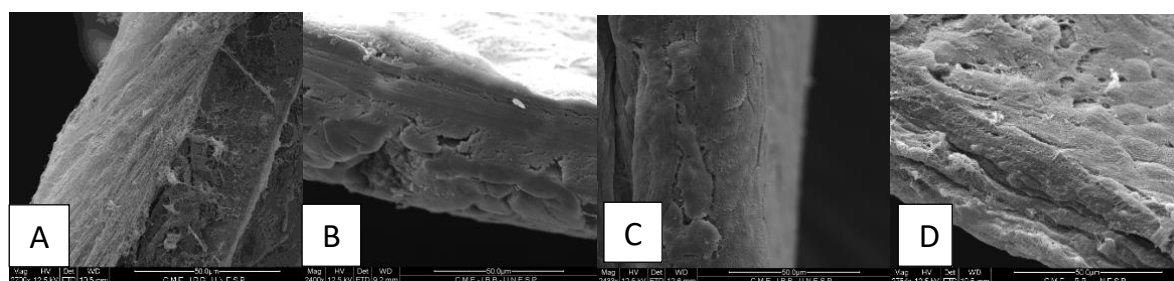


Figura 12 – Mah dos diferentes grupos visto em microscopia eletrônica de varredura. 12A: Mah fresca; 12B: Mah criopreservada, 12C: Mah liofilizada, 12D: Mah seca com SpeedVac

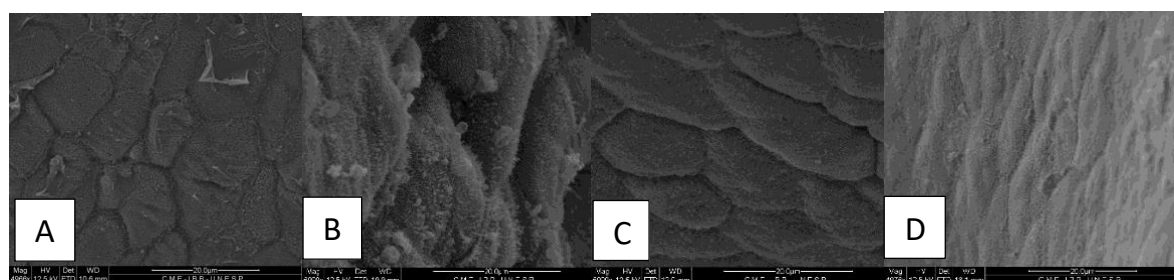


Figura 13 – Mah dos diferentes grupos visto em microscopia eletrônica de varredura. 13A: Mah fresca, 13B: Mah criopreservada, 13C: Mah liofilizada, 13D: Mah seca com SpeedVac

Em todas as amostras frescas foram observadas células epiteliais com formatos irregulares, com projeções ou vilosidades apicais, fina membrana basal e grande quantidade de colágeno em disposição variada. No citoplasma das células epiteliais observamos grande quantidade de filamentos intermediários com desmossomos realizando união celular, múltiplas vesículas contendo lipídeo, núcleo com duplo envoltório e algumas organelas e complexos multivesiculares próximos ao núcleo.

Conforme pode ser observado na figura 14, foi possível observar epitélio e grande quantidade de colágeno.

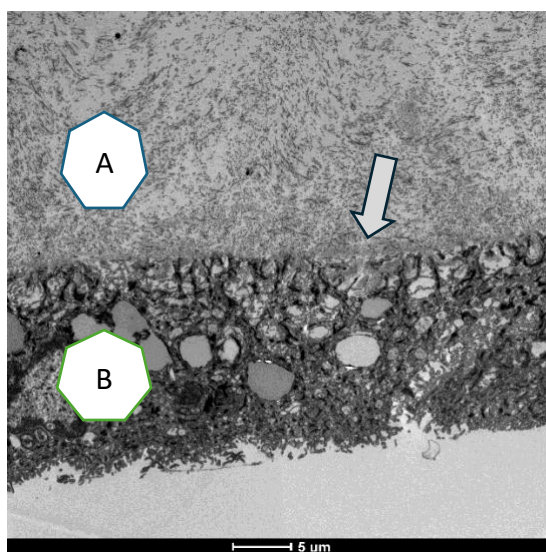


Figura 14 – Microscopia Eletrônica de Transmissão, em MAh *in natura* (A- Colágeno; B- epitélio; Flecha- Membrana basal)

Em todas as amostras do grupo de Mah criopreservadas identificou-se membrana basal intacta, núcleo com duplo envoltório, camada extensa de colágeno (figura 15), organelas próximas ao núcleo, grande quantidade de filamentos intermediários e desmossomos e vilosidades apicais. A amostra de Mah criopreservada da placenta três apresentou uma célula epitelial com maior eletrodensidade do citoplasma (figura 16), porém a alteração foi localizada, com demais células da amostra mantendo características de boa preservação.

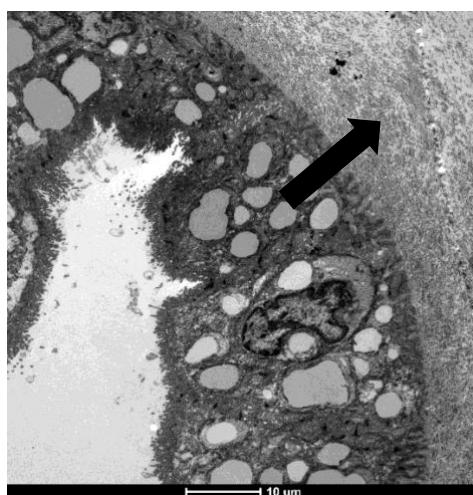


Figura 15 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de Mah criopreservada (Flecha: camada de colágeno)

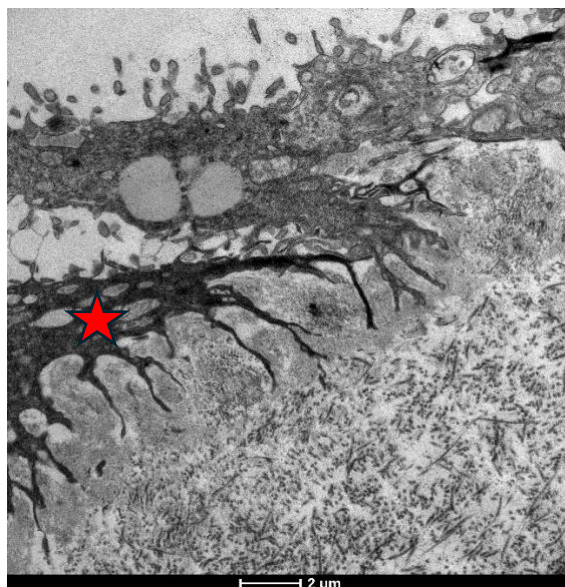


Figura 16 – Célula com aumento da eletrodensidade do citoplasma, alteração localizada (estrela vermelha)

As Mah liofilizadas também exibiram manutenção das características morfológicas da Mah fresca (figura 17), único diferencial sendo discreto aumento da quantidade de vesículas de lipídeo (figura 18). Membrana basal e camada de colágeno estavam preservadas, organelas e núcleo íntegros, múltiplos desmossomos e filamentos intermediários presentes e vilosidades apicais mantidas.

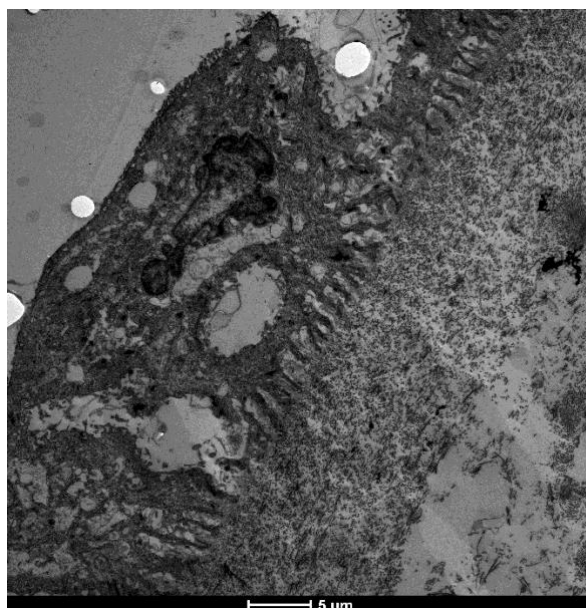


Figura 17– Microscopia Eletrônica de Transmissão de Mah liofilizada

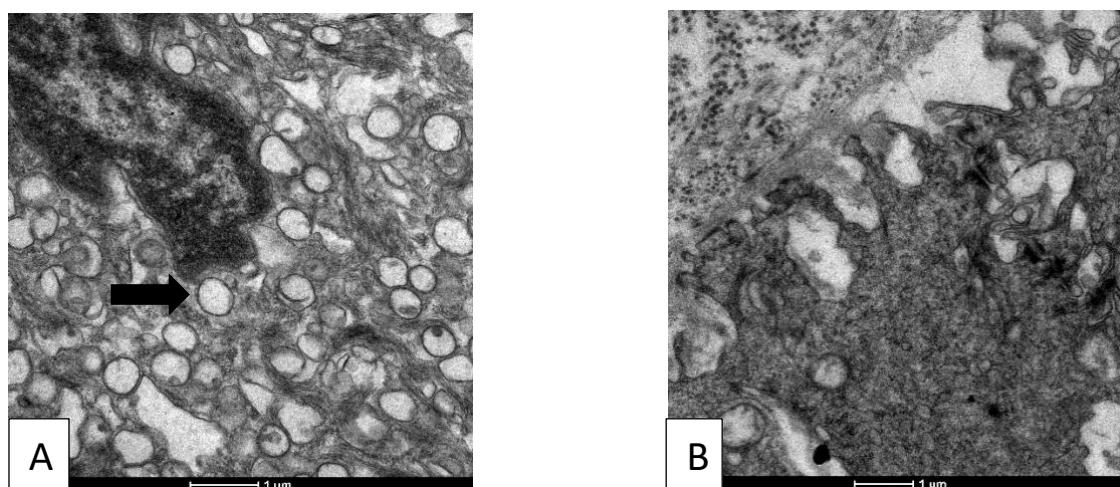


Figura 18 – Mah liofilizada (18A); Mah fresca (18B). Observe maior quantidade de vacúolos contendo lipídeos no citoplasma da Mah liofilizada (seta).

As Mah secas com concentrador a vácuo apresentaram bom estado de preservação (figura 19). O núcleo apresentou marginalização da cromatina e formato irregular, porém sem sinais de morte celular programada, além de manter duplo envoltório nuclear, camada de colágeno espessa, membrana basal intacta, organelas citoplasmáticas íntegras, vilosidades apicais preservadas e grande quantidade de filamentos intermediários e desmossomos.

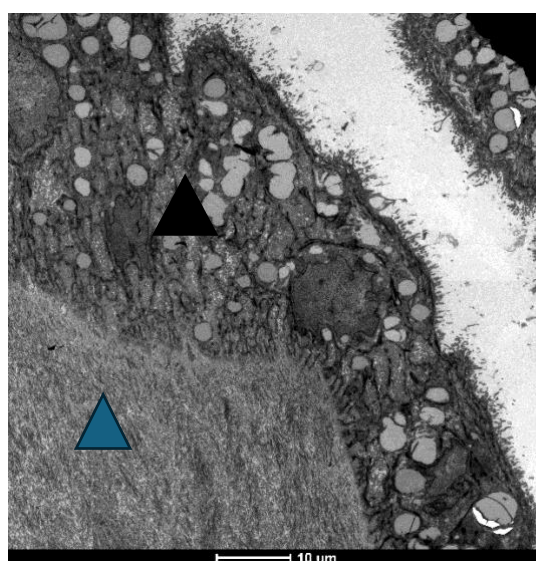


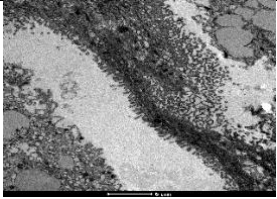
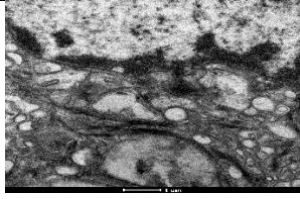
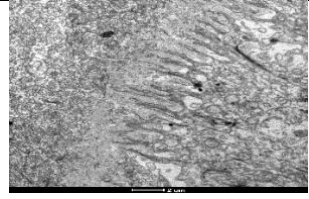
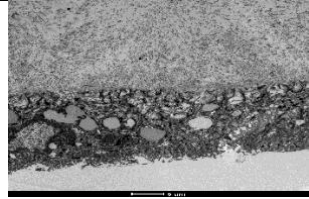
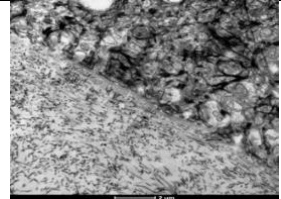
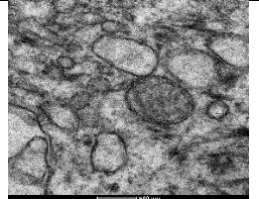
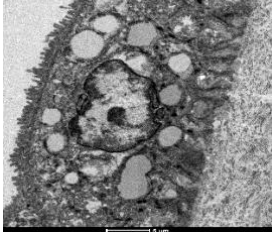
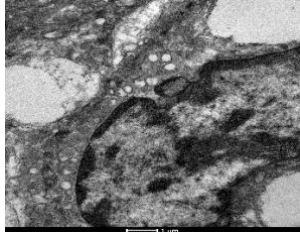
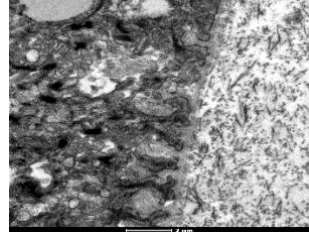
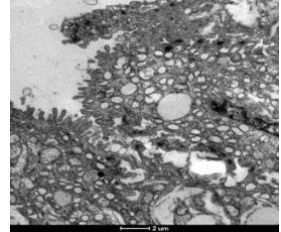
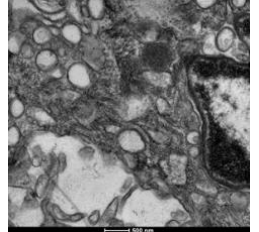
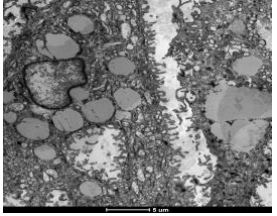
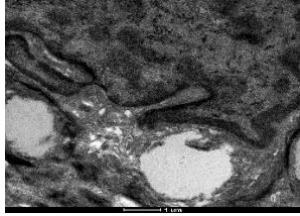
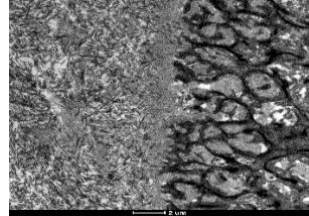
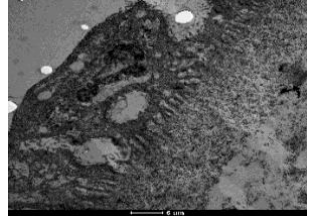
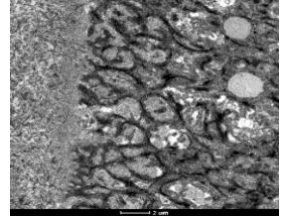
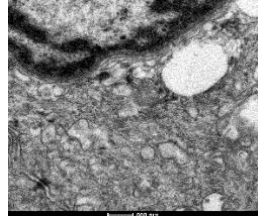
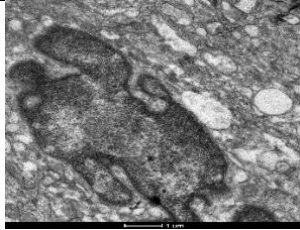
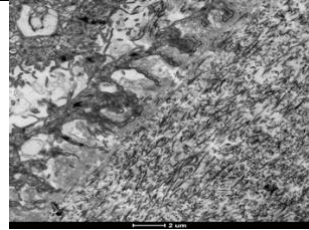
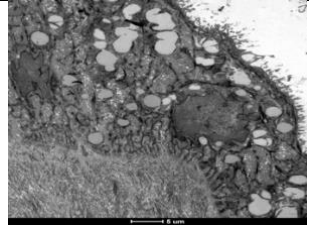
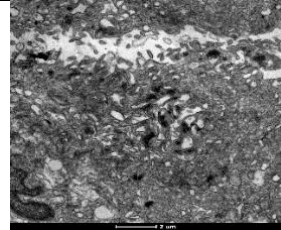
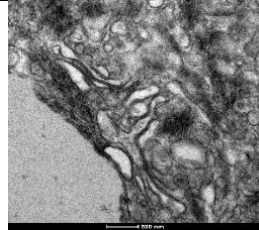
Figura 19 – Mah seca com SpeedVac™ em microscopia eletrônica de transmissão (triângulo preto: epitélio; triângulo azul: estroma de colágeno)

Os quadros 2 e 3 mostram os resultados resumidos e imagens da análise qualitativa de microscopia eletrônica de transmissão.

Quadro 2 – Análise morfológica qualitativa das amostras de Mah em microscopia eletrônica de transmissão

Mah	Vilosidades	Núcleo	Membrana Basal	Colágeno	Desmossomos	Organelas
Mah fresca 1	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah fresca 2	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah fresca 3	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah criopreservada 1	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah criopreservada 2	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah criopreservada 3	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah liofilizada 1	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah liofilizada 2	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah liofilizada 3	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah SpeedVac 1	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah SpeedVac 2	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes
Mah SpeedVac 3	Íntegro	Íntegro	Íntegra	Íntegro	Numerosos	Presentes

Quadro 3 –Análise morfológica dos grupos de Mah em microscopia eletrônica de transmissão.

	Vilosidades	Núcleo	Membrana Basal	Colágeno	Desmossomos	Organelas
Mah Fresca						
Mah Criopreservada						
Mah Liofilizada						
Mah SpeedVac						

5. Discussão

A membrana amniótica possui epitélio simples de células cuboidais ou colunares com microvilosidades na superfície apical³⁰. Em nosso estudo observamos manutenção do epitélio com microvilosidades intactas após processamento em liofilizador, criopreservação e secagem a vácuo. Outras duas camadas também são bem divididas: membrana basal e estroma, rico em colágeno³⁰.

A Mah apresenta características únicas para uso em oftalmologia: promove suporte e facilita a epitelização, cicatrização de córnea e conjuntiva, reduz a inflamação e apresenta baixa rejeição imunológica²⁰. Adicionalmente, apresenta melhor resultado cosmético em relação a enxertos bucais ou mucosos, que resultam em morfologia epitelial não conjuntival¹⁶. Foi demonstrado que células epiteliais da Mah produzem fatores de crescimento derivados de pigmento, neurotransmissores, neuropeptídeos e fatores neurotróficos que podem contribuir com as propriedades cicatrizantes em uso em oftalmologia²⁰. As células epiteliais das amostras mantiveram núcleo íntegro e organelas presentes após os procedimentos de secagem a vácuo, criopreservação e liofilização, o que pode significar que após a reidratação ou descongelamento da Mah as células epiteliais continuem funcionando, apesar de essa conclusão fugir do escopo do nosso trabalho.

A Mah pode ser utilizada na superfície ocular tanto como enxerto permanente, integrando-se ao tecido do hospedeiro, quanto como curativo biológico, aliviando a dor e promovendo a redução da inflamação¹⁶. Quando empregada como enxerto, deve ser aplicada com o lado epitelial voltado para cima, sobre o leito da ferida³¹. A membrana basal da Mah apresenta características semelhantes às da conjuntiva e da córnea, funcionando como substrato para o crescimento de células epiteliais na superfície ocular^{8,20}. Além disso, a Mah forma desmossomos e hemidesmossomos, que conferem à membrana a capacidade de se incorporar eficientemente ao estroma ocular¹⁶. Dessa forma, torna-se crucial que os processos de preservação da Mah preservem a integridade da membrana basal e a quantidade adequada de desmossomos. No presente estudo, tanto a secagem a vácuo quanto a liofilização e a criopreservação demonstraram manter a integridade da membrana basal, o principal critério avaliado, bem como a abundância de desmossomos. Adicionalmente, quando utilizada na oftalmologia, as células inflamatórias ficam aprisionadas no estroma da Mah, onde sofrem apoptose, impedindo a ativação de cascatas inflamatórias na superfície ocular^{16,20}. O estroma, rico em

colágeno, fundamental para a ação anti-inflamatória, foi observado em todas as amostras analisadas no estudo.

A Mah pode ser empregada em consultório, aplicada sob uma lente de contato terapêutica, em casos de úlcera de córnea, ceratopatia neurotrófica e queimaduras químicas, com a possibilidade de uso concomitante de colírios¹³. Em situações de ceratite bacteriana, seu uso revela-se vantajoso, uma vez que, além de não interferir na penetração do antibiótico, a Mah se impregna com o antimicrobiano, prolongando seus efeitos terapêuticos¹⁶. Do ponto de vista logístico, é preferível que a Mah destinada ao uso em consultório seja mantida em temperatura ambiente, o que permite ao oftalmologista tê-la armazenada em sua clínica e disponível para aplicação imediata. Nesse contexto, a Mah liofilizada e seca a vácuo com o dispositivo SpeedVac™ apresentam vantagem sobre a Mah criopreservada. As vantagens da Mah seca a vácuo é a necessidade de apenas um aparelho para o processamento, enquanto a Mah liofilizada exige congelamento a -80°C antes de ser submetida ao processo de liofilização, além de manuseio mais simples do aparelho. Além disso, o concentrador a vácuo SpeedVac™ é um equipamento compacto e leve, de fácil transporte, permitindo que o processamento da Mah seja realizado no mesmo ambiente do parto, caso isso seja desejado e previamente planejado pela equipe.

O custo de aquisição dos equipamentos utilizados para a produção da Mah criopreservada, liofilizada e seca a vácuo varia significativamente. O ultrafreezer, modelo similar ao utilizado em nosso estudo, apresenta um custo aproximado de US\$ 26.700,00, sendo necessário também o fornecimento contínuo de nitrogênio líquido e um software para controle de temperatura 24 horas por dia³². O liofilizador, da marca Martin Christ, utilizado em nossa pesquisa, possui um custo em torno de US\$ 16.000,00³³. Já o concentrador a vácuo, da marca Eppendorf, utilizado para a produção da Mah seca a vácuo, tem uma cotação aproximada de US\$ 16.500,00³⁴. Dessa forma, o custo total em aparelhos para a produção de Mah criopreservada, Mah liofilizada e Mah seca a vácuo é de aproximadamente US\$ 26.700,00, US\$ 42.700,00 e US\$ 16.500,00, respectivamente. Vale destacar que a Mah liofilizada e a Mah seca a vácuo, por serem armazenadas em temperatura ambiente, permitem uma produção em maior escala quando comparadas à Mah criopreservada, que tem produção limitada pela capacidade de armazenamento do ultrafreezer. Além disso, ao contrário da Mah liofilizada e criopreservada, não existe patente registrada para a Mah seca a vácuo, o que facilita a implementação de novos produtos. O quadro 4 resume a comparação logística entre os métodos mencionados.

Quadro 4 – Comparação logística entre os métodos

Método	Congelamento -80°C	Liofilização	SpeedVac
Portabilidade	Não	Não	Sim
Patente	Sim	Sim	Não
Lotes	Pequenos	Lotes maiores	Lotes maiores
Logística	Difícil (carga congelada)	Mais fácil	Mais fácil
Preço do Equipamento	US\$ 26.700,00	US\$ 16.000,00	US\$ 16.500,00
Profissional habilitado para processamento	Biólogo/Biomédico/Farmacêutico/médico	Engenheiro Químico	Biólogo/Biomédico

6. Conclusões

- ✓ Nas amostras e nas condições estudadas e com os resultados obtidos, pode-se concluir que não ocorre mudança qualitativa na morfologia e estrutura de Mah criopreservada, liofilizada e seca a vácuo com SpeedVac.
- ✓ A secagem a vácuo com SpeedVac™, liofilização e criopreservação mantiveram características morfológicas qualitativas da Mah semelhante a amostra fresca
- ✓ A tecnologia empregada pelo SpeedVac® apresenta vantagens em relação aos demais métodos, especialmente no que tange a custos e à logística, facilitando a disponibilização mais ampla de membranas para aplicação oftalmológica.

7. Referências bibliográficas:

- 1- PALIWAL, V.; MIDHA, A.; JAIN, P.; ARORA, I. Amniotic membrane transplantation – role redefined. **Group 100**, v. 2, n. 10, p. 10, 1910.
- 2- HILLENKAMP, J. et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface in CEP. **Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde**, v. 105, p. 89–146, 1911.
- 3- STERN, M. D. Membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts: a preliminary report. **JAMA**, v. 60, n. 13, p. 973–974, 1913. DOI: 10.1001/jama.1913.04340130021008.
- 4- WEST JR., W. B. Advancing wavelike epitheliopathy: a subtype of partial limbal stem cell deficiency. Disponível em: <https://www.healthcare.utah.edu/moran/morancore.utah.edu>. Acesso em: 18 mar. 2025.
- 5- DE ROTTH, A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. **Archives of Ophthalmology**, v. 23, p. 522–525, 1940. DOI: 10.1001/archophth.1940.00860130586006.
- 6- PUBMED CENTRAL. Ferramenta de citação para pesquisa biomédica – PMID2cite. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 18 mar. 2025.
- 7- KORKMAZ, I. et al. Beyond transplants: current and future therapeutic potential of amniotic membrane extract (AME) in ophthalmology. **Regenerative Medicine**, v. 20, n. 2–3, p. 97–109, 2025. DOI: 10.1080/17460751.2025.2472578.
- 8- SATO, M. et al. Effects of human amniotic membrane on the angiogenesis and healing of ischemic wounds in a rat model. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 39, n. 7, p. 789–796, 2024. DOI: 10.1177/08853282241289919.
- 9- ELKHENANY, H. et al. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 1–19, 2022. DOI: 10.1186/s13287-021-02684-0.
- 10- JAHANAFROOZ, Z. et al. Human amniotic membrane as a multifunctional biomaterial: recent advances and applications. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 37, n. 8, p. 1341–1354, mar. 2023.

- 11-AWATARA, I. B. N. et al. The effect of storage time of fresh human amniotic membrane on the levels of growth factors in freeze-dried human amniotic membrane after gamma ray irradiation. ***Biomolecular and Health Science Journal***, v. 7, n. 2, p. 114–118, jul.–dez. 2024. DOI: 10.4103/bhsj.bhsj_37_2.
- 12-BOURNE, G. L. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***, v. 79, n. 6, p. 1070–1073, 1960.
- 13-KRACHMER, J. H.; MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. ***Cornea***. 3. ed. New York: Elsevier, 2011.
- 14-CHOPRA, A.; THOMAS, B. S. Amniotic membrane: a novel material for regeneration and repair. ***Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering***, v. 18, p. 1, 2013. DOI: 10.4172/1662-100X.1000106.
- 15-PARIKH, A. O. et al. A review of current uses of amniotic membrane transplantation in ophthalmic plastic and reconstructive surgery. ***Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery***, v. 40, n. 2, p. 134–149, 2024.
- 16-JIRSOVA, K.; JONES, G. L. A. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting – a review. ***Cell and Tissue Banking***, v. 18, n. 2, p. 193–204, 2017. DOI: 10.1007/s10561-017-9618-5.
- 17-DUA, H. S. et al. The amniotic membrane in ophthalmology. ***Survey of Ophthalmology***, v. 49, n. 1, p. 51–77, 2004.
- 18-NIKNEJAD, H. et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. ***European Cells and Materials***, v. 15, p. 88–99, 2008.
- 19-FURDOVA, A. et al. Amniotic membrane application in surgical treatment of conjunctival tumors. ***Scientific Reports***, v. 13, p. 2835, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-30050-y.
- 20-FERENCZY, P. A. V. H.; SOUZA, L. B. de. Comparison of the preparation and preservation techniques of amniotic membrane used in the treatment of ocular surface diseases. ***Revista Brasileira de Oftalmologia***, v. 79, n. 1, p. 71–80, 2020.
- 21-RODRÍGUEZ-ARES, M. T. et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. ***Acta Ophthalmologica***, v. 87, n. 4, p. 396–403, 2009.
- 22-HERMANS, M. H. Clinical experience with glycerol-preserved donor skin treatment in partial thickness burns. ***Burns***, v. 15, n. 1, p. 57–59, 1989.

- 23- KOIZUMI, N. J. et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research*, v. 20, n. 3, p. 173–177, 2000.
- 24- McGAUGHY, A.; GUPTA, K. P. In-office use of amniotic membrane. *Ophthalmic Pearls Cornea*, 2015.
- 25- HEMOCORD. Orçamento do produto Amnio-Aid. [documento não publicado], 31 mar. 2025.
- 26- THERMO FISHER SCIENTIFIC. *SpeedVac Concentrators: Vacuum Concentration Technology*. Disponível em: <https://www.thermofisher.com>. Acesso em: 30 mar. 2025.
- 27- ALLEN, C. L. et al. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing. *PLOS ONE*, v. 8, n. 10, p. 1–15, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.007.
- 28- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 707, de 1º de julho de 2022. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos para Saúde. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1 jul. 2022. Seção 1, p. 48.
- 29- LAVAGNOLI, D. C. F. et al. Protocolo de captação, processamento e armazenamento de membrana amniótica humana para uso oftalmológico. *Oftalmo*, v. 9, n. 4, p. 181–192, 2023.
- 30- RÖCK, T. et al. Amniotic membrane transplantation in reconstructive and regenerative ophthalmology. *Annals of Transplantation*, v. 23, p. 160–165, 2018.
- 31- SHIMMURA, S. et al. Anti-inflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*, v. 20, n. 4, p. 408–413, 2001.
- 32- EQUIPMENT. *Thermo Scientific TSX40086D Cold Storage*. Disponível em: <https://www.tequipment.net/Thermo-Scientific/TSX>
- 33- EXIPRO. *CHRIST (Alemanha) Liofilizador de laboratório Alpha 1-2 LDplus*. Disponível em: <https://www.exapro.pt/christ-germany-alpha-1-2-ldplus-p240813225/>. Acesso em: 5 abr. 2025.
- 34- EPPENDORF. Orçamento para compra de Concentrador Plus com bomba a vácuo, número de referência Q24000741398. [documento não publicado]. Recebido em: 17 dez. 2024.

