



AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE TÉCNICAS DE DESEPITELIZAÇÃO DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS GLICEROLADAS

MICROSCOPIC EVALUATION OF DEEPIHELIZATION TECHNIQUES OF GLYCEROLATED AMNIOTIC MEMBRANE.

César Isaac¹, Mônica Beatriz Mathor², Walci Teodoro³, Viviane Fernandes de Carvalho⁴, Rolf Gemperli¹, André de Oliveira Paggiaro¹⁻⁴

Submetido: 18/12/2016

Aprovado: 21/02/2017

RESUMO:

Introdução: A membrana amniótica (MA) é considerada um biomaterial com propriedades biológicas benéficas ao processo de reparação tecidual servindo também como substrato para o cultivo de células epiteliais. **Objetivo:** estabelecer um método de desepitelização amniótica que preserve a membrana basal. **Método:** Foram testados 7 tipos diferentes de desepitelização enzimática de membranas amnióticas gliceroladas, avaliando-se cada um por microscopia óptica e posteriormente, por microscopia eletrônica. **Resultado:** A exposição das membranas à Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos permitiu a completa retirada epitelial com a menor delaminação quando comparado aos outros métodos testados. A microscopia eletrônica evidenciou que após desepitelização com Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos a membrana basal permanecia íntegra. **Conclusão:** Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos permite completa desepitelização das MAs com preservação da membrana basal.

DESCRITORES: Âmnio; Glicerol; Membrana Basal; Células Cultivadas.

ABSTRACT:

Introduction: The amniotic membrane (MA) is considered a biomaterial with biological beneficial properties to tissue repair, also serving as a substrate for the epithelial cells culture. **Objective:** to establish a method of amniotic deepithelization that preserves the basement membrane. **Methods:** Seven different types of enzymatic deepithelization of glycerolated amniotic membranes were tested, each by light microscopy and then electron microscopy. **Results:** Exposure of the membranes to Trypsin 0.05% / 0.02% EDTA for 20 minutes allowed complete epithelial removal with the lowest delamination when compared to other methods tested. Electron microscopy showed that after deepithelization with 0.05% Trypsin / 0.02% EDTA for 20 minutes the basement membrane remained intact. **Conclusion:** 0.05% trypsin / 0.02% EDTA for 20 minutes allows complete deepithelization of the MAs with basement membrane preservation.

DESCRIPTORS: Amnion; Glycerol; Basement Membrane; Cultured Cells

¹ Banco de Tecidos do Instituto Central HCFMUSP

² IPEN-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

³ Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia (LM 17) - FMUSP

⁴ Universidade Guarulhos – Pós-Graduação em Enfermagem

**RESUMEN:**

Introducción: La membrana amniótica (AM) se considera un biomaterial con propiedades biológicas beneficiosas para el proceso de reparación de los tejidos también sirve como sustrato para el cultivo de células epiteliales. **Objetivo:** Establecer un método de deepithelization amniótico que preserve la membrana basal. **Método:** Hemos probado siete tipos diferentes de escarificación enzima gliceroladas membranas amnióticas, la evaluación de cada por microscopía óptica y más tarde por microscopía electrónica. **Resultados:** La exposición de las membranas a 0,05% de tripsina / 0,02% de EDTA durante 20 minutos como resultado la eliminación completa del epitelio con menos delaminación en comparación con los otros métodos ensayados. La microscopía electrónica mostró que después de la escarificación con 0,05% de tripsina / 0,02% de EDTA durante 20 minutos permaneció membrana basal intacta. **Conclusión:** 0,05% de tripsina / 0,02% de EDTA durante 20 minutos permite la escarificación completa sin embargo la preservación de la membrana basal.

PALABRAS CLAVE: Amnios; Glicerol; Membrana Basal; Células Cultivadas

Introdução

A membrana amniótica (MA) é a mais interna das membranas fetais, originando-se do citotrofoblasto subjacente à face dorsal do disco germinativo. A MA é histologicamente muito semelhante ao tecido cutâneo e quando aplicada à ferida, forma uma barreira contra a invasão bacteriana, reduz a perda de fluidos corpóreos e proteínas, diminui a dor e aporta fatores de crescimento e moduladores da cicatrização ao leito. Por conseguinte, restabelece condições ideais para que os processos de cicatrização endógenos progridam satisfatoriamente^{1,2,3}.

Com a evolução das técnicas de cultivo celular associadas aos conceitos de bioengenharia de tecidos, Schwab (1999)⁴ descreveu o uso das MA como um substrato ao cultivo de células límbicas, com o intuito de construir uma espécie de córnea artificial. O uso do âmnio como um biomaterial de suporte ao cultivo dessas células começou a ser utilizado para o tratamento de algumas patologias oftálmicas, como simbléfaro e pterígio, apresentando resultados clínicos favoráveis^{5,6,7}.

Koizumi et al.⁸ compararam o cultivo de células límbicas sobre MA intactas ou

deseptelizadas por EDTA. Em seus resultados, evidencia-se que as células migram mais rapidamente sobre a membrana denudada e o epitélio final é mais estratificado e organizado. Por outro lado, com a presença das células epiteliais, a morfologia das células límbicas fica alterada e o epitélio desorganizado, quase que completamente em monocamada. As células próximas à camada basal, que deveriam adquirir um aspecto colunar, mostram-se cilíndricas, semelhantes às das camadas mais superficiais da epiderme.

Outros autores também apontam a importância da deseptelização para o cultivo celular e a formação de epitélios mais estratificados^{9,10}. Koizumi et al.⁸ consideram que a exposição da matriz extracelular estromal seria um fator estimulador ao crescimento e à organização do tecido cultivado. Yang et al.¹¹ avaliam que a existência de resíduos de membrana basal ocasionaria melhor estratificação.

Não existe concordância sobre qual método de deseptelização é o mais adequado para a separação do epitélio amniótico. Essa controvérsia decorre do fato de as técnicas descritas retirarem as células epiteliais e ao mesmo tempo acarretar

danos as demais camadas do tecido, ocasionando uma delaminação.

Melo et al.¹² compararam diferentes protocolos usando dispase, tripsina e EDTA por tempos variados de exposição e avaliam seus resultados em microscopia óptica e eletrônica. Observam que o EDTA, mesmo seguido de fricção mecânica, é um método com pouca eficácia na retirada das células. A tripsina e a dispase, nos tempos testados, desepitelizavam completamente o âmnio e, ao mesmo tempo, retiravam a membrana basal. Assim, recomendam novos estudos sobre o assunto, enfatizando a necessidade de redução do tempo de ação das enzimas.

Almejando a solução desses impasses, este artigo propõe estudar diferentes protocolos de desepitelização e padronizar o método ideal que cause menor desestruturação tecidual e preserve a membrana basal.

Objetivo:

Determinar um método de desepitelização de membranas amnióticas gliceroladas que preserve a estrutura tecidual e a membrana basal íntegra.

Método

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microcirurgia e Cirurgia Plástica (LIM 04) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sendo aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 1 de setembro de 2008, sob o n. 0309/08.

As membranas amnióticas (MA) foram cedidas pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas (BT-ICHC) e os experimentos de avaliação microscópica da membrana basal, no Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia (LIM 17) da FMUSP.

a) Triagem das doadoras

O BT-ICHC cedeu quatro membranas amnióticas provenientes de doações voluntárias que preenchiam os seguintes critérios: gestantes jovens (20-35 anos), com gestações sem intercorrências, pós-partos de cesarianas com conceitos normais, sem antecedentes médico-sociais que contraindicassem a doação e que fossem confirmadas como sorologicamente negativas para contato com HIV, Hepatite B e C, HTLV, Doença de Chagas, Sífilis, CMV e Toxoplasmose no momento do parto, e após 6 meses, para HIV e Hepatite B e C.

b) Processamento das membranas amnióticas

Ainda em centro cirúrgico, após a dequitação placentária, coletaram-se as MA de forma estéril. A obtenção do tecido foi realizada por uma manobra digitiforme capaz de separá-lo do córion. Transportou-se o material ao laboratório (LIM 04) e, a partir desse instante, todo o manuseio ocorreu dentro da proteção do fluxo laminar. O âmnio foi lavado e limpo com soro fisiológico. A seguir, depositou-se o material em solução salina com antibióticos (penicilina cristalina – 1.000.000 U/L e sulfato de estreptomicina – 1g/L) por 6 horas a 4° C.

Removidos os resíduos remanescentes, as membranas foram expostas a uma solução de glicerol de concentração >85%, com antibióticos semelhantes aos da solução salina, sendo mantidas sob agitação a 37 °C durante duas horas. Transcorrido esse intervalo, efetuou-se a troca da solução de glicerol >85% por uma fresca. Em seguida, o âmnio foi apostado sobre papel-filtro, com a porção epitelial mais brilhante voltada para cima e recortado em formato retangular de 8 X 7 cm. Cada uma das amostras retangulares foi duplamente embalada em plástico validado para essa finalidade e armazenado a 4 °C, configurando um lote de tecido. Portanto, cada uma das MA foi capaz de fornecer diversos lotes de tecido.

c) Padronização do método de desepitelização

Para a realização dos testes de desepitelização foi utilizado um lote de cada uma das quatro membranas amnióticas. Em condições de trabalho em fluxo laminar (VECO®) e com técnica asséptica, todas foram reidratadas em solução fisiológica por 30 minutos para a completa remoção do glicerol. Cada um desses lotes de 8 X 7 cm foi recortado em oito fragmentos de 2 X 1,5 cm. Um desses fragmentos foi enviado para análise histológica em hematoxilina-eosina (HE), como controle de teste pré-desepitelização. A partir de então, cada um dos restantes foi exposto a um diferente método enzimático de retirada epitelial:

a. Incubação em dispase a 0,04% (Protease Neutra – grau II, Boehringer-Manheim, Alemanha) por 45 minutos, a 37 °C.

b. Incubação inicial em dispase a 0,04% (Protease Neutra – grau II, Boehringer-Manheim, Alemanha) por 30 minutos, seguida de tripsina 0,05%/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,02% (GIBCO®) por 15 minutos, a 37 °C.

c. Incubação em EDTA 0,02% por 2 horas a 37 °C, seguido por fricção mecânica para a retirada das células epiteliais.

d. Incubação em tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (GIBCO®) variando-se o tempo de exposição em: 15, 20, 30 e 45 minutos, a 37 °C.

A seguir foram conservadas em formaldeído 10% e enviadas para inclusão em parafina. Após os cortes histológicos, foram coradas por HE.

d) Análise por microscopia óptica

Cada uma das lâminas foi analisada em microscópio óptico Olympus BX2, e, com base nessa análise, determinou-se o melhor método de desepitelização utilizando-se os seguintes critérios de escolha: retirada completa do epitélio e manutenção do restante da estrutura histológica do âmnio.

Determinado o protocolo de desepitelização, essa escolha foi avaliada por microscopia eletrônica para verificação da presença de membrana basal após a retirada do epitélio do âmnio.

e) Avaliação do método de desepitelização por microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de 0,5 cm X 0,8 cm de MA glicerolada e desepitelizadas (pelo método escolhido por microscopia óptica) foram preparadas segundo protocolo padrão para visualização em microscopia eletrônico e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips modelo Tecnai 10.

Resultados

Após a reidratação, a análise em microscopia óptica das MA controle conservadas

em glicerol revelou que a arquitetura estrutural do tecido permanecia preservada. A monocamada de epitélio colunar estava aderida ao estroma, porém as células mostravam claros sinais de morte celular com um núcleo celular mais brilhante e picnótico. As células epiteliais mostravam uma adesão entre si, não sendo observados intervalos entre elas. As demais camadas amnióticas também estavam presentes, sendo possível inclusive a visualização de fibroblastos no tecido (Figura 1).

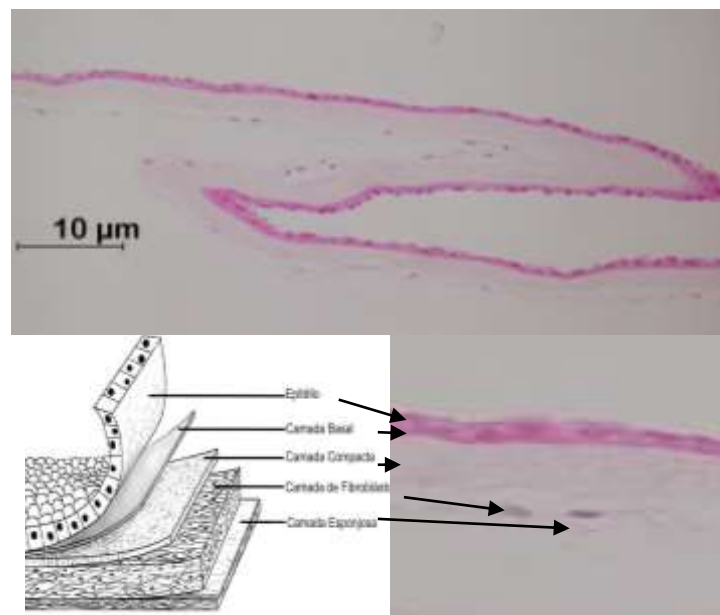


Figura 1. Membrana amniótica preservada em glicerol – microscopia óptica: Observa-se a manutenção da arquitetura do tecido com a existência das cinco camadas amnióticas. (Coloração HE, aum: 200X)

a) Padronização da desepitelização das MA-ni

Em todas as técnicas de desepitelização testadas, a estrutura macroscópica das membranas manteve-se íntegra. Embora estivessem mais finas e suscetíveis a rompimentos por traumas mecânicos, mesmo assim, a manipulação de todas foi possível sem a destruição das amostras.

A disperse 0,04% por 45 minutos retirava completamente o epitélio (Figura 2), em contrapartida, causava uma destruição importante

Nessa padronização, objetivou-se identificar por microscopia óptica o método de desepitelização que fosse capaz de retirar todo o epitélio do tecido, mantendo as características estruturais das demais camadas.

das demais camadas da membrana, com eliminação dos fibroblastos e delaminação da estrutura colágena residual.



Figura 2. Dispase a 0,04% por 45 minutos – microscopia óptica: nota-se a ausência completa de células epiteliais, porém com destruição da estrutura colágena de todas as camadas amnióticas. (Coloração HE, aum: 400X.)

Nas amostras, submetidas à incubação inicial em dispase a 0,04% por 30 minutos, seguida de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos (Figura 3), observou-se completa retirada

do epitélio, entretanto, a destruição da estrutura colágena foi ainda maior, inclusive com áreas de completa separação das camadas amnióticas.

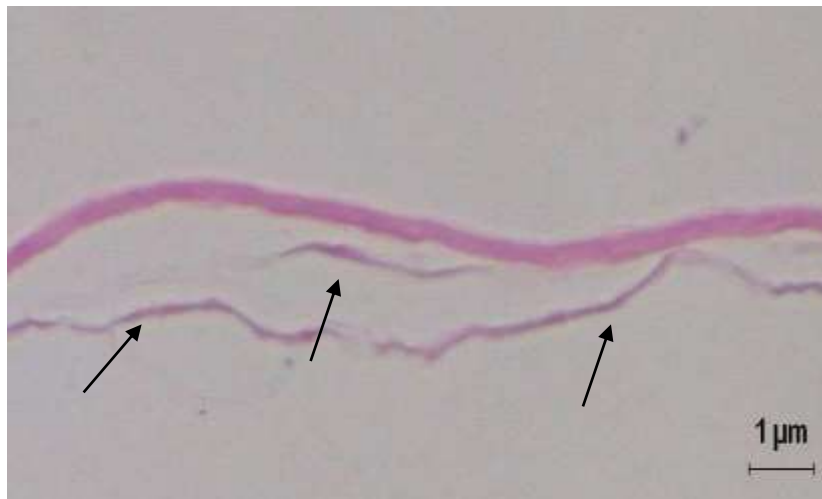


Figura 3. Dispase a 0,04% por 30 minutos, seguida por tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos – microscopia óptica: nota-se a ausência completa de células epiteliais e delaminação das demais camadas amnióticas. A seta indica áreas em que houve a separação de camadas estromais da estrutura conjuntiva. (Coloração HE, aum: 400X.)

O banho em EDTA 0,02% por 30 minutos seguido de fricção mecânica foi ineficaz (Figura 4). Na análise em microscopia óptica, pode-se

perceber uma retirada epitelial bastante heterogênea, sendo que, em algumas áreas, as

células foram retiradas, entretanto, em outras, o epitélio estava praticamente íntegro.

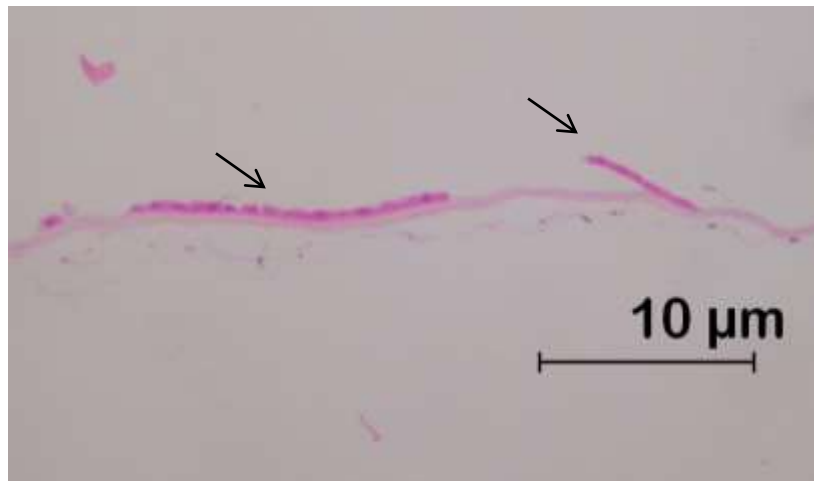


Figura 4. EDTA 0,02% por 30 minutos seguido de fricção mecânica - microscopia óptica: presença de restos epiteliais ao longo de toda a superfície da membrana, indicada nas setas. (Coloração HE, aum: 200X.)

A imersão em tripsina 0,05 % /EDTA 0,02% por 45 (Figura 5) e 30 minutos (Figura 6) resultou em uma completa denudação do epitélio, porém com delaminação das camadas colágenas. Por outro lado, a exposição por 15 minutos (Figura 7) preservava a arquitetura do tecido, mas não era

suficiente para retirar todo o epitélio. Com o tempo de 20 minutos (Figura 8), ocorreu a completa retirada do epitélio, com a menor destruição da arquitetura amniótica quando comparada com os resultados obtidos nas demais formas de desepitelização.

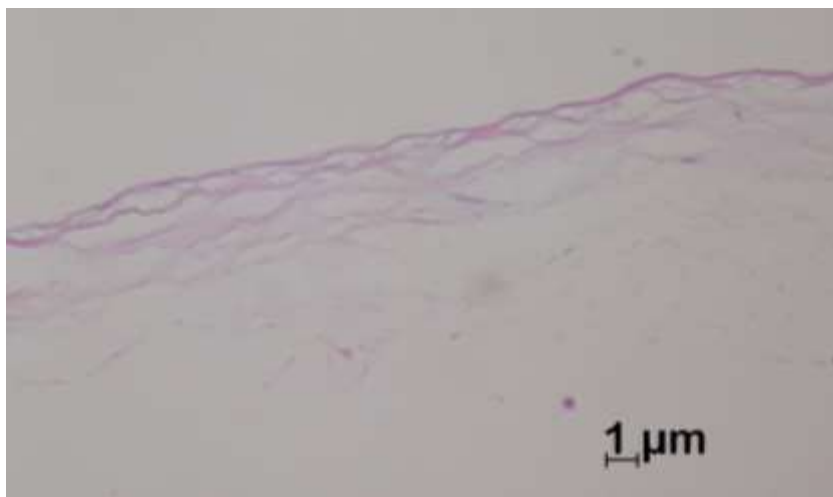


Figura 5. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 45 minutos – microscopia óptica: ausência completa de epitélio com importante delaminação e separação estromal. (Coloração HE, aum: 400X.)

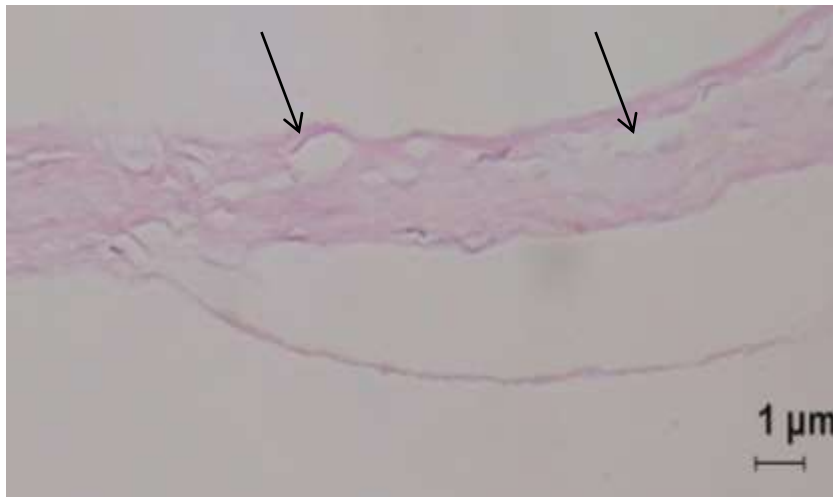


Figura 6. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 30 minutos – microscopia óptica: ausência completa de epitélio com destruição estromal e vacuolização da estrutura colágena apontada pela seta. (Coloração HE, aum: 400X.)

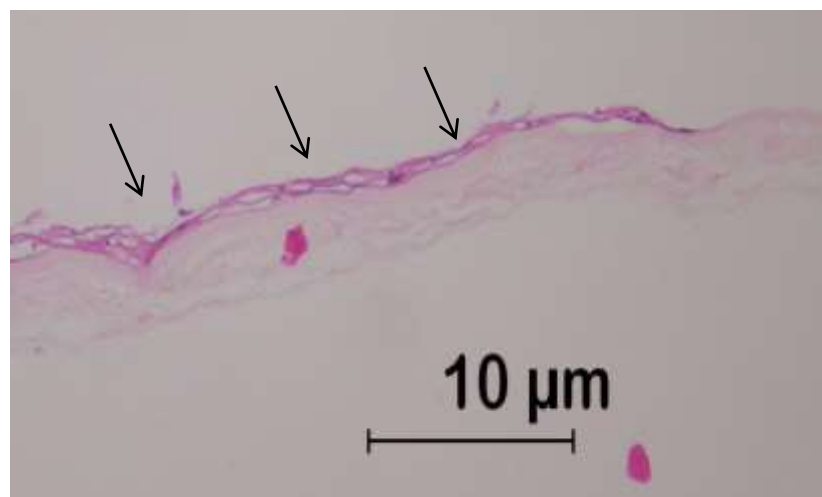


Figura 7. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 15 minutos – microscopia óptica: nota-se, na superfície, a existência de restos epiteliais, apontados pelas setas. (Coloração HE, aum: 200X.)



Figura 8. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos – microscopia óptica: observa-se, na superfície, a completa ausência de restos epiteliais com a menor destruição estromal em comparação a todos os outros métodos. (Coloração HE, aum: 400X.)

Desse modo, escolhemos a exposição a tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos (Figura 8) como o método padrão de desepitelização para a realização da análise por microscopia eletrônica.

b) Avaliação do método de desepitelização por microscopia eletrônica de transmissão

Após a definição da técnica de desepitelização, utilizou-se a análise em microscopia eletrônica para confirmação da

persistência da continuidade da membrana basal na estrutura do tecido.

No menor aumento (Figura 9A), nota-se a presença de material eletrodense em toda a superfície da estrutura e, sobre ele, resquícios de material eletroluscente. Nos maiores aumentos (Figura 9B), confirmam-se esses achados, evidenciando-se uma irregularidade na disposição do material eletroluscente da superfície. A observação desses achados indica a persistência da membrana basal.

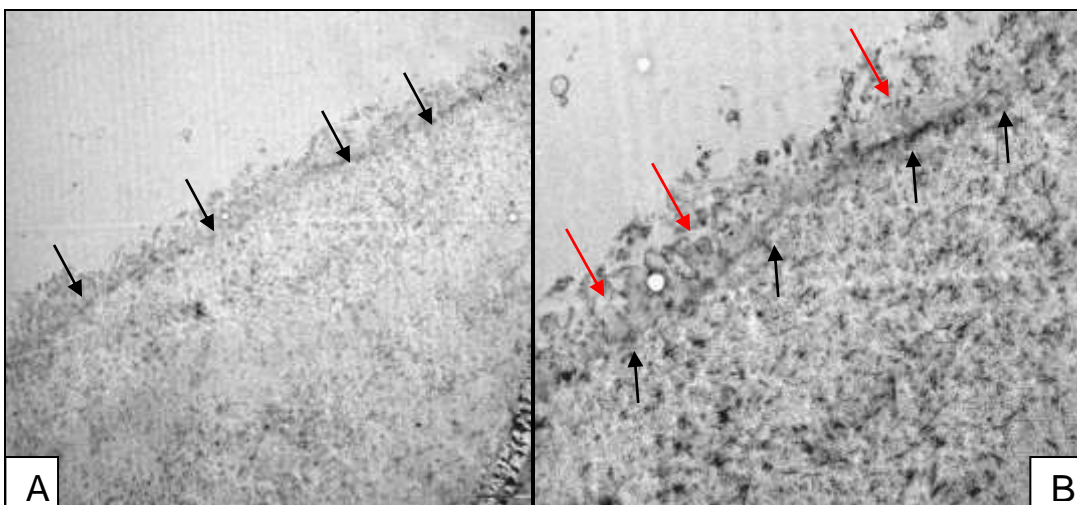


Figura 9. Tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos – microscopia eletrônica: A - ausência completa de células epiteliais e presença de material eletrodense indicando presença da membrana basal (continuidade indicada pelas setas)(aum: 2.550X). B - material eletroluscente (setas de cor preta) irregular sobre material eletrodense (setas de cor vermelha)(aum: 6.200X).

Discussão

A busca por fatores de estimulação da regeneração tecidual propicia o surgimento de alternativas terapêuticas com o objetivo de substituir os transplantes convencionais de órgãos e tecidos por mecanismos mais simples e seguros de restauração dos tecidos lesados¹³.

Nesse contexto, o âmnio é um biomaterial com grande potencial de reparação tecidual, servindo como uma matriz de regeneração ou um substrato para o transplante de células autógenas e alógenas cultivadas¹³. A análise histológica das membranas gliceroladas utilizadas como controle evidenciou sua arquitetura preservada, no entanto, com claros sinais de inviabilidade dos componentes celulares (Figura 1). Os estudos de Rejzek et al.³ indicam resultados semelhantes aos nossos, também com picnose dos núcleos das células epiteliais e destruição de mitocôndrias. A confirmação da morte celular pela exposição ao glicerol proporciona um benefício ao intuito de usar o âmnio como biomaterial.

Neste trabalho foram testadas diversas técnicas de desepitelização amniótica e analisado seu efeito na estrutura tecidual. A enzima dispase popularizou-se com Green et al.¹⁴ em sua utilização para soltura de epitélios confluentes de queratinócitos. Em relação à desepitelização amniótica, Spurr e Gipson¹⁵ demonstram que a dispase retira o epitélio mantendo-o íntegro, em contrapartida, deteriora a membrana basal e demais camadas do âmnio. Corroborando esses

resultados, também não obtivemos sucesso com dispase, pois a destruição das demais camadas era demasiadamente intensa (Figuras 2 e 3).

O uso exclusivo de EDTA foi insatisfatório. A exigência do “raspador” de células prejudica o trabalho pela fina espessura do tecido, levando a rompimentos da membrana durante a raspagem. Histologicamente, fica clara a ineficácia do processo, identificando-se células aderidas em diversos locais (Figura 4).

Os melhores resultados foram conseguidos com a associação de tripsina ao EDTA. A ação conjunta dessas substâncias tem seu uso consagrado nas técnicas de isolamento celular¹⁴. No tempo de 45 e 30 minutos de exposição (Figuras 5 e 6), a retirada do epitélio foi completa, mas com excessiva delaminação. Com 15 minutos (Figura 7), restos celulares ainda podiam ser notados, já com 20 minutos (Figura 8), observamos a retirada completa do epitélio e a menor delaminação das demais camadas. Por isso, esse foi o método considerado ideal para os estudos em microscopia eletrônica.

Com o intuito de esclarecer o ponto de clivagem de liberação epitelial, foram realizadas análises em microscopia eletrônica de transmissão. Após a exposição à tripsina/EDTA por 20 minutos, visualizou-se que as membranas amnióticas gliceroladas apresentavam preservação da estrutura da membrana basal (Figura 9 A e B).



A microscopia eletrônica foi conclusiva quanto à existência de membrana basal após o processo de desepitelização. A manutenção da membrana basal é fundamental para o desenvolvimento dos epitélios cultivados, derivando em estruturas mais organizadas e estratificadas. Herson et al.¹⁶ comparam a área de junção dermoepidérmica a um trilho que orienta a migração e estruturação do novo epitélio. A interação entre os queratinócitos e a membrana basal contribui para a manutenção da arquitetura tissular, estimulando diversos processos biológicos como a adesão, proliferação, diferenciação e migração celular¹⁷.

Para a construção de substitutos dermoepidérmicos baseados no cultivo de queratinócitos sobre qualquer tipo de matriz de origem biológica ou sintética, sabe-se que a preexistência de componentes da membrana basal, além de contribuir para a melhora da morfologia da epiderme, tem papel fundamental na formação dos hemidesmossomos e no desenvolvimento da lâmina densa¹⁷ Assim sendo o protocolo de desepitelização escolhido parece promissor ao cultivo de células humanas sobre a membrana amniótica desepitelizada.

Conclusão

A exposição de membranas amnióticas gliceroladas em solução enzimática de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 20 minutos permite a sua completa desepitelização com manutenção da integridade da membrana basal.

REFERÊNCIAS:

1. Sanches R, Molina A, Lopes V, Generation of Two Biological Wound Dressings as a Potential Delivery System of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ASAIO J.* 2015 Nov 61(6): 718–725
2. Loeffelbein D, Rohleder N, Eddicks M, Baumann C, Stoeckelhuber M, Evaluation of Human Amniotic Membrane as a Wound Dressing for Split-Thickness Skin-Graft Donor Sites. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 572183.
3. Rejzek A, Weyer F, Eichberger R, Gebhart W. Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute: light and electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank.* 2001; 2(2):95-102.
4. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1999; 97:891-986.
5. Singhal S, Vemuganti GK. Primary adult human retinal pigment epithelial cell cultures on human amniotic membranes; cultures on human amniotic membranes. *Indian J Ophthalmol.* 2005; 53(2):109-13.
6. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Modulation of keratin and connexin expression in limbal epithelium expanded on denuded amniotic membrane with and without a 3T3 fibroblast feeder layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(10):4230-6.



7. Li W, He H, Kuo CL, Gao, Y, Kawakita T, Tenseg SC. Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(6):2381-9.
8. Koizumi N, Rigby H, Fullwood N, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K et al. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245(1):123-34.
9. Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S. Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea.* 2003b; 22:70-1.
10. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Nakamura T et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:93-9.
11. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Hanakama Y, Hirakawa S, Sayama K, Hamuro J, Hashimoto K. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *J Dermatol Sci.* 2009; 56(3):188-95.
12. Melo GB, Gomes JA, Glória MA, Martins MC, Haapalainen EF. Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da membrana amniótica humana. *Arq Bras Oftalmol.* 2007; 70(3):407-11.
13. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci.* 2007; 105:215-28.
14. Green H, Kehinde O, Thomas J Growth of cultured human epidermis cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Acad Sci USA.* 1979; 76:5665-8.
15. Spurr SJ, Gipson IK. Isolation of corneal epithelium with Dispase II or EDTA. Effects on the basement membrane zone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985; 26(6):818-27.
16. Herson MR. Estudo da composição *in vitro* de substituto cutâneo dermoepidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
17. Kim SW, Park KC, Kim HJ, Cho KH, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Lee JS, Park KD. Effects of collagen IV and laminin on the reconstruction of human oral mucosa. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58:108-12.