

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**REGULAÇÃO MICROAMBIENTAL DE CÉLULAS EPITELIAIS
LÍMBICAS CORNEAIS DE COELHO EXPANDIDAS SOBRE
MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESEPITELIZADA:
ÊNFASE PARA A ORGANIZAÇÃO SUPRAMOLECULAR
DOS MAIORES BIOPOLÍMEROS EXTRACELULARES**

Gisele Pereira Valdetaro

Médica Veterinária

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**REGULAÇÃO MICROAMBIENTAL DE CÉLULAS EPITELIAIS
LÍMBICAS CORNEAIS DE COELHO EXPANDIDAS SOBRE
MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESEPITELIZADA:
ÊNFASE PARA A ORGANIZAÇÃO SUPRAMOLECULAR
DOS MAIORES BIOPOLÍMEROS EXTRACELULARES**

Gisele Pereira Valdetaro

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Aldrovani

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia Veterinária

2015

V145r Valdetaro, Gisele Pereira
Regulação microambiental de células epiteliais límbicas corneais de coelho expandidas sobre membrana amniótica humana desepitelizada : ênfase para a organização supra-molecular dos maiores biopolímeros extracelulares / Gisele Pereira Valdetaro. – – Jaboticabal, 2015
xviii, 62 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: José Luiz Laus
Co-orientadora: Marcela Aldrovani Rodrigues
Banca examinadora: João Antonio Tadeu Pigatto, Aline Adriana Bolzan

Bibliografia

1. Birrefringência. 2. Colágenos. 3. Dicroísmo Linear. 4. Proteoglicanos. 5. Matriz Extracelular. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617.7:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gisele Pereira Valdetaro - Nasceu em 18 de novembro de 1988, na cidade de Vitória, estado do Espírito Santo. Filha de Carmen Margareth P. Valdetaro e Adelson Valdetaro Neves. Coursou Medicina Veterinária entre 2007 e 2012, na Universidade Vila Velha (Vila Velha, ES). Realizou, em 2012, Curso de Aperfeiçoamento em Oftalmologia Veterinária, no instituto Qualittas de Pós Graduação, em São Paulo. Participou, em 2013, do Programa de Capacitação de Recursos Humanos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), tendo desenvolvido atividades junto ao Serviço de Oftalmologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal. Em 2014, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, com bolsa da FAPESP.

EPÍGRAFE

“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

DEDICATÓRIA

Dedico a finalização dessa etapa aos meus pais, os maiores responsáveis por esta conquista, e à minha pequena Dolly, que durante 14 anos me proporcionou momentos de muita alegria, e no final de sua vida, fez- me despertar o interesse pela oftalmologia veterinária.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter demonstrado seu cuidado e amor a todo tempo, que está comigo sempre e nada me deixou faltar. “Obrigada Senhor por ser tudo para mim!”

Aos meus pais Carmen e Adelson, que me ensinaram princípios eternos e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos, apoiando-me sempre, mesmo com os corações apertados pela distância. “Pais, obrigada por me darem conhecimento e amor que são tesouros que ninguém poderá me roubar!”

À minha irmã Estela, pelo apoio e parceria a distância. “Obrigada pentelha por tudo, amo você também!”

A todos os amigos que sempre caminharam comigo e que de perto ou de longe estiveram presentes nessa fase. Em especial, à Flavia, à Alinne, à Bruna, à Maíra, à Aline e à Priscila, que principalmente de longe, me deram toda força e carinho para concluir essa etapa. “Muito obrigada princesas, vocês foram anjos pra mim!”

Aos meus filhos não humanos, que me fazem muito feliz e alegam todos os meus dias. Por serem tão sinceros e carinhosos, o que me faz lembrar sentimentos humanos que muitas vezes faltam-nos. Especialmente ao Audi, que esteve comigo todo esse tempo, sendo meu “cãopanheiro” de todas as horas.

Ao professor e orientador José Luiz Laus, que me deu a honra de ser sua orientada nesses anos e de participar de um serviço tão bem estruturado e reconhecido. “Obrigada professor por essa oportunidade!”

À Marcela, que como coorientadora e amiga não tenho palavras para agradecê-la por tudo o que fez por mim. Por ter acreditado em mim e me conduzido em um caminho que a princípio parecia surreal para mim. “Obrigada mesmo Marcela. Eu e Audi temos muito carinho e seremos muito agradecidos sempre!”

Aos meus colegas do grupo da oftalmo que se mostraram uma equipe unida e prestativa, pelos quais tenho como exemplo de profissionais dedicados e pessoas maravilhosas. Em especial ao Ivan que dividiu comigo as segundas-feiras de atendimento, me proporcionando o aprendizado na prática. “Obrigada a todos pela parceria sempre!”

À minha vizinha Marcella (Tiêete), que sempre foi muito prestativa e virou comadre, cuidando sempre do meu filhote quando eu precisei. “Obrigada por sempre estar por perto e amar tanto o Audi!”

Aos amigos que ganhei em “Jabuka”. Em especial ao Augusto (Lemão) que sempre muito prestativo socorreu o fusca sentimental e se tornou um grande amigo. A família Nostravamos que socorreu a Gi sentimental e que foi nesse último ano uma família para mim.

Aos amigos de outros departamentos, em especial Fausto, Paulin e Ana, com os quais dividi muitas risadas.

Aos professores, funcionários e colegas do Hospital Veterinário, que participaram dos meus dias, mantendo sempre um convívio agradável.

Aos professores da graduação, em especial à Betânia e Séfora que me estimularam e apoiaram para que eu fizesse meu mestrado nesta instituição.

Aos animais utilizados na pesquisa. Meu eterno respeito.

Ao professor doutor Jose Álvaro Pereira Gomes, diretor do Centro Avançado de Superfície Ocular, pertencente ao Departamento de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina, pelo prestimoso auxílio na aquisição de membranas amnióticas humanas.

Ao professor Joaquim Mansano Garcia por ceder seu laboratório para a realização do cultivo celular.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro (Proc. 2013/01494-7) e pela bolsa de estudos (Proc. 2013/25533-1) concedidos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio (Proc. 467289/2014-0) concedido.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DO CEUA – COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO HOSPITAL SÃO PAULO	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Processamento de membrana amniótica humana.....	11
3.2 Animais, considerações quanto à ética, coleta de limbo	13
3.3 Cultivo celular	14
3.4 Confecção de cortes histológicos.....	16
3.5 Grupos da pesquisa.....	17
3.6 Anisotropias ópticas, organizações supramoleculares	17
3.6.1 Parâmetros birrefringentes, fibras colágenas.....	18
3.6.2 Parâmetros dicroicos, proteoglicanos.....	20
3.7 Estatística.....	21
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Cultivo celular	21
4.2 Parâmetros birrefringentes, fibras colágenas.....	23
4.2.1 Matriz extracelular amniótica.....	23
4.2.2 Matriz extracelular límbica.....	26
4.3 Parâmetros dicroicos, proteoglicanos.....	29
4.3.1 Matriz extracelular amniótica.....	29
4.3.2 Matriz extracelular límbica.....	32
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÕES.....	45

7 REFERENCIAS.....	46
APÊNDICE	60
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	61



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

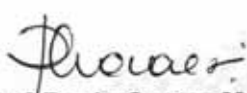


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 05430/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Regulação microambiental de células epiteliais límbicas corneais expandidas sobre membrana amniótica desepitelizada: Ênfase na organização supramolecular dos maiores biopolímeros extracelulares"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de abril de 2014.

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comissão de Ética Médica
Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo

São Paulo, 07 de maio de 1998

Ilmo. Sr.

JOSÉ ALVARO PEREIRA GOMES

Disciplina de Oftalmologia
Departamento de Oftalmologia da UNIFESP

A Comissão de Ética Médica do Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo analisou e aprovou o protocolo de pesquisa nº 227/98, intitulado
membrana amniótica na reconstrução da superfície ocular

Atenciosamente,

Prof. Dr. Mauricio M. A. Alchorne
Presidente da Comissão de Ética Médica do
Hospital São Paulo / Universidade Federal de São Paulo

cc./ Prof. Dr. Rubens Belfort Jr
Chefe do Depto. de Oftalmologia da UNIFESP

Rua Pedro de Toledo, 947 - CEP 04039-032 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 576.4368 - FAX (011) 549.2127

LISTA DE ABREVIATURAS

AM - amniotic membrane

APA - absorção paralela ao azimute do vetor elétrico

APE - absorção perpendicular ao azimute do vetor elétrico

CTs - células tronco

DL - dicroísmo linear

DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco

EDTA - ácido etileno-diamino-tetra-acético

ECM - extracelular matrix

EP - erro padrão

EGF - fator de crescimento epidérmico

FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

GA - valores médios dos níveis de cinza

GAm_{ax} - valores máximos do cinza médio

GAm_{in} - valores mínimos do cinza médio

ID - índice dicroico

LD - linear dichroism

MA(s) - membrana(s) amniótica(s)

MEC - matriz extracelular

RO - retardo óptico

SD_{td} - desvio padrão dos valores médios dos níveis de cinza

TGF-beta - fator transformador de crescimento beta

UNESP - Universidade Estadual de São Paulo

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1. Classificação dos colágenos das matrizes extracelulares dos tecidos conjuntivos de vertebrados, segundo Michellaci, 2003.....	5
Tabela 1. Parâmetros de análise de imagem relacionados às intensidades dos brilhos das birrefringências das fibras colágenas amnióticas, após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	23
Tabela 2. Proporção de fibras verdes, amarelas e vermelhas, em amostras coradas com Ponceau SS e visibilizadas com luz polarizada policromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	25
Tabela 3. Parâmetros de análise de imagem relacionados às intensidades dos brilhos das birrefringências das fibras colágenas límbicas, após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	26
Tabela 4. Proporção de fibras verdes, amarelas e vermelhas, em amostras coradas com Ponceau SS e visibilizadas com luz polarizada policromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.	28
Tabela 5. Parâmetros de análise de imagem da matriz extracelular amniótica, após coloração com azul de toluidina e visibilização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.	29
Tabela 6. Valores de dicroísmo linear e de índice dicroico calculados nos pontos de absorbância máxima estabelecidos para os grupos de I a IV. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	31

Tabela 7. Parâmetros de análise de imagem da matriz extracelular límbica, após coloração com azul de toluidina e visualização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2014.	32
Tabela 8. Valores de dicroísmo linear e de índice dicroico calculados nos pontos de absorbância máxima estabelecidos para os grupos de II a V. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática do arranjo microestrutural da membrana amniótica, como descrito por Bourne, em 1962.....	2
Figura 2. Esquematização das vias de regulação e de controle envolvidas na realimentação das supraorganizações de matriz extracelular, como proposto por Vidal, em 1994.....	7
Figura 3. Esquema ilustrando a orientação da membrana amniótica (MA) sobre o filtro de nitrocelulose. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	12
Figura 4. Membrana amniótica fixada dentro de um “insert” para cultivo celular. A seta (←) aponta para o explante límbico. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	15
Figura 5. Representação esquemática dos grupos que compuseram a pesquisa. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	17
Figura 6. Representação esquemática das áreas estromais amnióticas e límbicas, dos grupos de II a IV, cuja matriz extracelular foi examinada, relativamente aos parâmetros de anisotropia óptica que informam sobre a organização supramolecular dos colágenos fibrilares e dos proteoglicanos. Figura adaptada de Li et al., 2007.....	18
Figura 7. Imagem fotográfica de cultura celular observada à microscopia de luz invertida, em aumento de ×100. A parte escura no campo esquerdo corresponde ao explante de limbo. A seta (←) aponta para células epiteliais límbicas corneais globulares, não aderidas, em processo de migração, em cultura de dois dias. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	22
Figura 8. Imagem fotográfica de cultura celular observada à microscopia de luz invertida, em aumento de ×100. A parte escura no campo esquerdo corresponde ao explante de limbo. Os asteriscos (*) delimitam a área de crescimento, contendo células epiteliais límbicas corneais poliédricas. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....	22

- Figura 9. Gráficos de topografia de superfície construídos para representar a variabilidade dos valores de “bitmap” que compuseram as áreas birrefringentes analisadas nos estromas amnióticos. Em **A**, grupo controle. Em **B**, amostra cultivada por dois dias. Em **C**, amostra cultivada por sete dias. Em **D**, amostra cultivada por 15 dias. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015..... 24
- Figura 10. Imagem fotográfica das cores de interferência observadas no estroma amniótico de amostra do grupo IV, após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz polarizada policromática. Au: $\times 100$. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015..... 25
- Figura 11. Gráficos de topografia de superfície construídos para representar a variabilidade dos valores de “bitmap” que compuseram as áreas birrefringentes analisadas nos estroma límbicos. Em **A**, grupo controle. Em **B**, amostra cultivada por dois dias. Em **C**, amostra cultivada por sete dias. Em **D**, amostra cultivada por 15 dias. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015..... 27
- Figura 12. Imagem fotográfica das cores de interferência observadas no estroma límbico de amostra do grupo V, após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz polarizada policromática. Au: $\times 200$. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015..... 28
- Figura 13. Curvas de absorção espectral construídas com valores médios de APA plotados em função dos diferentes comprimentos de onda do fóton. APA, absorção paralela ao azimute do vetor elétrico.. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015..... 30
- Figura 14. Curvas de absorção espectral construídas com valores médios de APE plotados em função de diferentes comprimentos de onda do fóton. APE, absorção perpendicular ao azimute do vetor elétrico. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015..... 31
- Figura 15. Curvas de absorção espectral construídas com valores médios de APA plotados em função dos diferentes comprimentos de onda do fóton. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015..... 33

Figura 16. Curvas de absorção espectral construída com valores médios de APE plotados em função dos diferentes comprimentos de onda do fóton. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.....

**REGULAÇÃO MICROAMBIENTAL DE CÉLULAS EPITELIAIS LÍMBICAS
CORNEAIS DE COELHO EXPANDIDAS SOBRE MEMBRANA AMNIÓTICA
HUMANA DESEPITELIZADA: ÊNFASE PARA A ORGANIZAÇÃO
SUPRAMOLECULAR DOS MAIORES BIOPOLÍMEROS EXTRACELULARES**

RESUMO – Por objetivos, estudaram-se procedimentos em cultivo celular e se eles alteram a supraorganização da matriz extracelular (MEC) amniótica e da límbica, considerando-se propriedades anisotrópicas dos biopolímeros em comum, isto é, colágenos fibrilares e proteoglicanos. Explantes límbicos de coelhos foram cultivados sobre fragmentos de membrana amniótica (MA) desepitelizada humana, por dois, sete e 15 dias. Fragmentos não cultivados de MA e de limbo foram usados como controles. Avaliaram-se parâmetros de birrefringência em fibras colágenas e de absorção e de dicroísmo linear (LD) em proteoglicanos, da MEC amniótica e da límbica. Todas as análises foram conduzidas em microscópio óptico munido de luz polarizada, filtros monocromadores com diferentes comprimentos de onda e vídeo-câmera. Empregaram-se procedimentos em análise digital de imagens (software Image J®, NIH, USA). Parâmetros de birrefringência revelaram que os graus de paralelismo das fibras colágenas amnióticas foram de 1,02 nos controles, 1,17 nas amostras cultivadas por dois dias, 1,26 nas amostras cultivadas por sete dias e de 1,17 nas amostras cultivadas por 15 dias. Relativamente às fibras límbicas, foram de 1,33, 1,17, 1,25 e 1,44. Os contrastes dos brilhos das birrefringências das fibras amnióticas foram de 2,0 nos controles, 13,25 nas amostras cultivadas por dois dias, 19,26 nas amostras cultivadas por sete dias e de 13,23 nas amostras cultivadas por 15 dias. Relativamente às fibras límbicas, foram de 23,01, 13,39, 19,90 e 30,31. Cores de interferência causadas por dispersão anômala de birrefringência foram detectadas. Procedimentos em cultivo celular alteraram parâmetros absorciométricos relacionados à supraorganização dos proteoglicanos da MEC amniótica e da límbica. As MAs de todas as amostras, exceto as cultivadas por 15 dias, apresentaram-se com valores negativos de DL. Os valores de DL dos limbos de todas as amostras, exceto as cultivadas por dois dias, oscilaram entre números negativos e positivos.

Palavras-chave: birrefringência, colágenos, dicroísmo, matriz extracelular, proteoglicanos, superfície ocular.

**MICROENVIRONMENTAL REGULATION OF RABBIT CORNEAL LIMBAL
EPITHELIAL CELLS CULTURED ON HUMAN DENUDED AMNIOTIC
MEMBRANE: EMPHASIS TO THE SUPRAMOLECULAR ORGANIZATION OF THE
MAJOR EXTRACELLULAR BIOPOLYMERS**

ABSTRACT – The goal of this study was to evaluate whether procedures on cell culture alter the supraorganization of amniotic and limbal extracellular matrix (ECM). Anisotropic properties of fibrillar collagen and proteoglycans were studied, since they correspond to major extracellular biopolymers. Rabbit limbal explants were cultured on denuded human amniotic membrane (AM) for two, seven, and 15 days. Uncultured AM and limbus were used as controls. Birefringence parameters related to the supraorganization of collagen fibers, and spectral absorption and linear dichroism (LD) related to the supraorganization of proteoglycans were evaluated. All samples were evaluated on microscope equipped with polarized light, monochromatic filters with varying wavelengths, and digital video camera. Birefringence, absorbances and LD were quantified by using image analyses software (Image J®, NIH, USA). Studies on birefringence showed that parallelism degrees of amniotic collagen fibers were of 1.02 for the control group, 1.17 for the two days culture, 1.26 for the seven days culture, and 1.17 for the 15 days culture. In relation to limbal collagen fibers, parallelism degrees were of 1.33, 1.17, 1.25, and 1.44. Birefringence brightness contrasts of amniotic collagen fibers were of 2.0 for the control group, 13.25 for the two days culture, 19.26 for the seven days culture, and 13.23 for the 15 days culture. In relation to limbal collagen fibers, birefringence brightnesses were of 23.01, 13.39, 19.90, and 30.31. Interference colors due to anomalous birefringence dispersion were observed. Procedures on cell culture induced alterations in absorbance values related to proteoglycans from amniotic and limbal ECM. In all samples, except on those cultured for 15 days, the amniotic ECM showed negative DL values. The DL of limbal ECM varied between negative and positive values for all, except on two days culture.

Keywords: birefringence, collagens, dichroism, extracellular matrix, ocular surface, proteoglycans.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O limbo corneoescleral é revestido por um epitélio estratificado que abriga células tronco (CTs) oligopotentes destinadas à manutenção populacional do epitélio da córnea (SCHERMER; GALVIN; SUN, 1986, PELLEGRINI et al., 1999, DANIELS et al., 2001, LI et al., 2007, MARIAPPAN et al., 2014). Estima-se que as CTs representem cerca de 10% da população de células encontradas no epitélio límbico. Elas exibem particularidades morfofuncionais, como razão núcleo-citoplasma elevada, ciclo celular estrategicamente quiescente em G₀, divisão celular assimétrica e ausência de junções comunicantes na membrana plasmática (SCHLÖTZER-SCHREHARDT; KRUSE, 2005). As paliçadas de Vogt constituem o nicho primário das CTs epiteliais límbicas corneais (DUA; AZUARA-BLANCO, 2000, MIRI et al., 2012, OVADIA; NIE, 2013). Estruturas secundárias, possivelmente relacionadas ao nicho das CTs, têm sido identificadas, incluindo-se as criptas epiteliais límbicas (DUA et al., 2005) e as projeções focais estromais (SHORTT et al., 2007, OVADIA; NIE, 2013).

Enfermidades da superfície ocular e do filme lacrimal podem alterar ou destruir o microambiente do limbo, causando perda total ou parcial das CTs (KENYON; TSENG, 1989, PUANGSRICHAREN; TSENG, 1995, LI et al., 2007, DUA et al., 2009, BAYLIS et al., 2011). O epitélio corneal perde a estabilidade fenotípica e se torna propenso à invasão por células epiteliais da conjuntiva (TSAI; SUN; TSENG, 1990, KIM; TSENG, 1995, PUANGSRICHAREN; TSENG, 1995, DANIELS et al., 2001, DUA; JOSEPH; SHANMUGANATHAN, 2003, DUA et al., 2009, BAYLIS et al., 2011). A conjuntivalização secundária à depleção de CTs límbicas está acompanhada por graus variáveis de reparação estromal, neovascularização, inflamação e opacidade corneais, que ensejam fotofobia e diminuição ou perda da visão em casos mais graves (DUA et al., 2009, BAYLIS et al., 2011). Estima-se que 65% dos casos de conjuntivalização, em seres humanos, apresentem-se como lesões difusas associadas à perda total de CTs límbicas (BAYLIS et al., 2011). Em animais domésticos, todavia, não há estatísticas quanto à incidência ou à prevalência da deficiência límbica ou da conjuntivalização.

O tratamento da deficiência límbica total e de suas manifestações é oneroso, apoia-se na reposição das células perdidas e representa problema socioeconômico significativo para os países menos desenvolvidos. Aproximadamente 28% dos casos tratados com terapias convencionais, incluindo o transplante de limbo, evoluem para falência terapêutica e recidiva da doença (BAYLIS et al., 2011). O transplante de córnea não constitui opção terapêutica. Pesquisadores em ciências da visão e oftalmologistas depositam perspectivas de cura, livre de complicações tardias, no aprimoramento da terapia límbica descrita por Pellegrini et al., em 1997. Balizada em princípios de bioengenharia, ela consiste no cultivo de população total de células epiteliais límbicas corneais (ou seja, as células progenitoras e as diferenciadas), em explante ou em suspensão, sobre membrana biológica ou substrato sintético (PELLEGRINI et al., 1997).

A membrana amniótica (MA) constitui o substrato de cultivo celular mais empregado na terapia límbica. Ela é composta por cinco camadas: epitélio, em contato direto com o líquido amniótico; membrana basal; camada compacta; camada fibroblástica; e camada esponjosa (Figura 1) (BOURNE, 1962, DUA et al., 1999). A membrana basal é espessa, contém colágeno tipo IV e laminina. As demais camadas, abaixo da membrana basal, compõem a matriz extracelular (MEC) estromal avascular (DUA et al., 1999, HEINZ et al., 2004, MALHOTRA; JAIN, 2014).

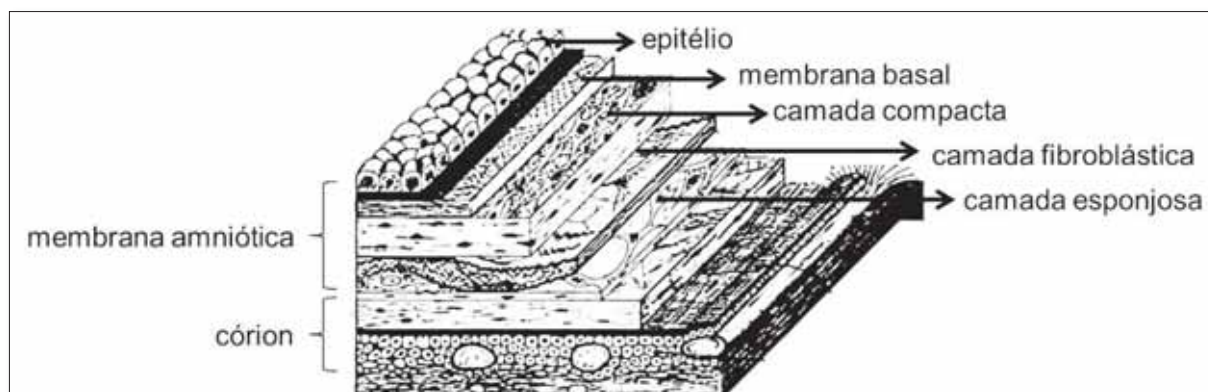


Figura 1. Representação esquemática do arranjo microestrutural da membrana amniótica, como descrito por Bourne, em 1962.

A utilização da MA, em oftalmologia médica, iniciou-se com De Roth (1940 *apud* Kim e Tseng, 1995), no tratamento do simbléfaro e de outros defeitos conjuntivais. Na ocasião, o autor não separou a MA do córion. Em 1995, Kim e

Tseng separaram a MA humana do córion e a empregaram em modelo experimental de deficiência límbica total em coelhos, relatando bons resultados em 77% dos casos, com melhora na transparência corneal e redução da neovascularização. Desde então, a MA tornou-se adjunto importante na cirurgia reconstrutiva da superfície ocular humana, notadamente nos defeitos corneais persistentes ou nos recorrentes, nas perfurações corneais, nos defeitos conjuntivais, no pterígio e para certos tipos de tumor. Ela também é empregada em casos de olho seco, em bolhas filtrantes com vazamentos e em disfunções palpebrais (AZUARA-BLANCO; PILAI; DUA, 1999, GOMES et al., 1999, PRABHASAWAT; TESAIVIBUL; KOMOLSURADEJ, 2001; HIGA et al., 2007). Em veterinária, a MA é utilizada na ceratoplastia (BARROS et al., 1998), no simbléfaro, em certos tumores esclerais e corneais (BARROS et al., 2005), no tratamento de úlceras corneais (PONTES et al., 2008), na deficiência límbica (CREMONINI et al., 2007), nas queimaduras químicas e no sequestro corneal felino (PONTES et al., 2010, BARACHETTI; GIUDICE; MORTELLARO, 2010). Os efeitos da MA sobre a reparação corneal, aparentemente, decorrem de suas propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (KIM; TSENG, 1995, TSUBOTA et al., 1995, TSENG et al., 1998, SHIMAZAKI; SHINOZAKI; TSUBOTA, 1998, AZUARA-BLANCO; PILLAI; DUA, 1999, SAMPAIO; RANZANI; RODRIGUES JUNIOR, 2006, MALHOTRA; JAIN, 2014). Ela pode ser usada como enxerto (técnica do embutimento) ou como ponte para a migração de células remanescentes da córnea (técnica da sobreposição). Pode, ainda, ser recrutada como bandagem para proteção de tecidos transplantados à córnea ou como carreadora de CTs (DUA et al., 2009).

As aplicações clínicas de constructos formados por MA e CTs epiteliais límbicas corneais iniciaram-se em 1999, após publicação de Schwab. MAs e CTs podem advir da mesma espécie ou de espécies diferentes; neste caso, originando xenoenxertos, cuja viabilidade já foi comprovada (BAYLIS et al., 2011, RENDAL-VÁZQUEZ et al., 2012). Evidências sobre o potencial terapêutico das CTs foram geradas por pesquisas em que se utilizaram xenoenxertos de MA humana e células epiteliais límbicas de coelhos (RENDAL-VÁZQUEZ et al., 2012). A MA humana não expressa antígenos da classe maior de histocompatibilidade (HLA, HLB, HLC, DR) ou beta-2-microglobulinas, favorecendo sua utilização, pois diminui as chances de rejeição quando utilizada como enxerto (KUBO et al., 2001). Dificuldades, todavia, se

interpõem quanto à sua obtenção. O material deve ser colhido no curso de operação cesariana, em gestante com sorologia negativa para HIV, HPV, hepatites e sífilis, após assinatura espontânea de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (GOMES et al., 1999).

Os protocolos de preparação da MA humana, para uso em cultivo celular, podem envolver agentes químicos ou enzimáticos, visando à remoção de seu epitélio. Dentre os agentes químicos já utilizados, melhores resultados foram percebidos com o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (GRUETERICH; ESPANA; TSENG, 2002). Koizumi e colaboradores (2007), ao compararem as características de células epiteliais crescidas sobre MAs íntegras ou desepitelizadas, observaram que culturas provenientes de MAs desepitelizadas apresentavam-se mais diferenciadas, estratificadas e ricas em estruturas de adesão. A MA humana desepitelizada parece atuar como nicho biológico substituto, que modula o comportamento das CTs epiteliais límbicas corneais, em cultura (LI et al., 2007, OVADIA; NIE, 2013). A integridade das CTs, bem como seu recrutamento para a via de diferenciação, são parcialmente moduladas pelo microambiente extracelular (DANIELS et al., 2001, LI et al., 2007, OVADIA; NIE, 2013).

Ensaio bioquímicos e imunoquímicos têm sido conduzidos na tentativa de se identificarem os componentes moleculares da MA desepitelizada e do estroma límbico, estabelecendo a função de cada um deles no complexo programa de regulação microambiental, pelo qual as CTs epiteliais retêm ou não suas características indiferenciadas (LI et al., 2007, OVADIA; NIE, 2013, PELLEGRINI; DE LUCA, 2014). Células nocauteadas para a expressão de genes, como o PAX-6 e o DKK2, que governam o desenvolvimento pré e pós-natal das estruturas oculares, têm sido empregadas em pesquisas (COLLINSON; CHANAS; WEST, 2004, MUKHOPADHYAY et al., 2006). Ênfase tem sido dada para as vias de sinalização bioquímica, que envolvem a participação de moléculas extracelulares solúveis, na estabilidade do epitélio corneal (LI et al., 2007, OVADIA; NIE, 2013, PELLEGRINI; DE LUCA, 2014). As vias biofísicas de regulação microambiental, que dependem, entre outros fatores, da organização supramolecular dos biopolímeros da MEC amniótica e da límbica têm sido muito pouco estudadas.

Os colágenos fibrilares e os proteoglicanos representam 90% dos biopolímeros da MEC amniótica (na camada compacta) e da límbica (COOPER et

al., 2005, MEI; GONZALES; DENG, 2012, CHEN; MIENALTOWSKI; BIRK, 2015). Eles podem atuar como agentes promotores de adesão e de diferenciação celulares, como quimiotáticos para macrófagos e fibroblastos, e como antígenos em processos envolvendo o sistema imune (HAY, 1991). Já foram descritos 28 tipos de colágenos (Quadro 1), cujas diferenças residem na composição de aminoácidos, nos domínios moleculares e nos arranjos supramoleculares (van der REST; GARRONE, 1991, MICHELACCI, 2003, GUIDO, 2006, BLUM, 2011). Proteoglicanos são glicoconjugados macromoleculares que contêm um core proteico covalentemente ligado a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (poliânions) (CHEN; MIENALTOWSKI; BIRK, 2015). Eles são versáteis e podem apresentar, em sua estrutura, oligossacarídeos dos tipos N- ou O-ligados (SWEET et al., 1977, LOHMANDER et al., 1980). Dividem-se em duas classes: os grandes proteoglicanos, representados pelo agregam e o versicam, e os pequenos proteoglicanos, donde se destacam o biglicam, decorim, o epificam, o lumicam, o mimecam, o queratocam e a osteoglicina (KUC; SCOTT, 1997, CHAKRAVARTI et. al., 1998, IOZZO; SCHAEFER, 2015).

Quadro 1. Classificação dos colágenos das matrizes extracelulares dos tecidos conjuntivos de vertebrados, segundo Guido, 2006.

Tipos de colágenos	Organização estrutural
I, II, III, V e XI	Colágenos fibrilares
IX, XII, XIV, XVI e XIX	Colágenos associados às fibrilas (FACIT)
VIII e X	Colágenos não fibrilares de cadeia curta
IV	Colágeno de membrana basal
VII	Colágeno de ancoragem
VI	Colágeno microfibrilar
XIII, XV, XVII, XVIII, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII e XXVIII	Outros colágenos

O termo organização supramolecular, ou supraorganização, refere-se à interação e ao arranjo macromolecular tridimensional que confere qualidades macroscópicas e biomecânicas a um tecido ou estrutura (SCOOT, 1995, RIFES; THORSTEINSDÓTTIR, 2012, MATTIA; OTTO, 2015). A MEC supraorganizada não é estática ou inerte. Trata-se de cristal líquido fisiologicamente ativo, cuja

homeostasia ou remodelação é governada por transições de fase e fenômenos de automontagem molecular (HAY, 1991, LEHN, 2002, GIRAUD GUILLE et al., 2005, KIRKWOOD, 2008, ACTON, 2013). A automontagem constitui a força motriz pela qual as supraorganizações de MEC são realimentadas (MARTIN-BERMUDO; BROWN, 2010, ACTON, 2013). O processo é factível porque as ligações covalentes, as eletrostáticas e as forças de van der Waals que conectam os biopolímeros extracelulares são lábeis e reversíveis (MARTIN-BERMUDO; BROWN, 2000, LEHN, 2002, MATTIA; OTTO, 2015).

As supraestruturas de MEC são hábeis para responder, com adaptação, flexibilidade ou remodelação (positiva ou negativa), a uma série de eventos ou intervenções, como massagens, “lasers”, cirurgias, implantação de “stents”, enxertias, atividades enzimáticas, fármacos, demandas ou desordens fisiológicas, patógenos, estímulos mecânicos ou elétricos e interação com diferentes tipos celulares (SELLARO, 1999, GRIM et al., 2003, SILVA et al., 2006, ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007, ALDROVANI; VIDAL, 2007, GÖTZINGER et al., 2007, SHARMA et al., 2007, RETAMOSO et al., 2009, SAHU et al., 2010, SILVA et al., 2013, FREEDMAN et al., 2014, AROKIARAJ; PALACIOS, 2014). As especialidades cirúrgicas têm se beneficiado das pesquisas em supraorganizações. Parâmetros supraorganizacionais da MEC dérmica, por exemplo, são empregados em cirurgias plásticas e reconstrutivas, visando-se a estabelecerem orientações preferenciais de incisões e a se minimizar a formação de feridas, de cicatrizes hipertróficas e de queloides (LISTER; WRIGHT; CHAPPEL, 2012, VERAEGEN et al., 2012, RIBEIRO et al., 2013). O diagnóstico do ceratocone fundamenta-se na detecção de alterações supramoleculares por tomografia de coerência óptica sensível à polarização (GÖTZINGER et al., 2007). Em “osteogenesis imperfecta”, o padrão de desarranjo supramolecular, detectado por sistemas de luz polarizada, juntamente com estudos em genética, fornece diagnóstico diferencial dos tipos clínicos possíveis (GLORIEUX et al., 2008).

Dois mecanismos cibernéticos de regulação espaço-temporal realimentam as supraorganizações de MEC resultantes de automontagem molecular (Figura 2). O primeiro depende das interações dos componentes da MEC com os receptores de superfície celular. O segundo depende da ordem molecular resultante do próprio fenômeno de automontagem, o qual gera sinalização para as células por

deslocamentos intra e intermoleculares e por piezo-piroeletricidade. O estímulo microambiental é sentido pelos setores de síntese e de exportação da célula que, por conseguinte, aumenta ou diminui a produção de macromoléculas para a MEC (VIDAL, 1994).

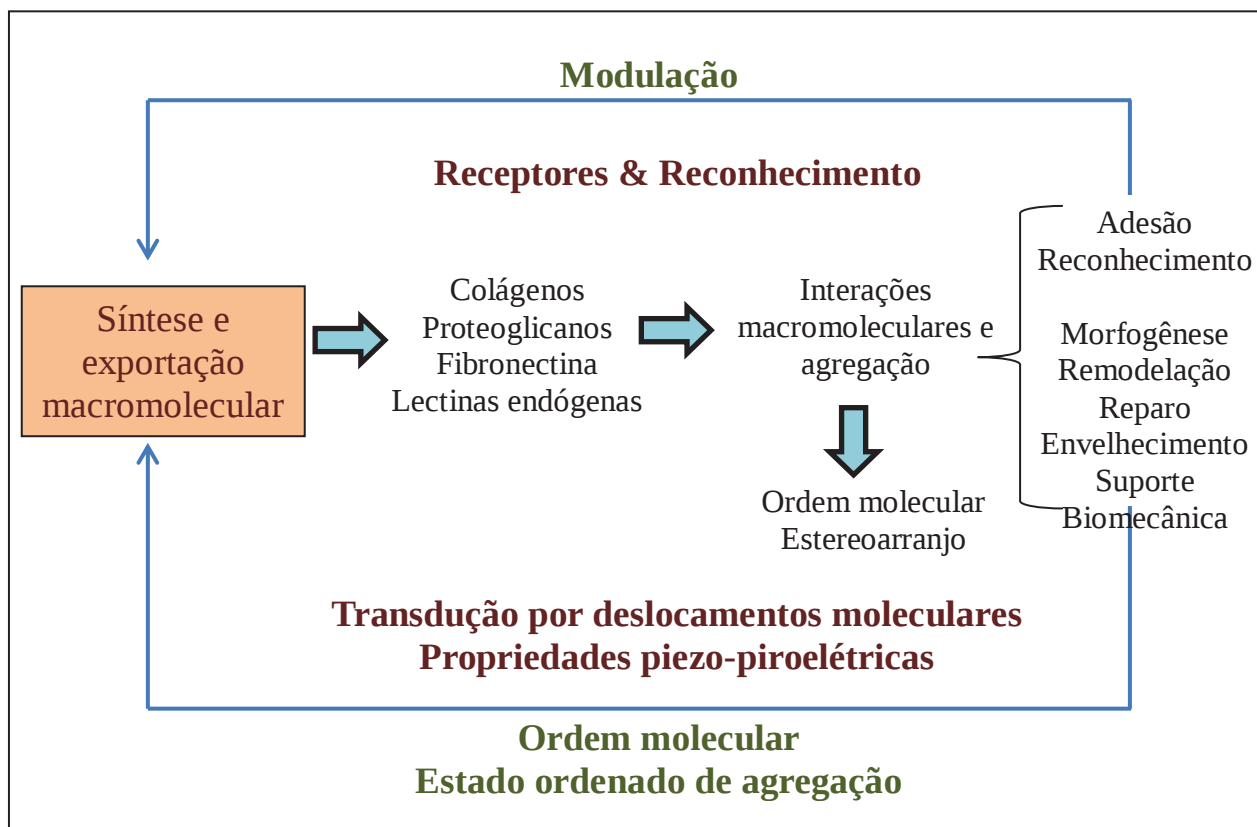


Figura 2. Esquematização das vias de regulação e de controle envolvidas na realimentação das supraorganizações de matriz extracelular, como proposto por Vidal, em 1994.

Há um “loop” regulatório entre as células epiteliais límbicas corneais e a MEC supraorganizada do nicho biológico “in vivo” ou do substrato “ex vivo”. As primeiras evidências foram reportadas por HAY (1991), cujo trabalho inspirou, no final da década de 1990, o desenvolvimento da primeira “córnea humana de bioengenharia”, construída com MEC e células epiteliais imortalizadas (GRIFFITH et al., 1999). Em 2003, Espana e colaboradores observaram que CTs epiteliais expostas à MEC corneal tendiam à diferenciação e à morte, enquanto que sob influência da MEC estromal límbica, preservavam características de indiferenciação.

Estudo publicado na “Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America” mostrou que células epiteliais da glândula mamária,

quando cultivadas sobre substratos de MEC, reorganizavam seus sítios de adesão focal (TSENG et al., 2012). As adesões focais atuam como sensores de alterações mecânicas e como centros de transdução de sinais. Aparentemente, as células migram buscando reduzir o estresse anisotrópico ao seu redor (TSENG et al., 2012). CTs de diferentes linhagens, em cultura, podem se diferenciar em osteoblastos, em condroblastos ou em células musculares, unicamente em função das propriedades físicas geradas pela supraorganização do substrato, na ausência de fatores de crescimento (ROY, 2010, HAO et al., 2015, HUANG; DAI; ZHANG, 2015, TAN et al., 2015). A supraorganização de “per se” estabelece sítios de interação célula-MEC.

A supraorganização de MEC confere, aos tecidos e estruturas, propriedades físicas que modulam o comportamento celular. Destacam-se a geometria, a topografia, a orientação espacial, a rigidez, a elasticidade e a força mecânica (BURRIDGE; CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996, HAO et al., 2015, LV et al., 2015). Supraorganizações de MEC, em décadas passadas, eram avaliadas à microscopia eletrônica, que informa sobre a ultraestrutura, porém falha em fornecer dados estatísticos. Admite-se, como ideal, que a avaliação seja realizada com ferramentas de nanotecnologia, uma vez que cada biopolímero da MEC supraorganizada pertence à escala nanométrica de comprimento (SCHILLER; HUSTER, 2012, CHEN; TAN; TIEN, 2015). Fenômenos que ocorrem em nanoescala, incluindo-se as anisotropias ópticas, estão sendo explorados na interface entre biologia e ciência de materiais. Com os adventos da nanobiotecnologia e da nanomedicina, as organizações supramoleculares têm sido consideradas os níveis estruturais ou hierárquicos plenos, que pesquisadores necessitam dominar para criar membranas, tecidos e órgãos artificiais (LEHN, 2002, PALMER et al., 2007, WEBBER; KESSLER; STUPP, 2010).

As anisotropias ópticas resultam de elementos periodicamente ordenados aos níveis atômico e molecular (BENNET, 1967, CASSIM; TOBIAS; TAYLOR, 1968, KIM et al., 2000, SAVENKOY; SYDUROK, 2005, SILVA et al., 2006, VIDAL; MELLO, 2006, ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007, JACQUES, 2013, RIBEIRO et al., 2013). Elas correspondem aos fenômenos observados em estruturas cristalinas e refletem as propriedades físicas macro e microscópicas da matéria. A incidência de ondas eletromagnéticas polarizadas sobre estruturas anisotrópicas acarreta mudanças na fase ou na amplitude dos componentes ortogonais do vetor elétrico, o

que se conhece, respectivamente, por birrefringência e dicroísmo linear (DL) (WIED, 1966, BENNET, 1967, CASSIM; TOBIAS; TAYLOR, 1968, KIERMAN, 1990; KIM et al., 2000, LOUIS-DORR et al., 2004, SAVENKOY; SYDUROK, 2005, SILVA et al., 2006, ALDROVANI; VIDAL, 2007, VIDAL; MELLO, 2006, JACQUES, 2013). Estudos em birrefringência e em DL são factíveis empregando-se luz polarizada, corantes topo-ópticos, técnicas densitométricas e absorciométricas “in situ” e vídeo-análise digital de imagens (ALDROVANI; VIDAL, 2007, RIBEIRO et al., 2013).

A birrefringência é a anisotropia óptica que resulta da diferença de índices de refração do material, acarretando propagação de luz com velocidades e direções diferentes (WIED, 1966, BENNET, 1967, 1990; KIM et al., 2000, SILVA et al., 2006, ALDROVANI; VIDAL, 2007, VIDAL; MELLO, 2008). Ela se expressa pela equação $\Delta_{nD} = n_y - n_x$, onde n_y é o índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário e n_x é o índice de refração na direção do raio ordinário. Informa sobre a supraorganização dos colágenos fibrilares e é constituída por duas frações: a intrínseca e a de forma (WIED, 1966, BENNET, 1967, 1990; KIM et al., 2000, SILVA et al., 2006, ALDROVANI; VIDAL, 2007, VIDAL; MELLO, 2008, RIBEIRO et al., 2013). A birrefringência intrínseca se deve às transições eletrônicas ($\pi-\pi^*$) nas ligações peptídicas planares situadas ao longo do eixo das fibras. O retardo óptico (RO) associado a ela pode ser representado pela fórmula $RO = S \cdot e^2 / 2 \epsilon_0 m \omega_0^2$, onde S é o número de ligações peptídicas por centímetro quadrado; e corresponde à carga do elétron; m corresponde à massa do elétron; ϵ_0 é a permissividade do espaço (constante dielétrica); e ω_0 é a frequência de ressonância do elétron (BENNET, 1967, 1990, SILVA et al., 2006, ALDROVANI; VIDAL, 2007, VIDAL; MELLO, 2008, RIBEIRO et al., 2013). A birrefringência de forma ocorre em meios dielétricos heterogêneos. Na MEC, ela resulta da compatibilidade dos comprimentos de onda do fóton com as dimensões nanométricas das moléculas de colágenos fibrilares (CASSIM; TOBIAS; TAYLOR, 1968, KIERMAN, 1990; KIM et al., 2000, SILVA et al., 2006, ALDROVANI; VIDAL, 2007, VIDAL; MELLO, 2008, RIBEIRO et al., 2013). Corantes azoicos, como o Ponceau SS, têm sido usados para se estudar birrefringência em fibras colágenas, uma vez que eles interagem ordenadamente com a molécula, alinhando seus elétrons ressonantes em paralelo com os do colágeno, e formando agregados altamente anisotrópicos e cristalinos (VIDAL; MELLO, 2005, ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007).

O DL é uma anisotropia de absorção, que se manifesta por mudanças na amplitude do vetor elétrico da luz polarizada (LOUIS-DORR et al., 2004, ALDROVANI; VIDAL, 2007; VIDAL; PIMENTEL, 2012). A absorção ocorre quando a onda eletromagnética não retorna a partir da superfície incidente nem se propaga no meio. Macromoléculas dicroicas absorvem luz polarizada diferentemente na dependência da direção de seus grupamentos cromofóricos em relação ao azimute do vetor elétrico (LOUIS-DORR et al., 2004, ALDROVANI; VIDAL, 2007). Há relação entre DL, transições eletrônicas e orientação molecular, em estruturas supraorganizadas. Modelos de interação entre proteoglicanos e colágenos, por exemplo, foram propostos a partir de estudos em DL (VIDAL; 1963, MATHEWS, 1965, JACKSON; BENTLEY, 1968, SCOTT, 1995, MÜLLER et al., 2004). A maioria das moléculas biológicas exibe DL em luz ultravioleta. Para estudos conduzidos no espectro visível da luz, corantes topo-ópticos, como os tiazínicos, são usados para promover o fenômeno extrinsecamente (ALDROVANI; VIDAL, 2007; APARECIDA de ARO; VIDAL; PIMENTEL, 2012). O azul de toluidina é o corante tiazínico mais usado para se estudar DL e disponibilidade de poliânions de proteoglicanos (ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007, SCHIMITZ et al., 2010). Trata-se de molécula privilegiada para estudos em organização supramolecular, pois é pequena, apresenta geometria planar e elétrons ressonando ao longo de seu eixo (VIDAL; 1964, MELLO; VIDAL, 1973).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Organizações supramoleculares contêm requerimentos morfofuncionais, em nanoescala, úteis para a bioengenharia de tecidos (PALMER et al., 2007). Dada à importância da MEC amniótica e da límbica, notadamente na modulação de CTs e para o tratamento de afecções da superfície ocular, há interesse em se ampliarem conhecimentos sobre os arranjos de seus principais biopolímeros. Admite-se que rearranjos espaço-temporais dos componentes da MEC supraorganizada constituem mecanismos de regulação microambiental, pelo qual comportamentos celulares são modulados. Ademais, com os avanços da ciência de materiais, aplicada à oftalmologia, a perspectiva de se explorar uma supraorganização para, posteriormente, reproduzi-la

em laboratório, e de se criarem tecidos oculares artificiais, passou da ficção para a realidade. O futuro da medicina regenerativa é supramolecular (BOEKHOVEN; STUPP, 2014).

Com a pesquisa, estudaram-se organizações supramoleculares da MEC amniótica e da límbica, antes e após cultivo celular, considerando-se propriedades anisotrópicas (ou seja, birrefringência e DL) dos principais biopolímeros em comum, isto é, colágenos fibrilares e proteoglicanos. Foi avaliado, no presente trabalho, se (e como) procedimentos em cultivo celular podem alterar a supraorganização da MEC amniótica e da límbica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Processamento de membrana amniótica humana

Empregou-se, na pesquisa, MA de uma única gestante, visando-se a eliminação de vieses associados com fatores (por exemplo, o nutricional) inerentes (HOPKINSON et al., 2006). A MA foi coletada no curso de operação cesariana em paciente assistida no Amparo Maternal do Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), após realização de exames sorológicos (para HIV, HPV, hepatites B e C e sífilis) e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Obedeceram-se aos princípios éticos enunciados na Declaração de Helsinki e na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os procedimentos, envolvendo MA, foram executados no Centro Avançado de Superfície Ocular (CASO) do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP, Câmpus de São Paulo, seguindo-se premissas impostas pela “United States Food and Drug Administration” e a “The American Association of Tissue Banking”. Vinte e quatro fragmentos de MA, medindo 2 cm x 2 cm, foram desepitelizados em EDTA¹ e por raspagem mecânica, para remoção de células epiteliais amnióticas

¹ Ácido etileno-diamino-tetra-acético - Sigma Company, St. Louis, USA

remanescentes. Todos os fragmentos de MA foram lavados em solução estéril de cloreto de sódio 0,9%² e distendidos, com a face epitelial voltada para cima, sobre filtros de nitrocelulose estéreis³ (Figura 3).

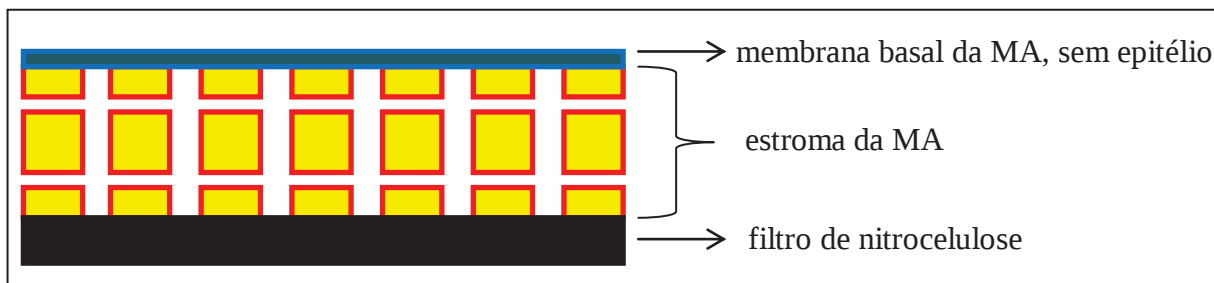


Figura 3. Esquema ilustrando a orientação da membrana amniótica (MA) sobre o filtro de nitrocelulose. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Os complexos membrana-filtro foram lavados em tampão fosfato⁴, pH 7,4, contendo 1000 UI/mL de penicilina G⁵, 20 mcg/mL de estreptomicina⁶ e 2,5 mcg/mL de anfotericina B⁷. O material foi acondicionado em frascos estéreis contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco⁸ (DMEM) e glicerina⁹ (1:1, v/v).

Imediatamente ao processamento, as membranas foram transportadas (em isopor contendo gelo seco) para o Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Elas foram criopreservadas, em biofreezer (-80°C), até o momento do uso. O tempo de criopreservação (12 dias) foi o mesmo para todos os fragmentos de MA.

² Cloreto de sódio 0,9% - Synth, São Paulo, Brasil

³ Filtros de nitrocelulose - Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁴ Tampão fosfato - Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁵ Penicilina G - Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁶ Estreptomicina - Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁷ Anfotericina B - Ophthalmos, São Paulo, Brasil

⁸ DMEM - Sigma Company, St. Louis, USA

⁹ Glicerina - Ecibra, São Paulo, Brasil

3.2 Animais, considerações quanto à ética, coleta de limbo

A pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob o número de protocolo 05430/14. Os princípios éticos estabelecidos pelo “Canadian Council on Animal Care” (“Principles of Laboratory Care, NIH publication no 85-23, revised 1996”) foram obedecidos. Utilizaram-se seis coelhos da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos ou fêmeas, hígidos. Os procedimentos, envolvendo coelhos, foram realizados no Centro Cirúrgico do Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

A anestesia dissociativa foi induzida e mantida pela associação de xilazina¹⁰ (5mg/kg) e cetamina¹¹ (20mg/kg), por via intramuscular. A tricotomia periorcular e a antisepsia cirúrgica, com solução de iodopovidona 0,1%, foram feitas com os animais posicionados em decúbito lateral esquerdo. A dessensibilização corneal foi efetuada com colírio de tetracaína contendo 0,1% de fenilefrina¹², imediatamente após isolamento do campo operatório com panos de campo estéreis e Tegaderm®¹³. O blefarostato¹⁴ foi colocado.

Com o auxílio de um microscópio cirúrgico, dois fragmentos de limbo corneoescleral foram removidos do olho direito de cada animal. Com um paquímetro, os tecidos foram mensurados (2 mm) e em seguida coletados das posições de 10 às 12h e de 4 às 6h com bisturi angulado de 15 graus¹⁵ e pinça colibri¹⁶. O endotélio e o estroma posterior (cerca de 2/3) dos limbos foram descartados. Na sequência, os fragmentos límbicos foram divididos em duas metades iguais, acomodados sobre filtros de nitrocelulose¹⁷ e acondicionados em tubos estéreis contendo DMEM¹⁸. Dezoito fragmentos de limbo destinaram-se ao cultivo celular. Os demais foram

¹⁰ Dopaser® - Hertape Calier, Madri, Espanha

¹¹ Ketamina agener 10%® - Agener União, São Paulo, Brasil

¹² Colírio anestésico® - Allergan, São Paulo, Brasil

¹³ Tegaderm™ film® - 3M, São Paulo, Brasil

¹⁴ Blefarostato barrequer® - Steel inox, São Paulo, Brasil

¹⁵ Slit knife 15 degrees® - Alcon, São Paulo, Brasil

¹⁶ Pinça colibri - Steel inox, São Paulo, Brasil

¹⁷ Filtros de nitrocelulose - Ophthalmos, SP, Brasil

¹⁸ DMEM, Sigma Company, St. Louis, USA

fixados em paraformaldeído¹⁹ 4% e destinaram-se a confecção de cortes histológicos.

Para a analgesia pós-operatória, empregou-se tramadol²⁰ na dose de 4 mg/kg, em intervalos regulares de 8h, por cinco dias consecutivos. Os coelhos não manifestaram alterações oftálmicas e foram encaminhados para utilização em outra pesquisa.

3.3 Cultivo celular

Os procedimentos foram executados no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Empregou-se protocolo de cultura em explante (SANGWAN et al., 2006).

Os fragmentos de MA foram fixados dentro de “inserts”²¹ posicionados em placas de seis poços, para não emergirem durante o cultivo. Previamente, eles foram removidos dos filtros de nitrocelulose¹⁷ e lavados em tampão fosfato⁴, pH 7,4, 0,01 M, para remoção dos traços de glicerina. Os explantes límbicos foram igualmente removidos dos filtros de nitrocelulose e acomodados sobre os fragmentos de MA (Figura 4), com o epitélio orientado para cima. Todo o material foi manipulado em capela de fluxo laminar²².

¹⁹ Paraformaldeído - Synth, São Paulo, Brasil

²⁰ Tramadol® - Cristália, São Paulo, Brasil

²¹ Corning netwells inserts® - Sigma Company, St. Louis, USA

²² Capela de fluxo laminar - Veco, São Paulo, Brasil



Figura 4. Imagem fotográfica da membrana amniótica fixada dentro de um “insert” para cultivo celular. A seta (←) aponta para o explante límbico. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

As condições (incubadora com 5% de CO₂ e temperatura constante de 37°C) e o meio de cultura foram os mesmos para todos: DMEM/HAM-F12²³ contendo 10% de soro fetal bovino²⁴, 0,5% de dimetilsulfóxido²⁵, 5 ng/mL de selenato de sódio²⁶, 5 ug/mL de apo-transferrina²⁷, 2 ng/mL de fator de crescimento epidermal²⁸, 0,1 µg/mL de toxina colérica²⁹, 1 µg/mL de insulina³⁰, 5 µg/mL de hidrocortisona³¹, penicilina³², estreptomicina³³ e anfotericina B³⁴ (LOUREIRO et al., 2013). As amostras foram cultivadas por dois, sete e 15 dias. Dois dias correspondem ao tempo necessário para adesão do explante ao substrato. Sete dias correspondem ao início da migração das células epiteliais do explante límbico em direção à membrana basal da MA. Quinze dias correspondem ao tempo médio de cultivo calculado de 28 estudos

²³ DMEM/HAM-F12 - Sigma Company, St. Louis, USA

²⁴ Soro fetal bovino - Sigma Company, St. Louis, USA

²⁵ Dimetilsulfóxido - Sigma Company, St. Louis, USA

²⁶ Selenato de sódio - Sigma Company, St. Louis, USA

²⁷ Apo-transferrina - Sigma Company, St. Louis, USA

²⁸ Fator de crescimento epidermal - Sigma Company, St. Louis, USA

²⁹ Toxina colérica - Sigma Company, St. Louis, USA

³⁰ Insulina - Sigma Company, St. Louis, USA

³¹ Hidrocortisona - Sigma Company, St. Louis, USA

³² Penicilina - Sigma Company, St. Louis, USA

³³ Estreptomicina - Sigma Company, St. Louis, USA

³⁴ Anfotericina B - Sigma Company, St. Louis, USA

revisados por Baylis et al. (2011). Todos os sistemas de cultivo foram estabelecidos ao mesmo tempo. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Cada amostra recebeu 2,5 mL de meio de cultura (por troca). As culturas foram monitoradas diariamente, em relação ao crescimento, migração e morfologia celulares, em microscopia de luz invertida³⁵.

As áreas de crescimento epitelial foram mensuradas, em “pixels”, no décimo quinto dia de cultivo, empregando-se “software”³⁶. Ao término dos procedimentos em cultivo celular, as amostras foram encaminhadas à confecção de cortes histológicos.

3.4 Confecção de cortes histológicos

Os cortes foram confeccionados no Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia Veterinária, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As amostras (cultivadas ou não) foram fixadas em paraformaldeído¹⁷ diluído a 4% em tampão fosfato³, pH 7,4, 0,01 M; desidratadas em soluções decrescentes de etanol³⁷; diafanizadas em xilol³⁸; e processadas para inclusão rotineira em Histosec®³⁹. Cortes longitudinais com sete micrômetros de espessura foram confeccionados para os estudos em anisotropias ópticas como recomendado pela literatura (ALDROVANI; VIDAL, 2007, RIBEIRO et al., 2013).

³⁵ Axio Observer - Zeiss, Göttingen, Germany

³⁶ Image J® - disponível em: <http://srbweb.nih.gov/ij/>

³⁷ Etanol - Synth, São Paulo, Brasil

³⁸ Xilol - Ecibra, São Paulo, Brasil

³⁹ Histosec® - Merck, Darmstadt, Germany

3.5 Grupos da pesquisa

Cinco grupos compuseram a pesquisa (Figura 5), cada um com seis amostras, a saber: grupo I, composto por fragmentos não cultivados de MA (controle); o grupo II, por amostras cultivadas durante dois dias; o grupo III, por amostras cultivadas durante sete dias; o grupo IV, por amostras cultivadas durante quinze dias; e o grupo V, composto por explantes não cultivados de limbo (controle).

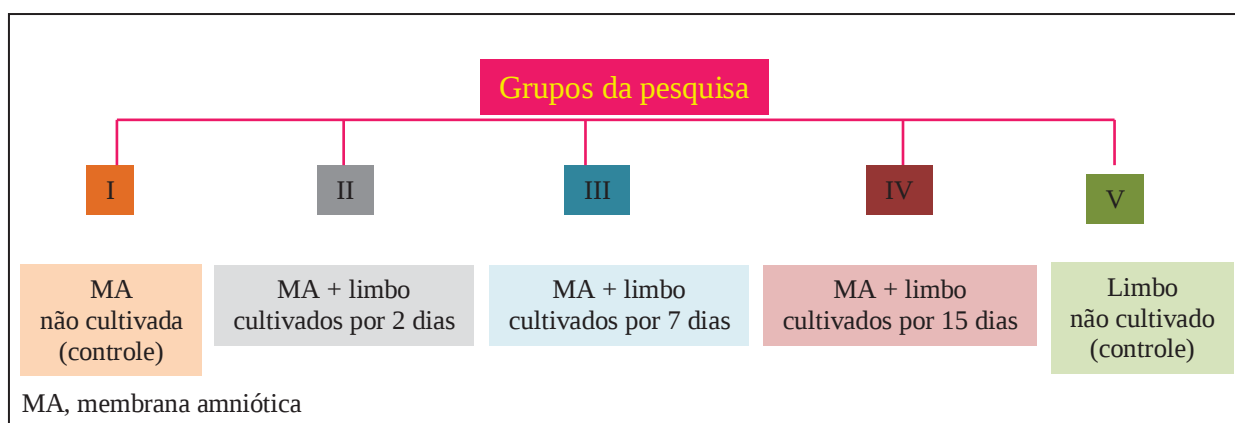


Figura 5. Representação esquemática dos grupos que compuseram a pesquisa. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

3.6 Anisotropias ópticas, organizações supramoleculares

Os estudos em anisotropias ópticas foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Empregaram-se dois cortes de cada amostra, nos quais se avaliaram seis campos (imagens) de microscopia. No total, 432 análises foram realizadas para cada grupo.

Relativamente às MAs, as avaliações foram conduzidas na MEC das áreas estromais subjacentes à membrana basal. Nos explantes de limbo, examinaram-se áreas dos estromas superficial e profundo. A escolha dos campos de avaliação foi randômica para os grupos I e V (controles). Nos grupos de II a IV, as análises

ficaram confinadas às regiões que apoiavam o explante límbico e as células epiteliais que dele migraram (Figura 6).

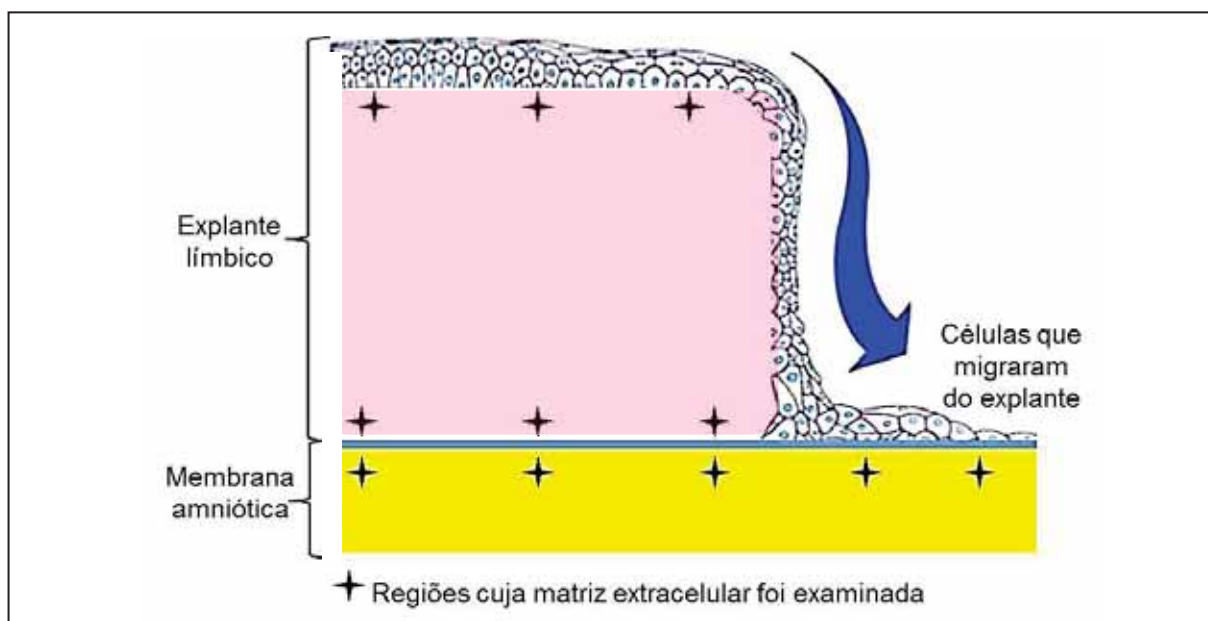


Figura 6. Representação esquemática das áreas estromais amnióticas e límbicas, dos grupos de II a IV, cuja matriz extracelular foi examinada, relativamente aos parâmetros de anisotropia óptica que informam sobre a organização supramolecular dos colágenos fibrilares e dos proteoglicanos. Figura adaptada de Li et al., 2007.

Estudaram-se parâmetros birrefringentes relacionados à supraorganização das fibras colágenas, e parâmetros dicroicos relacionados à supraorganização dos proteoglicanos (poliânions).

3.6.1 Parâmetros birrefringentes, fibras colágenas

As amostras foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com solução acídica de Ponceau SS⁴⁰, pH 2,5, por três minutos. Em seguida, foram lavadas em solução aquosa de ácido acético glacial⁴¹ 3%, secadas ao ar, diafanizadas em xilol⁴²

⁴⁰ Ponceau SS - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

⁴¹ Ácido acético glacial - Synth, São Paulo, Brasil

⁴² Xilol - Synth, São Paulo, Brasil

e montadas com bálsamo do Canadá natural⁴³ (VIDAL; MELLO, 2006). Os estudos foram conduzidos em microscópio⁴⁴ munido de luz linearmente polarizada, objetiva de 20X, filtro monocromador passa banda em 546 nm⁴⁵ e lâmpada de halogênio com iluminação de Köhler. Com vídeo-câmera⁴⁶, as imagens foram transmitidas do microscópio para um computador, digitalizadas e processadas. As condições de trabalho, notadamente a intensidade da luz emitida pela lâmpada de halogênio, foram as mesmas para todas as amostras.

As fibras birrefringentes visibilizadas sob luz monocromática (546 nm) foram convertidas para sistema binário (8-bits), contendo 256 “pixels”, variando de zero a 255, e analisadas em “software”⁴⁷. As intensidades dos brilhos das birrefringências foram estudadas em fibras posicionadas a 45 graus dos planos da luz polarizada, como descrito por Aldrovani e Vidal (2007). O processo de segmentação das imagens foi manual. As imagens foram divididas em quadrantes, para quantificação “in situ” dos valores médios dos níveis de cinza (GA), dos valores máximos do cinza médio (GAm_{ax}) e dos valores mínimos do cinza médio (GAm_{in}). Os graus de paralelismo das fibras foram calculados dividindo-se os valores médios de GAm_{ax} pelos valores médios de GAm_{in}. Os contrastes dos brilhos das birrefringências foram expressos pela fórmula $GAm_{ax} - GAm_{in}$. Gráficos de topografia de superfície foram construídos para representar a variabilidade tridimensional dos valores de “bitmap” associados aos brilhos das birrefringências, em imagens digitais tratadas com pseudocores.

As cores de interferência causadas pela dispersão anômala da birrefringência foram estudadas em fibras visibilizadas sob condições policromáticas, ou seja, o filtro monocromador foi removido do trajeto da luz. Os percentuais de áreas birrefringentes cobertas por fibras verde, amarelas ou vermelhas foram calculados em “software”⁴⁷.

⁴³ Balsamo do Canadá natural - Vetec, Rio de Janeiro, Brasil

⁴⁴ Axiopot - Zeiss, Göttingen, Germany

⁴⁵ Filtro monocromador - Edmund Optics, Barrington, USA

⁴⁶ S 500® - Bell Photonics, São Paulo, Brasil

⁴⁷ Image J® - disponível em <http://srweb.nih.gov/ij/>

3.6.2 Parâmetros dicroicos, proteoglicanos

As amostras foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com solução de azul de toluidina 0,025%, em tampão McIlvaine 0,1M, pH 4,0, por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá natural (ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007). As avaliações foram conduzidas em microscópio de luz⁴⁸ equipado com objetiva de $\times 40$, lâmpada de halogênio, iluminação de Köhler, conjunto de filtros polarizador e analisador⁴⁹, luz monocromática⁵⁰ com comprimentos de onda de 500, 520, 540, 546, 560, 580 ou 600 nm e vídeo-câmera⁵¹. As condições de trabalho, notadamente a intensidade da luz emitida pela lâmpada de halogênio, foram as mesmas para todas as amostras.

As imagens de material iluminado com fóton polarizado de 546 nm foram convertidas para sistema binário ("8-bits") contendo 256 "pixels", variando de zero a 255. Parâmetros densitométricos da MEC foram mensurados, empregando-se "software"⁵², de consoante com o que segue: valores médios dos níveis de cinza (GA), valores máximos do cinza médio (GAm_{ax}), valores mínimos do cinza médio (GA_{min}) e desvio padrão dos valores médios dos níveis de cinza (SD_{td}) (ALDROVANI; VIDAL, 2007).

Para se estudar a absorção espectral e o DL, o filtro analisador foi removido do trajeto da luz e o polarizador foi mantido em campo. As medidas absorciométricas foram sequencialmente efetuadas, empregando-se fótons com comprimentos de onda de 500, 520, 540, 560, 580 e 600 nm. Para cada comprimento de onda, os eixos estruturais foram posicionados paralela e perpendicularmente ao azimute do vetor elétrico da luz. Empregaram-se técnicas em análise de imagens, em módulo de densidade óptica calibrada. O "background" da lâmina, sem material biológico, foi usado para calibração do sistema (100% de transmitância). Curvas de absorção espectral foram construídas plotando-se os valores médios de absorção paralela (APA) e perpendicular (APE) ao azimute do vetor elétrico "versus" os comprimentos

⁴⁸ Eclipse E200® - Nikon, Tokyo, Japan

⁴⁹ Conjunto de filtros polarizadores - Proteon, São Paulo, Brasil

⁵⁰ Filtros de interferência- Proteon, São Paulo, Brasil

⁵¹ S 500® - Bel photonics, São Paulo, Brasil

⁵² Image J® - disponível em <http://srbweb.nih.gov/ij/>

de onda do fóton. Valores de DL foram calculados, nos pontos máximos de absorção das curvas, empregando-se a fórmula APA - APE (ALDROVANI; VIDAL, 2007). Para eliminação de vieses ou biases causados por variações nas espessuras dos cortes (artefato de microtomia), índice dicróicos (ID) foram calculados valendo-se da fórmula APA/APE.

3.7 Estatística

As amostras foram testadas para a normalidade estatística, empregando-se Kolmogorov-Smirnov. Variáveis qualitativas foram comparadas, empregando-se o teste do quiquadrado. Resultados foram expressos em percentuais. Variáveis quantitativas contínuas foram comparadas empregando-se ANOVA e pós-teste de Tukey ou com teste *t* pareado. Resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão (EP) da média.

As diferenças foram consideradas significativas quando *p* igual ou menor que 5%, com intervalo de confiança de 95% (± 2 EP). Os cálculos, os gráficos e as comparações estatísticas foram implementados em “software”⁵³.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivo celular

No segundo dia de cultivo, os explantes límbicos mostraram-se aderidos aos substratos (MA). Migração e crescimento celulares foram observados entre o quinto e o sétimo dias de cultivo. A área média de crescimento celular, estimada em “pixels”, no décimo quinto dia de cultivo, foi de $302,06 \pm 40,08$.

⁵³ MedCalc® - MedCalc, Mariakerke, Belgium

As células em migração apresentavam formato globular (Figura 7). As células aderentes tinham aspecto poliédrico (Figura 8).

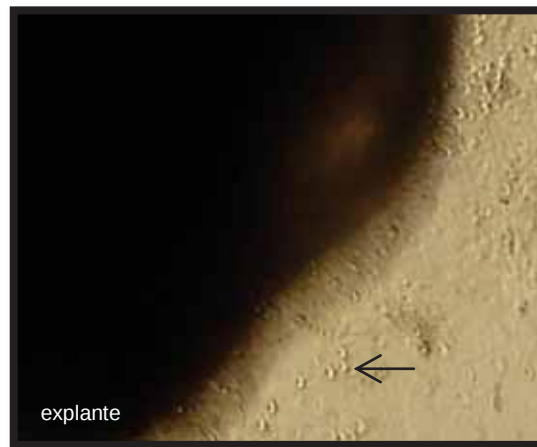


Figura 7. Imagem fotográfica de cultura celular observada à microscopia de luz invertida, em aumento de $\times 100$. A parte escura no campo esquerdo corresponde ao explante de limbo. A seta ($\leftarrow$) aponta para células epiteliais límbicas corneais globulares, não aderidas, em processo de migração, em cultura de dois dias. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

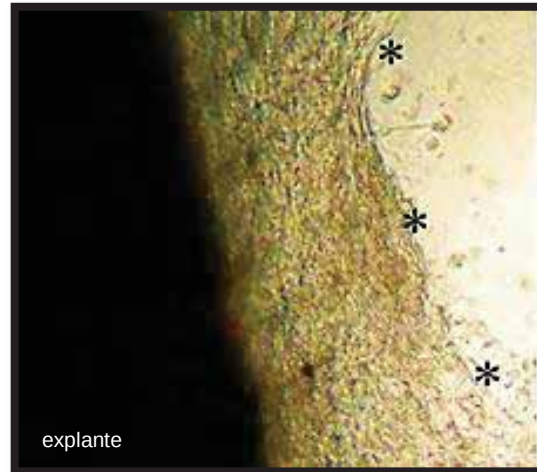


Figura 8. Imagem fotográfica de cultura celular observada à microscopia de luz invertida, em aumento de $\times 100$. A parte escura no campo esquerdo corresponde ao explante de limbo. Os asteriscos (*) delimitam a área de crescimento, contendo células epiteliais límbicas corneais poliédricas. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

4.2 Parâmetros birrefringentes, fibras colágenas

4.2.1 Matriz extracelular amniótica

Na Tabela 1, exibem-se as médias e os EP estabelecidos para GA, GAmáx e GAmin relacionados às intensidades dos brilhos das fibras colágenas da MEC amniótica (grupos I a IV), após coloração com Ponceau SS e visualização com luz monocromática de 546 nm. Os grupos II e IV apresentaram-se com valores reduzidos de GA e de GAmin, quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Os valores de GAmáx do grupo II não diferiram dos do controle ($p > 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros de análise de imagem relacionados às intensidades dos brilhos das birrefringências das fibras colágenas amnióticas, após coloração com Ponceau SS e visualização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Parâmetros	Grupos			
	Controle (I)	II	III	IV
GA	92,90±0,23	86,48±0,38	90,34±0,45	87,20±0,59
GAmáx	93,50±0,30	88,21±0,37	93,20±0,61	88,63±0,74
GAmin	91,50±0,15	74,96±0,37	73,94±0,36	75,40±0,13

GA, valores médios dos níveis de cinza; GAmáx, valores máximos do cinza médio; GAmin, valores mínimos do cinza médio
Valores em vermelho diferiram significativamente dos obtidos para o controle não cultivado ($p < 0,05$)

Grupo I, membrana amniótica não cultivada (controle)

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias

Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias

Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

Os graus de paralelismo das fibras colágenas amnióticas foram de 1,02 no grupo I (controle), 1,17 no grupo II, 1,26 no grupo III e de 1,17 no grupo IV.

Os contrastes dos brilhos das birrefringências foram de 2,0 no grupo I, 13,25 no grupo II, 19,26 no grupo III e de 13,23 no grupo IV.

Os gráficos na prancha da Figura 9 (A-D) mostram a variabilidade e o contraste dos valores de “bitmap”, que compuseram as imagens birrefringentes da MEC amniótica, em cada grupo da pesquisa, após atribuição de pseudocores.

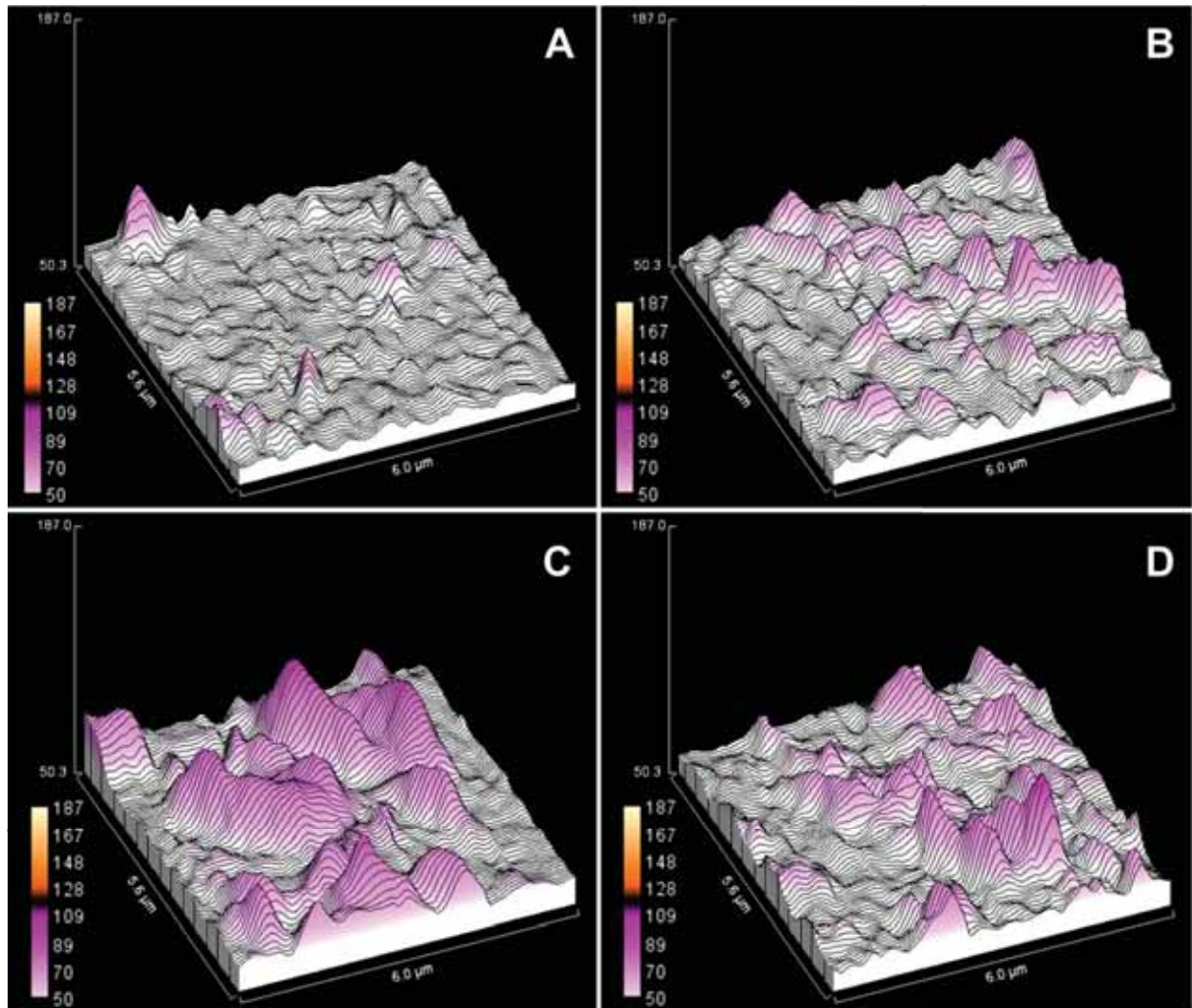


Figura 9. Gráficos de topografia de superfície construídos para representar a variabilidade dos valores de “bitmap” que compuseram as áreas birrefringentes analisadas nos estromas amnióticos. Em **A**, grupo controle. Em **B**, amostra cultivada por dois dias. Em **C**, amostra cultivada por sete dias. Em **D**, amostra cultivada por 15 dias. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Os estromas amnióticos de todas as amostras coradas com Ponceau SS (grupos I a IV), após visibilização com luz policromática, apresentaram cores de interferência causadas pela dispersão anômala da birrefringência (Figura 10).

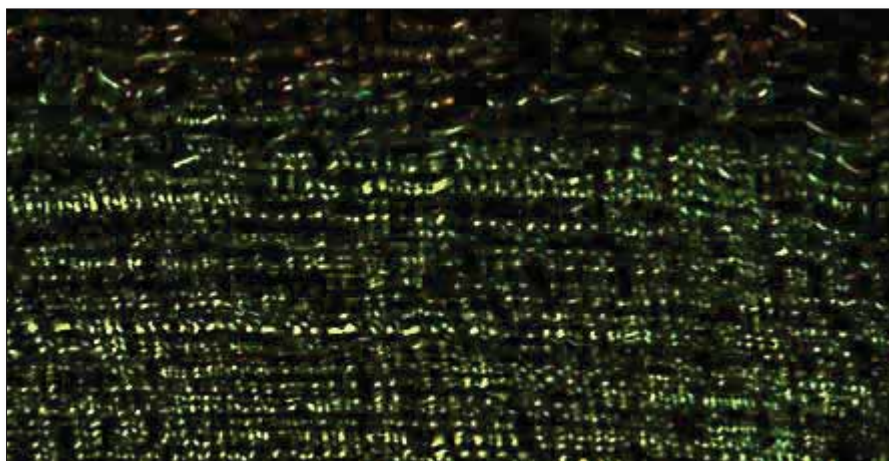


Figura 10. Imagem fotográfica das cores de interferência observadas no estroma amniótico de amostra do grupo IV, após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz polarizada policromática. Au: $\times 100$. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Na Tabela 2, apresentam-se as proporções de fibras verdes, amarelas e vermelhas contidas nas imagens birrefringentes. Encontram-se diferenças entre os grupos da pesquisa ($p < 0,05$).

Tabela 2. Proporção de fibras verdes, amarelas e vermelhas, em amostras coradas com Ponceau SS e visibilizadas com luz polarizada policromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Cor	Grupos			
	Controle (I)	II	III	IV
Verde	75	80,66	61,78	51,68
Amarelo	25	16,31	31,01	31,66
Vermelho	zero	3,03	7,21	16,66

Valores em vermelho diferiram significativamente dos obtidos para o controle não cultivado ($p < 0,05$)

Grupo I, membrana amniótica não cultivada (controle)

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias

Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias

Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

4.2.2 Matriz extracelular límbica

Na Tabela 3, exibem-se as médias e os EP estabelecidos para GA, GAmáx e GA_{mín} relacionados às intensidades dos brilhos das fibras colágenas da MEC límbica (grupos II a V), após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz monocromática de 546 nm. O grupo III apresentou valores elevados de GA, quando comparado ao grupo V ($p<0,05$). Em contrapartida, o grupo IV apresentou-se com valores reduzidos ($p<0,05$). Os valores de GAmáx dos grupos de II a IV diferiram dos do controle ($p<0,05$). Os valores de GA_{mín} foram menores nos grupos II e III ($p<0,05$).

Tabela 3. Parâmetros de análise de imagem relacionados às intensidades dos brilhos das birrefringências das fibras colágenas límbicas, após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Parâmetros	Grupos				
	Controle (V)	II	III	IV	
GA	89,35±0,10	88,61±0,90	95,02±0,18	85,05±0,39	
GAmáx	91,50±0,31	90,34±0,54	98,80±0,28	98,80±0,46	
GA _{mín}	68,49±0,13	76,95±0,10	78,90±0,38	68,49±0,13	

GA, valores médios dos níveis de cinza; GAmáx, valores máximos do cinza médio; GA_{mín}, valores mínimos do cinza médio

Valores em vermelho diferiram significativamente dos obtidos para o controle não cultivado ($p<0,05$)

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias

Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias

Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

Grupo V, explante límbico não cultivado (controle)

Os graus de paralelismo das fibras colágenas límbicas foram de 1,33 no grupo controle (V), 1,17 no grupo II, 1,25 no grupo III e de 1,44 no grupo IV.

Os contrastes dos brilhos das birrefringências foram de 23,01 no grupo controle, 13,39 no grupo II, 19,90 no grupo III e de 30,31 no grupo IV.

Os gráficos na prancha da Figura 11 (A-D) ilustram a variabilidade e o contraste dos valores de “bitmap” que compuseram as imagens birrefringentes da MEC límbica, em cada grupo da pesquisa, após atribuição de pseudocores.

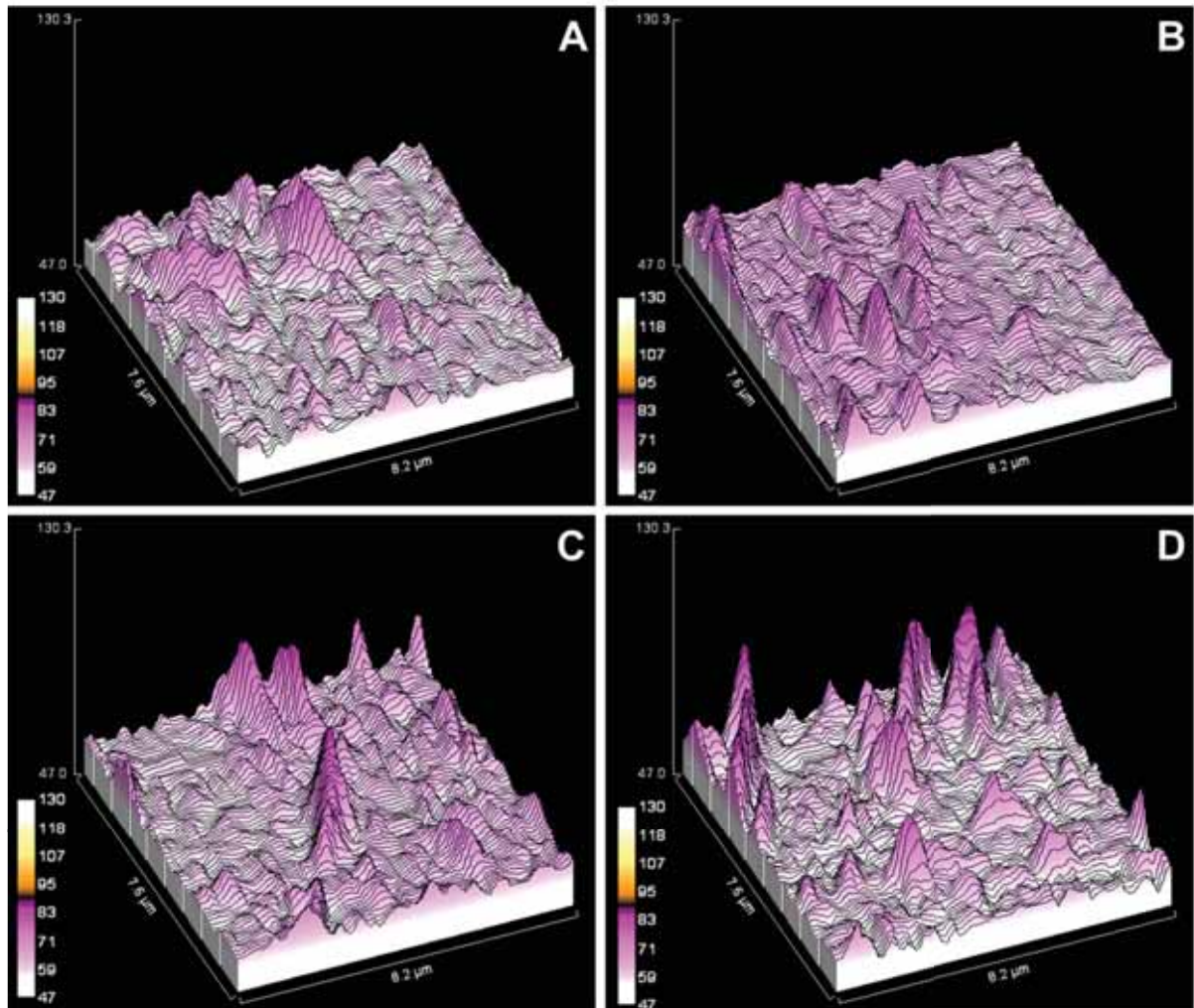


Figura 11. Gráficos de topografia de superfície construídos para representar a variabilidade dos valores de “bitmap” que compuseram as áreas birrefringentes analisadas nos estroma límbicos. Em **A**, grupo controle. Em **B**, amostra cultivada por dois dias. Em **C**, amostra cultivada por sete dias. Em **D**, amostra cultivada por 15 dias. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Os estromas límbicos de todas as amostras coradas com Ponceau SS (grupos II a V), após visibilização com luz policromática, apresentaram cores de interferência causadas pela dispersão anômala da birrefringência (Figura 12).

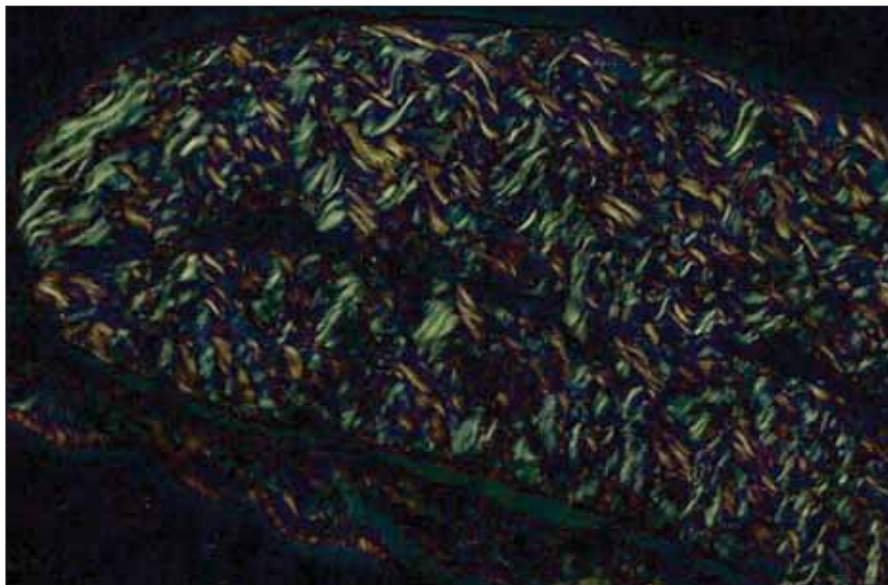


Figura 12. Imagem fotográfica das cores de interferência observadas no estroma límbico de amostra do grupo V, após coloração com Ponceau SS e visibilização com luz polarizada policromática. Au: $\times 200$. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Na Tabela 4, descrevem-se as proporções de fibras verdes, amarelas e vermelhas contidas nas imagens birrefringentes. Encontraram-se diferenças entre os grupos da pesquisa ($p < 0,05$).

Tabela 4. Proporção de fibras verdes, amarelas e vermelhas, em amostras coradas com Ponceau SS e visibilizadas com luz polarizada policromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Cor	Grupos			
	Controle (V)	II	III	IV
Verde	40,54	30,41	31,52	37,95
Amarelo	39,55	38,34	51,41	34,42
Vermelho	19,91	31,25	17,07	27,63

Valores em vermelho diferiram significativamente dos obtidos para o controle não cultivado ($p < 0,05$)

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias

Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias

Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

Grupo V, explante límbico não cultivado (controle)

4.3 Parâmetros dicróicos, proteoglicanos

4.3.1 Matriz extracelular amniótica

Na Tabela 5, apresentam-se as médias e os EP estabelecidos para GA, GAmáx, GAmín e SDtd das MEC amnióticas (grupos I a IV), após coloração com azul de toluidina e visibilização com luz polarizada monocromática de 546 nm. Os grupos II e III apresentaram-se com valores reduzidos de GA, de GAmáx e de GAmín, quando comparados ao grupo I ($p < 0,05$). Todas as amostras cultivadas (grupos II a IV) exibiram valores de SDtd menores do que os observados no controle ($p < 0,05$).

Tabela 5. Parâmetros de análise de imagem da matriz extracelular amniótica, após coloração com azul de toluidina e visibilização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Parâmetros	Grupos			
	Controle (I)	II	III	IV
GA	98,89±1,03	90,14±2,01	91,55±0,98	98,85±0,18
GAmáx	126,37±1,13	114,20±2,25	117,03±1,28	123,84±0,26
GAmín	75,21±0,88	67,17±1,14	72,64±0,84	78,49±1,94
SDtd	9,26±0,41	6,47±0,52	6,17±0,21	6,14±0,39

GA, valores médios dos níveis de cinza; GAmáx, valores máximos do cinza médio; GAmín, valores mínimos do cinza médio; SDtd, desvio padrão dos valores médios dos níveis de cinza

Valores em vermelho diferiram significativamente dos obtidos para o controle não cultivado ($p < 0,05$)

Grupo I, membrana amniótica não cultivada (controle)

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias

Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias

Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

Relativamente aos valores absorciométricos, amostras do grupo controle absorveram mais luz polarizada, em todos os comprimentos de onda do fóton, quando os eixos longos das fibrilas estromais foram posicionados perpendicularmente ao azimute do vetor elétrico ($p < 0,05$ para todos, APA x APE). No grupo II, os valores de APE foram maiores que os de APA, para os comprimentos

de onda de 480, 520, 580 e de 600 nm ($p<0,05$). No grupo III, o foram para todos os comprimentos de onda empregados, exceto 560 nm ($p<0,05$). No grupo IV, o foram para os comprimentos de onda de 480, 500 e de 560 nm ($p<0,05$).

As curvas de absorção espectral revelaram que MEC amnióticas (de todos os grupos) apresentam dois picos de absorção máxima da luz polarizada, os quais coincidem para APA (Figura 13) e APE (Figura 14). Membranas dos grupos I, III e IV apresentaram picos de absorbância máxima em 540 e em 600 nm. No grupo II, o primeiro dos picos foi observado em 520 nm e o segundo o foi em 600 nm.

Os valores de APA e de APE dos grupos de II a IV foram maiores que os do grupo controle ($p<0,05$), em todos os comprimentos de onda do fóton.

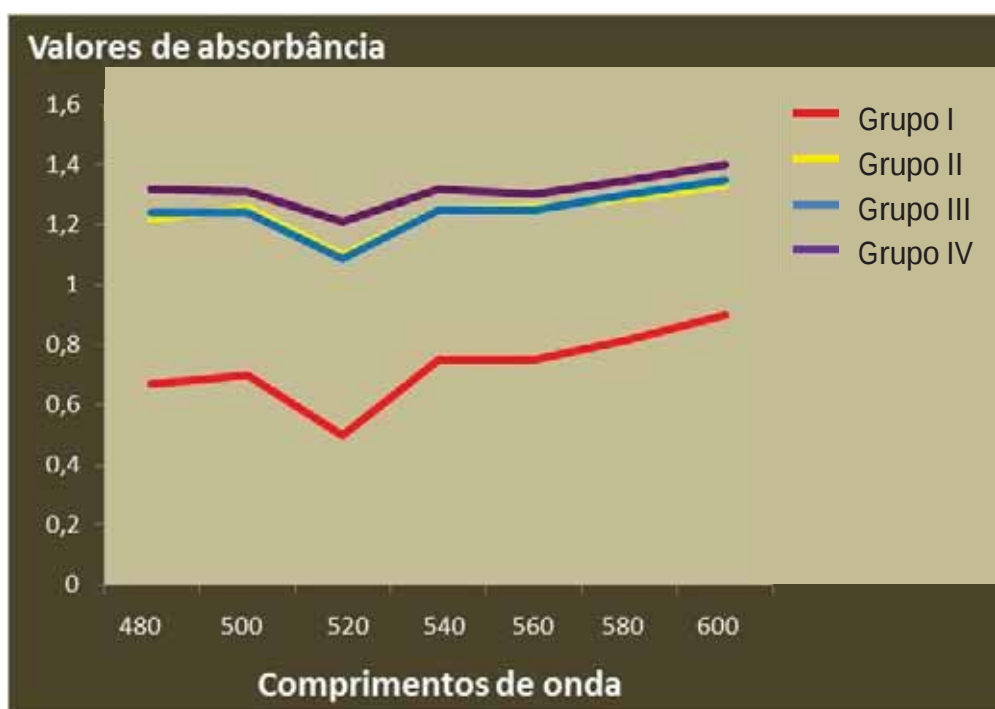


Figura 13. Curvas de absorção espectral construídas com valores médios de APA plotados em função dos diferentes comprimentos de onda do fóton. APA, absorção paralela ao azimute do vetor elétrico. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

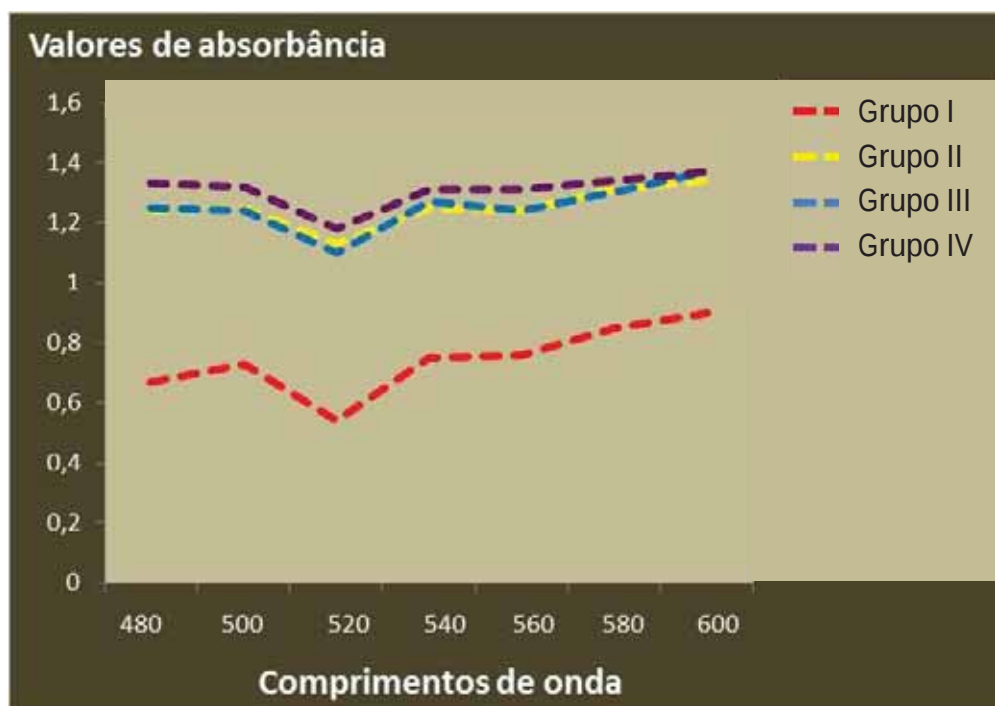


Figura 14. Curvas de absorção espectral construídas com valores médios de APE plotados em função de diferentes comprimentos de onda do fóton. APE, absorção perpendicular ao azimute do vetor elétrico. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Na Tabela 6, arrolam-se os valores de DL e de ID calculados nos pontos de absorbância máxima estabelecidos para as MEC amnióticas em cada grupo, após coloração com azul de toluidina e análise das curvas espectrais.

Tabela 6. Valores de dicróismo linear e de índice dicróico calculados nos pontos de absorbância máxima estabelecidos para os grupos de I a IV. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Absorção	Dicróismo linear				Índice dicróico			
	Grupos Controle	II	III	IV	Grupos Controle	II	III	IV
520 nm	...	-0,030	...	...	...	0,97	...	...
540 nm	-0,004	...	-0,019	0,008	0,99	...	0,98	1
600 nm	-0,005	-0,009	-0,016	0,033	0,99	0,99	0,98	1

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias

Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias

Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

4.3.2 Matriz extracelular límbica

Na Tabela 7, encontram-se as médias e os EP calculados para GA, GAmáx, GAmin e SDtd das MEC límbicas (grupos II a V), após coloração com azul de toluidina e visibilização com luz polarizada monocromática de 546 nm. O grupo IV apresentou valores elevados de GA, em comparação ao grupo V ($p<0,05$). Todas as amostras cultivadas exibiram valores elevados de GAmáx ($p<0,05$). O grupo II mostra valores de GAmin menores que os do controle ($p<0,05$). Valores de SDtd foram menores para o grupo V ($p<0,05$).

Tabela 7. Parâmetros de análise de imagem da matriz extracelular límbica, após coloração com azul de toluidina e visibilização com luz polarizada monocromática. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2014.

Parâmetros	Grupos			
	Controle (V)	II	III	IV
GA	124,17±1,23	122,60±1,82	126,75±1,18	126,54±1,11
GAmáx	144,79±2,13	150,54±2,36	155,59±1,34	157,65±0,88
GAmin	119,11±1,27	110,87±1,85	118,55±1,03	118,86±1,02
SDtd	4,53±0,27	8,59±0,59	7,66±0,44	8,46±0,46

GA, valores médios dos níveis de cinza; GAmáx, valores máximos do cinza médio; GAmin, valores mínimos do cinza médio; SDtd, desvio padrão dos valores médios dos níveis de cinza

Valores em vermelho diferiram significativamente dos obtidos para o controle não cultivado ($p<0,05$).

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias

Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias

Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

Grupo V, explante de limbo não cultivado (controle)

Os valores de APE do grupo controle foram maiores que os de APA, para os comprimentos de onda de 500, 520, 540, 560 e de 600 nm ($p<0,05$, APA x APE). No grupo II e III, o foram para os comprimentos de onda de 500, 520 e de 580 nm ($p<0,05$). No grupo IV, o foram para todos os comprimentos de onda, exceto 560 nm ($p<0,05$). Curvas de absorção espectral revelaram que as MEC límbicas (todos os grupos) apresentam picos de absorbância máxima em 540 e em 600 nm, os quais coincidiram para APA (Figura 15) e APE (Figura 16). Encontraram-se diferenças em absorções, medidas em 540 nm, entre os grupos IV e V ($p<0,05$).

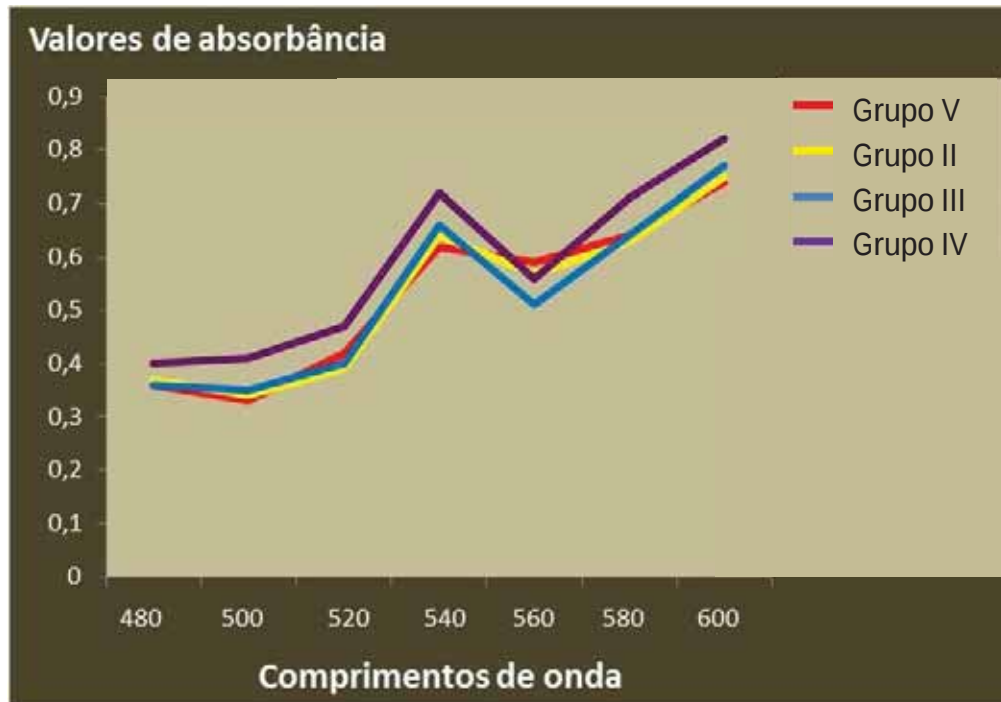


Figura 15. Curvas de absorção espectral construídas com valores médios de APA plotados em função dos diferentes comprimentos de onda do fóton. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.



Figura 16. Curvas de absorção espectral construída com valores médios de APE plotados em função dos diferentes comprimentos de onda do fóton. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Na Tabela 8, arrolam-se os valores de DL e de ID calculados nos pontos de absorbância máxima estabelecidos para a MEC límbica de cada grupo, após coloração com azul de toluidina e análise das curvas espectrais.

Tabela 8. Valores de dicroísmo linear e de índice dicroico calculados nos pontos de absorbância máxima estabelecidos para os grupos de II a V. Laboratório de Pesquisa do Serviço de Oftalmologia, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2015.

Absorção	Dicroísmo linear				Índice dicroico			
	Controle	Grupos II	III	IV	Controle	Grupos II	III	IV
540 nm	-0,007	0,041	0,019	0,004	0,00	1	1	1
600 nm	-0,022	0,014	-0,020	-0,20	0,97	0,98	0,97	0,97

Grupo II, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por dois dias
 Grupo III, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por sete dias
 Grupo IV, membrana amniótica contendo células epiteliais límbicas cultivadas por 15 dias

5 DISCUSSÃO

A evolução da díade risco-benefício que acompanha o uso de tecidos de bioengenharia destinados à reconstrução da superfície ocular com deficiência límbica depende de novas ideias e abordagens metodológicas diferenciadas para se estudar a regulação microambiental das CTs epiteliais límbicas corneais e se buscarem ou desenvolverem substratos de retroalimentação adequados à expansão “ex vivo” das mesmas. A MA desepitelizada e criopreservada a -80°C , como usada nesta pesquisa, representa o substrato de expansão mais empregado na terapia límbica (BAYLIS et al., 2011). Por esta razão, foi escolhida como substrato biológico a ser estudado como um modelo a ser reproduzido sinteticamente.

A utilização da MA de uma única doadora está recomendada para estudos comparativos controlados, visando à eliminação de vieses associados com fatores biológicos inerentes à gestação (HOPKINSON et al., 2006). As condições nutricionais da gestante doadora, o tempo de gestação e o sexo do bebê parecem modular a síntese de fatores de crescimento, notadamente do fator transformador de

crescimento beta (TGF-beta) e do fator de crescimento epidérmico (EGF) (HOPKINSON et al., 2006, WOLBANK et al., 2009). Discutia-se, no passado, sobre o risco da seleção controlada de MA humana constituir fator limitante para a reprodutibilidade e a transferibilidade dos resultados publicados por diferentes autores (DUA; MAHARAJAN; HOPKINSON, 2005). Todavia, na atualidade, os critérios de seleção da MA, tanto no âmbito das ciências básicas quanto para aplicação clínica, tornam-se cada vez mais padronizados e rigorosos. Há também de se considerar que os agentes empregados na criopreservação da MA reduzem a biodisponibilidade de moléculas solúveis e o quantitativo de células viáveis, permitindo a obtenção de substratos quimicamente mais homogêneos, por diferentes centros de pesquisa (AKLE et al., 1981). Diante destas afirmações, empregou-se, no presente estudo, MA criopreservada de única gestante.

Connon et al., (2010) estabeleceram que o índice de refração, a transparência e a espessura da MA humana variam de acordo com sua localização topográfica na placenta. As propriedades físicas da MA representam condições decisivas para seu sucesso como enxerto, notadamente para o tratamento de afecções da superfície ocular. Seguindo-se a recomendações internacionais (CONNON et al., 2010), apenas fragmentos de MA provenientes da zona central da placenta e proximal ao cordão umbilical foram utilizados.

A remoção do epitélio da MA, previamente ao seu emprego como substrato para expansão de células epiteliais límbicas corneais, é uma prática rotineiramente adotada, em diferentes centros de pesquisa e de tratamento da superfície ocular. Koizumi et al. (2007), ao compararem as características de células tronco epiteliais límbicas corneais expandidas sobre MAs íntegras ou desepitelizadas, observaram que a desepitelização da MA favorece a formação de culturas com progênie mais diferenciada, estratificada e rica em estruturas de adesão. A desepitelização pode ser conseguida empregando-se uma variedade de agentes químicos, enzimáticos ou físicos. Optou-se, no presente estudo, pelo EDTA, uma vez que ele implica na remoção de componentes celulares sem comprometer a integridade da MEC e a biomecânica da estrutura (GRUETERICH; ESPANA; TSENG, 2002). O emprego de agentes quelantes, como o EDTA, forma um anel central em torno de um complexo molecular e isola um íon metálico central, geralmente um cátion divalente (Ca^{2+} ou Mg^{2+}), cuja participação na montagem das fibras de colágeno e da fibronectina já foi

demonstrada. O EDTA ao se ligar com cátions divalentes das adesões focais permite a remoção das células sem danificar o microambiente ao redor (FRANCISCO, 2012).

Relativamente às células empregadas na pesquisa, optou-se por obtê-las de rimas corneoesclerais de coelhos, por se tratar de modelo experimental amplamente empregado em oftalmologia. Conhecimentos sobre o potencial terapêutico e a biologia das CTs foram gerados por estudos em que se utilizaram xenoenxertos construídos com MA humana e células epiteliais límbicas corneais de coelhos da Nova Zelândia Branco (RENDAL-VÁZQUEZ et al., 2012). Os fragmentos de limbo corneoescleral foram removidos do olho direito, nas posições de 10 às 12h e de 4 às 6h, por se tratarem de regiões ricas em paliçadas de Vogt (DUA; AZUARA-BLANCO, 2000, MIRI et al., 2012, OVADIA; NIE, 2013). As paliçadas constituem os nichos primários das CTs epiteliais e correspondem a elevações fibrovasculares radiais, que favorecem aporte sanguíneo próximo à camada basal do epitélio límbico (DUA; AZUARA-BLANCO, 2000, MIRI et al., 2012, OVADIA; NIE, 2013).

Os cultivos celulares, no presente estudo, foram estabelecidos seguindo-se um método de cultura em explante, descrito por Sangwan et al. (2006). É importante creditar que os princípios do método foram descritos por Carrel, em 1910. Seu objetivo é promover a liberação de células e favorecer a migração em direção centrípeta, a partir de fragmento tecidual posicionado na superfície do substrato. O intento está recomendado para o estabelecimento de culturas de primárias, quando se dispõe de pouca quantidade de tecido ou de exemplar biológico de difícil obtenção, visando-se a minimizar o risco de lise ou de perdas celulares, por desagregação enzimática. No presente estudo, o emprego da técnica de cultura em explante era imprescindível, uma vez que a manutenção da MEC límbica era desejável.

Há registros sobre a ocorrência de transição epitélio-mesenquimal em culturas de células epiteliais obtidas de explantes límbicos cultivados sobre MA (KAWAKITA et al., 2015). Acredita-se que esse evento reflita um processo muito ativo de recrutamento celular, estando associado com desenvolvimento tecidual, processos reparativos ou, até mesmo, neoplasias (MICALLIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010). No presente estudo, nenhum indício de transição epitélio-mesenquimal foi observado. As células epiteliais límbicas corneais migraram do explante límbico em

direção à membrana basal da MA. Migração e crescimento celulares foram observados entre o quinto e o sétimo dias de cultivo, corroborando achados de estudos prévios (BAYLIS et al., 2011).

O comportamento das CTs, tanto “in vivo”, no nicho biológico, quanto “ex vivo”, na MA, é modulado por fatores extrínsecos relacionados com vias múltiplas de sinalização célula-MEC (DANIELS et al., 2001, LI et al., 2007, OVADIA; NIE, 2013). Evidências sugerem que rearranjos espaço-temporais na supraorganização dos biopolímeros de MEC constituem mecanismos regulatórios das atividades celulares, incluindo adesão, migração e crescimento (HAY, 1991, ROY, 2010, TSENG, 2012, HAO et al., 2015, HUANG; DAI; ZHANG, 2015, TAN et al., 2015).

Com ineditismo, neste estudo, avaliaram-se organizações supramoleculares da MEC amniótica e da límbica. Estudaram-se procedimentos em cultivo celular e se (ou como) eles alteram parâmetros de anisotropia da MEC amniótica e da límbica. Fenômenos ópticos resultantes da interação da MEC supraorganizada com a radiação eletromagnética constituíram a base física das análises aqui realizadas.

No presente trabalho, a incidência de ondas eletromagnéticas polarizadas sobre a MEC amniótica e a límbica acarretou em mudanças na fase e na amplitude dos componentes ortogonais do vetor elétrico, gerando efeitos ópticos e espectrais, cujas causas e naturezas têm sido estudadas por diferentes autores (WIED, 1966, BENNET, 1967, CASSIM; TOBIAS; TAYLOR, 1968, KIERMAN, 1990; KIM et al., 2000, LOUIS-DORR et al., 2004, SAVENKOY; SYDUROK, 2005, SILVA et al., 2006, ALDROVANI; VIDAL, 2007, VIDAL; MELLO, 2009, JACQUES, 2013).

Desde que propriedades anisotrópicas podem, do ponto de vista físico, serem consideradas medidas do grau de ordenamento em cristais líquidos nemáticos (FRANCISCO, 2012), os fenômenos ópticos aqui detectados permitem propor que o nicho biológico (limbo) e o substituto (MA) das células epiteliais límbicas corneais correspondem a sistemas líquido-cristalinos fisiologicamente ativos, cuja dinâmica foi comprovada por variações ou mudanças nos parâmetros birrefringentes e dicroicos dos grupos que compuseram a pesquisa. O conceito de cristal líquido já está sendo usado para descrever outras estruturas, como córneas e tendões (GIRAUD-GUILLE; BESSEAU; MARTIN, 2003, GULINO et al., 2005). Ele fundamenta-se na observação de que os colágenos fibrilares apresentam características mesofasogênicas e propriedades piezo-piroelétricas, que geram

sinalização celular (ATNENSTAED, 1974, FUKADA, 1974, GIRAUD-GUILLE; BESSEAU; MARTIN, 2003, VIDAL; MELO, 2010).

Na presente pesquisa, parâmetros birrefringentes, relacionados à supraorganização de fibras colágenas, foram estudados em microscópio óptico munido com luz polarizada (ALDROVANI; VIDAL, 2007, RIBEIRO et al., 2013). As fibras colágenas foram complexadas com Ponceau SS, um corante azoico que, ao alinhar seus elétrons ressonantes em paralelo com os do colágeno, amplifica o sinal da birrefringência (ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007, VIDAL; MELLO, 2009).

Em oftalmologia, o emprego de luz polarizada tem auxiliado na compreensão e no diagnóstico de afecções da córnea (NEWTON; MEEK, 1998, MARTINS, 2005). Luz circularmente polarizada, luz elipticamente polarizada ou luz linearmente polarizada podem ser empregadas. A polarização circular ou elíptica da luz está restrita para estudos em que se pretende quantificar as fibras colágenas (WHITTAKER et al., 1994). Para estudos quali-quantitativos, em que se pretende estabelecer a morfologia, a orientação espacial e o estado de agregação das fibras, recomenda-se empregar luz linearmente polarizada, conforme o protocolo seguido nesta pesquisa, uma vez que variações no brilho da birrefringência emergem como alterações no ângulo formado entre as fibras e o plano da luz polarizada (SILVA et al., 2006, ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007, RIBEIRO et al., 2013). Sabe-se que fibras colágenas exibem brilho máximo quando um de seus eixos de propagação está posicionado a 45° do plano da luz polarizada (VIDAL; MELO, 2010). Assim, a luz sai da fibra em duas frentes de onda, após percorrê-la. Tais frentes apresentam uma diferença de fase. Quanto maior a diferença de fase, maior o ordenamento das estruturas em torno dos eixos ordinário e extraordinário (SILVA et al., 2006).

Vidal e Melo (2010), ao estudar tendões do calcâneo de ratos, e Aldrovani e Vidal (2007), em pesquisa envolvendo córneas porcinas, estabeleceram que os valores de RO, fornecidos pelos compensadores de fase, se correlacionam com os valores de “pixels”, fornecidos por “softwares” de análise de imagens. O emprego de “software” oferta vantagens, em relação aos compensadores de fase, pois permite que os parâmetros de birrefringência sejam avaliados em larga escala (tamanho amostral amplo) e fornece descrição detalhada da organização supramolecular (ALDROVANI; VIDAL, 2007).

Nesta pesquisa, o brilho da birrefringência foi avaliado e quantificado, em “software”, como sendo uma função do GA e de suas derivações (GA_{max} e GA_{min}). O GA é um parâmetro densitométrico que, no caso de imagens birrefringentes, representa a soma das frações intrínseca e total que compõem a amostra anisotrópica (OJALA; PIETIKAINEN; MAENPAA, 2002).

Relativamente aos resultados desta pesquisa, deve-se primeiro atentar à observação de que fibras colágenas límbicas controles (variando entre $68,49 \pm 0,13$ e $91,50 \pm 0,31$) apresentam menores valores de GA, em relação às fibras colágenas amnióticas controles (variando entre $91,50 \pm 0,15$ e $93,50 \pm 0,30$). Este achado sugere que a MEC amniótica e a límbica, em amostras não cultivadas, diferem quanto à cristalinidade e o grau de empacotamento dos colágenos fibrilares (VIDAL et al., 1975, RIBEIRO, 2013). Segundo Aldrovani (2004), diferenças no passo da hélice, na concentração, na composição química e na interação dos colágenos com outros componentes de MEC, especialmente poliânions de proteoglicanos, contribuem para os valores de GA. A MEC amniótica é composta por colágenos dos tipos I e III (WYNN; CORBETT, 1969; DUA; MAHARAJAN; HOPKINSON, 2005), enquanto a MEC estromal límbica, à similitude da MEC estromal corneal, possui predomínio de fibras heterotípicas, compostas por colágenos dos tipos I e V (AHMADI; JAKOBIEC, 2002).

Estudos prévios mostraram que quanto maior os valores de GA ou de RO da amostra birrefringente, maior o número vibrações eletrônicas e de ligações cruzadas intermoleculares (ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007). No caso das fibras colágenas, as ligações cruzadas estabelecem o alinhamento, a estabilidade e o estado ordenado de agregação; condições estas que se correlacionam com as propriedades biomecânicas do tecido (VIDAL; MELLO, 2009, RIBEIRO et al., 2013). A MA humana possui grande resistência biomecânica. Ela é capaz de suportar a carga de pressão do líquido amniótico e as contrações de Braxton-Hicks, durante a gestação (RIAU et al., 2010).

Não há informações, na literatura compulsada, sobre os valores de GA associados à birrefringência de córneas de coelhos. Entretanto, Aldrovani e Vidal (2007) estabeleceram parâmetros de GA relacionados à intensidade do brilho das birrefringências de fibras colágenas da córnea axial de porcos. Os valores obtidos

por esses autores foram maiores do que os observados no presente estudo, tanto para limbo quanto para MA.

Um estudo prévio, baseado nos efeitos polarizantes da luz, revelou que fibras colágenas do estroma límbico de seres humanos, em regiões adjacentes à membrana basal, apresentam-se mais densas e empacotadas, quando comparadas às fibras colágenas da córnea axial (BUENO; VARGAS-MARTIN, 2002). Admite-se que as forças tensionais atuantes sobre a córnea sejam maiores na região do limbo (GASSET; DOHLMAN, 1968).

Tseng et.al. (2002) demonstrou que células epiteliais migram de regiões de maior para menor tensão, na tentativa de reduzir o estresse anisotrópico ao seu redor. É possível que diferenças em supraorganização, entre colágenos límbicos e corneais, representem estratégia mecânica favorável à migração centrípeta de células progenitoras epiteliais. Sendo assim, também é possível que a supraorganização das fibras colágenas, juntamente com outros fatores, estimulem células epiteliais remanescentes de córneas lesionadas a migrarem em direção aos enxertos que lhe são transplantados, inclusive os de MA. Tais hipóteses necessitam de investigação “in vivo”, porém, têm o amparo científico dos resultados de estudos “ex vivo”, envolvendo cultivo celular, realizados nesta pesquisa.

Os procedimentos em cultivo celular, adotados nesta pesquisa, reduziram os valores de GA associados à birrefringência das fibras colágenas amnióticas, em todos os grupos da pesquisa. O mesmo foi observado para as fibras límbicas, em todos os grupos cultivados, exceto no III. Chama a atenção o fato dos valores de GA das fibras colágenas amnióticas, em amostras cultivadas por sete dias, período este de migração e proliferação celular, terem sido inferiores (variando entre $73,94 \pm 0,36$ e $93,20 \pm 0,61$, média de $90,34 \pm 0,45$) aos obtidos para fibras colágenas límbicas (variando entre $78,90 \pm 0,38$ e $98,80 \pm 0,28$, média de $95,02 \pm 0,18$). Um estudo prévio mostrou que células epiteliais límbicas corneais captam atributos topográficos e mecânicos emitidos por substratos nanofibrosos (SHARMA; SHARMA; SHUKLA, 2011), cujas confecções seguem princípios reversíveis de automontagem molecular, característicos de colágenos supraorganizados (LEHN, 2002). Em geral, as células, em cultura, migram de superfícies mais rígidas para superfícies moles ou macias (KIM et al., 2012).

O grau de paralelismo e o contraste dos brilhos das birrefringências constituem importantes parâmetros associados à supraorganização dos colágenos, às vias de sinalização célula-MEC e às propriedades biomecânicas do tecido. Eles decorrem de alterações na ondulação e nos planos e orientações espaciais das fibras (KIM et al., 2012). Na presente pesquisa, as fibras colágenas amnióticas do grupo controle apresentam brilho homogêneo (contraste de 2,0). Em contrapartida, as fibras colágenas límbicas apresentaram brilho heterogêneo (contraste de 23,01). Esses achados indicam que a MA possui fibras, preferencialmente, orientadas em sentido espacial único, ou seja, ao longo de seu eixo estrutural, à similitude do que foi reportado para tendões, por Vidal e Melo (2010). Já as fibras colágenas límbicas, corroborando com dados de estudos prévios, apresentaram mais de uma direção preferencial dentro do estroma, além de arranjo lamelar (MEEK; FULLWOOD, 2001). Estima-se que, seres humanos, possuem 300 lamelas de colágeno na região central da córnea e 500 na zona límbica (JARONSKI; KASPRZAK, 2003). Em cada lamela, as fibras de colágeno se orientam paralelamente umas às outras, porém, formam diferentes ângulos com as fibras localizadas em lamelas adjacentes (MEEK; FULLWOOD, 2001). Em seres humanos, camundongos, porcos e coelhos, 60% das lamelas de colágeno estão orientadas em sentidos súpero-inferior e têmporo-nasal, as demais (40%) se orientam em sentido oblíquo (DAXER; FRATZEL, 1997, NEWTON; MEEK, 1998, BOOTE et al., 2004).

Fibras colágenas não são planares. Correspondem à supraorganizações helicais, que periodicamente mudam de plano e de direção espacial, segundo os requerimentos fisiológicos ou biomecânicos que recebem (VIDAL; MELO, 2010). Na presente pesquisa, os procedimentos em cultivo celular suscitaram mudanças na direção e no plano espacial das fibras colágenas amnióticas. Essas mudanças foram suficientes para elevar os valores de contraste de brilho para patamares próximos aos obtidos para fibras límbicas, especialmente nos grupos II e III. O remodelamento do colágeno, em termos de orientação espacial, é modulado por forças emitidas pelas células (TSENG et al., 2012). Admite-se que, neste trabalho, a presença de fibroblastos no estroma dos explantes límbicos pode ter contribuído para o remodelamento de fibras, como proposto por Vidal (1994). Foi observado, em outros testudos, que eles também podem alterar a biomecânica estrutural e acarretar mudanças na topologia e na topografia dos colágenos fibrilares, podendo ainda inibir

ou estimular a montagem de macromoléculas do sítio de adesão focal e a síntese de fatores de crescimento (KIM et al., 2012, TSENG et al, 2012).

Outro aspecto crucial e intimamente relacionado à regulação de células “ex vivo” seria a espessura das fibrilas da matriz de expansão. A espessura das fibrilas, aparentemente, está associada com a geração e a transmissão de forças que facilitam o reposicionamento das junções celulares (WANG; THAMPATTY, 2008). Nesta pesquisa, a espessura das fibrilas de colágeno foi estabelecida com base nas cores de interferência causadas pela dispersão anômala da birrefringência, em amostras iluminadas com luz polarizada policromática, segundo proposto por Whittaker; Boughner; Kloner (1989). Admitiu-se que fibras espessas brilharam em amarelo e vermelho, e fibras finas (entre 20 e 40 nm) brilharam em verde (LATTOUF et al., 2014).

Associações entre cores de interferência e tipos de colágenos não foram estabelecidas neste estudo, apesar de as fibras de colágeno tipo III, presentes em grande quantidade na MEC amniótica, serem mais finas que as de colágeno tipo I (RICH; WHITTAKER, 2005). A leitura dos resultados considerou que fibras colágenas tipo I, quando imaturas ou cortadas obliquamente, também brilham em verde (LATTOUF et al., 2014). Alterações nas proporções de fibras finas e espessas, como observadas neste estudo, devem ser atribuídas ao grau de maturidade das fibras colágenas e ao “turnover” da MEC (RICH; WHITTAKER, 2005). O aparecimento de fibras vermelhas, na MEC amniótica, em amostras cultivadas, é sugestivo de aumento na taxa de degradação do colágeno e de afrouxamento de fibras (LATTOUF et al., 2014), o que estaria de acordo com a supraorganização revelada pelos valores de GA, o grau de paralelismo e o contraste do brilho da birrefringência.

Os colágenos fibrilares interagem ordenadamente com outros biopolímeros de MEC, incluindo os proteoglicanos, os quais interferem em suas propriedades físico-químicas (SCOTT et al., 1981, YOON; HALPER, 2005). A biodisponibilidade e a distribuição dos proteoglicanos variam em função dos estímulos que a MEC recebe; o que resulta em alterações na maturação das fibras colágenas (SCOTT et al., 1981, YOON; HALPER, 2005). Segundo Matavelli et al. (2009), mudanças no perfil de proteoglicanos, em tecidos saudáveis, sem inflamação, correlacionam-se com remodelamento tecidual e proliferação celular. Sob condições “ex vivo”, mudanças

em proteoglicanos modulam a organização dos filamentos de actina e a adesão celular (RUOSLATI, 1988). Os mecanismos extracelulares de transdução de sinais (mecanotransdução) são mediados por alterações na biodisponibilidade ou no arranjo dos proteoglicanos, os quais podem, ainda, interagir com diferentes fatores de crescimento (ALMEIDA e al., 2010).

Observaram-se, nesta pesquisa, que procedimentos em cultivo celular suscitaram mudanças na biodisponibilidade (parâmetros densitométricos associados ao GA) dos poliânions de proteoglicanos das MECs amnióticas e límbicas. Houve redução dos valores de SDtd da MEC amniótica e aumento dos valores de SDtd da MEC límbica, em comparação aos controles. Galanternik; Kramer; Piotrowskic (2015) observaram o aumento da biodisponibilidade de proteoglicanos ricos em leucina, os quais são encontrados na MEC límbica, estimulam a migração celular.

Os proteoglicanos, através de seus glicosaminoglicanos, formam uma ponte entre fibrilas de colágeno adjacentes, facilitando o deslizamento das mesmas, quando uma força é aplicada (PAOLI, 2007). Ademais, constituem mecanismos de controle do diâmetro das fibras colágenas (MICHELLACI et al., 2003). Vários autores notaram que proteoglicanos contribuem para a supraorganização das fibras colágenas. Eles representam aproximadamente 13% da birrefringência de forma, em tendões (ALDROVANI, 2004). Estudos envolvendo fenômenos ópticos espectrais, caracterizados por absorção seletiva de luz e DL, têm sido conduzidos na tentativa de se estabelecerem modelos de interação entre proteoglicanos e colágenos (VIDAL; 1963, MATHEWS, 1965, JACKSON; BENTLEY, 1968, SCOTT, 1995, MÜLLER et al., 2004).

O DL pode ser definido como uma anisotropia de absorção. Ele se manifesta em macromoléculas que absorvem a luz polarizada diferentemente, na dependência da direção do grupo cromofórico em relação ao do azimute do vetor elétrico (LOUIS-DORR et al., 2004, ALDROVANI; VIDAL, 2007). Os proteoglicanos, à semilidade de outras macromoléculas biológicas, não apresentam DL no espectro visível da luz. Nesta pesquisa, o corante azul de toluidina foi empregado, para se promover o fenômeno extrinsecamente (ALDROVANI; VIDAL, 2007, de ARO; VIDAL; PIMENTEL, 2012). A ligação do azul de toluidina aos poliânions de proteoglicanos é do tipo eletrostática e se caracteriza por reações de metacromasia (de ARO; VIDAL; PIMENTEL, 2012).

A metacromasia responde pelos picos de absorbância detectados em curvas espectrais (VIDAL, 1963), como as que foram construídas nesta pesquisa. Trata-se

de efeito espectral caracterizado pelo abaixamento do pico original de absorção da luz (i.e., hipocromismo), até muitas vezes o seu desaparecimento, simultaneamente ao deslocamento dos valores maiores de absorbância para comprimentos de onda menores (i.e., hipsocromismo) (ALDROVANI, 2004). Sua manifestação se deve à formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros, orquestrada pelo empilhamento ordenado de moléculas de azul de toluidina frente a um biopolímero ácido (LISON, 1960, VIDAL, 1963).

Neste estudo, tanto as MEC amnióticas quanto as límbicas, cultivadas ou não, apresentaram dois picos de absorção da luz polarizada. Este achado indica que poliânions com diferentes graus de agregação encontravam-se biodisponíveis nos tecidos, o que corrobora com estudos prévios envolvendo córneas de camundongos (ALDROVANI; GUARALDO; VIDAL, 2007) e tendões flexores digitais superficiais de frangos (PAOLI, 2007). Em comum, todas as estruturas supramencionadas sofrem a ação, concomitante, de forças compressivas e tensionais.

Quando o azul de toluidina se liga aos poliânions de proteoglicanos, ele orienta seus eixos ressonantes perpendicularmente ao maior eixo da molécula de colágeno (LISON, 1960, MELLO; VIDAL, 1973, SILBERMAN; FROMER, 1973). Com base nessa observação, foi proposto que os glicosaminoglicanos de proteoglicanos encontram-se estatisticamente alinhadas em paralelo ao eixo longitudinal das fibrilas de colágeno (VIDAL, 1963). Estudos prévios mostraram que essa orientação preferencial gera um DL negativo, nos picos das curvas espectrais, uma vez que a absorção paralela de luz polarizada é menor do que a perpendicular (VIDAL, 1984).

Na presente pesquisa, detectaram-se valores negativos de DL nos picos máximos de absorção das curvas construídas para a MEC amniótica e a límbica, em amostras não cultivadas. Após o cultivo celular detectaram-se alterações no sinal dicróico. A MEC amniótica, em culturas de 15 dias, apresentou alterações na ordenação dos glicosaminoglicanos, cuja reorientação espacial se aproximou do modelo de isotropia proposto por Henninger et al. (2009). Na MEC límbica, a reorientação espacial e isotrópica de glicosaminoglicanos foi parcial, uma vez que valores positivos de DL foram detectados em apenas um dos pontos máximos de absorção da curva espectral. Estudos prévios sugerem que a reorientação espacial e isotrópica de glicosaminoglicanos aumenta a resiliência e a permeabilidade dos

tecidos (LIAO, VESELEY, 2007, HENNINGER et al., 2009). Aparentemente, este estudo é o primeiro a detectar o fenômeno em sistemas de cultivos celulares.

6 CONCLUSÕES

A incidência de ondas eletromagnéticas polarizadas sobre a MEC amniótica e a límbica acarretou em mudanças na fase e na amplitude dos componentes ortogonais do vetor elétrico. MEC amniótica e límbica devem, portanto, ser tratadas como sistemas líquido-cristalinos, compostos de biopolímeros supraorganizados e fisiologicamente ativos.

As supraorganizações de MEC, ou seja, colágenos fibrilares e proteoglicanos, se alteraram em função de estímulos interpostos pelos procedimentos em cultivo celular, o que suscitou em mudanças nos parâmetros birrefringentes e dicroicos estudados. Supraorganizações de colágenos sofreram alterações quanto ao grau de empacotamento molecular e à orientação preferencial de fibras dentro dos estromas amniótico e límbico. Supraorganizações de proteoglicanos sofreram alterações quanto à biodisponibilidade e ao alinhamento das cadeias de glicosaminoglicanos.

7 REFERÊNCIAS

ACTON, Q.A. **Extracellular Matrix: Proteins - Advances in research and application**. Scholarly Editions. p. 671, 2013.

AHMADI, A.J.; JAKOBIEC, F.A. Corneal wound healing; cytokines and extracellular matrix proteins. **International Ophthalmology Clinics**, v. 42, n. 3, p. 13-22, 2002.

AKLE CA, ADINOLFI M, WELSH KI, LEIBOWITZ S, MCCOLL I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. **Lancet**, v. 2, n. 8254, p. 1003–1005, 1981.

ALDROVANI, M. **Anisotropias ópticas em feixes de colágeno e pesquisa de morte celular em fibroblastos de tendões durante o estabelecimento do diabetes espontâneo em camundongos não-obesos (NOD)**. Dissertação (Mestrado em biologia celular e estrutural). Universidade Estadual de Campinas, SP, 2004.

ALDROVANI, M.; GUARALDO, A.M.A.; VIDAL, B.C. Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. **Vision Research**, v.47, n.26, p. 3229–3237, 2007.

ALDROVANI, M.; VIDAL, B.C. Application of principles of optical anisotropies and image analysis to the investigation of molecular packing, cristallinity, spatial organization and three-dimensional topography in collagen fibers from porcine cornea. In **Progress in Biopolymer Research** (ed. Sanchez PC), Nova Sci Publ Inc, New York, p. 225-42, 2007.

AROKIARAJ, M.C.; PALACIOS, I.F. Finite element modeling of a novel self-expanding endovascular stent method in treatment of aortic aneurysms. **Scientific Reports**, v.4, p.3630, 2014.

ATHENSTAEDT, H. Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.238, p. 68-94, 1974.

AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C.T.; DUA, H.S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **British Journal Ophthalmology**, v. 83, n. 4, p. 399-402, 1999.

BARACHETTI, L.; GIUDICE, C.; MORTELLARO, C.N. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 5, p. 326–330, 2010.

BARROS P.S.; SAFATLE, A.M.;GODOY, C.A; SOUZA, M.S.;BARROS, L.F.; BROOKS, D.E.. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.3, p.189-192, 2005.

BARROS P.S.M.; GARCIA, J.A.; LAUS, J.L.; SALLES GOMES, T.L. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 1, n. 2-3, p. 119-123, 1998.

BAYLIS, O.; FIGUEIREDO, F.; HENEIN, C.; LAKO, M.; AHMAD, S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. **Journal Cell Biology**, v.112, p. 993-1002, 2011.

BENNETT, H.S. **The microscopical investigation of biological materials with polarized light**. In: Jones RM (ed.) McClung's Handbook of Microscopical Technique. New York: Hafner Publ. Co., p. 591–766, 1967.

BENSON-MARTIN, J.; ZAMMARETTI, P.; BILIC, G.; SCHWEIZER, T.; PORTMANN-LANZ, B.; BURKHARDT, T.; ZIMMERMANN, R.; OCHSENBEIN-KÖLBLE, N. The Young's modulus of fetal preterm and term amniotic membranes. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 128, n 1-2, p. 103-7, 2006.

BLUM, S.R. The collagen family. **Cold Spring Harbor Perspective Biology**, v.3, n. 1, 2011.

BOEKHOVEN, J.; STUPP, S.I. 25th anniversary article: supramolecular materials for regenerative medicine. **Advanced Materials**, v. 26, n. 11, p. 1642-59, 2014.

BOOT, C.; DENNIS, S.; MEEK, K. Spatial mapping of collagen fibril organization in primate cornea- an X-ray diffraction investigation. **Journal of Structural Biology**, v. 146, n. 3, p. 359-67, 2004.

BOURNES, G. The foetal membranes: a review of the anatomy of normal and chorion and some aspects of their function. **Postgraduate Medical Journal**. v.38, p.193-201, 1962.

BUENO, J.M.; VARGAS- MARTIN, F. Measurements of the corneal birefringence with a liquid-crystal imaging polariscope. **Applied Optics**,v. 41, n. 1, 2002.

BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M.. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Cell Development Biology**, v. 12, p. 463– 518, 1996.

CARREL, A. The treatment of wounds. **Journal of the American Medical Association**, p. 2148, 1910.

CASSIM, J.Y.; TOBIAS, P.S.; TAYLOR, E.W. Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 168, p. 463-71, 1968.

CHAKRAVARTI, S.; MAGNUSON, T.; LASS, J.H.; JEPSEN, K.J.; LAMANTIA, C.; CARROLL, H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. **Journal Cell Biology**, v.141, n.5, p.1277-1285, 1998.

CHEN, C.S.; TAN J.; TIEN J. Mechanotransduction at cell matrix and cell-cell contacts. **Annual Review Biomedical Engineering**, v. 6, p. 275– 302, 2004.

CHEN, S.; MIENALTOWSKI, M.J.; BIRK, D.E. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. **Experimental Eye Research**, v. 133, p. 69-80, 2015.

COLLINSON, J.M.; CHANAS, S.A.; HILL, R.B. Corneal development, limbal stem cell function, and corneal epithelial cell migration in the Pax6^{+/-} Mouse. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, n. 4, p. 1101-8, 2004.

CONNON, C. J.; DOUTCH, J; CHEN, B.; HOPKINSON, A.; MEHTA, J.S.; NAKAMURA, T.; KINOSHITA, S.; MEEK, K.M. The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration. **British Journal Ophthalmology**. v. 94, n. 8, p.1057–61, 2010.

COOPER, L.J.; KINOSHITA, S.; GERMAN, M.; KOIZUMI, N.; NAKAMURA, T.; FULLWOOD, N.J. An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. **Cornea**, v. 24, n. 6, p. 722-9, 2005.

CREMONINI, D.N.; RANZANI, J.J.T; MARQUES, M.E.A; RODRIGUES, G.N.; BRANDÃO, C.V.S. Transplante de membrana amniótica canina criopreservada para cicatrização de córnea com deficiência de células límbricas em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1462-1467, 2007.

DANIELS, J.T.; DART, J.K.G.; FRCOPHTH, D.M.; TUFHT, S.J.; FRCOPHTH, M.D.; KHAW, P.T. Corneal stem cell in review. **Wound Repair Regeneration**, v.9, p. 483-94, 2001.

DAXER, A.; FRATZL, P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 38, n.1, p. 121-9, 1997.

de ARO, A.A; VIDAL, B.C.; PIMENTEL, E.R. Biochemical and anisotropical properties of tendons. **Micron**, v. 46, n. 2-3, p.205- 14, 2012.

DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **British Journal Ophthalmology**, v.83, n. 6, p. 748-52, 1999.

DUA, H.S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey of Ophthalmology** , v. 44, n. 5, p. 415–425, 2000.

DUA, H.S.; JOSEPH, A.; SHANMUGANATHAN, V.A.; JONES, R.E. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. **Eye**, v. 17, p. 877-85, 2003.

DUA HS, MAHARAJAN VS, HOPKINSON A. Controversies and limitations of amniotic membrane in ophthalmic surgery. **Essentials in Ophthalmology Cornea and External Eye Disease**, p.29-41. 2005.

DUA, H.S.; MIRI, A.; ALOMAR, T.; YEUNG, A.M.; SAID, D.G. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: Testing of dogma. **Ophthalmology**, v. 116, n. 5, p. 856-63, 2009.

DUA, H.S.; SHANMUGANATHAN, V.A.; POWELL-RICHARDS, A.O.; TIGHE, P.J.; JOSEPH, A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. **British Journal Ophthalmology**, v. 89, p. 529-532, 2005.

FREEDMAN, B.R.; SARVER, J.J.; BUCKLEY, M.R.; VOLETI, P.B.; SOSLOWSKY, L.J. Biomechanical and structural response of healing Achilles tendon to fatigue loading following acute injury. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 9, p. 2028-34, 2014.

FUKADA, E. Electrically Mediated Growth Mechanisms in Living Systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**. p. 7–25, 1974.

FRANCISCO, J.C. **Desenvolvimento de biomaterial a partir de matriz amniótica humana**. Tese (Doutorado Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde Humana e Animal, Setor de Tecnologia) Universidade Federal do Paraná, 2012.

GALANTERNIK, M.V.; KRAMER, K.L.; PIOTROWSKI, T. Heparan Sulfate Proteoglycans Regulate Fgf Signaling and Cell Polarity during Collective Cell Migration. **Cell Reports**, v. 10, n. 3, p. 414-428, 2015.

GASSET, A.R.; DOHLMAN, C.H. The tensile strength of corneal wounds. **Archives of Ophthalmology**, n. 79, v.5, p. 595-602, 1968.

GIRAUD GUILLE, M.M.; BESSEAU, L.; MARTIN, R. Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems. **Journal of Biomechanics**, v. 36, n.10, p. 1571-79, 2003.

GIRAUD GUILLE, M.M.; MOSSER, G.; HELARY, C., EGLIN, D. Bone matrix like assemblies of collagen: from liquid crystals to gels and biomimetic materials. **Micron**, v. 36, n.7-8, p. 602-8, 2005.

GLORIEUX F.H. Osteogenesis imperfecta. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology**, v.22, p. 85-100, 2008.

GOMES, J.A; KOMAGOME, C.M.; SANTOS N, CUNHA MC, FREITAS D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular nas ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 62, n. 5, p. 562-76, 1999.

GÖTZINGER, E.; PIRCHER, M.; DEJACO-RUHSWURM, I.; KAMINSKI, S.; SKORPIK, C.; HITZENBERGER, C.K. Imaging of birefringent properties of keratoconus corneas by polarization-sensitive optical coherence tomography. **Investigative Ophthalmology and Visual Sciences**, v. 48, n. 8, p. 3551-8, 2007.

GRIFFITH, M.; OSBORNE, R.; MUNGER, R.; XIONG, X.; DOILLON, C.J.; LAYCOCK, N.L.; HAKIM, M.; SONG, Y.; WATSKY, MA. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. **Science**, v. 286, p. 2169–2172, 1999.

GRIMM, P.C.; NICKERSON, P.; GOUGH, J.; MCKENNA, R.; STERN, E.; JEFFERY, J.; RUSH, D.N. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. **Journal of the American Society Nephrology**, v. 14, p. 1662-1668, 2003.

GRUETERICH, M.; ESPANA, E.; TSENG, S.C.G. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact denuded amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 43, n.1, p. 63-71, 2002.

GUIDO, V.; KOBBE, B.; KEENE, D.R.; PAULSSON, M.; KOCH, M.; WAGENER, R. Collagen XXVIII, a novel Von Willebrand factor a domain-containing protein with many imperfections in the collageuns domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 28, n. 6, p 3494-3504, 2006.

GULINO, M.; BELLIA, P.; FALCIGLIA, F.; MUSUMECI, F.; PAPPALARDO, A.; SCORDINO, A.; TRIGLIA, A. Role of water content in dielectric properties and delayed luminescence of bovine Achilles' tendon. **FEBS Letters**, v.579, n. 27, p. 6101-4, 2005.

HAO, J.; ZHANG, Y.; JING, D.; SHEN, Y.; TANG, G.; HUANG, S.; ZHAO, Z. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Perspective into mechanical induction of MSC fate. **Acta Biomaterials**, v.1, n. 20, 2015.

HAY, E.D. Cell biology of the extracellular matrix. **1st. New York: Plenum Press**, p. 468, 1991.

HEINZ, C.; ECKSTEIN, A.; STEUH L., .K.P; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of corneal ulcer in graves ophthalmopathy. **Cornea**, v.23, n.5, p.524-526, 2004.

HENNINGER, H.B.; MAAS, S.A.; CHEPHERD, J.H.; JOSHI, S.; WEISS, J.A. Transcercely isotropic distribution ofsulfated glycosaminoglycans in human medial collateral ligament: A quantitative analysis. **Jounal Struct Biology**, v.165, n. 3, p.176-83, 2009.

HIGA, K.; SHIMMURA, S.; KATO, N.; KAWAKITA, T.; MIYASHITA, H.; ITABACHI, Y.; FUKUODA, K.; SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 48, n. 2, p. 597-604, 2007.

HOPKINSON, A.; MCINTOSH, R.S.; TIGHE, P.J.; JAMES, D.K.; DUA, H. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF- β content. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.47, n.10, p.4316-4322, 2006.

HUANG, C.; DAI, J.; ZHANG, X.A. Environmental physical cues determine the lineage specification of mesenchymal stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 6, p. 1261-1266, 2015.

IOZZO, R.V.;SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology**, v.42, p. 11-55, 2015.

JACKSON, D.S.; BENTLEY, J.P. **Collagen-glycosaminoglycans interactions**. In: Treatise on Collagen, Gould, B.S. (ed), vol.2, Academic Press, New York and London, p.189-211, 1968.

JACQUES, S.L. Optical properties of biological tissues: a review. **Physics in Medicine and Biology**, v.58, n. 11, p. 37-61, 2013.

JARONSKI, J.W.; KASPRZAK, H.T. Linear birefringence measurements of the in vitro human cornea. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 23, n.4, p. 361-369, 2003.

KAWAKITA, J.; SHINODA, Y.H.; SHUTO, T.; CHIKYOW, T. Conductive polymer/metal composites for interconnect of flexible devices. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 54, p.6, 2015.

KENYON, K.R.; TSENG, S.C. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v. 96, p.709-22, 1989.

KIERNAN, J.A. Histological and histochemical methods: theory and practice. **Oxford: Pergamon Press**, p. 150, 1990.

KIM, B.M.; EICHLER, J.; REISER, K.M.; RUBENCHIK, A.M.; SILVA, L.B. Collagen structure and non-linear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 27, p. 329-3547, 2000.

KIM, J.C.; TSENG, S.C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v.14, n. 5, p. 473-84, 1995.

KIM, D.; PROVENZANO, P.P.; SMITH, C.L.; LEVCHENKO, A. Matrix nanotopography as regulator of cell function. **Journal of Cell Biology**, v. 197, n. 3, p. 351-360, 2012.

KIRKWOOD, J.E. **Liquid Crystalline Collagen: Matrices for oriented cell growth**. Tese (Doutorado) – Stanford, EUA, 2008.

KOIZUMI, N.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N.J.; KAWASAKI, S.; TANIOKA, H.; KOIZUMI, K.; KOCIOK, N.; JOUSSEN, A.M.; KINOSHITA, S. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. **Graefes Archive Clinic and Experimental Ophthalmology**, v. 245, n.1, p.123-34, 2007.

KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R.; USUI, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, n. 7, p. 1539-46, 2001.

KUCH, I.M.; SCOTT P.G. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. **Connective Tissue Research**, v.36., n.4, p. 287-296, 1997.

LATTOUF, R.; YOUNES, R.; LUTOMSKI, D.; NAAMAN, N.; GODEAU, G.; SENNI, K.; CHANGOTADE, S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 751-8, 2014.

LEHN, J.M. Toward self-organization and complex matter. **Science**, v. 295, p.2400-2401, 2002.

LI, W.; HAYASHIDA, Y.; CHEN, Y.T.; TSENG, S.C.G. Niche regulation of corneal epithelial stem cell at the limbus. **Cell Research**, v.17, p. 26-36, 2007.

LISTER, T.; WRIGHT, P. A.; CHAPPELL, P. H. Optical properties of human skin. **Journal Biomedical Optics**, v. 17, n. 9, p. 90901-1, 2012.

LISON, L.. **Histochimie et Cytochimie Animales: Principes et Methodes**. Gauthier-Villar, Paris, p. 239-294, 1960.

LOHMANDER, L.S.; DE LUCA, S.; NILSSON, B.; HASCALL, V.C.; CAPUTO, C.B.; KIMURA, J.H. Oligosacharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. **Journal of Biology Chemistry**, v.255, n.13, p.6084-6091, 1980.

LOUIS-DORR, V.; NAOUN, K.; ALLE, P.; RASPILLER, A. Linear dichroism of the cornea. **Applied Optics**, v. 43, p. 1515-21, 2004.

LOUREIRO, R.R.; CRISTOVAM, P.C.; MARTINS, C.M.; COVRE, J.L.; SOBRINHO, J.A.; RICARDO, J.; HAZARBASSANOV, R. M.; HOFLING-LIMA, A. L.; NISHI, M.; GOMES, J.A.P. Comparison of culture media for ex vivo expansion of limbal epithelial progenitor cells. **Molecular Vision**, v.19, p. 69-77, 2013.

LIAO, J.; VESELY, I. Skewness angle of interfibrillar proteoglycans increases with applied load on mitral valve chordae tendineae. **Journal Biomechanics**, v.40, p.390–398, 2007.

LV, H.; LI, L.; ZHANG, Y.; CHEN, Z. SUN, M. XU, T.; TIAN, L.; LU, M.; REN, M.; LIU, Y.; LI, Y. Union is strength: matrix elasticity and microenvironmental factors codetermine stem cell differentiation fate. **Cell and Tissue Research**, 2015.

MALHOTRA, C.; JAIN, A.K. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. **World Journal Transplantation**, v. 4, n. 2, p. 111-21, 2014.

MATAVELLI, F.D.; HAN, S.W.; NADER, H.B.; MENDES, A.; KANISHIRO, R. TUCCI, P. Long-term effects remodeling. **Growth Factors**, v. 27, p. 22-31, 2009.

MARIAPPAN, I.; KACHAM, S.; PURUSHOTHAM, J.; MADDILETI, S.; SIAMWALA, J.; SANGWAN, V. S. Spatial distribution of niche and stem cells in ex vivo human limbal cultures. **Stem Cells Translational Medicine**, pii: sctm.2014-0120, 2014.

MARTIN-BERMUDO, M.D.; BROWN, N. H., The localized assembly of extracellular matrix integrin ligands requires cell- cell contact. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 3715-3723, 2000.

MARTINS, S.A.R. **Efeito agudo da cirurgia refrativa sobre a síntese de proteoglicanos em explantes de córnea humana**. Tese de doutorado. Departamento de Bioquímica e Oftalmologia. Universidade Federal de São Paulo, SP, 2005.

MATHEWS, M. B. The interaction of collagen and acid mucopolyscharides – a model for connective tissue. **Biochemical Journal**, v. 96, p.710-716, 1965.

MATTIA, E.; OTTO, S. Supramolecular systems chemistry. **Nature Nanotechnology**, v. 10, n. 2, p.111-9, 2015.

MEI, H.; GONZALES, S.; DENG, S.X. Extracellular Matrix is an Important Component of Limbal Stem Cell Niche. **FASEB Journal**, v. 3, n. 4, p. 879-894, 2012.

MEEK, K.M.; FULLWOOD, N.J. Corneal and sclera collagens – a microscopist's perspective. **Micron**, v. 32, n.3, p. 261-72, 2001.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. **Annals Histochemistry**, v.18, p.103-122, 1973.

MICALIZZI, D.M.; FARABAUGH, S.M.; FORD, H.L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Glad Biology and Neoplasia**, v, 15, n. 2, p117-34, 2010.

MICHELACCI, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.8, p. 1037-1046, 2003.

MIRI, A.; AL-AQABA, M.; OTRI, A.M.; FARES, U.; SAID, D.G.; FARAJ, L.A.; DUA, H. S. In vivo confocal microscopic features of normal limbus. **British Journal of Ophthalmology**, v. 96, n. 4, p. 530- 6, 2012.

MUKHOPADHYAY, M. GORIVODSKY, M.; SHTROM, S.; GRIMBERG, A.; NIEHRS, C.; MORASSO, M. I.; WESTPHAL, H. Dkk2 plays an essential role in the corneal fate of the ocular surface epithelium. **Development**, v. 133, n. 11, p.2149-54, 2006.

MÜLLER, L.J.; PELS, E.; SCHURMANS, L.R.H.M.; VRENSSEN, G.F.J.M. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibers I the human corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v.78, p.494-501, 2004.

NEWTON, R.H.; MEEK, K.M. The integration of the corneal and limbal fibrils in the human eye. **Biophysical Journal**, v. 75, p.2508-2512, 1998.

OJALA, T.; PIETIKÄINEN, M.; MÄENPÄÄ, T. Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 24, n. 22, p. 971-987, 2002

OVADIA, J.; NIE, Q. Stem Cell Niche Structure as an Inherent Cause of Undulating Epithelial Morphologies. **Biophysical Journal**, v. 104, p. 237–246, 2013.

PALMER, L. C.; VELICHKO, Y.S., CRUZ, M. O.; STUPP, S. I. Supramolecular self-assembly codes for functional structures. **Philosophical Transactions A Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 365, n. 1855, p. 1417- 33, 2007.

PAOLI, F. **Análise estrutural, morfológica e funcional do tendão flexor digital superficial de frangos**. Tese de doutorado em biologia celular e estrutural, na área de Histologia. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

PARK, J.; KEMP, N.J.; RYLANDER III, H.G.; MILNER, T.E. Complex polarization ratio to determine polarization properties of anisotropic tissue using polarization-sensitive optical coherence tomography. **Optic Express**, v. 17, p. 13402-17, 2009.

PELLEGRINI, G.; DE LUCA, M. Eyes on the Prize: Limbal Stem Cells and Corneal Restoration. **Stem Cells**, v. 15, n. 2, p. 121-122, 2014.

PELLEGRINI, G.; GOLISANNO, O.; PATERNO, P.; LAMBIASE, A.; BONINI, S.; RAMA, P.; DE LUCA, M. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. **Journal Cell Biology**, v. 145, n. 4, p. 769-82, 1999.

PELLEGRINI, G.; TRAVERSO, C.E.; FRANZI, A.T.; ZINGIRIAN, M.; CANCELEDDA, R.; DE LUCA, M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. **Lancet**, v. 349, n. 9057, p. 990-3, 1997. Comment in: **Lancet**, v. 349, n. 9064, p.1556, 1997.

PONTES, K.C.S.; BORGES, A. P. B.; DUARTE, T. S.; MORATO, G. L.; ZAVAN, V.; ELEOTÉRIO, R. B.; CARLO, E. C. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos – Aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1069-1074, 2008.

PONTES, K.C.S.; DUARTE, T. S.; MACHADO, D. P. D.; SEPÚLVEDA, R. V.; RAMOS, D. R.; BORGES, A. P. B.. Membrana amniótica bovina, preservada em glicerina, no tratamento de úlcera de córnea em um cão e de sequestro corneal em dois felinos – Relato de casos. **Revista Clínica Veterinária**, n.85, p.88-96, 2010.

PRABHASAWAT, P.; TESAIBUL, N.; KOMOLSURADEJ, W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. **British Journal Ophthalmology**, v. 85. p. 1455-1463, 2001.

PUANGSRICHAREN, V.; TSENG, S.C.G. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. **Ophthalmology**, v. 102, p. 1476-85, 1995.

RENDAL-VÁZQUEZ E, SAN-LUIZ-VERDES A, YEBRA-PIMENTEL-VILAR T, LÓPEZ-ROQDRÍGUEZ I, DOMENECH-GARCÍA N, ANDIÓN-NÚÑEZ C, BLANCO-GARCÍA F. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. **Cell and Tissue Banking**, v. 13, p. 513-519, 2012.

RETAMOSO, L.B.; DA CUNHA, T.D.E.M.; KNOP, L.A.; SHINTCOVSK, R.L.; TANAKA, O.M. Organization and quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth movement. **Micron**, v.40, n. 8, p. 827-30, 2009.

RETAMOSO, L.B.; MONTAGNER, F.; CAMARGO, E.S.; VITRAL, R.W.; TANAKA, O.M. Polarized light microscopic analysis of bone formation after inhibition of cyclooxygenase 1 and 2. **Anatomical Records**, v. 293, n. 2, p. 195-9, 2010.

RIAU, A.K.; BEUERMAN, R.W.; LIM, L.S.; MEHTA, J.S. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 216-225, 2009.

RIBEIRO, J.F.; ANJOS, E.H.M.; MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Skin collagen fiber molecular order: a pattern of distributional fiber orientation as assessed by optical anisotropy and image analysis. **PLOSone**, (8):e54724, 2013.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment. **Brazilian Journal of morphological Sciences**, v. 22, n.2, p. 97-104, 2005.

RIFES, P.; THORSTEINSDÓTTIR, S. Extracellular matrix assembly and 3D organization during paraxial mesoderm development in the chick embryo. **Developmental Biology**, v. 368, n. 2, p. 370-81, 2012.

ROY, K. Biomaterials as Stem Cell niche. **Springer Science and Business Media**, p. 317, 2010.

RUOSLAHTI, E. Structure and biology of proteoglycans. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 4, p. 229-55, 1988.

SAHU, K.; VERMA, Y.; SHARMA, M.; RAO, K.D.; GUPTA, P.K. Non-invasive assessment of healing of bacteria infected and uninfected wounds using optical coherence tomography. **Skin Research Technology**, v. 16, n. 4, p. 428-37, 2010.

SAKAI, M; SHIMIZU, S.; ITO, S.; Viscoelastic Indentation of Silicate Glasses. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 85, n. 5, p. 1210-16, 2004.

SAKAI, S.; YAMANARI, M.; LIM, Y.; NAKAGAWA, N.; YASSUNO Y. In vivo analysis of human skin anisotropy by polarization-sensitive optical coherence tomography. **Photon Therapy Diagnostic VII**, 7883:78830Q-1, 2011.

SAMPAIO, R.L.; RANZANI, J.J.T.; RODRIGUES JÚNIOR, V. STACCIARINI, M. S.; BRAGA, E. M.; BORREZI, C.. Aspectos clínicos e imunológicos da ceratoplastia com membrana amniótica xenógena fresca e conservada em glicerina. Estudo experimental em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Medicina veterinária e Zootecnia**, v.58, p.1077-1085, 2006.

SANGWAN, V.S.; IFTEKHAR, G.; REDDY, P.; MATALIA, H.; BALASUBRAMANIAN, D.; VERMUNGATI, G.K. Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. **Journal Postgraduate Medice**, v. 19, n. 52, p. 257-61, 2006.

SAVENKOY, S.M.; SYDUROK, O.L. Conditions for polarization elements to be dichroic and birefringent. **Journal of the Optical Society of America**, v. 7, p. 1447-52, 2005.

SCHERMER, A.; GALVIN, S.; SUN, T.T. Differentiation related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. **Journal Cell Biology**, v. 103, p. 49-62, 1986.

SCHILLER, J.; HUSTER, D. New methods to study the composition and structure of the extracellular matrix in natural and bioengineered tissues. **Biomatters**, v. 2, n. 3, p. 115-131, 2012.

SCHLÖTZER-SCHREHARDT,U.; KRUSE, F. E. Identification and characterization of limbal stem cells. **Experimental Eye Research**., v. 81, n. 3, p. 247-264, 2005.

SCHMITZ, N.; LAVERTY, S.; KRAUS, V.B.; AIGNER, T. Basic methods in histopathology of joint tissues. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 3, p. 113- 6, 2010.

SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R.; HUGHES, E.W.; Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation. **Biochemical Journal**, v. 195, n. 3, p. 573-81, 1981.

SCOTT, J.E. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. **Journal Anatomy**, v. 187, Pt. 2, p. 259–269, 1995.

SELLARO, L.T. **Effects of collagen orientation on the medium-term fatigue response of heart valve biomaterials**. 93f. Dissertação (Mestrado). University of Pittsburgh, Pitisburgo, 1999.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A.K. Biotechnological approach of Microbial Lipase: A Review. **Biotechnology**, v. 10, n.1, p. 23-40, 2011.

SHIMAZAKI, J.; SHINOZAKI, N.; TSUBOTA, K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. **British Journal Ophthalmology**, v. 82, n. 3, p. 235-40, 1998.

SHORTT, A.J.; SECKER, G.A.; MUNRO, P.M.; KHAW, P.T.; TUFT, S.J.; DANIELS, J.T. Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells. **Stem Cells**, v. 25. p. 1402-1409, 2007.

SILBERMANN M, FROMMER J. Ultrastructural localization of acid phosphatase in cartilage of young mandibular condyles. **Histochemie**, v.37, n.4, p.365–369, 1973.

SILVA , D.F.; GOMES, A.S.; VIDAL, C.B.; RIBEIRO, M.S. Birefringence and second harmonic generation on tendon collagen following red linearly polarized laser irradiation. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 41, n. 4, p. 752-62, 2013.

SILVA, D. F.; VIDAL, B. C.; ZESEL, D.M.; ZORN, T.M.; NUNEZ, S.C.; RIBEIRO, M.S. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 11, n. 2, p. 024002, 2006.

SWEET, M.B., THONAR, E.J.; IMMELMAN, A.R. Regional distribution of water and glycosaminoglycan in immature articular cartilage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.500, n.1, p.173:86, 1977.

TAN, K.K.; GIAN, C.S.; LEOW, M.Y.; CHAN, C.W.; YIM, E.K. Differential cell adhesion of breast cancer stem cells on biomaterial substrate with nanotopographical cues. **Journal Functional Biomaterials**, v.6, n. 2, p. 241-58, 2015.

TSAI, R.J.; SUN, T.T.; TSENG, S.C. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. **Ophthalmology**, v. 97, n. 4, p. 446-55, 1990.

TSENG, Q.; DUCHEMIN-PELLETIER, E.; DESHIERE, A.; BALLAND, M.; GUILLOU, H.; FILHOL.O.; THÉRY, M. Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell-cell junction positioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n.5, p.1506-1511, 2012.

TSENG, S.C.; PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; GRAY, T.; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Archives of Ophthalmology**, v. 116, n. 4, p. 431-41, 1998.

TSENG, S.C.; MELLER, D.; ANDERSON, D.F.; TOUHAMI, A.; PIRES, R.T.; GRÜTERICH, M.; SOLOMON, A.; ESPANA, E.; SANDOVAL, H.; TI, S.E.; GOTO, E. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane for treating corneal diseases with total limbal stem cell deficiency. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 506, p. 1323-1324, 2002.

TSUBOTA, K.; TODA, I.; SAITO, H.; SHINOZAKI, N.; SHIMAZAKI, J. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. **Ophthalmology**, v. 102, n. 10, p. 1486-96, 1995.

VAN DER REST, M.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEB Journal**, v.5, p.2814-2823, 1991.

VERHAEGEN, P.H.H.M.; MARLE, J.V.; ANDREAS, K.; SCHOUTEN, H.J.; GAFFNEY, E.A.; MAINI, P.K.; MIDDELKOOP, E.; ZUIJLEN, P.P.M.V. Collagen bundle morphometry in skin and scar tissue: a novel distance mapping method provides superior measurements compared to Fourier analysis. **Journal of Microscopy**, v. 245, p. 82–89, 2012.

VIDAL, B.C. Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. **Revistada Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP**, v.4, p. 1-11, 1994.

VIDAL, B.C.; MELLO, M. L.S. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochemica**, v. 112, p. 53-61, 2010.

VIDAL, B.C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. **Protoplasma**, v. 56, p.529-536, 1963.

VIDAL, B.C. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. **Protoplasma**, v. 59, p.472–479, 1964.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.; GODO, C.; CASEIRO, A.C.; ABUJADI, J.M. Anisotropis Properties os Silver Plos Fod- Impregnated collagen bundles ABD and from birrefringence curves. **Ann Histochem**, v. 20, p. 15-26, 1975.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye Ponceau SS to collagen fibers. **Biopolymers**, v.73, p.121-128, 2006.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.; Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochem.**, v.112, n. 1, p.53-61, 2010.

WANG, J.H.; THAMPATTY, B.P. Mechanobiology of adult and stem cells. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 271, p.301-46, 2008.

WEBBER, M.J.; KESSLER, J.A.; STUPP, S.I. Emerging peptide nanomedicine to regenerate tissues and organs. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 1, p. 71-88, 2010.

WIED, G.L. In Introduction to quantitative cytochemistry. **New York: Academic Press**, p.557-600, 1966.

WHITTAKER, P.; KLONER, R.A.; BOUGHNER, D.R.; PICKERING, J.G. **Basic Research in Cardiology**, v. 89, n. 5, p. 397-410, 1994.

WHITTAKER, P.; BOUGHNER, D.R.; KLONER, R.A. Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. **American Journal Pathology**, v.134, p.879–893, 1989.

WOLBANK, S.; STALDLER, G.; PETERBAUER, A.; GLILICH, A.; KARBIENER, M.; STREUBEL, B.; WIESER, M.; KATINGER, H.; VAN GRIENSVEN, M.; REDL, H.; GABRIEL, C.; GRILLARI, J.; GRILLARI-VOGLAUER, R. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 7, p 1843- 54, 2009.

WYNN, R.M.; CORBETT, J.R. Ultrastructure of the canine placenta and amnion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 103, n.6, p. 878, 1969.

YOON, J.H.; HALPER, J.; Tendon proteoglycans: biochemistry and function. **Journal Musculoskelet Neuronal Interactive**, v.5, n. 1, p. 22-34, 2005.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome: "membrana amniótica na reconstrução da superfície ocular"

Local: Departamento de Oftalmologia / UNIFESP-EPM

Rua Botucatu, 821 - São Paulo-SP, 04023-062

Fone: (0xx11) 5085-2010

A membrana amniótica é a camada interna da placenta, a bolsa que envolve o feto dentro do útero materno. Após o parto tipo cesárea, a placenta é removida e submetida a limpeza com soro fisiológico. Em seguida, a membrana amniótica é separada do resto da placenta e submetida a lavagens com soluções antibióticas. Após isso é cortada em pequenos fragmentos que são colocados em meio de preservação e congelados em temperatura muito baixa para posterior utilização. Exames do sangue da placenta são feitos para a pesquisa de doenças como sífilis, hepatite e AIDS. A membrana só será utilizada se estiver sem infecção, com os resultados dos exames negativos.

A membrana amniótica já vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de doenças em várias áreas da medicina, como nas queimaduras, úlceras da pele, cirurgias de cabeça abdômen, pelve e olho, entre outras.

No olho, o transplante de membrana amniótica vem sendo utilizado na reconstrução da superfície ocular nos casos de doenças cicatriciais, tais como queimaduras, penfigóide e síndrome de Stevens Johnson, entre outras; no tratamento de afinamento e perfuração da córnea e esclera; no tratamento de pterígio e tumores conjuntivais; associação a enxertos de conjuntiva e limbo.

Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária nesse estudo, que tem como objetivo A DOAÇÃO DA PLACENTA, visando somente a utilização da membrana amniótica para a reconstrução da superfície ocular.

Procedimentos realizados

As pacientes incluídas nesse estudo serão doadoras de placenta, durante a cirurgia de parto cesárea que a voluntária estiver sendo submetida. O médico obstetra cirurgião, após o nascimento do bebê, irá colocar a placenta em uma bacia estéril, que será levada para o laboratório pelo responsável.

No laboratório, o responsável irá separar a membrana amniótica do córion, irá proceder várias lavagens com soro fisiológico a fim de retirar todos os resíduos de sangue. Posteriormente irá lavar com solução PBS contendo antibióticos e antifúngicos, e cortar em pequenos fragmentos para preservação em meio próprio. Os fragmentos de membrana amniótica serão armazenados em freezer -80°C até o momento do uso.

Cirurgia

A cirurgia será realizada no Amparo Maternal, sob responsabilidade do pessoal do hospital.

Possíveis Benefícios do Estudo

Participar deste estudo que poderá ajudar muitos pacientes que possuem falência límbica ou outras doenças que prejudicam a sua visão.

Possíveis Riscos do Estudo

Não há riscos associados a essa doação, além dos que as pacientes já estão sendo submetidas no procedimento eletivo (cirurgia de parto cesárea).

Garantia de Acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. O médico responsável é o Dr. José Álvaro Pereira Gomes que poderá ser encontrado na Rua Botucatu, 821, fone: 11-5085-2010.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Botucatu, 572 - 1º andar conj 14: tel 55 (11) 5571-1062 / 55 (11) 5539-7162

É garantida a liberdade da retirada de consentimento, a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Direito de Confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente.

Os pesquisadores têm o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com meu médico sobre a minha decisão de participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data: / /

Assinatura do médico responsável

Data: / /

Assinatura da testemunha

Data : / /