

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Ian Göedert Leite Duarte

**MEMBRANA AMNIÓTICA
COMO CURATIVO BIOLÓGICO
NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS COM PERDAS DE
SUBSTÂNCIA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2014

Ian Göedert Leite Duarte

**MEMBRANA AMNIÓTICA
COMO CURATIVO BIOLÓGICO
NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS COM PERDAS DE
SUBSTÂNCIA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Linha de pesquisa: Inflamação e cicatrização.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Dr. Francisco José Penna

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia:

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomes

IAN GÖEDERT LEITE DUARTE

**MEMBRANA AMNIÓTICA COMO CURATIVO BIOLÓGICO NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS COM PERDAS DE
SUBSTÂNCIA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Tese apresentada no dia 11 de abril de 2014 perante a banca examinadora constituída pelos professores doutores:

Prof. Dr. Paulo Roberto da Costa

Prof. Dr. Rui Lopes Filho

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

Prof^a. Dr^a. Sumara Marques Barral

Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo (Orientadora)

Aos meus amados pais, Izon e Aparecida, pelo exemplo de vida e constante incentivo.

Ao meu amado marido Renato e aos meus amados filhos, Mateus e André, pelo carinho, paciência, incentivo e total reconhecimento pelas horas em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo, minha orientadora, pela paciência, confiança e ensinamentos, sempre com muito profissionalismo, mostrando os caminhos da pesquisa no decorrer da pós-graduação. Muito obrigada e meu eterno respeito e admiração.

Aos meus futuros colegas de trabalho, os acadêmicos Mateus Duarte Leite, Paula Vitória Sobral e à médica Verônica Di Mari, pela ajuda na coleta de artigos e durante toda a pesquisa, por estarem comigo no Biotério para a coleta de dados e tratamento com os animais, principalmente nos finais de semana, quando ficaram afastados de seus entes queridos e entretenimentos. Agradeço do fundo do meu coração.

Ao meu querido amigo Prof. Dr. Rafael Barbuto, pela presença frequente e palavras de carinho, incentivo e conforto sempre que precisei! Meu eterno reconhecimento.

À Prof^a. Dr^a. Paula Vidigal, patologista, pela dedicação e colaboração nas peças para o estudo histopatológico e pelos ensinamentos no manuseio com as lâminas. Obrigada pela oportunidade.

Ao Biotério da UFMG, nas pessoas de Marcelo e Derlin, pela receptividade, por me proporcionarem o desenvolvimento prático do experimento, pelos cuidados e carinhos com os animais, agradeço muito.

À minha secretária Juliana Costa, pelo constante apoio, por controlar meu consultório, minha agenda e meus pacientes, quando necessário.

À Prof^a. Dr^a. Myriam Fátima de Siqueira Celani, ginecologista, que de maneira voluntária e particular colaborou na obtenção da membrana amniótica.

Ao Fernando Henrique Pereira, do Departamento de Bioestatística da Faculdade de Medicina da UFMG, por todo empenho, cuidados e carinho com que me ajudou a analisar os dados e chegarmos a um resultado estatístico, agradeço sinceramente.

À Mari, secretária do Departamento de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, por todas as horas que acredito tê-la deixado desesperada em resolver as coisas, um grande beijo e meu agradecimento.

Aos professores de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia da UFMG, pela amizade, atenção e paciência em nos orientar nas matérias.

Aos funcionários da Pós-Graduação da UFMG, pelo respeito, dedicação e colaboração.

Aos meus pais, irmãos e amigos, pela presença, mesmo quando ausentes.

Aos amigos e colegas de jornada na Pós-graduação, pelo apoio, dias e horas inesquecíveis nestes anos.

Às ratas utilizadas neste estudo, meu respeito e agradecimento.

Às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo, meu agradecimento eterno.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende com o que ensina.”

Cora Coralina

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Médias das medidas por aproximação, em cm ² , das áreas cruentas no dia da indução das feridas, 13° e 27° dias em ratas wistar não tratadas: controle (Cont) ou tratadas com colagenase (Col), membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).....	42
TABELA 2- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou infiltrado inflamatório nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).....	46
TABELA 3- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou tecido de granulação nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).....	46
TABELA 4- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou reação de células gigantes a corpo estranho, nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).....	47
TABELA 5- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou necrose nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).Diferença significativa entre os grupos Cont e MP, no sexto dia, com p = 0,014.	48
TABELA 6- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou fibroplasia jovem nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).Diferença significativa entre os grupos Col e MP, no sexto dia, com p = 0,016.	48
TABELA 7- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou fibroplasia organizada nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont);colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).....	49

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1-** Médias das medidas das áreas cruentas das feridas no dia de suas induções (0), em dorso de ratas wistar não tratadas controle: Cont0; tratadas com colagenase: Col0; tratadas com membrana amniótica fresca: MF0 e membrana amniótica preservada: MP0. Sem diferença significativa entre os grupos..... 43
- GRÁFICO 2-** Médias das medidas das áreas cruentas das feridas induzidas em dorso de ratas wistar no 13° dia (1) nos grupos não tratadas controle (Cont1), ou tratadas com colagenase (Col1), membrana amniótica fresca (MF1) ou membrana amniótica preservada (MP1). Diferença significativa entre os grupos Cont e MF, com $p=0,001$ 44
- GRÁFICO 3-** Médias das medidas das áreas cruentas das feridas induzidas em dorso de ratas wistar no 27° dia(2) e pertencentes aos grupos não tratadas controle (Cont2), tratadas com colagenase (Col2), tratadas com membrana amniótica fresca (MF2) ou membrana amniótica preservada (MP2). Diferença significativa entre os grupos Cont e MF, com $p=0,005$ e entre os grupos MF e MP, com $p=0,035$ 45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Desenho esquemático da descrição das camadas da membrana amniótica descritas por Bourne.	25
FIGURA 2- Acomodação de 42 animais do estudo, em estantes com gaiolas individuais na sala de pequenos animais do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG.....	29
FIGURA 3- Animais após sedação. A: depilação do dorso do animal com lâmina, após tonsura com tesoura e marcação da área de 2cmx2cm. B: exposição do plano da fáscia muscular após excisão de toda pele e subcutâneo.....	31
FIGURA 4- Membrana amniótica. A: mantida mergulhada em solução tampão por 1 hora. B: membrana amniótica sendo estirada para corte em fragmentos de aproximadamente 5cmx5cm.	32
FIGURA 5- Membrana amniótica. A: fixada em papel de nitrocelulose. B: papel de nitrocelulose com a MA colocados em um frasco de boca larga, contendo 10 mL glicerina a 98%.	32
FIGURA 6- Ferida exposta, com aplicação da pomada de collagenase, antes da homogeneização do produto na ferida.....	33
FIGURA 7- Ferida. A: recebendo a aplicação única de MAF. B: MAF fixada à ferida com pontos de nylon 6.0.	34
FIGURA 8- Ferida. A: recebendo a aplicação única de MAP retirada do papel de nitrocelulose. B: MAP sendo fixada à ferida com pontos de nylon 6.0.....	35
FIGURA 9- Área de demarcação em quadrantes da ferida, para a retirada da peça para biópsia: parte da ferida e parte da pele sadia.....	36
FIGURA 10- A e B: o delineamento das áreas das feridas, em filme de acetato.....	37
FIGURA 11- Desenhos das áreas nos primeiro, 13° e 27° dias. Verde: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo Cont. Azul: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo Col. Lilás: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo MF. Vermelho: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo MP.....	38

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

Anexo A	Certificado de aprovação do CEUA.....	64
Anexo B	Termo de consentimento do Comitê de Ética Hospitalar.	65
Anexo C	Termo de consentimento para obtenção da membrana amniótica.	66
Apêndice A	Protocolo de avaliação da histologia.	67
Apêndice B	Número de achados de parâmetros histológicos das feridas, com a soma dos achados: ausentes com discretos e moderados com acentuados.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comitê de Ética em Utilização de Animais
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Col	Grupo tratado com colagenase
Cont	Grupo controle tratado a seco
DG	Diretrizes Gerais
EGF	Fator de crescimento epitelial
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HGF	Fator de crescimento hepático
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLAA	Antígenos de leucócitos humanos tipo A
HLAB	Antígenos de leucócitos humanos tipo B
HLAC	Antígenos de leucócitos humanos tipo C
HLAD	Antígenos de leucócitos humanos tipo D
IL1	Interleucina1
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
MA	Membrana amniótica
MAF	Membrana amniótica fresca
MAP	Membrana amniótica preservada
MF	Grupo tratado com membrana amniótica fresca
MMP	Matriz metaloproteases
MP	Grupo tratado com membrana amniótica preservada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PVPI	Polivinilpirrolidona-iodo
SST	Solução salina tamponada
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF α	Fator transformador de crescimento α
TGF β	Fator transformador de crescimento β
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VDRL	Veneral Disease Research Laboratory
α SMA	Alfa actina do músculo liso

ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO	19
2-OBJETIVOS	27
3-MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Comitê de Ética	28
3.2. Material e Métodos.....	28
3.2.1. Animais utilizados e cuidados dispensados	28
3.2.2. Cálculo do tamanho da amostra	29
3.2.3. Registro fotográfico	29
3.3. Desenho do experimento	29
3.4. Indução das feridas	30
3.5. Obtenção, preparo e preservação da membrana amniótica	31
3.6. Tratamentos instituídos	33
3.6.1. Tratamento do grupo controle Cont	33
3.6.2. Tratamento com desbridamento químico no grupo Col.....	33
3.6.3. Tratamento com membrana amniótica fresca no grupo MF.....	34
3.6.4. Tratamento com membrana amniótica preservada no grupo MP	35
3.7. Obtenção de amostras das feridas	36
3.7.1. Avaliação macroscópica	37
3.7.2. Avaliação microscópica	39
3.8. Destinação dos animais ao término do estudo	40
3.9. Análise estatística.....	40
4- RESULTADOS.....	42
4.1. Medidas macroscópicas das feridas (áreas cruentas)	42
4.2. Microscopia dos grupos Cont, Col, MF e MP, nos sexto, 13 ^o 20 ^o e 27 ^o dias	45
4.2.1. Infiltrado inflamatório	45
4.2.2. Tecido de granulação	46
4.2.3. Reação de células gigantes a corpo estranho	47
4.2.4. Necrose	47
4.2.5. Fibroplasia jovem	48
4.2.6. Fibroplasia antiga ou organizada	49
5- DISCUSSÃO	50
6- CONCLUSÕES	57

7- REFERÊNCIAS	58
8- ANEXOS E APÊNDICES	64

RESUMO

Introdução: Extensas perdas cutâneas, consequentes a traumas ou operações, apresentam grande incidência de complicações. Várias terapêuticas podem ser úteis, visto que essas afecções requerem tratamentos intervencionistas, onerosos, com inúmeras internações e preparos para enxertias. **Objetivo:** Avaliar o uso da membrana amniótica (MA), fresca e preservada em glicerina a 98%, como curativo biológico em extensas perdas cutâneas induzidas no dorso de ratas, observando-se, à macroscopia, a redução da área cruenta e, histologicamente, as fases inflamatória, de granulação e fibroplasia. **Métodos:** Estudaram-se 56 ratas submetidas à indução de feridas em seu dorso e aleatoriamente distribuídas em quatro grupos: Cont, Col, MF e MP. O grupo Cont não recebeu qualquer tratamento, ficando a ferida exposta e seca. O grupo Col recebeu tratamento exposto diário com colagenase. O grupo MF recebeu a membrana amniótica fresca uma única vez, permanecendo exposto, sem curativos e o grupo MP recebeu a membrana amniótica preservada uma única vez, permanecendo exposto, sem curativos diários. Cada grupo continha 14 animais, sendo sete de cada grupo biopsiados nos sexto, 13º, 20º e 27º dias após a indução das feridas, e os demais avaliados macroscopicamente, no primeiro dia, 13º e 27º dias após a indução das feridas. **Resultados:** À macroscopia, no 13º dia, as áreas cruentas foram significativamente maiores nos grupos Cont e MF e no 27º dia as áreas cruentas no grupo MF foram significativamente maiores que aquelas observadas nos grupos Cont e MP. À microscopia a reação inflamatória, o tecido de granulação, a reação de células gigantes a corpo estranho, e a fibroplasia organizada não mostraram diferença significativa entre os grupos em nenhuma fase cicatricial. A fibroplasia jovem mostrou diferença entre os grupos Col e MP no sexto dia, e a presença de áreas de necrose foi maior no grupo MP no sexto dia quando comparada com os outros grupos. **Conclusões:** A MAF desencadeou um menor fechamento das áreas cruentas, comparada aos outros grupos. A MAF e MAP, não alteraram significativamente as fases cicatriciais inflamatória, de granulação e fibroplasia organizada. A MAP manteve o processo de angiogênese presente até no 20º dia.

Descritores: Membrana amniótica. Inflamação. Curativo biológico. Ferida aberta. Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

Introduction: Extensive skin losses following trauma or surgery are often prone to complications. Several treatments can be useful because these conditions often require costly and invasive treatments with a number of hospitalizations and preparations for grafts. **Objective:** To assess the use of amniotic membrane (AM), both fresh and preserved in glycerin 98%, as a biological bandage for extensive skin loss induced on the back of rats, observing the contraction of the bleeding areas macroscopically and the scarring (in the inflammatory, granulation, and fibroplasia stages) histologically. **Methods:** Fifty-six rats were submitted to wound induction on their backs and randomly distributed into four groups: Cont, Col, FM and PM. Group Cont did not receive any treatment, and the wound was left dry and exposed. Group Col received daily exposed treatment with collagenase. Group FM received the fresh amniotic membrane, whereas group PM received the preserved amniotic membrane, both groups remaining exposed without daily bandages. Each group contained fourteen animals, and seven of each group was biopsied on the 6th, 13th, 20th, and 27th days after wound induction, and the remainder were assessed macroscopically on the 1st, 13th, and 27th day. **Results:** Macroscopically, on the 13th day, there was a significant difference between the injury areas of groups Cont and FM. On the 27th day, the injury area of group FM was significantly larger than in groups Cont and PM. Microscopically, there was no significant difference regarding inflammatory reaction, granulation tissue, giant cell reaction to foreign body, and fibroplasia between any of the groups in any of the scarring stages. Early fibroplasia was different between groups Col and PM, and there were larger necrotic areas in the PM group on the 6th day. **Conclusions:** FAM triggered a minor closure of raw areas, compared to the other groups. FAM and PAM did not significantly alter the inflammatory healing phases, granulation and organized fibroplasia. The PAM remained the process of angiogenesis even at the present day 20.

Keywords: Amniotic membrane. Inflammation. Open wound. Biological dressing. Healing wound.

1- INTRODUÇÃO

O interesse por tratamentos às injúrias cutâneas, na tentativa de seus reparos, vem evoluindo desde a antiguidade, onde os curativos sempre foram relevantes e a sua utilização foi extremamente empregada em feridas tanto nas mais simples quanto nas mais complexas^{1,2}.

Feridas podem ser definidas como descontinuidades agudas ou crônicas de quaisquer partes moles do corpo, com ou sem prejuízos de suas funções básicas, e causadas por fatores externos e ou internos. Classificam-se de acordo com sua etiologia, complexidade e tempo de existência³. De acordo com Smaniotto, (2010)³, Ferreira e cols., definiram critérios para classificar as feridas complexas separando-as das simples. Fazem parte do grupo das complexas as com extensas perdas cutâneas, que ocorrem em consequência de traumas, operações com grandes ressecções tumorais e desbridamentos. Geralmente, requerem um tempo cicatricial prolongado, com riscos de complicações e em sua maioria, demandam internações frequentes, com preparo para posteriores enxertias de pele ou confecções de retalhos, acarretando um impacto negativo sobre o equilíbrio psíquico, social e econômico dos pacientes^{1,2,3}. Esses tratamentos frequentemente evoluem para uma cicatriz inestética e pouco funcional.

Na tentativa de diminuir o tempo de cicatrização das feridas, vem-se utilizando diversos materiais para suas coberturas buscando manter o ambiente propício a uma reparação tissular mais rápida, com pouca ou nenhuma sequela. Muitas coberturas utilizadas apresentam contraindicações para alguns tipos de feridas. O filme de poliuretano não deve ser utilizado em feridas infectadas ou exsudativas; o hidrocolóide é contraindicado em feridas exsudativas, bem como o hidrogel em feridas infectadas; o carvão ativado e o alginato de cálcio não são recomendados em feridas secas ou com crostas e a collagenase, embora seja um desbridante químico, é pouco efetiva em grandes áreas necróticas; os sais de prata não devem ser usados em quem tem hipersensibilidade à prata e a papaína é contra indicada em feridas limpas e secas^{1,3,4}.

Uma cobertura que altere o microambiente do leito de uma ferida complexa, estimulando sinalizadores endógenos da cicatrização, é chamada de “cobertura inteligente”³. Ainda de acordo com Smaniotto (2010)³, Fan e cols., classificam os curativos em:

- coberturas passivas: curativo aderente, o filme transparente, o hidrogel, o hidrocolóide e o alginato de cálcio.
- coberturas com princípios ativos: curativos de papaína, collagenase.
- coberturas inteligentes: curativos com carvão ativado com prata, espuma com prata, placa de prata.
- coberturas biológicas: matriz de colágeno, matriz de celulose, pele alógena.

A cobertura ideal deveria conter as seguintes características: aderir bem ao ferimento, resistir aos movimentos articulares, não ser citotóxica nem incluir partículas, manter a umidade fisiológica da ferida, remover o excesso de exsudado, permitir a troca gasosa e o isolamento térmico, proporcionar defesa contra as infecções, necessitar de menos observação, e ainda, ser de fácil disponibilidade, fácil manuseio e baixo custo^{1,4}. Não existem evidências que mostrem um melhor produto ou aquele que possa ser utilizado durante todo o processo de cicatrização, principalmente nas feridas com extensas perdas cutâneas, com exposição fásquio-muscular e até ósseas, que exigem uma cobertura com finalidades práticas e funcionais.

A cicatrização é a tentativa do organismo de reparar a área lesada⁴⁻⁷ e é um evento complexo de reações e interações entre células e mediadores bioquímicos^{3,5-7}. Pode ocorrer de três formas: por primeira, por segunda e por terceira intenção^{1,6}. De modo geral, uma ferida com extensa perda cutânea cicatriza-se por segunda ou terceira intenção, em um processo mais demorado e suscetível a complicações, com necessidade de enxertia de pele ou confecções de retalhos.

Os aspectos celulares de uma cicatrização ocorrem em três fases distintas, porém interligadas:

- A primeira fase, a inflamatória, inicia-se imediatamente após a lesão e pode durar seis dias. Inclui a hemostasia, com a formação do trombo fibrinoso com a migração das plaquetas, células endoteliais, polimorfonucleares como neutrófilos e monócitos que vão se transformar em macrófagos, além de vários outros mediadores químicos⁵⁻⁸.
- A segunda fase, a proliferativa, compreende a granulação e a reepitelização, que se iniciam algumas horas após a lesão. O fibrinogênio do exsudado inflamatório transforma-se em fibrina, formando uma rede onde os fibroblastos se multiplicam e ocorre uma intensa proliferação vascular. É o tecido de granulação. A proliferação epitelial ocorre de maneira centrípeta, das bordas para o centro da ferida, por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos, pelo fator transformador de crescimento α (TGF- α) e fator de crescimento epitelial (EGF). Começam a se apresentar os miofibroblastos, uma célula que confere capacidade contrátil à ferida, reduzindo a área cruenta e facilitando a reepitelização⁵⁻⁸.
- A terceira fase, de maturação ou remodelagem, é a responsável por conferir ao tecido cicatricial aspecto próximo ao do tecido normal. Os fibroblastos se transformam em miofibroblastos com características funcionais similares às células do músculo liso, promovendo a contração da ferida. A maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparece do local da ferida, mediante processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos desconhecidos de morte celular. Isso leva à formação da cicatriz com reduzido número de células⁵⁻⁸. As principais citocinas dessa fase são: fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina1 (IL1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epitelial (EGF) e fator transformador de crescimento β (TGF- β)⁹⁻¹². Nesta etapa surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I, que vão se depositando para formar o tecido cicatricial. Alguns eosinófilos aparecem nesta fase final, e acredita-se estarem relacionados com a produção de fatores de crescimento. O

processo de remodelagem envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. A princípio, esta deposição é feita de maneira aleatória e as primeiras fibras que são quebradas pela colagenase são ressintetizadas e arranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente. Ao final desta fase, os anexos da pele sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente^{5,7,8}. Clinicamente, a cicatriz torna-se menos espessa e mais esbranquiçada, com 70% a 80% de sua força de tensão inicial. Ocorre a reorganização da matriz extracelular, que de provisória se torna definitiva.

A intensidade fenotípica das cicatrizes reflete a intensidade dos fenômenos que aí ocorreram^{5,7,8}. Vários tipos de curativos e técnicas de tratamentos tentam controlar ou diminuir a intensidade destes fenômenos na tentativa de obtenção de uma cicatriz o mais natural e funcional possível.

De acordo com Porter (2007)¹¹, a diminuição da área cruenta é uma necessidade da ferida na tentativa de reduzir o tempo de cura da lesão. Inicia-se três a quatro dias após a injúria, com a migração dos fibroblastos, atingindo seu pico máximo em 14 dias¹¹⁻¹³, com a predominância dos miofibroblastos e progredindo lentamente de 0,60mm a 0,75mm por dia, cessando em torno de quatro meses a seis meses.

Os fibroblastos são essenciais na diminuição da área cruenta da ferida e sintetizam fibronectinas, que são segregadas para a matriz extracelular como fibrilas insolúveis, que mantêm as células ligadas à matriz. Na superfície das células estas fibrilas estão sob tensão e alongadas. A migração dos fibroblastos na matriz extracelular é influenciada pelo fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), que vai iniciar a transformação de uma nova matriz rica em colágeno. Este colágeno é predominantemente extracelular e acredita-se que esteja relacionado com os níveis de vitamina C no organismo¹¹. A contração no processo cicatricial de uma ferida se dá das bordas para o centro (centrípeta) e do leito da ferida para suas margens (da profundidade para a superfície)⁹, no intuito de reduzir a área cruenta.

Os fibroblastos, células envolvidas neste processo, se diferenciam em miofibroblastos na matriz extracelular, sob a ação da alfa-actina do músculo liso (α SMA: alfa-smooth muscle actin). Descrito por Sharpe e Martin (2013)⁹ este processo inicial depende de três fatores primários: adesão dos fibroblastos à matriz extracelular via integração com células receptoras; estimulação do TGF β 1 e tensão mecânica da ferida. Porter (2007)¹¹ descreveu que a tensão mecânica na ferida se dá pela força gerada pelas células da parte central da ferida, no tecido de granulação. Há a presença de colágeno tipo I na matriz extracelular nessa fase¹⁰ e outros estudos relataram que o uso de antagonistas do TGF β e inibidores do α SMA para diminuir a contração cicatricial^{11,12}. Estudos *in vitro* sugerem que o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), estimula a apoptose seletiva de miofibroblastos, mas não de fibroblastos.

Porter (2007)¹¹ relatou duas teorias para a redução das áreas cruentas das feridas. A primeira, a teoria do miofibroblasto, onde os fibroblastos adquirem características de fibras musculares lisas, ricos em microfilamentos de actina (fibras de estresse) que, juntamente com a expressão de α SMA, contraem a ferida. Estes miofibroblastos se uniriam por meio de junções desmossômicas célula a célula e célula à matriz (fibronexus), tracionando o colágeno tipo I e III em direção as células, reduzindo o tecido de granulação e mantendo a área contraída. Os miofibroblastos sofrem então apoptose e a ferida se fecha. A rapidez com que os fibroblastos mudam de fenótipo depende do grau de tensão mecânica local e forças que resistem à contração. A segunda teoria, a do fibroblasto, pressupõe que vários fibroblastos exerceriam uma força de tração em todo o centro da matriz, reorganizando e compactando as fibras de colágeno, causando a contração da ferida.

Rhett e cols.(2008)¹² descreveram que os TGF β s são secretados pelas plaquetas, fibroblastos e macrófagos desde o início do processo cicatricial e *in vitro*, são estimulados pelos queratinócitos, mas os TGF β 1 induzem a diferenciação dos miofibroblastos e estão em quantidade diminuída no tecido fetal se comparado com o do adulto, ao contrário de TGF β 3, que está elevado. Acreditam ser este um dos fatores de redução cicatricial no feto. Tratamentos com neutralizadores endógenos de TGF β 1 e TGF β 2 (efeito do fator de

crescimento hepático - HGF) e estimuladores de TGF β 3 são propostos a redução da contração cicatricial, embora ainda segundo os mesmos autores, existem estudos que comprovaram o contrário. O gene *Smad3* é outro mediador do TGF β 1, pesquisado como provável opção para diminuir a contração cicatricial. O estradiol também tem sido sugerido por seus efeitos de diminuir o TGF β 1.

Outro mecanismo de diminuição das áreas cruentas das feridas se relaciona com os fatores de crescimento polipeptídeos assim como os TGF β s, que são secretados no leito das feridas, reduzindo sua área inicial. Diferentes tipos de genes de conexão são expressos: Cx26, Cx30, Cx31 e Cx43 e estão presentes nas camadas epidérmica e dérmica da pele. Eventuais interligações entre genes de conexão com TGF β s, carecem de estudos¹². Inibidores de peptídeos reduzem a zona de oclusão¹, localizada no leito da ferida, reduzindo sua contração.

Ainda de acordo com Rhett e cols. (2008)¹², além de produtos e substâncias que tentam reduzir os valores de TGF β s e os conectores, o uso de ácido hialurônico (muito presente no feto), HGF, fibromoduladores, inibidores de matriz metaloproteases (MMPs), pro-colágeno C proteinase e dipeptidil peptidase IV, tem sido mencionados como prováveis redutores da contração cicatricial.

Vários métodos de tratamentos tem sido introduzidos com o objetivo de melhorar a cicatrização de feridas complexas. Dentre esses tratamentos, a membrana amniótica (MA) foi testada em vários estudos como cobertura capaz de melhorar a cicatrização após queimaduras¹⁴⁻¹⁷, úlceras^{18,19}, lesões oculares²⁰⁻²², com bons resultados. Não há ainda na literatura estudos avaliando seu uso em feridas com grandes perdas de substância em relação ao melhor resultado cicatricial com menor contração final da área cruenta da ferida.

A membrana amniótica ou âmnio recobre toda a placenta em sua face fetal. Sua estrutura histológica varia desde a concepção até o momento do parto, sendo resistente, lisa, brilhante, flexível e delgada²³⁻²⁵.

Vários autores descreveram as camadas da membrana amniótica e suas características^{20,26,27}, mas de acordo com Matthews (1982)²⁵ as camadas da MA foram descritas por Bourne, em número de cinco. A mais interna, em contato com o líquido amniótico, é formada de uma monocamada de células epiteliais cubóides, não adesiva, rica em citoquinas imunomoduladoras e fatores de crescimento epitelial²⁶. Ela se une mediante interdigitações à segunda camada, a basal, fina e resistente, formada basicamente por fibras reticulares, colágeno tipo IV e laminina. Aderida a esta segunda camada, a terceira, a mesenquimal ou estromal é totalmente avascular, e é dividida em três outras camadas: camada compacta de colágeno (compact collagenous layer), a camada de fibroblastos (fibroblastic layer) e uma última camada, a esponjosa (sponge layer)^{19,26,28,29} (Figura 1).

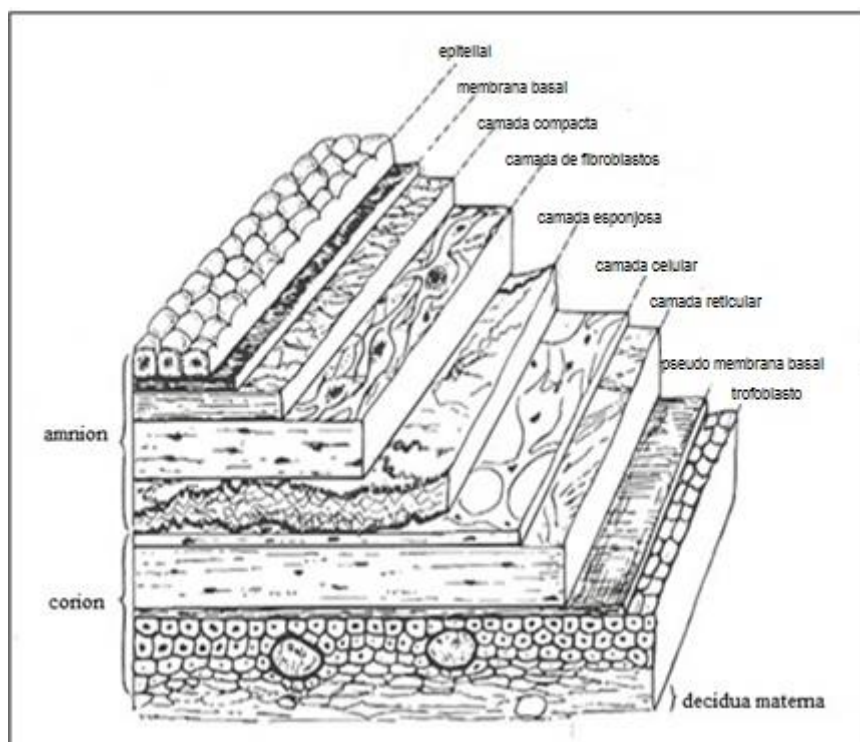


FIGURA 1- Desenho esquemático da descrição das camadas da membrana amniótica descritas por Bourne.

Fonte: MATTHEWS RN. e cols., 1982²⁵.

A face epitelial, também chamada de apical, contém inúmeras microvilosidades e numerosas vesículas dentro do citoplasma das células epiteliais, abundantes organelas como complexo Golgi e retículo endoplasmático. Seu núcleo tem configuração irregular e os nucléolos são frequentemente grandes e homogêneos, sugerindo atividade nuclear²⁷⁻³⁰. Esta estrutura sugere que este epitélio funcione, além de estrutura comum, como um secretor de novas células epiteliais e meio onde ocorre intenso transporte inter e transcelular²⁷⁻³⁰. Esta membrana origina-se precocemente do embrião a partir do epiblasto (ectoderma fetal) e encontra-se aderida ao córion, mas ambos podem ser separados facilmente por dissecação roma.

A MA não tem músculo liso, nervos ou vasos linfáticos e sanguíneos^{20,25,31}. A face em que a membrana amniótica é implantada sobre a lesão reflete sua capacidade como um curativo biológico: se utilizada sua face epitelial, funciona como um suporte biológico e quando usada sua parte estromal funciona como um enxerto^{32,33}. Ninknejad e cols. (2013)²⁶ supõem uma ação angiogênica em sua face estromal devida à capacidade de induzir proliferação endotelial e pela ação anti-angiogênica de sua face epitelial.

A MA tem importância crescente por suas características, como baixa antigenicidade, capacidade de diminuir o exsudado local e aderências, acelerar a reepitelização, reduzir a dor local e ainda agir como substrato para o crescimento de tecidos^{20-22,34-37}. De acordo com alguns trabalhos, essas propriedades permaneceriam mesmo após sua preservação em glicerol³⁸⁻⁴¹. Outra característica que alguns estudos mostraram, é que a MA poderia diminuir a contração da cicatriz em sua fase de maturação, tornando a área final com características macroscópicas mais semelhantes à da pele local^{20,30,36}. A MA assemelha-se ao tecido fetal com a mesma origem embrionária, mantendo suas características, tanto fresca quanto preservada, além de uma plasticidade e a presença de efeitos imunomoduladores⁴²⁻⁵¹.

Por suas características, é possível que a MA possa ser utilizada como curativo biológico, reduzindo o tempo de cicatrização e ou complicações de feridas extensas, atuando de forma a permitir um reparo mais fisiológico da ferida, com melhores resultados estéticos e funcionais na aparência final da cicatriz.

2- OBJETIVOS

Avaliar a membrana amniótica fresca e preservada como curativo biológico, na cicatrização de feridas cutâneas com perdas de substância, em ratas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo nº 140-2010, em reunião no dia 25 de agosto de 2010 (Anexo A).

Os termos de consentimento do Comitê de Ética da UFMG, e de consentimento da paciente para obtenção da MA estão expostos nos Anexos B e C.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Animais utilizados e cuidados dispensados

Foram utilizados 56 ratos da raça *wistar*, fêmeas, adultas jovens, peso médio de 197,8g (195,0g a 256,0g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os animais passaram por um período de aclimação de sete dias, sob temperatura controlada, umidade e ciclo de luz ambiente. No momento da admissão no Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, foram avaliados clinicamente, pesados e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: Cont (controle), Col (colagenase), MF (membrana amniótica fresca) e MP (membrana amniótica preservada). Em sete animais de cada grupo foram realizadas biópsias seriadas, e nos sete animais restantes de cada grupo fez-se a avaliação macroscópica.

Os 56 animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração padrão (Presence Alimentação Animal[®]) à vontade, durante todo o período da experimentação (Figura 2).



FIGURA 2- Acomodação de 42 animais do estudo, em estantes com gaiolas individuais na sala de pequenos animais do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG.

Fonte: Arquivo pessoal

3.2.2. Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado através do endereço eletrônico www.lee.dante.br considerando-se desvio padrão da média para as feridas iniciais de $0,47\text{cm}^2$, com diferença a ser detectada de $0,80\text{cm}^2$, nível de significância de 5%, poder do teste de 85% e teste de hipótese bicaudal. Foi então definido o tamanho da amostra em $n=6$.

3.2.3. Registro fotográfico

As fotografias deste estudo foram registradas com máquina fotográfica D7000 da Nikon com sensor CMOS formato DX de 16,2 MP, disparo contínuo de 6 qps e Full HD (1080p) com foco automático contínuo. Utilizou-se iluminação flash para todas elas, mesmo diante de luz natural. Foram obtidas a uma distância de 50 centímetros (objeto-máquina), em ângulos variados.

3.3. Desenho do experimento

Grupo Cont ($n=14$), controle. Os animais foram submetidos à ferida dorsal, tratada seca e exposta.

Grupo Col (n=14), tratados com colagenase. Os animais foram submetidos à ferida dorsal e tratados com uso diário de colagenase.

Grupo MF (n=14), tratados com membrana amniótica fresca. Os animais foram submetidos à ferida dorsal e tratados com aplicação única de MAF, expostos.

Grupo MP (n=14), tratados com membrana amniótica preservada. Os animais submetidos à ferida dorsal e tratados com aplicação única de MAP, expostos.

Para observação microscópica, sete animais dos grupos Cont, Col, MF e MP, foram avaliados histologicamente nos sexto, 13º, 20º e 27º dias. A avaliação macroscópica foi feita em outros sete animais de cada um dos grupos Cont, Col, MF e MP, por meio da avaliação das áreas cruentas no primeiro, 13º e 27º dias após a indução das feridas.

3.4. Indução das feridas

O procedimento cirúrgico para indução das feridas foi realizado sob anestesia (sedação) com solução de cloridrato de quetamina (50mg/Kg) associada a cloridrato de xilazina (8 mg/Kg), aplicadas por via intramuscular no quarto posterior direito de cada animal, com o objetivo de promover a sedação⁵².

Após confirmação do plano anestésico, pela observação do reflexo coclear negativo, ataxia, reflexos voluntários negativos⁵², fez-se o corte dos pelos no dorso dos animais, em uma extensão de 5cmx5cm, primeiramente com tesoura, seguida da depilação com lâmina. Após a antisepsia com solução aquosa de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) a 10%, procedeu-se a excisão de 2cmx2cm de pele e subcutâneo no dorso dos animais, com exposição do plano da fáscia muscular a aproximadamente 3cm abaixo das bordas internas das escápulas, indo em direção à região pélvica (Figura 3A e B). Para analgesia, todos os animais receberam injeção de cloridrato de nalbufina na dose de 3mg/kg/dia (12/12 horas) nas primeiras 48 horas após indução das feridas.

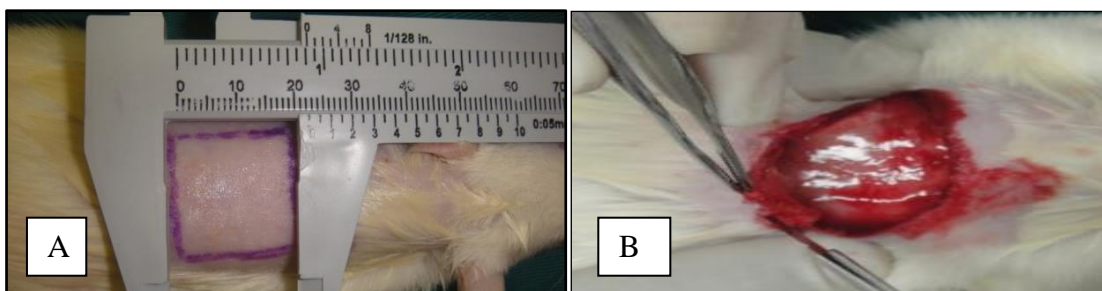


FIGURA 3- Animais após sedação. A: depilação do dorso do animal com lâmina, após tonsura com tesoura e marcação da área de 2cmx2cm. B: exposição do plano da fáscia muscular após excisão de toda pele e subcutâneo.
Fonte: Arquivo pessoal

3.5. Obtenção, preparo e preservação da membrana amniótica

O uso da MA humana, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e pelo Comitê de Ética Hospitalar (Anexo B), e após consentimento livre e esclarecido da paciente (Anexo C) DPS, 33 anos, adulta, durante procedimento de cesariana eletiva, após prenhez a termo de 39 semanas. A paciente apresentava sorologia VDRL negativa, HIV negativa e provas de função hepática sem alterações, assim como ausência de Doença de Chagas. Em condições estéreis, obteve-se uma MA, que foi isolada das demais membranas fetais. Foi lavada em bandeja esterilizada contendo solução salina a 0,9%, em quantidade suficiente para encobri-la, com o objetivo de removerem-se os coágulos. Esta solução salina foi trocada em um total de nove vezes, até que a MA se apresentasse limpa. Em seguida, ela foi imersa em 500 ml de solução salina tamponada (SST), pH 7,2 e contendo cloreto de sódio 0,15 mM /mL e fosfato de potássio 6,5 mM /mL (solução tampão PBS® - Laborclin LTDA. Pinhais, Brasil). A membrana foi deixada nessa solução tampão por 1 hora e, em seguida, cortada em fragmentos de aproximadamente 5cmx5cm (Figura 4A e B) que foram estendidos separadamente sobre papel filtro de nitrocelulose, cor branca, esterilizado, com poros de 0,2 micron de espessura e diâmetro de 6cm (Hybond - ECL®, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra).

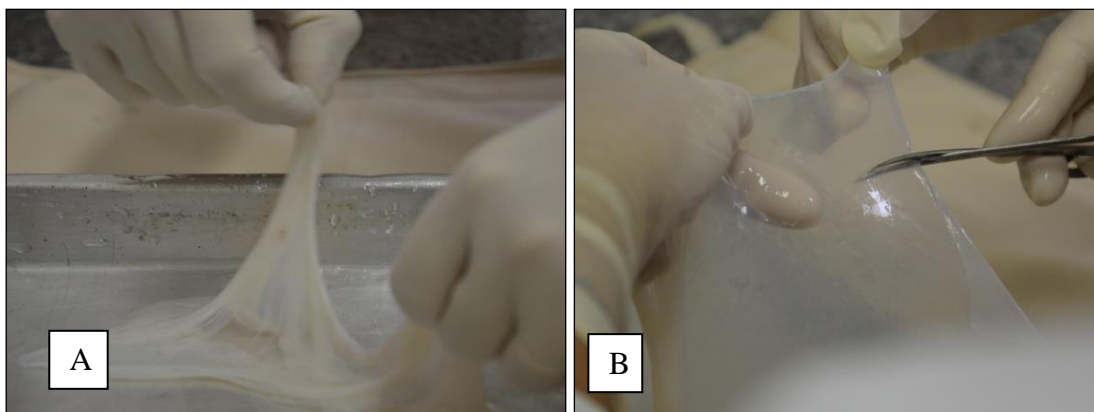


FIGURA 4- Membrana amniótica. A: mantida mergulhada em solução tampão por 1 hora. B: membrana amniótica sendo estirada para corte em fragmentos de aproximadamente 5cmx5cm.

Fonte: Arquivo pessoal

As faces estromais das membranas ficaram em contato com o papel. Em seguida, elas foram imersas em frascos de plásticos esterilizados, de boca larga, contendo 10mL de glicerina a 98% como meio de estocagem, e mantidas sob refrigeração de 8° C até a data de sua utilização, que ocorreu 34 dias após o seu preparo e conservação (Figura 5A e B).

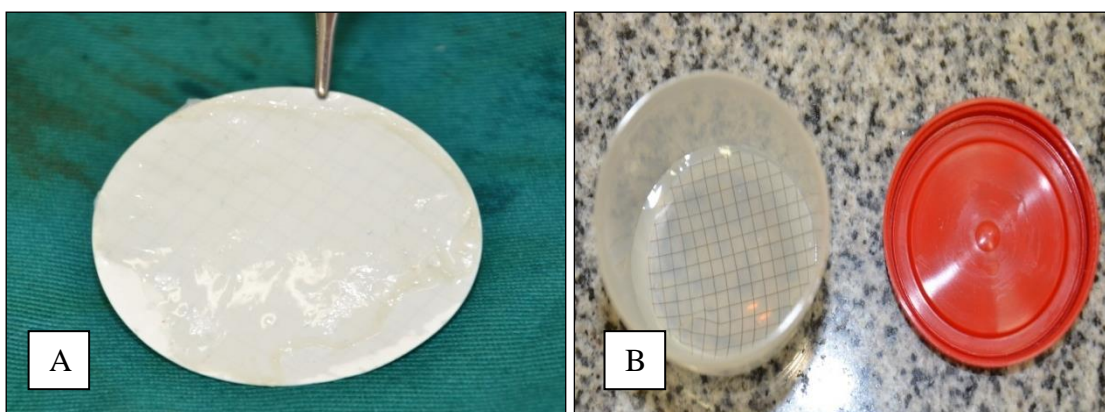


FIGURA 5- Membrana amniótica. A: fixada em papel de nitrocelulose. B: papel de nitrocelulose com a MA colocados em um frasco de boca larga, contendo 10mL glicerina a 98%.

Fonte: Arquivo pessoal

3.6. Tratamentos instituídos

3.6.1. Tratamento do grupo controle: Cont

Os 14 animais do grupo Cont foram mantidos em suas gaiolas individuais sem que suas lesões fossem limpas diariamente. Desses, sete animais foram avaliados nos sexto, 13º, 20º e 27º dias após a indução das feridas, que foram fotografadas e após a limpeza com solução salina a 0,9%, realizada biópsia de suas feridas. Os outros sete animais do grupo, foram fotografados e suas feridas permaneceram expostas e secas, sem gazes, oclusões ou qualquer intervenção local.

3.6.2. Tratamento com desbridamento químico no grupo Col

Os 14 animais do grupo Col foram mantidos em gaiolas individuais e receberam aplicação tópica diária em suas feridas, pela manhã, de 1,2 UI de collagenase clostridiopeptidase A e 0,24 UI de suas proteases por grama de pomada, sem limpeza prévia, que permaneceram expostas, sem gazes ou oclusões secundárias. Metade dos animais do grupo foi avaliada, fotografada e biopsiada nos sexto, 13º, 20º e 27º dias após a indução das feridas. As feridas dos demais sete animais desse grupo foram fotografadas e medidas no dia da indução da ferida, no 13º e no 27º dias (Figura 6).

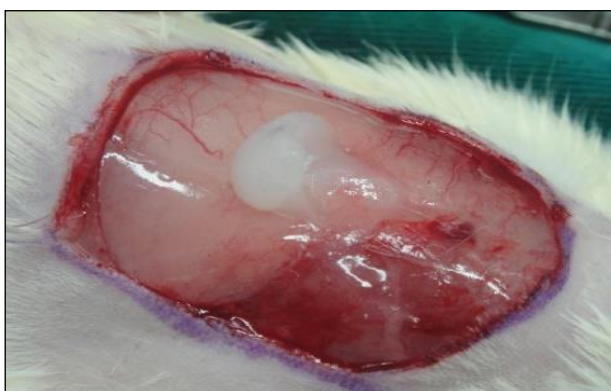


FIGURA 6- Ferida exposta, com aplicação da pomada de collagenase, antes da homogeneização do produto na ferida.

Fonte: Arquivo pessoal

3.6.3. Tratamento com membrana amniótica fresca no grupo MF

Os 14 animais do grupo MF foram mantidos em gaiolas individuais. A indução das feridas foi feita 1 hora após a membrana amniótica fresca ser preparada. Após o coleta e separação da MA das membranas fetais, ela foi retirada da solução tampão e cortada em fragmentos de 5cmx5cm e com o auxílio de uma lente de aumento frontal 6x, eles foram colocados sobre as feridas dos animais previamente limpas com solução salina a 0,9%. Foram colocados com suas faces estromais em contato com a área cruenta e bordas ultrapassando cerca de 3mm os limites das feridas. Foram fixados à pele íntegra com pontos separados de mononylon 6.0. Em seguida, com auxílio de gazes, as feridas foram secas e retiradas pequenas bolhas de ar entre elas e a MA, para melhor aderência entre as superfícies. Nos sexto, 13º, 20º e 27º dias após a indução das feridas, em metade dos animais, as feridas foram limpas com solução salina a 0,9%, observadas, fotografadas e realizadas biópsias. As feridas dos sete animais restantes do grupo MF foram observadas, fotografadas e medidas no dia da indução das feridas e nos 13º e 27º dias. Não houve a troca da membrana amniótica e nem curativos diários, ficando as feridas expostas somente com a aplicação única de MAF (Figura 7A e B).

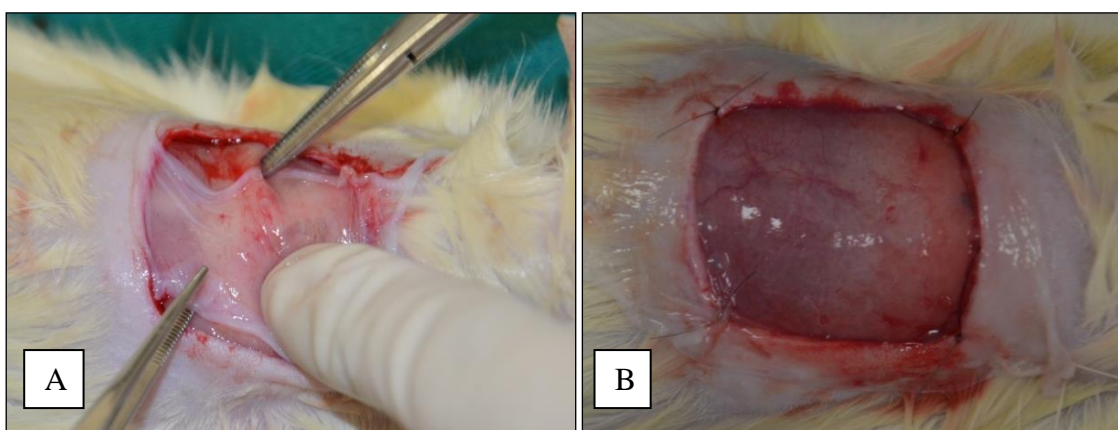


FIGURA 7- Ferida: A: recebendo a aplicação única de MAF. B: MAF fixada à ferida com pontos de nylon 6.0.

Fonte: Arquivo pessoal

3.6.4. Tratamento com membrana amniótica preservada no grupo MP

Após 34 dias do preparo e preservação da MA, os 14 animais do grupo MP foram submetidos à confecção das feridas e, em seguida, receberam os fragmentos de MA, preservados e fixados em papel de nitrocelulose. A MA preservada, foi retirada do refrigerador 30 minutos antes de sua utilização e colocada em imersão por 10 minutos em cuba estéril para reidratação em solução salina a 0,9% em volume suficiente para cobrir todo o papel, avaliando-se o sucesso da reidratação pela modificação da aparência do papel, que de translúcido passa a leitoso. Depois, com o auxílio de uma lente de aumento frontal 6x, elas foram separadas do papel e colocadas sobre as feridas previamente limpas com solução salina a 0,9%, com suas bordas ultrapassando cerca de 3mm os limites das feridas. A face estromal da MA foi colocada em contato com a área cruenta da lesão e a membrana foi fixada à pele íntegra com pontos separados de mononylon 6.0. Em seguida, com auxílio de gazes, as feridas foram secas e retiradas pequenas bolhas de ar entre elas e as MAs, para melhor aderência entre as superfícies. Desses 14 animais, sete tiveram suas feridas observadas, fotografadas e retiradas biópsias nos sexto, 13º, 20º e 27º dias após a indução das feridas. Nos outros sete animais, as feridas foram observadas, fotografadas e medidas no dia da sua indução, nos 13º e 27º dias. As feridas não foram limpas diariamente e permaneceram expostas, somente com a aplicação única da MAP (Figura 8A e B).

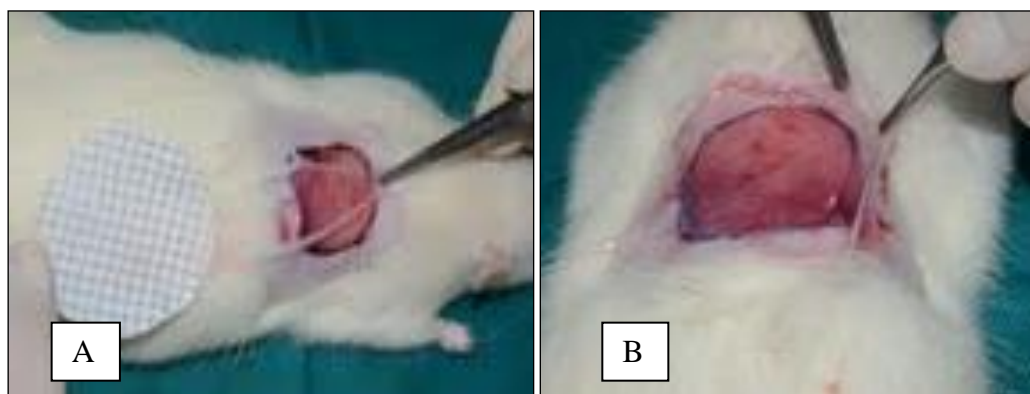


FIGURA 8- Ferida: A: recebendo a aplicação única de MAP retirada do papel de nitrocelulose. B: MAP sendo fixada à ferida com pontos de nylon 6.0.

Fonte: Arquivo pessoal

3.7. Obtenção de amostras das feridas

Em sete animais de cada grupo nos sexto, 13^o, 20^o e 27^o dias após a indução das feridas fez-se a avaliação macroscópica para observação de infecção e/ou secreção local, sinais de necrose e edema ou outras alterações locais.

No sexto dia após a indução das feridas, os animais foram posicionados em decúbito ventral, em campo estéril e anestesiados com solução de cloridrato de quetamina (50mg/Kg) associada a cloridrato de xilazina (8 mg/Kg)⁵², aplicadas por via intramuscular no quarto posterior direito de cada animal, observando-se os cuidados relativos ao jejum hídrico de duas horas e alimentar de oito horas⁵². Foi feita biópsia da ferida, por excisão em elipse no quadrante superior direito, interessando a área lesada e parte da pele adjacente, após limpeza com solução salina a 0,9%. A área biopsiada foi suturada com pontos simples de mononylon 6.0 e os fragmentos de tecido colocados em frascos com formol a 10%, identificados e enviados para o laboratório de histologia.

Nos 13^o, 20^o e 27^o dias após a indução das feridas, foi feito o mesmo procedimento descrito anteriormente, nos quatro grupos, exceto pelo local de onde foram retirados os fragmentos de tecido, que foram: no 13^o dia, no quadrante inferior direito; no 20^o dia, no quadrante inferior esquerdo e no 27^o dia, no quadrante superior esquerdo (Figura 9).

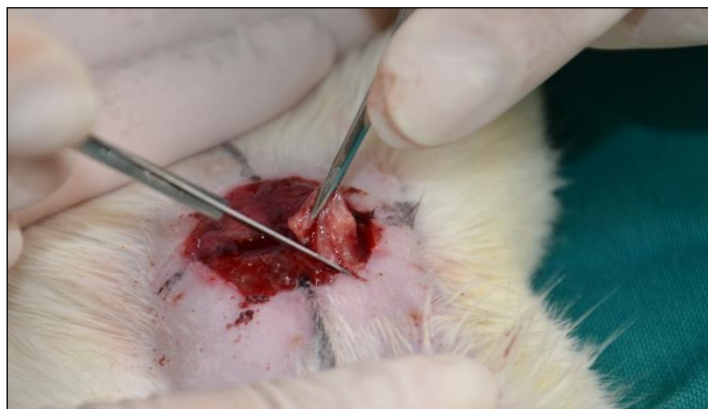


FIGURA 9- Área de demarcação em quadrantes da ferida, para a retirada da peça para biópsia: parte da ferida e parte da pele sadia.

Fonte: Arquivo pessoal

Nos fragmentos de tecido retirados, foram avaliados: infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia. Avaliou-se também as células presentes na reação inflamatória, a reação de células gigantes a corpo estranho e a presença de necrose tecidual.

Nos outros sete animais de cada grupo não se fizeram biópsias seriadas das feridas, cujas bordas foram delineadas em filmes de acetato para as medidas das áreas cruentas, além de serem fotografadas e avaliadas macroscopicamente para observação de infecção e/ou secreção local, sinais de necrose e edema ou outras alterações locais (Figura 10A e B).

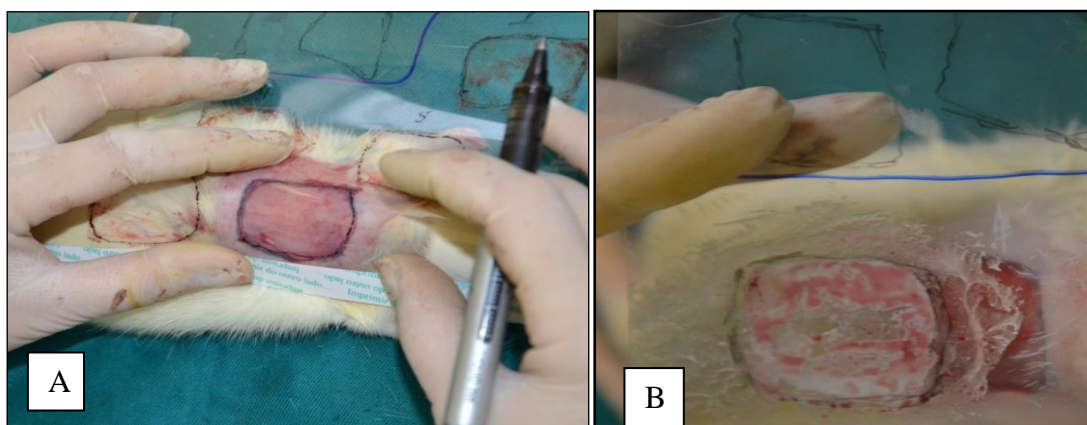


FIGURA 10- A e B: delineamento das áreas das feridas, em filme de acetato
Fonte: Arquivo pessoal

3.7.1. Avaliação macroscópica

Após a indução das feridas em seu dorso, os 28 animais não submetidos à biópsia seriada, dos grupos Cont, Col, MF e MP, foram fotografados e tiveram as bordas de suas feridas delineadas, nos primeiro, 13° e 27° dias, em filme de acetato, com caneta para retro projetor, ponta fina, 1,0mm, cor preta, para comparação entre os grupos da medida final da área cruenta da ferida (Figura 10A e B e Figura11).

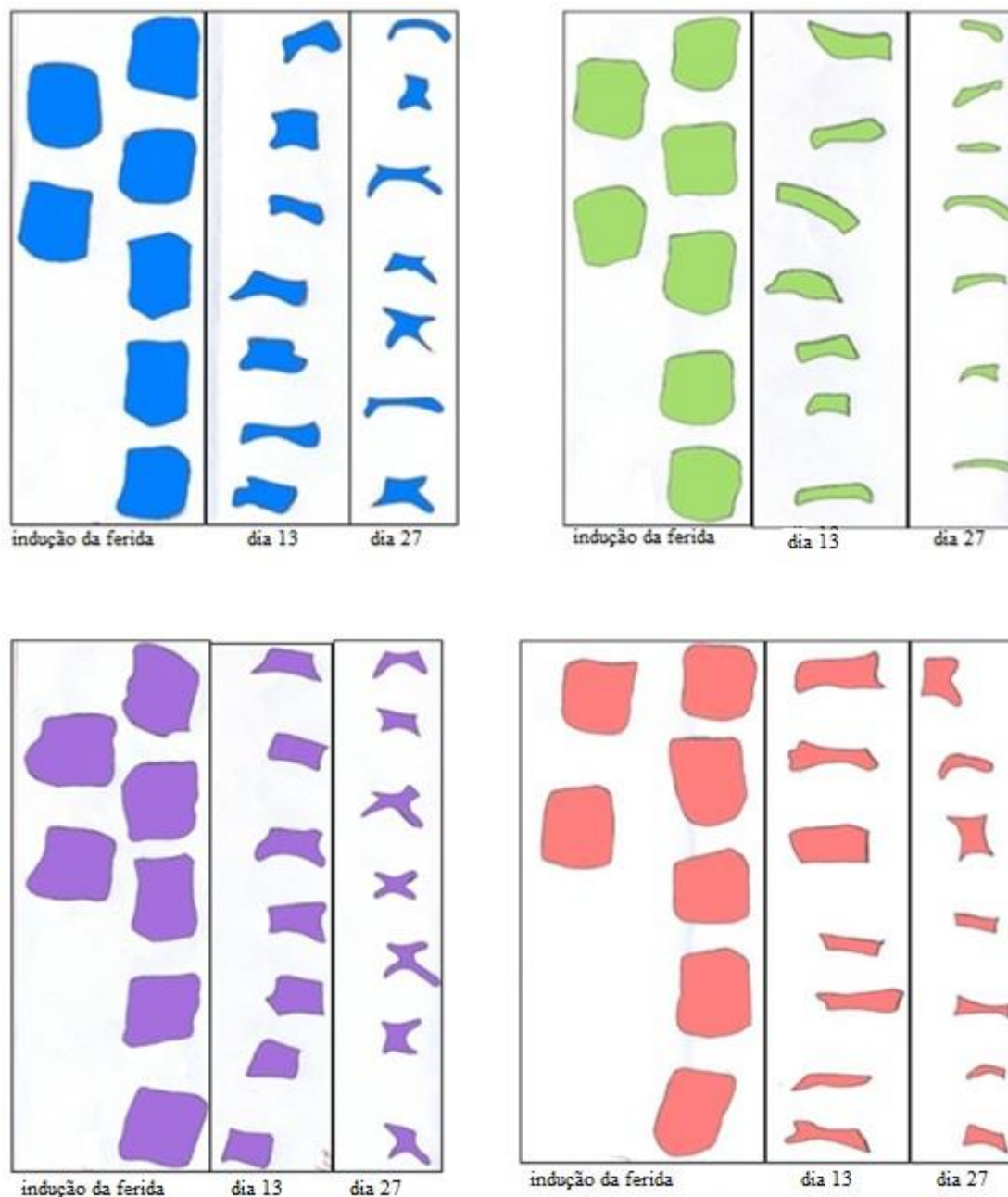


FIGURA 11- Desenhos das áreas nos primeiro, 13° e 27° dias: Verde: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo Cont. Azul: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo Col. Lilás: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo MF. Vermelho: áreas cruentas das feridas dos animais do grupo MP.

Fonte: Arquivo pessoal

Os cálculos das figuras planas, irregulares, foram determinados por meio do traçado de segmentos de retas suficientemente curtas de forma a acompanhar as irregularidades das bordas das figuras, transformando-as de figuras irregulares a figuras o mais regular possível, diminuindo a possibilidade de erros nas medidas das áreas. Desta forma a figura irregular foi convertida em

um polígono multifacetado e assim pode-se determinar o seu perímetro. Estas áreas foram determinadas usando-se o programa AUTOCAD Versão 2009.

3.7.2. Avaliação microscópica

Os fragmentos biopsiados nos 28 animais dos grupos Cont, Col, MF e MP, nos sexto, 13º, 20º e 27º dias, foram fixados em formol a 10% e encaminhados para processamento por desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo com cortes de 4micrômetros a 6micrômetros de espessura e submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e as últimas amostras retiradas foram também submetidas a coloração de Gomori para avaliação do colágeno.

Esta avaliação foi subjetiva, baseada unicamente na experiência de um único e mesmo observador que desconhecia de qual grupo eram as amostras. Foram avaliadas segundo os parâmetros descritos abaixo (Apêndices A e B):

- 1- Infiltrado inflamatório, classificado como ausente (quando ausente ou discreto) e presente (quando moderado ou acentuado), de acordo com a presença de mais ou de menos células.
- 2- Angiogênese: observada pela presença do tecido de granulação que analisou a abundância de brotos vasculares e quantidade de fibroblastos e classificada como ausente (quando ausente ou discreta) e presente (quando moderada ou acentuada).
- 3- Reação de células gigantes a corpo estranho, caracterizada por células com núcleo desorientado, às vezes até com corpo estranho fagocitado. Essa reação foi classificada como ausente (quando ausente ou discreta) e presente, (quando moderada ou acentuada).
- 4- Necrose tecidual caracterizada por homogeneização do citoplasma, células com núcleos picnóticos e cariorrexe, classificada também como ausente (ausente ou discreta) e presente (moderada ou acentuada).

5- Fibrose composta de fibras jovens, caracterizada pela presença de fibroblastos com núcleos maiores e sem colágeno, classificadas como ausente (ausente ou discreta) e presente (moderada ou acentuada).

6- Fibrose composta de fibras antigas, caracterizada por fibroblastos de núcleos pequenos e maior número de fibras de colágeno, classificada como ausente (ausente ou discreta) e presente (moderada ou acentuada).

3.8. Destinação dos animais ao término do estudo

Todos os animais, após a retirada do fragmento de biópsia no 27º dia, foram mortos com solução de cloridrato de quetamina (200mg/Kg) associada a cloridrato de xilazina (30 mg/Kg), aplicadas por via intramuscular no quarto posterior direito de cada animal, estando eles anestesiados anteriormente, segundo os parâmetros de eutanásia citados por Oliveira, Alves e Rezende (2003)⁵³, recomendados pela *Directate General XI* da Comissão das Comunidades Europeias: rapidez +2 (velocidade com que se obtém a morte dos animais, classificada em +2; +1 e -1); nível de experiência 0 (exigência de conhecimentos técnicos e científicos nos níveis -3; -2; -1 e 0); eficácia +2 (êxito de resultados após a aplicação da técnica, nos níveis +2; +1 e -1); segurança para o operador +1 (segurança durante a execução classificada em +2; +1 e -1) e valorização estética +2 (aceitabilidade para o operador e terceiros, nos níveis +2; +1 e -1).

3.9. Análise estatística

A comparação das áreas cruentas das feridas foi feita por meio do teste de ANOVA, considerando-se significativas diferenças para $p \leq 0,05$. Na presença de significância, utilizou-se o teste de comparações múltiplas (Bonferroni) para cada tempo e medidas das áreas cruentas.

À microscopia, avaliaram-se os achados intergrupos, na evolução entre os sexto e 27º dias, utilizando-se o software R - Teste Exato de Fisher, com nível de significância considerado de 5% ($p \leq 0,05$).

4-RESULTADOS

O animal 2 do grupo MF foi excluído do estudo por ter morrido logo após a indução anestésica no sexto dia após a colocação da MA.

4.1. Medidas macroscópicas das feridas (áreas cruentas)

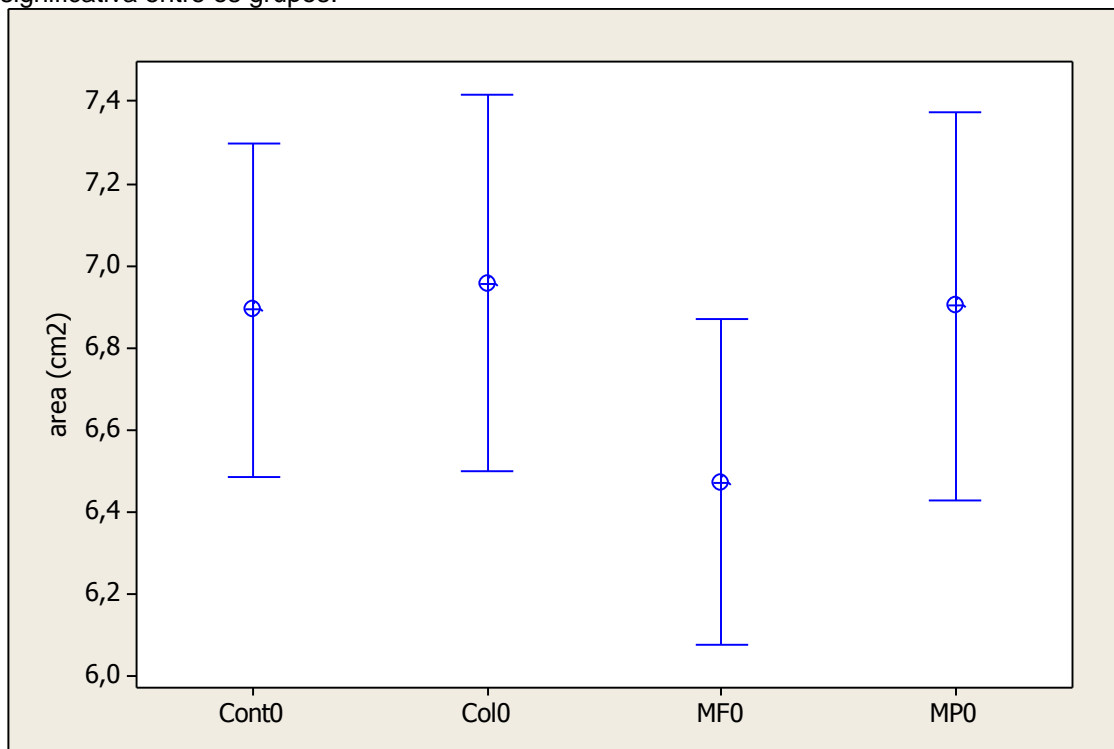
As médias das medidas das áreas cruentas das feridas, estão especificadas na Tabela 1 e Gráficos 1,2,3, e 4. O grupo MF sofreu uma diminuição menor das áreas cruentas de suas feridas quando comparado aos outros grupos. O grupo Cont foi o que sofreu maior redução das áreas cruentas das feridas.

As médias iniciais das áreas cruentas das feridas, em cm^2 , nos quatro grupos, foram de $6,894 \pm 0,428$ no grupo Cont, $6,958 \pm 0,497$ no grupo Col, $6,474 \pm 0,427$ no grupo MF e $6,902 \pm 0,512$ no grupo MP. Não houve diferença significativa entre os grupos na medida inicial ($p=0,219$) (Tabela 1 e Gráfico 1).

TABELA 1- Médias das medidas por aproximação, em cm^2 , das áreas cruentas no dia da indução das feridas, 13° e 27° dias em ratas wistar não tratadas: controle (Cont) ou tratadas com colagenase (Col), membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).

GRUPO	INDUÇÃO	13° DIA	27° DIA
Cont	6,9	0,7	0,4
Col	7,0	0,9	0,6
MF	6,5	1,3	0,8
MP	6,9	0,9	0,5

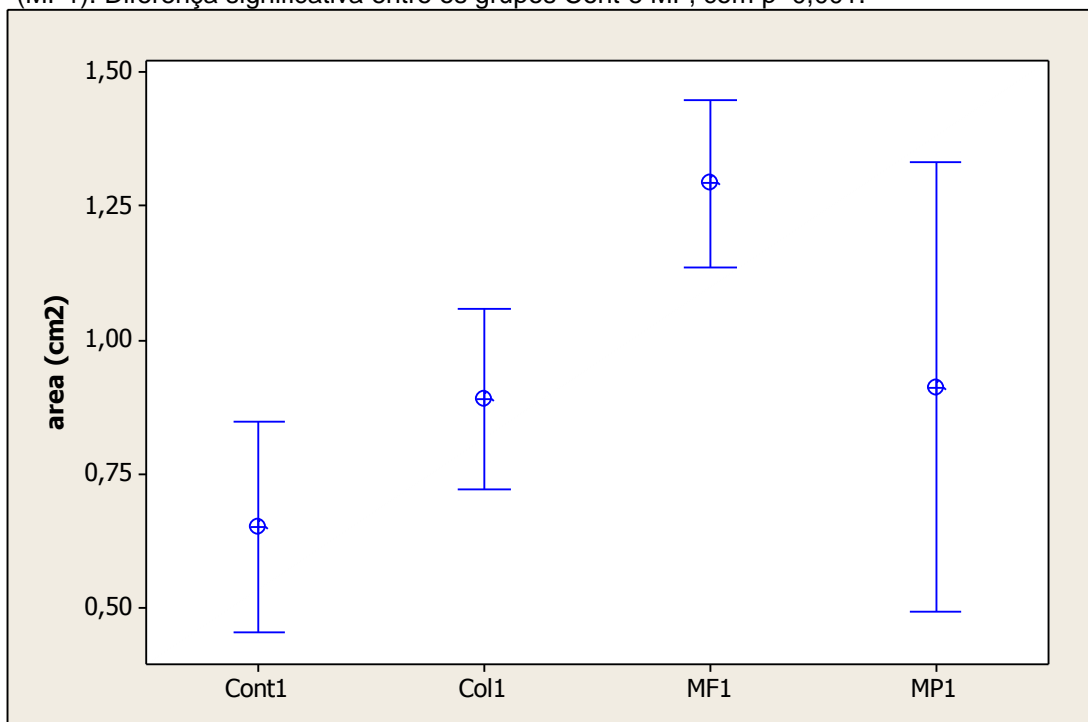
GRÁFICO 1- Médias das medidas das áreas cruentas das feridas no dia de suas induções (0), em dorso de ratas wistar não tratadas controle: Cont0; tratadas com colagenase: Col0; tratadas com membrana amniótica fresca: MF0 e membrana amniótica preservada: MP0. Sem diferença significativa entre os grupos.



0: medidas obtidas no tempo zero, no dia da indução das feridas.

Após 13 dias da indução das feridas e início dos tratamentos, as áreas das feridas foram de $0,651 \pm 0,212$ no grupo Cont, $0,891 \pm 0,182$ no grupo Col, $1,294 \pm 0,170$ no grupo MF e $0,913 \pm 0,454$ no grupo MP. Houve diferença significativa quando comparadas as áreas das feridas dos animais do grupo MF e aqueles do grupo Cont ($p=0,001$), como pode ser visto na Tabela 1 e Gráfico 2.

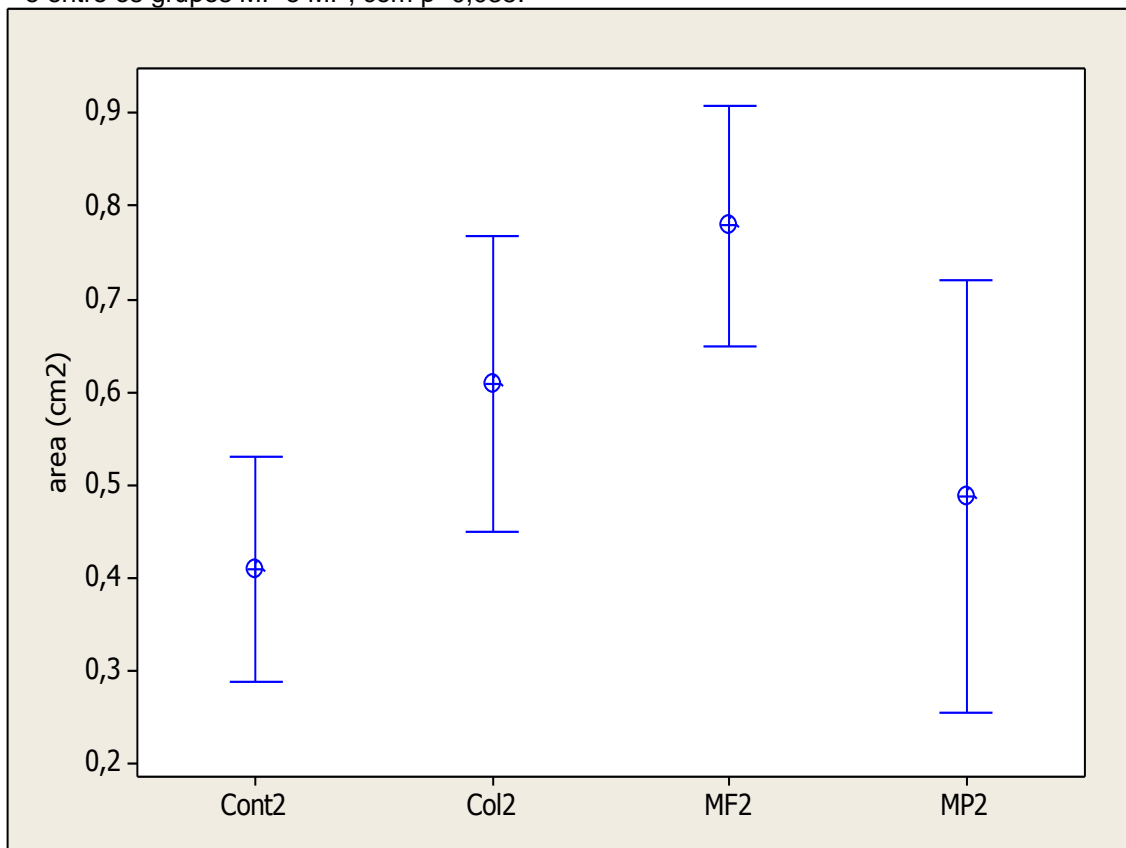
GRÁFICO 2- Médias das medidas das áreas cruentas das feridas induzidas em dorso de ratas wistar no 13º dia (1) nos grupos não tratados: controle (Cont1), ou tratadas com collagenase (Col1), membrana amniótica fresca (MF1) ou membrana amniótica preservada (MP1). Diferença significativa entre os grupos Cont e MF, com $p=0,001$.



1: medidas obtidas no tempo 1, no 13º dia após a indução das feridas.

Ao final do período de observação, aos 27 dias, as áreas das feridas, em cm^2 , foram $0,410 \pm 0,132$ no grupo Cont, $0,609 \pm 0,173$ nos animais do grupo Col, $0,779 \pm 0,141$ no grupo MF e $0,488 \pm 0,252$ no grupo MP. Houve diferenças significativas entre os grupos MF e Cont ($p=0,005$), e entre os grupos MF e MP ($p=0,035$), como demonstrado na Tabela 1 e Gráfico3.

GRÁFICO 3- Médias das medidas das áreas cruentas das feridas induzidas em dorso de ratos wistar no 27° dia (2) e pertencentes aos grupos não tratadas controle (Cont2), tratadas com colagenase (Col2), tratadas com membrana amniótica fresca (MF2) ou membrana amniótica preservada (MP2). Diferença significativa entre os grupos Cont e MF, com $p=0,005$ e entre os grupos MF e MP, com $p=0,035$.



2: medidas obtidas no tempo 2, no 27° dia após a indução das feridas.

4.2. Microscopia dos grupos Cont, Col, MF e MP, nos sexto, 13°, 20° e 27° dias

4.2.1. Infiltrado inflamatório

O infiltrado inflamatório no sexto dia esteve presente em quatro (57%) animais de cada grupo Col, MF e MP. No 13° dia, manteve-se presente em quatro (57%) animais do grupo Cont, três (43%) em cada um dos grupos Col e MF e dois (29%) no grupo MP. No 27° dia, manteve-se ausente em todos os grupos.

Não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos nesta fase cicatricial (Tabela 2 e Apêndice B).

TABELA 2- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou infiltrado inflamatório nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).

DIAS	6		13		20		27	
GRUPOS	n	%	n	%	n	%	n	%
Cont	1	14	4	57	3	43	0	0
Col	4	57	3	43	2	29	1	14
MF	4	57	3	50	1	17	0	0
MP	4	57	2	29	1	14	1	14

4.2.2. Tecido de granulação

O tecido de granulação esteve presente na maioria dos animais dos quatro grupos nos sexto e 13° dias. Foi evoluindo para ausente (poucos animais) nos grupos Cont, Col e MF no 20° dia, embora em seis (86%) animais do grupo MP tenha permanecido presente. Ficou predominantemente ausente no 27° dia em todos os grupos. Não houve diferença significativa com relação ao tecido de granulação entre nenhum dos grupos, em nenhuma fase cicatricial (Tabela 3 e Apêndice B).

TABELA 3- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou tecido de granulação nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).

DIAS	6		13		20		27	
GRUPOS	n	%	n	%	n	%	n	%
Cont	7	100	4	57	3	43	2	29
Col	7	100	5	71	3	43	2	29
MF	5	71	5	83	3	50	0	0
MP	7	100	7	100	6	86	0	0

4.2.3. Reação de células gigantes a corpo estranho

A reação de células gigantes à presença de corpo estranho predominou ausente em todos os grupos durante todo o processo cicatricial, embora tenha estado presente em dois (29%) animais do grupo Col nos 13° e 20° dias e em um (14%) animal do grupo MP nos 20° e 27° dias. Também nestes dados, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma fase cicatricial (Tabela 4 e Apêndice B).

TABELA 4- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou reação de células gigantes a corpo estranho, nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).

DIAS	6		13		20		27	
GRUPOS	n	%	n	%	n	%	n	%
Cont	0	0	0	0	0	0	2	29
Col	0	0	2	29	2	29	1	14
MF	0	0	0	0	0	0	0	0
MP	0	0	0	0	1	14	1	14

4.2.4. Necrose

A presença de tecido necrótico ocorreu em todos os grupos no sexto dia, mas predominou (100%) nos animais do grupo MP. Esteve ausente na maioria dos animais dos quatro grupos nos 13°, 20° e 27° dias. Houve diferença significativa entre os grupos Cont e MP, com $p = 0,014$, no sexto dia (Tabela 5 e Apêndice B).

TABELA 5- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou necrose nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP).
*Diferença significativa entre os grupos Cont e MP, no sexto dia, com $p = 0,014$.

GRUPOS	6		13		20		27	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Cont	1*	14	2	29	1	14	1	14
Col	4	57	0	0	0	0	0	0
MF	3	43	0	0	0	0	0	0
MP	7*	100	1	14	0	0	0	0

4.2.5. Fibroplasia jovem

A presença da fibroplasia jovem, formada por fibras jovens de colágeno e presença de mais fibroblastos, esteve presente em cinco (71%) animais do grupo Col e quatro (57%) do grupo MF, no sexto dia. Houve diferença significativa entre os grupos Col e MP (predominou 100% ausente neste segundo grupo), com $p=0,016$, no sexto dia. No 13° dia, estava presente em cinco (83%) animais do grupo MF, quatro (57%) do grupo Col, três (43%) do grupo Cont e dois (29%) do grupo MP. Foi tornando-se progressivamente ausente em todos os grupos nos 20° e 27° dias (Tabela 6 e Apêndice B).

TABELA 6- Número e porcentagem de ratas wistar que apresentou fibroplasia jovem nos sexto, 13°, 20° e 27° dias após a indução das feridas em seu dorso e tratamentos: controle (Cont); colagenase (Col); membrana amniótica fresca (MF) e membrana amniótica preservada (MP). *Diferença significativa entre os grupos Col e MP no sexto dia, com $p = 0,016$.

GRUPOS	6		13		20		27	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Cont	1	14	3	43	3	43	0	0
Col	5*	71	4	57	4	57	2	29
MF	4	57	5	83	3	50	0	0
MP	0*	0	2	29	2	29	0	0

5-DISCUSSÃO

Quando a pele tem sua integridade alterada, chama-se a isto de ferida, e o organismo inicia sua reparação imediatamente após o dano¹⁻⁵. Essas feridas são causadas por fatores externos como efeitos químicos, físicos, térmicos, radioativos e fatores internos como doenças concomitantes. Várias são as classificações das feridas: agudas ou crônicas; superficiais ou profundas; simples ou complexas. De um modo geral, a ferida crônica ou com grande perda cutânea, tende a cicatrizar por segunda ou terceira intenção, em um processo mais lento e susceptível de complicações, com um tratamento mais difícil e oneroso^{1,2,13,54}.

As perdas cutâneas extensas, classificadas como feridas complexas³, atualmente estão mais frequentes em função dos traumas por acidentes ou operações com grandes ressecções de tumores ou desbridamentos. Pacientes com extensa perda cutânea sofrem um longo período de preparo, tanto hospitalizados quanto a nível ambulatorial, aguardando a fase de granulação da ferida para colocação do enxerto, ou ainda confecção de retalhos, envolvendo gastos hospitalares e individuais, acompanhados do afastamento das atividades sociais e profissionais^{1,2,7,8}.

O homem vem buscando por meio de diferentes tipos de coberturas uma cura mais rápida e eficaz na recuperação da área lesada. As coberturas biológicas, como matriz de colágeno, com colágeno bovino ou suíno descelularizado com celulose oxidada, agrega sinalizadores que coordenam a ativação de fatores de crescimento endógenos, mas muitas estão ainda em estudos¹⁻⁴. Os de matriz de celulose, como a membrana de celulose produzida por *Acinetobacter xylinum*, desidratada e acrescida de poros artificialmente, mantém a umidade da ferida, a ativação de fatores de crescimento, mas é contra indicada em feridas muito exsudativas e infectadas. A pele alógena, de pele humana descelularizada, é um substituto temporário da pele humana e tem sua limitação nos bancos de tecidos em nosso meio^{1,3,4}. Vários outros tipos de curativos tem surgido, com as mais variadas propostas como a busca por

novos curativos com membranas biológicas como peritônio, pericárdio, tendão, cartilagem, membrana amniótica e membranas biológicas sintéticas como o látex⁵⁵, mas ainda não se produziu um curativo que cumprisse as necessidades de todas as fases da cicatrização.

Novas pesquisas buscam desenvolver tecnologias mais simples, baratas e igualmente eficientes, objetivo pelo qual se tem procurado usar tanto a MAF quanto MAP, como curativo biológico.

Em 1890, Ivanova publicou sobre o uso de pele fetal em queimados²⁰. Em 1910, Davis injetou fragmentos de saco amniótico em feridas abertas²⁰. Em 1913, Stern e Sabella utilizaram a MA no tratamento de feridas e queimaduras, onde observaram a ausência de infecção, com redução da dor e aumento na velocidade de reepitelização^{20,22,30,36}. De Rotth em 1940 iniciou o uso da MA em defeitos conjuntivais e em 1955 Kim e Tseng reintroduziram o uso da MA no tratamento de lesões oculares, onde é mais utilizada e pesquisada na atualidade³⁴.

A MA é uma estrutura resistente, lisa, brilhante, flexível e delgada, que recobre a placenta em sua face fetal. Origina-se no embrião a partir do epiblasto (ectoderma fetal) e encontra-se aderida ao córion de onde pode ser facilmente separada por dissecação romba^{20,30}. Suas características como a baixa antigenicidade, ação antimicrobiana, capacidade de diminuir o exsudado e aderências, acelerar a reepitelização^{20,22,30,36}, agir como substrato para o crescimento de tecidos³⁷, a tornam um produto de especial atenção. Outra característica citada na literatura foi a de diminuir a contração da cicatriz, tornando a área final com características macroscópicas mais semelhantes à pele local^{20,30,36}.

Uma das propostas do presente estudo foi verificar a possibilidade do uso da MA para diminuir a redução da área cruenta cicatricial. No dia da indução das feridas e início de cada tratamento, foi feita a primeira medição das áreas cruentas em metade dos animais nos grupos Cont, Col, MF e MP. Como era de se esperar, não houve diferença significativa entre elas, uma vez que foram feitas com aproximadamente 2cmx2cm cada.

No 13º dia, as áreas cruentas das feridas do grupo MF mantiveram-se maiores em relação às áreas do grupo Cont. No 27º dia, houve também uma diferença entre os grupos MF e Cont, e ainda entre os grupos MF e MP. Sabe-se que um dos processos que atuam na redução da área cruenta de uma ferida é o mecânico. Estaria nesse processo a presença de uma ação mecânica da MAF, mantendo os fibroblastos e miofibroblastos do leito da ferida com menor distensibilidade e movimentação mantendo a área cruenta da ferida maior? Embora esses dados estejam presentes neste estudo, não são suficientes para se concordar com alguns trabalhos na literatura, que descreveram a MA com uma característica de diminuir a redução da área cruenta da ferida^{30,36}, uma vez que não se teve como pesquisar a presença de fatores de crescimento, número de fibroblastos e miofibroblastos ou ainda de genes de conexão da zona de oclusão 1, que são fatores ligados à contração cicatricial.

Na literatura nenhum estudo especifica se esta diminuição de redução das áreas cruentas das feridas ocorre com a membrana fresca ou ainda se com ela preservada, e de que maneira chegou-se a esta conclusão. Acredita-se serem necessários mais estudos, principalmente histológicos, avaliando células envolvidas neste processo, como os miofibroblastos, fatores de crescimento e genes de conexão.

O uso da rata fêmea como animal experimental foi em função de sua fácil disponibilidade, manuseio, hospedagem, podendo ser usado em quantidade maior. Esse estudo questiona o uso desse modelo experimental nesta pesquisa específica, já que a pele dos ratos além de um subcutâneo muito fino tem um processo cicatricial mais rápido que o da pele humana, sendo provavelmente um dos fatores que atuariam em nossos resultados.

A opção neste estudo, em se usar como grupo controle, aquele com exposição seca das feridas, foi para que se tivesse um grupo sem qualquer interferência medicamentosa. A escolha de um grupo, com o uso da colagenase teve como objetivo, contar com um segundo grupo controle, que usasse uma medicação tópica de amplo uso, fácil acesso e preço mais acessível.

Embora em Buenos Aires, desde 2001 a resolução 187 da INCUCAI, de 19 de novembro⁵⁶ tenha normatizado o uso da MA, no Brasil se tem certa dificuldade na obtenção da mesma, com a necessidade de aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital e uma autorização de conhecimento e consentimento da paciente para a obtenção da MA, que é desprezada no lixo hospitalar após o parto.

O bom resultado obtido em vários estudos com a MA nos mais variados tipos de tratamentos^{30,35,36,57}, foi o constante incentivo para se fazer este estudo, levando-se em conta que na atualidade, além do resultado funcional das cicatrizes, é desejável que elas sejam o mais próximo possíveis em aparência de uma pele normal.

Neste estudo, utilizou-se a membrana amniótica fresca e preservada, com sua face estromal em contato com a área cruenta da ferida, funcionando como um enxerto. Observou-se na literatura unanimidade entre os autores tanto na forma de isolamento das membranas fetais (membrana amniótica e córion), mas também grande variabilidade de técnicas no preparo (quantidades e diferentes medicamentos)^{30-32,36} e preservação da membrana amniótica (meio utilizado e temperatura adequada)^{30-32,36}, assim como no tempo de uso após a sua obtenção e preparo (de 2 horas a 12 meses)^{30-32,36}.

As membranas amnióticas preservadas foram mantidas sob refrigeração de 8°C até a data de sua utilização, que ocorreu 34 dias após o seu preparo e conservação. Há consenso de que tanto a criopreservação quanto a glicerina em altas concentrações mantém a maioria de suas características, algumas com poucas alterações^{30,38,40,41}, embora em nenhum trabalho foram mostradas quais as alterações encontradas.

Nesta pesquisa não se evidenciou a redução do infiltrado inflamatório com o uso da MAF e MAP (grupos MF, MP) quando comparadas ao grupo controle (Cont) e da colagenase (Col). Acredita-se que a manutenção do infiltrado inflamatório pode estar relacionada ao meio seco no grupo Cont e à presença do glicerol utilizado como conservante da MA, causando provavelmente um grau de desidratação inadequado na MA⁴¹, no grupo MP. É possível que no

grupo Col, tal achado tenha ocorrido pelo fato de a colagenase, agindo com suas enzimas proteolíticas, aumentaria a quantidade de material amorfo na lesão, prolongando o infiltrado inflamatório.

O tecido de granulação presente no grupo MP, no sexto dia, permanecendo até o 20º dia, acredita-se estar relacionado ao fato de a MA, manter o meio da ferida mais úmido diminuindo a perda do exsudado, favorecendo a migração celular e com isso acelerando a neovascularização, falando a favor de autores como Ninknejad (2013)²⁶, Rosato e cols. (1992)⁵⁷ e Subrahmanyam (1995)⁵⁸, que citam o aumento deste tecido estimulado por substâncias ainda desconhecidas, presentes na MA, mas contradizendo outros autores como Del Campo (2002)³⁰ e Martim e cols. (2001)⁵⁹ que descreveram que a MA reduziria a neovascularização.

Por ser semelhante ao tecido fetal, com a mesma origem embrionária, a MA apresenta ainda a plasticidade e a presença de efeitos imunomoduladores⁴⁹⁻⁵¹ e baixa antigenicidade devido à ausência de alguns antígenos de superfície nas células epiteliais amnióticas (antígenos de leucócitos humanos tipos A,B,C e D - HLAA, HLAB, HLAC e HLAD)^{20,31,46,60-62}. Este estudo usou MA humana em ratas, ou seja, animais de espécies diferentes. Mesmo com características antigênicas, isto poderia ser um dos fatores que explicaria as alterações histológicas como o predomínio de células mononucleares, a presença acentuada da necrose ou ainda o retardo na fase de fibroplasia?

A literatura não apresenta informação conclusiva sobre o que ocorre com a membrana amniótica implantada. Alguns autores não a observaram à macroscopia nem à microscopia depois do término do estudo^{57,58}. Outros descreveram sua perfeita integração ao tecido autóctone³⁶, alguns sua eliminação⁴⁵ e outros sua dissolução ou reabsorção⁵⁹ e ainda sua remoção mecânica³⁶. Houve ausência de células gigantes à presença de corpo estranho nos quatro grupos, nos sexto, 13º, 20º e 27º dias. Nos dois animais dos grupos Col e Cont e um do grupo MP nos 20º e 27º dias, acredita-se estar relacionada a prováveis células desidratadas presentes na lesão seca exposta e pela própria MA apresentar pequenos fragmentos, que seriam fagocitados, assim como a ação enzimática da colagenase degradando o colágeno e o material

amorfo, o que aumentaria a necessidade de fagocitose local pelas células gigantes, embora à histologia, não tenha sido possível a verificação desse processo, uma vez que não se teve como confirmar qual era o material amorfo fagocitado, presente no interior das células gigantes.

Achados no presente estudo de diferença significativa da presença de necrose entre os grupos MP e Cont, acredita-se estar relacionada também com o meio de preservação que se utilizou o glicerol a 98%, que provavelmente agindo como um desidratante ainda presente na MAP agiria como um irritante das células das feridas funcionando como um dos fatores que aumentaria a necrose local⁴¹. Esta mesma desidratação provocaria a diminuição de umidade local como outro fator, que dificultando o movimento e crescimento das células na área cicatricial, acelerasse a necrose celular. Acredita-se que mais estudos sejam necessários para se chegar a um meio de preservação mais adequado, que mantenha as características físicas e histológicas do material preservado.

A fase da fibroplasia jovem foi significativamente diferente entre os grupos MP e Col, no sexto dia, e manteve-se presente nestes grupos, até o 20º dia, em concordância com a manutenção da angiogênese, ou seja, entende-se que uma angiogênese mais prolongada provavelmente irá também prolongar a fibroplasia jovem, levando a fibroplasia organizada a ser detectada em mais animais somente a partir do 27º dia.

Embora o presente estudo não tenha confirmado, alguns autores sugerem que a MA apresenta características inatas, como sua ação antibacteriana^{20,28,31,33,46}; por conter citocinas como o interferon^{31,60,61}; lisozina, transferina e progesterona⁶⁰; imunoglobulina 7S e globulinas B1c/B1a presentes no líquido amniótico⁶⁰; da epitelização mais rápida^{20,30,36,46,57}; pelo seu elevado número de fatores de crescimento (fator de crescimento epitelial – EGF; fator de crescimento de queratinócitos - KGF; fator de crescimento hepático – HGF; fator de crescimento dos fibroblastos; FGF; fator transformador de crescimento - TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2)^{20,26,28,31,46}; ação anti-inflamatória, por conter grande quantidade de substâncias inibidoras dos mediadores da inflamação, como as proteases e redução da formação de cicatriz retrátil, provavelmente por atuar como uma barreira mecânica ante a formação de fibrose^{28,29,30,31,60-62}.

Outras prováveis ações são o aumento do índice de apoptoses das células inflamatórias^{31,32}; redução de apoptose das células epiteliais; redução do exsudado local, por sua boa aderência à ferida^{28,30,32,61,62}, além da redução do número de aderências entre as estruturas neurais e peritoneais^{62,63}. Por estas propriedades, é utilizada como substrato *in vitro* para cultura de vários tipos de células^{17,22,31}, além de ter aparente efeito antiálgico, impedindo a exposição de feixes nervosos^{21,32,63}.

Para o cálculo amostral para avaliação macroscópica, utilizou-se o endereço eletrônico www.lee.dante.com.br, por meio do qual se chegou ao número de seis animais. Como não existe na literatura dados suficientes para se inferir uma amostragem⁶⁴ para as variáveis microscópicas, fez-se a opção de utilizar a amostragem não probabilística por conveniência, que é aquela frequentemente utilizada para a geração de ideias, em pesquisa exploratória, como base para a geração de uma nova hipótese e onde se aceita os riscos da imprecisão dos resultados do estudo. Chegou-se ao número de pelo menos seis animais por grupo, na tentativa, não de se inferir um resultado, mas de se usar os resultados obtidos para novas hipóteses⁶⁴.

É possível que a MA, tanto fresca quanto preservada, possa ser utilizada como curativo biológico, alterando o tempo de cicatrização em algumas de suas fases e provavelmente diminuindo a redução das áreas cruentas das feridas, resultando em uma cicatriz com melhor aspecto estético e funcional. O fato de a MP ter desencadeado maior angiogênese haveria a possibilidade de ela ser empregada para tal finalidade, como em feridas com menor aporte vascular?

6- CONCLUSÕES

A MAF desencadeou um menor fechamento das áreas cruentas quando comparada ao grupo controle.

A MAF e MAP, não alteraram significativamente as fases cicatriciais inflamatórias, de granulação e fibroplasia organizada.

A MAP manteve o processo de angiogênese presente até no 20º dia.

7- REFERÊNCIAS

- 1- Blanes L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva, JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado [monografia na internet] São Paulo; 2004. [Acesso em 20 set 2013].Disponível em [http:// www. bapbaptista.com](http://www.bapbaptista.com).
- 2- Broughton II G, Janis JE, Attinger CE. The basic Science of Wound Healing. **Plast Rec Surg** 2006;117 (7 Suppl.) 12S – 34S.
- 3- Smaniotto PHS, Galli R, Carvalho VF, Ferreira, MC. Tratamento clínico das feridas. **Rev Med** 2010; 89 (3/4):137-41.
- 4- Candido, LC. Livro do Feridólogo. São Paulo: Publicação autônoma; 2006.
- 5- R e D Systems. Citocinas na cicatrização de feridas. [Minirevistas na internet] [Acesso em 15 ago 2013]. Disponível em http://translate.googleusercontent.com/translate_c?hl=pt-BR&sl=en&u=http://www.rnd.
- 6- Mercandetti M, Cohen JA. Cicatrização de feridas, a cura e o reparo. Web MD Professional, 2008. [Acesso em 15ago 2013]. Disponível em http://translate.googleusercontent.com/translate_c?hl=pt-BR&sl=en&u=http://www.emedicina.
- 7- Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol** 2009; 84 (3): 257- 62.
- 8- Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Ciênc Farm** 2005; 41(1): 27-51.
- 9- Sharpe JR, Martin Y. Strategies demonstrating efficacy in reducing wound contraction in vivo. **Ad Wound Care** 2013; 2(4): 167-175.
- 10-Shi JH, Guan H, Shi S, Cai WX, Bai XZ, Hu XL, Fang XB, Liu JQ, Tao K, Zhu XX, Tang CW, Hu DH. Protection against TGF- β 1 induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for a reduction of skin scarring. *Arch Dermatol Res* DOI 10.1007/s00403-013-1314-0. Published online January; 2013.
- 11-Porter S. The role of the fibroblast in wound contraction and healing. **Wounds UK** 2007; 3 (1): 33 – 40.
- 12-Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, O Quinn M, Yost MJ, Gourdie, RG. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. **Trends Biotechnol** 2008;26 (4): 173 - 80.
- 13-Mandelbaum SH, Di Santis EP, MAndelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte 1. **An Bras Dermatol** 2003; 78 (4): 393 – 408.

- 14-Rita Singh, Chacharkar MP. Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. **J Tissue Viability** 2011; 20(2): 49-54.
- 15-Ting L, Hualei Z, Yuanyuan X, Yaling D, Yajie SZ, Jing Z. Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular chemical burn. **Mol Vis** 2012; 18: 2137-46.
- 16-Pessaloto AGT, Santos Martins D, Ambrósio CE, Mançaneres CAF, Carvalho AF. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns** 2011; 37(7): 1192-1201.
- 17-Ricardo JRS, Barros SL, Santos MS, Souza LB, Gomes JAP. Amniotic membrane transplantation for severe acute cases of chemical ocular burn and Stevens-Johnson syndrome. **Arq Bras Oftalmol** 2009; 72(2):215-20.
- 18-Gutiérrez-Moreno S, Alsina-Gibert M, Sampietro-Colom L, Pedregosa-Fauste S, Ayala-BlancoP. Estudio coste-beneficio del trasplante de la membrana amniótica para úlceras venosas de extremidades inferiores refractarias e tratamiento convencional. **Actas Dermosifiliogr** 2011; 102 (4): 284-8.
- 19-Taubin H, Humbert P, Viennet C, Saas P, Muret P. La membrane amniotique humaine dans la prise en charge des ulcères de jambe veineux chroniques. **Ann Dermatol Vener** 2011; 138(8-9): 572 - 9.
- 20-Fontenla JR, Vázquez X, Díaz P, Gatell J, Pita D. Membrana amniótica. Características, efectos y aplicaciones em oftalmologia. **Viernes** 2003; 64 (1465): 53-68.
- 21-Meller D, Paukin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP. Amniotic membrane transplantation in the human eye. **Disch Arztebi Int** 2011; 108 (14): 243 - 8.
- 22-Covre JL, Loureiro RR, Cristovam PC, Silva Ricardo JR, Haapalainen EF, Gomes Pereira JA. Comparação entre membrana amniótica com e sem epitélio como substrato para cultura de células epiteliais do limbo ex vivo. **Arq Bras Oftalmol** 2011; 74 (2):114 - 17.
- 23-Carvalho-Rêgo PR, Gomes JAP, Ballalai PL, Carvalho Cunha M, Barbosa Souza L, Erwenne C. Membrana amniótica na reconstrução da superfície ocular após exérese de carcinoma de células escamosas da conjuntiva. **Arq Bras Oftalmol** 2008; 71 (1): 22-7.
- 24-Pontes KCS, Borges APB, Duarte TS, Morato GL, Zavan V, Eleotério RB, Carlo EC. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea de coelhos-aspectos clínicos. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2008; 60 (5):1069 - 74.

- 25-Matthews RN, Faulk WP, Bennett JP. A review of the role of amniotic membranes in surgical practice. **Obstet Gynecol Annu** 1982; 11: 31-58.
- 26-Ninknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoeri M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. **Placenta** 2013;34: 340 - 5.
- 27-Dua, HS. Amniotic membrane transplantation. **Br J Ophthalmol** 1999; 83 (6) : 748 - 52.
- 28-Loeffelbein DJ, Baumann C, Stoecklhuber M, Hasler R, Mucke T, Steinstraber L, Drecool E, Wolff K-D, Kesting MR. Amniotic membrane as part of skin substitute for full- thickness wounds: an experimental evaluation in a porcine model. **J Biomed Mater Res Part B** 2012;100B (5): 1245 –56.
- 29-Liu J, Sheha H, Fu Y, Liang L, Tseng Scheffer CG . Update on amniotic membrane transplantation. **Expert Ver Ophthalmol** 2010; 5 (5): 645-61.
- 30-Del Campo Z, Gris O. Aplicaciones de la membrana amniótica em patologia ocular. **An Oftalmol** 2002;10 (3): 128 - 41.
- 31-Franco GR, Carvalho AF, Kroon EG, Lovagie S, Werenne J, Golgher RR, Ferreira PCP, Bonjardim CA. Biological activities of a human amniotic membrane interferon. **Placenta** 1999; 20 (2-3): 189 – 96.
- 32-Nakamura T, Sekiyama E, Takaoka M, Bentley AJ, Yokoi N, Fullwood NJ, Kinoshita S. The use trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. **Biomaterials** 2008; 29(27): 3729 - 37.
- 33-Díaz-Prado S, Muiños-Lopez E, Hermida-Gómez T, Cicione C, Rendal-Vásquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. **Differentiation** 2011; 1: 162 - 71.
- 34-Schuwan BL. Human amniotic transplantation for the treatment of ocular surface disease. **Investi Ophthalmol Vis Sci** 2004; 45 (1): 93-9.
- 35-Fishman IJ, Flores FN, Brantley Scott F, Spjut HJ, Morrow B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. **J Urology** 1987; 138 (5): 1291 - 94.
- 36-Gomes MF, Santos VW, Nogueira NO. Membrana amniótica humana liofilizada sobre feridas cruentas em área de biópsia bucal. **Rev Reg Araçatuba Assoc Paul Cir Dent** 2001; 55 (5): 327- 31.
- 37-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 (3): 215 - 28.

- 38-Paggiaro AO, Mathor MB, Carvalho VF, Pólo E, Herson MR, Ferreira MC. Estabelecimento de protocolo de glicerolização de membranas amnióticas para uso como curativo biológico. **Rev Bras Queimaduras** 2010; 9(1): 2- 6.
- 39-Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cells viability in amniotic membrane. **Cell Tissue Bank** 2007; 8(1): 1- 8.
- 40-Oliveira VA, Alvarenga J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de equinos. **Ciência Rural** 1998; 28 (4): 623-8.
- 41-Oliveira LL, Souza DB, Abílio EJ, Carvalho EC. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **JBCA** 2009; 2(3):175 - 88.
- 42-Kim H, Son D, Choi TH, Jung S, Kwon S, Kim J, Han K. Evaluation of an amniotic membrane collagen dermal substitute in the management of full thickness skin defects in a pig. **Arch Plast Surg** 2013; 40: 11-18.
- 43-Paracchini V, Carbone A, Colombo F, Castellani S, Mazzucchelli S, Di Gioia S, Degiorgio D, Deia M, Porretti L, Colombo C, Conese M. Amniotic mesenchymal stem cells: a new source for hepatocyte-like cells and induction of CFTR expression by coculture with cystic fibrosis airway epithelial cells. **J Biomed Biotechnol** 2012; 2012(article ID 575471): 1-15.
- 44-Lui J, Sheha H, Fu Y, Giegengack M, Tseng Scheffer CG. Oral mucosal graft with amniotic membrane transplantation for total limbal stem cell deficiency. **Am J Ophthalmol** 2011; 152 (5): 739- 47.
- 45-Ferreira PCC, Madrid N, Camargo PJT, Vianna MR. Membrana amniótica humana no tratamento da área doadora nos enxertos de pele nas úlceras de perna. **Rev Bras Angiol Cir Vasc** 1986; 16 (4):178 - 84.
- 46-Satish L, Katju S. Cellular and molecular characteristics of scarless versus fibrotic wound healing. **Dermatol Res Prat** 2010;2010 (article ID 790234): 11 pages. Published online 2010.
- 47-Lindenmair A, Wolbank S, Stadler G, Meinel A, Peterbauer-Scherb A, Eibl J, Polin H, Gabriel C, van Griensven M, Redl H. Osteogenic differentiation of intact human amniotic membrane. **Biomaterials** 2010; 31(33): 8659- 65.
- 48-Ma David H-K, Lai J-Y, Cheng H-Y, Tsai C-C, Yeh L-K. Carbodimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells. **Biomaterials** 2010; 31(25): 6647-58.
- 49-Oliveira EC, Zatti Ramos G, Afonso VCC, Souza LB. Estudo retrospectivo da utilização do transplante de membrana amniótica em um serviço terciário de oftalmologia. **Rev Bras Oftalmol** 2008; 67(4): 165-171.

- 50-Parolini O, Caruso M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: An update. **Placenta** 2011; 32 (Suppl 2): S186 - 95.
- 51-Evangelista M, Soncini M, Parolini O. Placenta- derived stem cells: new hope for cell therapy?. **Cytotechnology** 2008; 58(1): 33- 42.
- 52-Hubbell M, Bedmaski S, Muir WW, Hubbell JA. Drugs used for preanesthetic medication: Hand Book of Veterinary Anesthesia. 3^o edition. St Louis, Missouri: Mosby Ed; 2000. 19-57.
- 53-Oliveira HP, Silveira Alves GE, Rezende CMF. Eutanásia em Medicina Veterinária. [Resumo das apresentações junto à Disciplina de Deontologia Veterinária da UFMG; 2003; Belo Horizonte, Brasil].
- 54-Hess CT. Tratamento de feridas e úlceras. 4^a Edição. Rio de Janeiro (RJ). Ed Reichmann e Affonso; 2002.
- 55-Miranda FB, Santos WG, Freitas PMC, Eurides D. Membranas biológicas para uso em cirurgias reconstrutivas. In: Deminicis BB, Martins CB, Siqueira JB. Tópicos Especiais em Ciência Animal. Alegre, Espírito Santo: Editora CCA-UFES; 2012. 01-178.
- 56-Martins J. Consejo Argentino de Oftalmología. Resolución Del INCUCAI sobre implantes de membrana amniótica. 6^a Edição. Buenos Aires: Editora Consejo Argentino de Oftalmología; Maio, 2003.
- 57-Rosato EG, Radak D, DjukicV. Neoangiogénesis y membrana amniótica humana. Estudio clínico-instrumental em la úlcera flebostática de los miembros inferiores. **Angiología** 1992; 44(1): 1-7.
- 58-Subramanyan M. Amniotic membrane as a cover microskin grafts. **Brit J Plast Surg** 1995; 48(7):477- 8.
- 59-Martin JR, Redondo EB, Santana AR, De La Rosa G. Transplante de membrana amniótica em patologia de la superficie ocular. **Arch Soc Canar Oftal** 2001; 12: 101-7.
- 60- Ferreira LAP, Ferreira PCP, Kroon EG, Gonzaga C, Santos JR, Golher RR. A concentração de interferon humano de membranas amnióticas: métodos químicos. **Rev Microbiol São Paulo** 1991; 22 (3): 216- 20.
- 61-Godoy C, Guerra JL, Barros PSM. Ceratoplastia lamelar em cães utilizando membrana fetal equina como enxerto. Estudo experimental. **Arq Bras Oftalmol** 2002; 65 (5): 545-9.
- 62-Özeren S, Çorakci A, Erk A, Yücesoy G, Yücesoy I, Karabacak O. The effects of human membrane and fibrin sealant in the prevention of postoperative adhesion formation in the rabbit ovary model. **J Obstet Gynecol** 1998; 38 (2): 207- 10.

- 63-Barlas M, Gökçora H, Ereku S, Dindar H, Yücesan S. Human amniotic membrane as an intestinal patch for neomucosal growth in the rabbit model. **J Pediatr Surg** 1992; 27(5): 596-601.
- 64-Miot, HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos experimentais. **Vasc Bras** 2011; 10 (4): 275-8.

8- ANEXOS E APÊNDICES

Anexo A– Certificado de aprovação do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 140/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Uso da membrana amniótica como curativo biológico na cicatrização de feridas com extensa perda cutânea. Estudo experimental em ratos**", que tem como responsável(is) **Ivana Duval de Araujo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **25/ 08/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 140/2010**, related to the project entitled "**Use of the amniotic membrane as biological dressing in wounds with extensive cutaneous loss. Experimental study in rats**", under the supervisors of **Ivana Duval de Araujo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 25, 2010**.

This certificate expires in **August 25, 2015**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2010.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo B – Termo de consentimento do Comitê de Ética Hospitalar**Unidade Funcional Ginecologia,
Obstetrícia e Neonatologia**

A Unidade Funcional Ginecologia, Obstetrícia e Neonatologia têm como parecer favorável à realização da pesquisa intitulada **“ASSOCIAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA E FILME DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE TECIDOS”**.

Reiteramos que a sua realização não implica custos para esta Unidade Funcional.

Belo Horizonte, 23 de novembro de 2010.


Prof. Henrique Vitor Leite
CRM: 20.249
CPF: 678.928.548-49

Gerente da Unidade Funcional Ginecologia, Obstetrícia e Neonatologia

Anexo C- Termo de consentimento para obtenção da membrana amniótica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Ivana Duval de Araujo e os médicos da minha equipe de pesquisa, Rafael Calvão Barbuto e Ian Gôedert Leite Duarte, convidamos você a participar voluntariamente de um projeto de pesquisa onde queremos estudar se a membrana amniótica, uma pele fina que fica cobrindo a placenta, pode ser usada para ajudar na cicatrização de feridas difíceis de fechar. Já se sabe que essa membrana é muito útil para proteger a pele em queimaduras graves e pode ser preparada para ajudar na cicatrização da córnea. Outros pesquisadores acreditam que ela possa ajudar na cicatrização de outras regiões do corpo. Estamos então avaliando esse uso, e gostaríamos de pedir sua permissão para que sua placenta seja doada para essa pesquisa. Esclarecemos que a placenta após o parto usualmente é desprezada. É importante também sua autorização para que sua médica nos dê informações sobre se a senhora tem alguma doença como hepatite, AIDS ou outras doenças infecciosas. Garantimos também que todas as informações que nós obtivermos serão sigilosas e utilizadas somente para fazer esta pesquisa. Garantimos ainda que não iremos interferir de nenhuma forma no seu tratamento ou na sua relação com seu médico e ainda que, estamos disponíveis para responder quaisquer perguntas que a senhora tiver durante a pesquisa.

Em caso de dúvida, a senhora pode contactar a qualquer tempo a coordenadora da pesquisa, Dra. Ivana Duval Araujo pelo telefone 8488-2684. Se a senhora tiver alguma dúvida sobre a atitude ética dos pesquisadores ou sobre alguma questão ética referente aos estudos com membrana amniótica realizadas por esse grupo de pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), na Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar sala 2005, Campus Pampulha Belo Horizonte-MG, CEP 31270-901, telefone: 3409-4592

Eu DANIELLE PEREIRA DOS SANTOS
 identidade MG-11475524, declaro que fui informada dos objetivos dessa pesquisa e tive todos os esclarecimentos necessários, concordando em doar minha placenta de livre e espontânea vontade para esse estudo, estando consciente também de que não haverá benefícios pessoais de qualquer espécie como troca pela minha participação no estudo.
 Belo Horizonte, 10 de MARÇO de 2013

Assinatura Danielle P Santos

Testemunha 1 Patricia Pereira dos Santos
PATRICIA PEREIRA DOS SANTOS MG-11818751

Testemunha 2 Andrea Andrade
ANDREA ANDRADE MG-3979842

Declaro que expliquei os objetivos deste estudo ao voluntário e respondi às dúvidas expostas.

Rafael Calvão Barbuto
 Pesquisador responsável RAFAEL CALVÃO BARBUTO

Apêndice A – Protocolo de avaliação da histologia

DIAS		6	13	20	27
Tecido de granulação	Ausente				
	Discreto				
	Moderado				
	Acentuado				
Infiltrado inflamatório	Ausente				
	Discreto				
	Moderado				
	Acentuado				
Reação de células gigantes a corpo estranho	Ausente				
	Discreta				
	Moderada				
	Acentuada				
Necrose tecidual	Ausente				
	Discreta				
	Moderada				
	Acentuada				
Fibrose jovem	Ausente				
	Discreta				
	Moderada				
	Acentuada				
Fibrose antiga	Ausente				
	Discreta				
	Moderada				
	Acentuada				

Apêndice B - Número de achados de parâmetros histológicos das feridas, com a soma dos achados: ausentes com discretos e moderados com acentuados.

d i a s	6								13								20								27								
	Cont	S	Col	S	MF	S	MP	S	Cont	S	Col	S	MF	S	MP	S	Cont	S	Col	S	MF	S	MP	S	Cont	S	Col	S	MF	S	MP	S	
TG	a	0	0	0	0	2	0	0	1	3	1	2	1	1	0	0	1	4	1	4	0	3	0	1	4	5	3	5	5	6	6	7	
	d	0	0	0	2	0	2	2	1	1	0	0	0	3	3	3	3	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1		
	m	1	7	2	7	3	5	0	7	2	4	2	5	3	5	1	7	3	3	1	3	3	3	0	6	2	2	2	2	0	0	0	
	A	6	5	2	2	7	2	2	3	2	2	2	2	6	0	0	2	2	0	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
II	a	0	6	0	3	0	3	0	3	0	3	0	4	0	3	0	5	1	4	1	5	0	5	0	6	2	7	4	6	4	6	3	6
	d	6	3	3	3	3	3	3	4	4	3	5	3	4	5	6	3	4	5	6	5	6	6	5	5	2	2	2	2	3	3		
	m	1	1	3	4	3	4	2	4	3	4	3	3	2	3	1	2	3	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	
	A	0	1	1	1	2	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CG	a	6	7	7	7	6	7	5	7	4	7	5	5	6	6	6	7	3	7	1	5	5	6	5	6	3	5	5	6	6	5	6	
	d	1	0	0	1	0	2	3	3	0	0	0	1	4	4	1	4	4	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1	1		
	m	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	1	0	2	1	1	0	0	1	1		
	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
CII	m	6	2	3	3	4	3	2	5	5	4	5	4	5	6	4	5	6	4	5	6	6	7	4	4	4	2	4	2	4	4		
	p	0	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	m	1	4	2	2	2	3	3	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0		
NC	a	3	6	2	3	0	4	0	0	2	5	4	7	4	6	5	6	5	6	7	4	6	6	7	6	6	7	7	6	6	7	7	
	d	3	1	4	0	3	3	2	1	1	1	1	1	0	2	1	0	2	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	m	0	1	2	4	1	3	2	7	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0		
	A	1	2	2	2	5	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
FJ	a	3	6	0	2	0	3	6	7	2	4	1	3	0	1	1	5	2	4	2	3	1	3	3	5	6	7	3	5	6	6	7	
	d	3	2	3	1	2	2	1	4	2	2	1	4	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	0	0	1	1	1		
	m	1	1	5	5	4	4	0	0	3	3	4	4	4	5	1	2	3	3	3	4	3	3	2	2	0	0	2	2	0	0	0	
	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FA	a	7	7	6	7	6	6	7	7	3	5	4	5	4	4	7	7	3	3	4	4	3	4	6	7	0	0	0	1	0	0	0	
	d	0	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0		
	m	0	0	0	1	1	0	0	1	2	2	2	1	2	0	0	3	4	2	3	2	2	2	0	0	1	7	1	6	0	6	1	7
	A	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	6	5	6	6	6	6	6	6	6	

TG = tecido de granulação

II = infiltrado inflamatório

CG = reação de células gigantes

CII = células do infiltrado inflamatório

NC = necrose

FJ = fibrose jovem

FA = fibrose antiga

A = ausente d = discreta m = moderada A = acentuada


S = soma de a+d e soma de m+A


Cont = controle

Col = colágenase

MF = Membrana amniótica fresca

MP = membrana amniótica preservada

 = números considerados ausentes para efeito estatístico

 = números considerados presentes para efeito estatístico