

Table 1: Biological activity of heparin analogs from marine invertebrates.

Species	Heparinanalogue	Biologicalactivity
<i>Tachypleustridentatus</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Neuritogenicactivity
<i>Loligosp</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Neuronal growth inhibitory activity; P- and L-selectininhibitoryactivity; Neuronal growthinductionactivity; Herpexvirus infection inhibitory activity
<i>Holothuriagrisea (Ludwigothureagrisea)</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Anticoagulantandantithromboticactivity; P- and L-selectininhibitoryactivity; Antimetastatic activity; Angiogenesis induction activity
<i>Halocynthiaapyriformis</i>	Oversulfatedchondroitin sulfate	Anticoagulantactivity
<i>Styela clava</i>	Chondroitin sulfate	Antiinflammatoryactivity
<i>Panaeus brasiliensis</i>	Low molecular weightheparin	Anticoagulantandantithromboticactivity
<i>Litopenaeusvannamei</i>	Heparin	Anticoagulantactivity; Antiinflammatoryactivity
<i>Katylisia opima</i>	heparin-like	High antivcoagulantactivity
<i>Nodipectennodosus</i>	heparin-like	Anticoagulant andantithromboticactivity, Antiinflammatory activity; Antimetastatic activity

How do these molecules relate to each other during the cell migration? In the presence of manganese, integrin undergoes a conformational change to become active and allowing interaction with matrix fibronectin which, in turn, requires syndecan on the cell surface (Figure 2). This manganese-induced-ternary complex allows the reorganization of the cell cytoskeleton, enabling then the migration. 10 Unpublished preliminary data indicate that, in the presence of manganese, the tumor cells migrate in a faster way. Interestingly, it is observed that the addition of heparin reverses the effect of the migration inducer produced by manganese. We believe that this inhibitory effect of heparin may result from the extracellular manganese sequestration preventing its interaction with integrin.

In order to prove the role of manganese element in the increased migration of tumor cells and consequently the formation of metastases, histological sections of tissue kept in the HNMD Pathology Service from patients with colon cancer have been analyzed and related to the staging of the disease. Confirmation of this hypothesis can generate the inclusion of manganese search in biopsy material as a predictor of metastasis formation.

## DISCUSSION

Research emphasis on the molecular and cellular basis of cancer developed in the Medical Biochemistry Institute of the Federal University of Rio de Janeiro are well recognized by the published papers in scientific journals of great impact among the international scientific community. However, the relevance of the research is justified when their findings ultimately translate into benefits for the health of human beings. That is why the interaction of basic research at UFRJ is consolidated with the partnership with the Marcílio Dias Naval Hospital, by the Institute of Biomedical Research. The efficacy of the Hospital in registering and maintaining the data of their patients as well as the tissue bank samples allow retrospective studies to be conducted for verification of the data obtained by in vitro and experimental animals in vivo tests. Observations obtained from retrospective studies then allow the realization of prospective clinical studies in patients treated at HNMD, after authorization thereof. These things together are translated into increased service excellence with the introduction of new possibilities to the therapeutic arsenal.

## CONCLUSION

The translational research in health science arose from the need for a greater interaction between the laboratory and the clinics. The

findings observed at the molecular level have continuity when they are tested and proved in the medical practice. In this context, the interaction between the IPB-HNMD and IBqMLM-UFRJ translates the concept of Basic-Clinical Translational Research by combining researchers from different areas involved from the laboratory to the medical clinic in the search for the improvement of human welfare.

## REFERENCES

1. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA*. 2008; 299(2):211-3.
2. Collins FS. Reengineering translational science: The time is right. *Sci Transl Med*. 2011 Jul 6;3(90):90cm17
3. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial to mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
4. Kozłowski EO, Pavão MSG. Effect of sulfated glycosaminoglycans on tumor invasion and metastasis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(9):1807-15.
5. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can evolve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(4):2193-8.
6. Stevenson JL, Varki A, Borsig L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P-selectin and L-selectin, but non-anticoagulant heparin scan have additional effects. *Thromb Res*. 2007;120(Suppl2):S107-11.
7. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*. 2003;8(12):536-44.
8. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Discov*. 2009;8(1):69-85.
9. Kozłowski EO, Pavão MS, Borsig L. Ascidian dermatans sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *J Thromb Haemost*. 2011;9(9):1807-15.
10. Hopkinson SB, Hamill KJ, Wu Y, Eisenberg JL, Hiroyasu S, Jones JCR. Focal contact and hemidesmosomal proteins in keratinocyte migration and wound repair. *Adv Wound Care*. 2014 Mar 1;3(3):247-63.

**How to cite this article:** Souza MAF, Gregório ML, Arêas ALBG, Domingues MF, Silva VAC, Farias EOK, Pavão MSG. Interaction between the Federal University of Rio de Janeiro and Marcílio Dias Naval Hospital in the basic-clinical translational research on the tumor progression. *Arq Bras Med Naval*. 2015 Jan/Dec;76(1):59-62.

# MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA COMO CURATIVO BIOLÓGICO PARA FERIDAS DE DIFÍCIL RESOLUÇÃO E AS POSSÍVEIS UTILIZAÇÕES NO HNMD

Recebido em 28/08/2015

Aceito para publicação em 10/09/2015

- 1°Ten (RM2-Md) Maria Alice Fusco de Souza <sup>1</sup>  
1°Ten (RM2-Md) Renata Morley de Muno <sup>2</sup>  
1°Ten (RM2-S) Rodrigo Jorge de Alcantara Guerra <sup>3</sup>  
1°Ten (Md) Paula Reis Polito <sup>4</sup>  
GM (RM2-S) Rachel Antonioli Santos <sup>5</sup>  
GM (RM2-S) Adriana Paula Macedo Ferreira Pereira <sup>6</sup>  
GM (RM2-S) Shana Priscila Coutinho Barroso <sup>7</sup>  
CB-EF Caroline Corrêa de Aguiar <sup>8</sup>  
CB-EF Lucas Sant'ana Silva <sup>9</sup>  
CB-EF Ricardo Silva de Miranda <sup>10</sup>  
CF (Md) Marcelo Leal Gregório <sup>11</sup>

## RESUMO

Desde a Antiguidade, a Medicina se preocupa em tratar as feridas cutâneas. Ainda hoje, os mais diversos materiais têm sido utilizados na tentativa de acelerar a cicatrização dos diferentes tipos de feridas. Com o avanço do conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares do processo de cicatrização, a Membrana Amniótica Humana (MAH) vem sendo considerada como um curativo biológico ideal, por apresentar fatores de crescimento, citocinas e componentes de matriz extracelular favoráveis à cicatrização. Inúmeros centros de saúde mundiais já utilizam a MAH como recurso no tratamento de feridas como queimaduras, lesões oftalmológicas pós-cirúrgicas, lesões cutâneas de pacientes diabéticos, dentre outras. O Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD), por meio do Instituto de Pesquisas Biomédicas, vem realizando o processamento de MAH de parturientes do próprio Hospital, a fim de fornecer um curativo de baixo custo e grande vantagem aos usuários do Sistema de Saúde da Marinha portadores de feridas passíveis da utilização do mesmo. Por se tratar de uma unidade hospitalar de grande porte e de alta complexidade, o HNMD recebe, por ano, milhares de usuários com feridas. Dentre as ocorrências, destacam-se as queimaduras térmicas, elétricas e químicas, as úlceras por pressão e lesões pós-cirúrgicas. Os exemplos históricos de acidentes radiológicos de grande magnitude, a eminência de guerras com uso efetivo de armas nucleares e radiológicas, além do aumento recentemente observado nas práticas de rotina do submarino nuclear da Marinha do Brasil parecem nortear para uma nova utilização deste curativo biológico.

**Palavras-chave:** Cicatrização; Curativos biológicos.

## INTRODUÇÃO

Uma ferida é definida como a perda de continuidade do tegumento cutâneo (pele), acompanhada ou não da perda de tecido subjacente, seja ele muscular, ósseo ou nervoso.<sup>1</sup> A pele é o maior órgão do corpo humano, tendo sua importância como barreira e elemento de contato do organismo com o meio externo. Por isso, na ocorrência de uma ferida, imediatamente é ativada uma cascata de eventos celulares e moleculares no local a fim de regenerar, reconstituir e restaurar o tecido.<sup>2-3</sup> As feridas podem ser classificadas de acordo com a causa, a morfologia, o grau de contaminação, a característica do leito da ferida, a característica do exsudato, a cultura da secreção e a presença de fístulas,

<sup>1</sup> Médica Veterinária. Doutora em Ciências pela Faculdade de Medicina – UFRJ. Ajudante da Seção de Cirurgia Experimental do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias. E-mail: alicefusco@hnmd.mar.mil.br

<sup>2</sup> Médica Veterinária. Encarregada da Divisão de Cirurgia Experimental do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>3</sup> Biólogo. Pós-Doutorado em Biotecnologia Nuclear pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Encarregado da Divisão de Pesquisa Clínica do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>4</sup> Médica. Residente da Clínica de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>5</sup> Bióloga. Ajudante da Divisão de Pesquisa do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>6</sup> Bióloga. Ajudante da Divisão de Pesquisa do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>7</sup> Bióloga. Ajudante da Divisão de Pesquisa do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>8</sup> Graduanda em Biomedicina. Auxiliar técnica do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>9</sup> Graduando em Nutrição. Auxiliar técnica do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>10</sup> Bioterista do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias e Secretário da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-HNMD).

<sup>11</sup> Médico. Especialização Observership pela Cleveland Clinic, Florida, USA. Encarregado do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

a fase de evolução cicatricial e o tipo de cicatrização.<sup>4</sup> Os principais tipos de feridas incluem aquelas causadas por agentes físicos, químicos, térmicos e elétricos, ou decorrentes de doenças associadas como úlcera diabética ou carcinomas.<sup>5-6</sup>

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Cicatrização de Feridas

Independente da classificação, o reparo da ferida deve ocorrer para que seja garantida a integridade do tecido e a homeostase.<sup>2</sup> Sob condições fisiológicas, este reparo tem início a partir da instalação do dano. Baseadas nas alterações morfológicas que ocorrem ao longo do processo cicatricial, as feridas podem ser divididas em três fases.<sup>7</sup>

Na primeira fase – Inflamatória - uma matriz provisória preenche o sítio da ferida e promove a migração de uma variedade de tipos celulares para a região. A hemostasia permite o reparo inicial do dano, desencadeando a formação dos coágulos sanguíneos a partir da fibrina e fibronectina. Plaquetas liberam citocinas, tais como PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta) e TGF (fator de crescimento transformador), que induzem o recrutamento de macrófagos e outras células inflamatórias e ainda, induzem a quimiotaxia e o recrutamento de fibroblastos e células endoteliais.<sup>1,8</sup>

A segunda fase do processo de cicatrização – Proliferativa – é caracterizada pela proliferação de fibroblastos, tipo celular dominante no local da ferida. Esta proliferação ocorre devido à angiogênese local estimulada pela perda da perfusão sanguínea quando da instalação da ferida.<sup>9</sup> No tecido de granulação formado, os fibroblastos estão ativados e passam a exibir propriedades contráteis graças à expressão de  $\alpha$ -SM (actina muscular alfa) tornando-se, então, miofibroblastos.<sup>10</sup> Estes miofibroblastos exibem papel fundamental na contração/fechamento da ferida<sup>11</sup> e secretam componentes de matriz extracelular (MEC), tais como colágeno, glicosaminoglicanos, fibronectina, laminina e elastina, que substituem a matriz provisória formada inicialmente.<sup>12</sup>

Além disso, fibroblastos também secretam TGF, FGF (fator de crescimento de fibroblasto), TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteínas) e KGF (fator de crescimento de queratinócitos), sendo este último essencial para o processo de re-epitelização e, assim, para a reestruturação das funções da epiderme perdidas com a ferida.<sup>13</sup>

Na terceira fase – Regenerativa – ocorre o remodelamento do tecido de granulação e apoptose de células endoteliais e miofibroblastos.<sup>14</sup> A síntese de elementos da matriz extracelular (MEC) é reduzida e há modificação estrutural destes constituintes por enzimas proteolíticas liberadas na MEC, principalmente metaloproteínas (MMPs) e seus inibidores (TIMPs). Progressivamente, o colágeno tipo III (principal componente do tecido de granulação) é substituído pelo colágeno tipo I (principal componente estrutural da derme) e proteínas fibrosas como a elastina, ausentes no tecido de granulação, são incorporadas a matriz remodelada.

No entanto, em alguns casos, como nas feridas crônicas ou complexas ou em pacientes com doenças associadas, o processo de cicatrização não ocorre de forma fisiologicamente esperada.<sup>15</sup> Para estes casos, pesquisadores na área de medicina regenerativa vêm procurando curativos alternativos biológicos ou sintéticos capazes de fornecer condições que favoreçam os processos de cicatrização

e re-epitelização.<sup>15</sup> Todavia, além do fato de que a maior parte dos curativos disponíveis no mercado não são encontrados no Brasil, os produtos nacionais ainda representam um alto custo para o sistema de saúde pública.<sup>16</sup>

Os custos com o tratamento das feridas de diversas classificações também é um importante fator a ser considerado.<sup>4</sup> A venda de insumos para o tratamento de feridas em todo mundo atingiu a marca de 13 bilhões de dólares em 2013.<sup>6</sup> Os recursos financeiros do paciente e/ou da unidade de saúde representam um dos aspectos a serem considerados na escolha do tratamento da ferida.<sup>17</sup>

A procura por um curativo menos oneroso e que resulte em bons resultados clínicos fez com que pesquisadores e profissionais da área da saúde voltassem à atenção para o uso da membrana amniótica humana (MAH).

### Membrana Amniótica Humana (MAH)

A MAH é a camada mais interna da placenta,<sup>18</sup> com espessura de 20–50  $\mu$ m<sup>19</sup> e constituída por três camadas: uma camada única de células epiteliais cuboidais à colunares de origem ectodérmica; uma membrana basal composta de uma rede de fibras reticulares; e por último, uma matriz estromal avascular dividida em lâmina compacta, lâmina fibrorreticular e lâmina espongiiforme.<sup>18,20</sup> A lâmina fibrorreticular é a camada mais espessa da membrana amniótica composta por fibroblastos que repousam sobre uma rede reticular.<sup>21</sup> Dentre estas camadas, vale ressaltar que a membrana basal é morfológicamente similar àquela encontrada na pele humana e consiste de laminina e colágeno tipo IV, VII e XVII.<sup>22</sup>

A MAH apresenta características favoráveis a sua utilização como curativo biológico, devido à presença de vários fatores de crescimento já citados, como KGF, FGF, PDGF, além de fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Destes, o FGF estimula a síntese e depósito de proteínas da MEC.<sup>19,21</sup> Além disso, a MAH apresenta alguns componentes presentes também na MEC, como colágenos tipos I-VII, elastina, laminina e fibronectina.<sup>21</sup>

Os fatores de crescimento e os componentes de MEC conferem à MAH características de re-epitelização, redução da fibrose, inibição da dor, da infecção e da inflamação.<sup>21</sup> A formação da MEC é essencial para a cicatrização de feridas e a MAH representa, pelas características supracitadas, uma excelente ferramenta no tratamento de feridas de pele.

Outra característica da MAH de extrema importância é a ausência de imunogenicidade, visto que uma das preocupações da medicina regenerativa é a rejeição de enxertos e curativos. Os curativos baseados em MAH não apresentam tal problema uma vez que, são descritos como implantes de natureza orgânica, inertes, compostos quase que exclusivamente por colágeno, desprovidos de leucócitos<sup>23</sup> e apresentam pouca ou nenhuma expressão do antígeno leucocitário humano -A, B ou DR.<sup>18, 24-27</sup>

### Por que usar a membrana amniótica como curativo?

Historicamente, o uso da membrana amniótica origina-se na tradicional Medicina Chinesa. O primeiro relato científico do seu uso data de 1910, quando Davis a utilizou como material cirúrgico no tratamento de queimaduras na pele em pacientes humanos no Johns

Hopkins Hospital.<sup>28</sup> Mais tarde, Sabella descreveu seu uso à fresco para tratamento de queimaduras e ulcerações de pele e observou a redução da dor e aumento na velocidade de re-epitelização.<sup>29</sup> Na segunda metade do século XX, o uso da MAH ganhou popularidade como curativo biológico no manejo de queimaduras e feridas de pele por ácidos, úlcera e escara, entre outras, além da sua utilização como substituto de tecidos oculares,<sup>19</sup> demonstrando assim ser um excelente suporte biológico para o crescimento e migração celular.<sup>28</sup>

Apesar das vantagens, o uso da MAH foi abandonado durante anos devido ao risco de infecção oriundo de partos normais de mulheres não testadas sorologicamente. No entanto, atualmente o material oriundo de cesárea pode ser congelado e testado sorologicamente, além de esterilizado por diferentes meios.<sup>26,30-32</sup>

Como já mencionado, a MAH não é uma simples membrana avascular. Ela possui atividades metabólicas, como transporte de água e de materiais solúveis, produção de fatores bioativos como peptídeos vasoativos, fatores de crescimento e citocinas.<sup>33</sup> Como curativo, a MAH atua como um substrato que facilita a migração celular epitelial, melhora a adesão das células epiteliais<sup>34</sup> e promove diferenciação celular.<sup>35</sup> Também atua na reparação da lesão tecidual por liberar fatores de crescimento e citocinas que atuam facilitando a migração celular e contribuindo para a aceleração do processo de granulação.<sup>36-39</sup>

De especial importância é a dor do paciente durante o tratamento principalmente de feridas complexas. O uso de MAH reduz a dor por aderir à superfície da ferida, cobrindo as terminações nervosas, reduzindo a contaminação bacteriana e diminuindo assim a inflamação local.<sup>40-44</sup>

Todas essas características da MAH contribuem para o seu poder oclusivo sobre feridas (incluindo áreas irregulares como mãos e face) e conseqüentemente na diminuição do tempo de tratamento do paciente. Além disso, seu baixo custo, por ser um material de descarte, a torna vantajosa pela disponibilidade e facilidade de aceitação de doação pelas gestantes,<sup>45-46</sup> além da diminuição da frequência de trocas e facilidade de retirada do curativo, o que leva a um menor custo dos procedimentos e menor incômodo ao paciente.<sup>47</sup>

Alguns autores apontam como uma solução economicamente viável para o tratamento de feridas em países em desenvolvimento.<sup>48-49</sup>

### Possibilidades de uso da MAH

Atualmente a MAH é mais comumente usada na Oftalmologia para tratar queimaduras térmicas ou químicas, Síndrome de Stevens-Johnson e cirurgia de pterígio,<sup>48-51</sup> mas seu emprego tem se estendido a outras áreas da medicina como curativos biológicos para úlceras diabéticas dos pés, queimaduras, úlceras venosas, úlceras de pressão e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdômen, pelve, vagina e laringe.<sup>52-55</sup>

Dados coletados no Prontuário Informatizado (PIN) e no serviço de estatística do Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) mostram que uma demanda de usuários atendidos no ano de 2014 poderiam ter sido beneficiados pela utilização do curativo biológico a partir de MAH. Por exemplo, quatorze pacientes foram hospitalizados devido à lesão por queimadura na Clínica de Cirurgia Plástica e Reparadora e 166 cirurgias de pterígio foram realizadas na Clínica de Oftalmologia. No Departamento de Enfermagem foram

observados dados ainda mais expressivos, sendo enumeradas 814 internações de usuários que desenvolveram úlceras por pressão e 374 atendimentos de úlceras diabéticas. Por sua vez, a MAH é de fácil captação no HNMD, visto que em 2014 foram realizados 714 cesáreas neste Hospital.

A capacidade de apresentar uma resposta efetiva e rápida em acidentes de grande magnitude representa uma vantagem estratégica, além de garantir uma melhoria no atendimento dos pacientes graves. O incêndio ocorrido na Boate Kiss (Santa Maria, RS), em janeiro de 2013, revelou a importância da criação de um banco de tecidos para estocagem e pronto fornecimento de curativo biológico em casos de acidentes envolvendo um grande número de pacientes. Na ocasião, tendo em vista a grande demanda de vítimas do acidente, o Brasil teve que realizar a importação de grande volume de membranas amnióticas de bancos de tecidos da Argentina e do Uruguai, demonstrando a necessidade imediata da criação de um banco nacional.<sup>56</sup>

### Normatização

No Brasil, a remoção de tecidos do corpo humano para fins de transplante e tratamento está regulamentada pelas leis nº 9434/1997 e nº 10.211/2001. A realização de transplantes ou enxertos de tecidos só poderá ser autorizada após a realização, no doador, de todos os testes de triagem para diagnóstico de infecção e infestação exigidos em normas regulamentares expedidas pelo Ministério da Saúde.<sup>57-59</sup> Há, ainda, a necessidade de aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital para o uso de MAH nos pacientes.<sup>60</sup> A legislação nacional carece de uma regulação técnica específica a respeito da obtenção, preparação e utilização de MAH.<sup>61</sup>

## PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA PELO INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS (IPB)

Diversas são as metodologias de coleta, esterilização e estocagem de MAH descritas na literatura, com suas diferentes aplicações e vantagens. Considerando a infraestrutura já existente no IPB do HNMD, bem como a análise comparativa de dados coletados na literatura, a metodologia a seguir foi eleita para o desenvolvimento dos projetos associados.

Após aprovação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), usuárias eletivas para a cirurgia cesariana e que apresentam sorologia negativa para HIV-1 e -2, HTLV-1 e -2, Hepatite B e C, CMV e Sífilis têm a placenta coletada. Sob condições estéreis, a placenta é lavada em solução tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4) várias vezes para retirada de debris, sangue e coágulos.<sup>62</sup> A placenta é então seccionada a 2 centímetros do disco placentário, pois nesta área da MAH é maior a concentração de fatores de crescimento.<sup>28</sup> A placenta é lavada com solução salina contendo 10.000 UI de penicilina, 50  $\mu$ g/mL de estreptomicina e 50  $\mu$ g/mL de anfotericina B27,62 e então a membrana amniótica é separada manualmente do córion. Para a retirada do epitélio (descelularização), a MAH é mantida em solução de tripsina-EDTA 0,25% em banho-maria (37° C) por 30 minutos. Após neutralização da tripsina com DMEM, realiza-se a raspagem suave com o lado cego de uma lâmina de bisturi.<sup>63</sup> A MAH é esterilizada em solução de ácido paracético (PAA) 0,1% (v/v) em

PBS sem cálcio e magnésio (pH 7,2-7,4) por 3 (três) horas a 25° C sob agitação suave, seguido por 3 (três) lavagens de TBS.18 Após, a MAH é apoiada em papel de nitrocelulose com a superfície epitélio/membrana basal voltada para cima.<sup>62</sup> O papel contendo a MAH é então estocado a -80° C em solução de Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) e glicerol (proporção 1:1).<sup>62</sup> A MAH é assim mantida por 3 (três) meses, até a repetição dos exames da doadora. Com os resultados negativos dos exames de sorologia, a MAH está pronta para uso, após descongelamento em temperatura ambiente e lavagem com soro fisiológico (Figura 1).

## DISCUSSÃO

É alto o índice de pacientes com alterações na integridade da pele, constituindo assim um sério problema de saúde pública.<sup>4</sup> Nesse contexto, a substituição de tecidos é um dos principais desafios da medicina regenerativa atual. Em função das características extremamente favoráveis e do potencial uso como curativo biológico, a utilização clínica da membrana amniótica voltou à tona nos últimos anos. Com os avanços no conhecimento sobre o processo de cicatrização, cada vez mais a MAH revela-se como uma opção de curativo por minimizar o risco de infecções oportunistas, diminuir a dor e promover o desenvolvimento de tecido de granulação saudável que propiciará a cicatrização.

As características de um curativo ideal são facilmente encontradas na MAH: rápida utilização e vida de prateleira aceitável, fácil esterilização, resistente à manipulação, hipoalergênico, não corrosivo, não teratogênico, retirado sem morbidade e, ainda, moldável ao local de aplicação.<sup>64-65</sup>

O novo interesse pelo uso da MAH tem gerado uma série de novas indicações clínicas, tendo em vista a demanda crescente de novos e intrigantes quadros patológicos. Como todos os novos procedimentos em Medicina, estas indicações devem ser continuamente avaliadas e são necessários mais trabalhos clínicos controlados para a comprovação das novas hipóteses.<sup>61</sup>

A ocorrência de acidentes radiológicos de grande magnitude em todo o mundo, juntamente com a possibilidade concreta de uso de materiais de origem nuclear ou radiológica em atentados ou ataques terroristas, associada à necessidade do uso estratégico de energia nuclear no meio naval militar, demonstram a necessidade de um arsenal cada vez maior para o tratamento de lesões induzidas por radiação. Por sua vez, o HNMD apresenta-se como hospital de referência nacional para o atendimento de vítimas de

acidentes radiológicos e nucleares, com acreditação junto à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

## CONCLUSÃO

O HNMD, além de atender a uma significativa demanda de pacientes portadores de feridas passíveis da utilização da MAH, apresenta potencial para o uso deste curativo biológico em feridas mais complexas em que a MAH ainda não foi testada.

O objetivo da pesquisa com MAH iniciada no IPB é desenvolver curativos que envolvam tecnologias mais simples, de fácil obtenção e baixo custo, mas igualmente eficientes quando comparados aos curativos sintéticos oferecidos pelo mercado internacional, permitindo a continuidade na busca incessante pela melhoria da qualidade de vida do usuário.

## AGRADECIMENTO

Ao CF(Md) Jaime César Estumano e à CF (Md) Claudia Fiorot, da Clínica de Oftalmologia do HNMD; à CF (Md) Raquel Imazaki e CC (Md) Angélica Schettini, da Clínica de Cirurgia Plástica do HNMD, e à CT (S) Marília Cristina e CT (S) Patrícia Oliveira, da Seção de Enfermagem no pré diabético do HNMD, pelas informações gentilmente cedidas e aqui apresentadas.

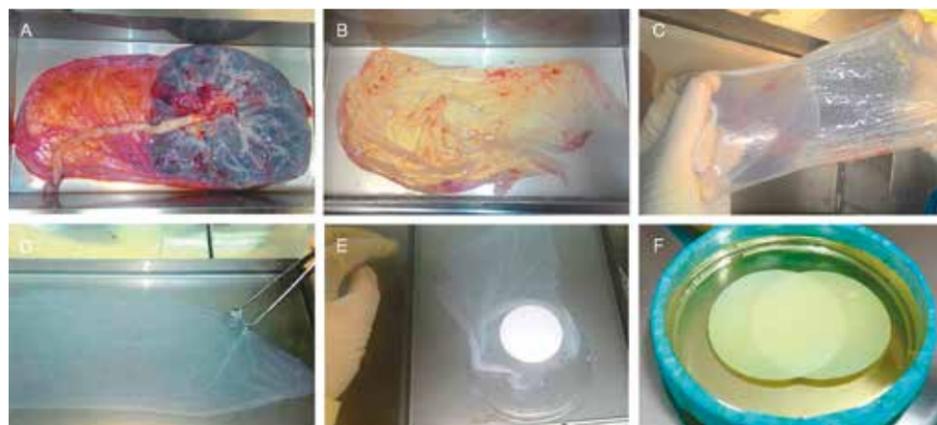
## REFERÊNCIAS

1. Leaper DJ, Harding KG. Wounds: biology and management. Oxford: Oxford University Press; 1998.
2. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127:514-25.
3. Clivatti GM, Cavichiolo FA, Teles FB, Nasr A. Feridas superficiais: fatores técnicos associados a complicações locais. *Rev Med UFPR.* 2015;2(1):8-16.
4. Ferreira AM, Frota OP, Rigotti MA, Almeida WA, Moura ES, Christofoletti G. Terapia tópica de feridas: disponibilidade e utilizações em uma rede de atenção primária à saúde. *Rev Enferm UFPE.* 2015;9(Supl 2):8401-10.
5. Hutchinson J. The Wound Programme. Centre for Medical Education Dundee. Dundee: University of Dundee; 1992.
6. MedMarket LLC. Worldwide Wound Management, Forecast to 2021: established and emerging products, technologies and markets in the Americas, Europe, Asia/Pacific and rest of world. [acesso em ago 2015]. Disponível em: <https://www.medilgence.com/store/page44.html>

7. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-46.
8. Clemetson K. Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis Research.* 2012;129 (3):220-4.
9. Wietecha MS, Dipietro LA. Therapeutic approaches to the regulation of wound angiogenesis. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(3):81-6.
10. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in woundhealing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology.* 2014;7:301-11.
11. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue modelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
12. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):9-18.
13. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
14. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995;146(1):56-66.
15. Paggiaro AO, Mathor MB, Carvalho VF, Pólo E, Herson MR, Ferreira MC. Estabelecimento de protocolo de gliceração de membranas amnióticas para uso como curativo biológico. *Rev Bras Queimaduras.* 2012;11(3):111-5.
16. Gajiwala K, Gajiwala AL. Use of banked tissue in plastic surgery. *Cell Tissue Bank.* 2003;4(2-4):141-6.
17. Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(3):203-6.
18. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials.* 2009;30(6):1056-65.
19. Atique BF, Ahmed KT, Asaduzzaman SM, Hasan KN. Effects of Gamma Irradiation on Bacterial Microflora Associated with Human Amniotic Membrane. *Biomed Res Int.* 2013.
20. Sangwan VS, Burman S, Tejwani S, Mahesh SP, Murthy R. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Indian J Ophthalmol.* 2007;55(4):251-60.
21. Riau AK, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials.* 2010;31(2):216-25.
22. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Engineering.* 2008;14(4):463-72.
23. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta.* 1991;12(3):285-8.
24. Solomon A, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *2001;108(3):449-60.*
25. Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):1167-73.

26. Pesteil F, Drouet M, Rousanne MC, Lacroix P. Amniotic membrane: an innovative treatment of refractory vascular ulcers? *Phlebology.* 2009;16(2):259-66.
27. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:748-52.
28. Litwiniuk M, Grzela T. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(4):451-6.
29. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y. Antiinflammatory effect of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea.* 2001;20:408-13.
30. Yatim RM, Kannan TP, Ab Hamid SS, Shamsudin SH. Effects of different processing methods of human amniotic membrane on the quality of extracted RNA. *Arch Orolfac Sci.* 2013;8(2):47-53.
31. Thomasen H, Steuhl KP, Meller D. Validation of an automatic test system for sterile testing of amniotic membranes. *Ophthalmol.* 2014;111(5):454-9.
32. Singh R, Chacharkar MP. Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. *J Tissue Viability.* 2011;20(2):49-54.
33. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ. Williams obstetrics. 21st ed. London: Slock Inc; 2001.
34. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol.* 1997;124:765-74.
35. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol.* 1989;93:372-8.
36. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2004;49(1):51-77.
37. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian Alexander M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell and Mater.* 2008;15:88-99.
38. Del Campo Z, Gris O. Aplicaciones de la membrana amniótica em patologia ocular. *Ann Oftal.* 2002;10:128-41.
39. Hanumanthappa MB, Gopinathan S, Guruprasad RD. Amniotic membrane dressing versus conventional dressing in lower limb varicoseulcer: a prospective comparative study. *Int J Biol Med Res.* 2012;3(2):1616-20.
40. Ravishanker R, Bath AS, Roy R. "Amnion Bank"- the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns.* 2003;29(4):369-74.
41. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns.* 1995;21(5):356-61.
42. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol.* 2005;16(4):233-40.
43. Bennet JP, Mathews R, Faulk WP. Treatment of chronic ulceration of leg with human amnion. *Lancet.* 1980;315:1153-6.
44. Colococho G, Graham WP, Greene AE, et al. Human amniotic membranes as a physiological wound dressing. *Arch Surg.* 1974;109:370.
45. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000;19(3):348-52.

**Figura 1:** Processamento da MAH para utilização como curativo biológico. Em A, a placenta recém-coletada é lavada em PBS (pH 7,4) para retirada de coágulos e debris. O âmnion/córion é recolhido e incubado em solução contendo antibióticos por 2 horas (B) e, em seguida a MAH é separada manualmente do córion (C). Após descellerização e esterilização, a MAH é lavada em solução tampão salina (D), colocada sobre papel de nitrocelulose com a superfície epitelial voltada para cima (E) e mantida, pronta para uso, a -80o C em solução de DMEM : glicerol (1:1) (F).



46. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981;72(8254):1003-5.

47. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16(4):233-40.

48. Alió JL, Abad M, Scorsetti DH. Preparation, indications and results of human amniotic membrane transplantation for ocular surface disorders. *Expert Rev Med Devices*. 2005;2(2):153-60.

49. Arvola R, Holopainen J. Amnion in the treatment of ocular diseases. *Duodecim*. 2015;131(11):1044-9.

50. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, Griffoni C, Grassetto A, Elbadawy HM, Ponzin D. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. *Cell Tissue Bank*. 2015 Apr/Jul.

51. Gutiérrez-Moreno S, Alsina-Gibert M, Sampietro-Colom L, Pedregosa-Fauste S, Ayala-Blanco P. Cost-benefit analysis of amniotic membrane transplantation for venous ulcers of the legs that are refractory to conventional treatment. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102(4):284-8.

52. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: burns of the second degree. *Br J Ophthalmol*. 1946;30(6):337-45.

53. Trelford JD, Trelford Suaer M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;134:833-45.

54. Kirsner RS, Sabolinski ML, Parsons NB, Skornicki M, Marston WA. Comparative effectiveness of a bioengineered living cellular construct vs. a dehydrated human amniotic membrane allograft for the treatment of diabetic foot ulcers in a real world setting. *Wound Repair Regen*. 2015 Jun.

55. Smiell JM, Treadwell T, Hahn HD, Hermans MH. Real-world experience with a decellularized dehydrated human amniotic membrane allograft. *Wounds*. 2015;27(6):158-69.

56. Pretto Neto AS, Rech DL, Martins ALM, Silveira DPM, Chem EM, Ely PB. Membrana amniótica humana: curativo biológico promissor. *Rev Bras Cir Plást*. 2013;28(supl):1-103.

57. Brasil. Decreto nº 2.268, de 30 de junho de 1997. Regulamenta a Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre

a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fim de transplante e tratamento, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 1997 jul. 01; Sec.1:13739.

58. Legislación sobre donación y trasplante de órganos, tejidos y células compilación y análisis comparado. Washington, D.C: OPS/WHO; 2013.

59. Brasil. Lei nº 10.211, de 23 de março de 2001. Altera dispositivos da Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 2001 mar. 24; Sec.1:6.

60. Duarte IGL. Membrana amniótica como curativo biológico na cicatrização de feridas infectadas: estudo experimental em coelhos [dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

61. Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. São Paulo: ABTO; 2009.

62. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):93-9.

63. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-25.

64. Bellows CF, Alder A, Helton WS. Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts: present status and future opportunities. *Expert Rev Med Devices*. 2006 Set;2006;3(5):657-75.

65. Oliveira EC, Ramos G Z, 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):165-71.

**Como citar este artigo:** Souza MAF, Munro RM, Guerra RJA, Polito PR, Santos RA, Ferreira APM, et al. Membrana amniótica humana como curativo biológico para feridas de difícil resolução e as possíveis utilizações no HNMD. *Arq Bras Med Naval*. 2015 jan/dez;76(1):63-68.

# HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE AS A BIOLOGICAL DRESSING FOR WOUNDS OF DIFFICULT RESOLUTION AND POSSIBLE USES IN THE HNMD

Received on 8/28/2015

Accepted for publication on 9/10/2015

1°Ten (RM2-Md) Maria Alice Fusco de Souza <sup>1</sup>  
 1°Ten (RM2-Md) Renata Morley de Munro <sup>2</sup>  
 1°Ten (RM2-S) Rodrigo Jorge de Alcantara Guerra <sup>3</sup>  
 1°Ten (Md) Paula Reis Polito <sup>4</sup>  
 GM (RM2-S) Rachel Antonioli Santos <sup>5</sup>  
 GM (RM2-S) Adriana Paula Macedo Ferreira Pereira <sup>6</sup>  
 GM (RM2-S) Shana Priscila Coutinho Barroso <sup>7</sup>  
 CB-EF Caroline Corrêa de Aguiar <sup>8</sup>  
 CB-EF Lucas Sant'ana Silva <sup>9</sup>  
 CB-EF Ricardo Silva de Miranda <sup>10</sup>  
 CF (Md) Marcelo Leal Gregório <sup>11</sup>

## ABSTRACT

Since ancient times medicine is concerned about how to treat wounds. Even today, several materials have been used in an attempt to accelerate the healing process of various types of wounds. With the advancement of knowledge about the cellular and molecular mechanisms of the healing process, the Human Amniotic Membrane (HAM) has been considered as an ideal biological dressing due to the presence of growth factors, cytokines and extracellular matrix components favorable to the healing process. Numerous world health centers already use HAM as a resource for the treatment of wounds such as burns, post-surgical eye injuries, skin lesions in diabetic patients, among others. The Marcílio Dias Naval Hospital (HNMD), by its Institute of Biomedical Research, has been the processing HAM from parturient women attending this Hospital, in order to provide a wound dressing of low-cost and of great gain to the patients from the Navy Health System with wounds that could be treated with this dressing. Because of the fact that HNMD is a large and high complexity hospital, this unit receives each year, thousands of wounded patients. Among these cases, there are the thermal, electrical and chemical burns, pressure ulcers and post-surgical lesions. Historical examples of radiological accidents of great magnitude, the imminence of war with effective use of nuclear and radiological weapons, besides the recently increased routine practices in the Brazilian Navy nuclear submarine seem to guide for a new use of this biological dressing.

**Keywords:** *Wound healing; Biological dressings.*

## INTRODUCTION

Wound is defined as the discontinuity of the cutaneous tegument (skin), which can involve the loss of the underlying tissue, such as muscle, bone or nerve tissue.<sup>1</sup> The skin is the largest organ of the human body, being of great importance as a barrier and contact element of the organism with the external environment. Therefore, the establishment of a wound immediately triggers a cascade of cellular and molecular events on the site of the wound in order to regenerate, replenish and restore the tissue.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Veterinary Doctor. PhD in Sciences by the Medicine University – UFRJ. Assistant of Experimental Surgery Section on Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias. E-mail: alicefusco@hnm.d.mar.mil.br

<sup>2</sup> Veterinary Doctor. Responsible for the Experimental Surgery Section on Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>3</sup> Biologist. Pos-Doctor in Nuclear Biosciences by the Universidade do Estado do Rio de Janeiro- UERJ. Responsible for the Division of Clinical Research on Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>4</sup> Doctor. Resident on Clínica de Ginecologia e Obstetrícia of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>5</sup> Biologist. Assistant for the Division of Clinical Research on Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>6</sup> Biologist. Assistant for the Division of Clinical Research on Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>7</sup> Biologist. Assistant for the Division of Clinical Research on Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>8</sup> Student in Biomedicine. Technical Auxiliary of Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>9</sup> Student in Nutrition. Technical Auxiliary of Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.

<sup>10</sup> Biologist at the Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias e Secretário da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-HNMD).

<sup>11</sup> Doctor. Observership on Cleveland Clinic, Florida, USA. Responsible for Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias.