



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ALINE LURI TAKEJIMA

CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES E MEMBRANA AMNIÓTICA
DESCELULARIZADA NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS

CURITIBA

2021

ALINE LURI TAKEJIMA

CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES E MEMBRANA AMNIÓTICA
DESCELULARIZADA NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

CURITIBA

2021

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

Takejima, Aline Luri
R136c Células-tronco mononucleares e membrana amniótica descelularizada no
2021 tratamento de feridas cutâneas em ratos / Aline Luri Takejima ; orientador:
Luiz César Guarita Souza. – 2021.
60 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2021
Bibliografia: f. 66-76

1. Células-tronco. 2. Âmnio. 3. Cicatrização de feridas. I. Souza, Luiz
César Guarita. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 616.02774

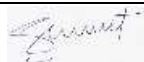




Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **09 dias do mês de fevereiro de 2021 às 19:00**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação “**Células-tronco mononucleares e membrana amniótica descelularizada no tratamento de feridas cutâneas em ratos**” apresentado por **Aline Luri Takejima** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza – Presidente	
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito (PUCPR)	
Prof. Dr. Alfredo Benjamim Duarte da Silva (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza **Conceito:** Aprovada

Profa. Dra. Selene Elifio Esposito **Conceito:** Aprovada

Prof. Dr. Alfredo Benjamim Duarte da Silva **Conceito:** Aprovada

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza
Presidente da Banca Examinadora



Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

A Deus, pela dádiva da vida e pela realização de tantos sonhos. Obrigada por me permitir crescer em uma família tão abençoada e especial.

Aos meus amados pais, Reinaldo e Suzana, pelo amor, fé e dedicação incondicionais em todas as etapas da minha vida. Verdadeiras fortalezas de amor, exemplo e inspiração.

As minhas queridas irmãs, Milka e Priscila, meu cunhado Célio e sobrinho Felipe pela amizade, cumplicidade e apoio nesta caminhada.

Aos meus ditian e batian, Haruji e Meire Takejima (*in memoriam*), Heiji (*in memoriam*) e Sayoko Okada, exemplos de força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza, por todo apoio, confiança e incentivo para a construção desta dissertação. Agradeço pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos e por toda atenção dispensada.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), grandes incentivadores da pesquisa científica, pelos conhecimentos transmitidos. Mestres sempre dispostos a ensinar e ajudar, em especial: Prof^ª. Dr^ª. Lucia de Noronha, Prof^ª. Dr^ª. Andrea Moreno, Prof^ª. Dr^ª. Márcia Olandoski, Prof. Dr. Ricardo Pinho.

À Dr^ª. Rossana Baggio Simeoni e Prof. Dr. Julio Cesar Francisco pela dedicação e solicitude na pesquisa, inclusive na coleta das células-tronco e membrana amniótica.

À Prof^ª. Dr^ª. Selene Elifio Esposito pela enorme contribuição no processo da dissertação, sempre com olhar atento e carinhoso na transmissão do conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. Alfredo Benjamim Duarte da Silva, exemplo de profissionalismo e dedicação, agradeço pela disponibilidade, gentileza e colaboração.

Ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR, pela estrutura e equipamentos disponibilizados, e Misael Barbosa, pela amizade, atenção e zelo com os nossos animais.

A equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, Seigo Nagashima, Caroline Busatta Vaz de Paula e Ana Paula Martins por todo o suporte e empenho na realização deste estudo.

Ao PPGCS e a todos os funcionários do programa de pós-graduação, principalmente à Paula Maira Portela do Nascimento, pelo apoio e cooperação ao longo desses anos.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade de realização deste trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela viabilização da pesquisa.

As minhas queridas amigas Ana Carolina Macedo, Camila Matsuda, Fabiane Osaku, Julie Del Moro e Liza Uchimura, pelo carinho e estímulos constantes durante essa jornada. E ao amigo Luiz Augusto Garbers pelo comprometimento e dedicação com o trabalho científico.

“ O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos. ”

-Oliver Wendell Holmes

RESUMO

INTRODUÇÃO: A função primária da pele é servir como barreira protetora contra os agentes externos. A interrupção na sua continuidade como resultado de uma lesão ou doença pode elevar a morbimortalidade quando grandes áreas são afetadas. A reparação das feridas cutâneas deve permitir o retorno de sua integridade, prevenir a cronificação e diminuir as complicações. Encontrar novos métodos terapêuticos para acelerar e garantir uma cicatriz funcional e esteticamente aceitável é um dos grandes desafios das pesquisas na engenharia tecidual. As células-tronco (CT) e membrana amniótica (MA) são reconhecidas pelos impactos benéficos no reparo de lesões cutâneas. **OBJETIVO:** Analisar o efeito da terapia com CT mononucleares da medula óssea associadas ou não à MA no reparo de feridas cutâneas em modelos experimentais de ratos. **MÉTODOS:** Quarenta ratos Wistar foram randomizados em quatro grupos e submetidos a lesões de espessura total no dorso. O grupo 1 (G1) - controle, não recebeu CT ou MA; no grupo 2 (G2) – foram injetadas CT nas lesões; no grupo 3 (G3) – as feridas foram cobertas por MA; e no grupo 4 (G4) - foram injetadas CT e cobertas por MA. A taxa de contração (Tc) da ferida foi avaliada semanalmente. No 28º dia, os animais foram eutanasiados e os materiais encaminhados para estudos histoquímico e imuno-histoquímico, que quantificaram as fibras colágenas e elásticas, e analisaram as expressões de metaloproteinase 8 (MMP-8), fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e alfa actina de músculo liso (α -AML). **RESULTADOS:** No sétimo dia pós-operatório observou-se que a taxa de contração (Tc1-7) foi maior no G3 e G4. Porém, no 28º dia, a taxa de contração (Tc1-28) foi maior no G1. A coloração de Picrosirius red, mostrou que o colágeno tipo 1 (maduro) foi predominante em todos os grupos. Entretanto, o grupo 4, que recebeu CT + MA, obteve maior média de colágeno tipo 1 (maduro) quando comparado ao grupo controle (p 0,033). A análise das fibras elásticas mostrou predomínio das mesmas nos grupos tratados com CT e/ou MA. Os G2 e G4 apresentaram as menores expressões de TGF- β e MMP-8, porém sem significância estatística. A análise de α -AML foi expressivamente menor no G4. **CONCLUSÃO:** A aplicação das CT e MA acelerou a fase inicial da cicatrização e favoreceu o início precoce da formação das fibras colágenas e elásticas. A terapia CT e MA nas lesões cutâneas não aumentou a taxa de contração das lesões cutâneas de espessura total nos estágios mais avançados de cicatrização, porém pode auxiliar no reparo por meio da remodelação do colágeno (MMP-8) e ação antifibrótica (TGF- β e α -AML).

Palavras-chaves: Cicatrização de feridas. Células-tronco mononucleares. Membrana amniótica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The primary function of the skin is to serve as a protective barrier against external agents. A wound is defined as the loss of continuity of the cutaneous integument as a result of an injury or illness can increase morbidity and mortality when large areas are affected. The repair of skin wounds must guarantee the return of its integrity, prevent chronicity and reduce complications. Finding new therapeutic methods to accelerate and guarantee a functional and aesthetically acceptable scar is one of the great challenges of research in tissue engineering. Stem cells (SC) and amniotic membrane (AM) are recognized for their beneficial impacts on the repair of skin lesions. **OBJECTIVE:** To evaluate the effect of therapy with bone marrow mononuclear SC associated or not with AM on the healing process of cutaneous wounds in experimental models of rats. **METHODS:** Forty Wistar rats were randomized into four groups: group 1 (G1) - control, performed a full thickness lesion on the back, did not receive SC or AM; group 2 (G2) - injected SC; group 3 (G3) - covered by AM; group 4 (G4) - injected SC and covered by AM. The contraction rate (Tc) of the wound was evaluated weekly, and on the 28th day the animals were euthanized and the materials sent to histochemical and immunohistochemical studies that analyzed collagen and elastic fibers, metalloproteinase 8 (MMP-8), transforming growth factor beta (TGF- β) and smooth muscle alpha actin (α -SMA). **RESULTS:** On the seventh postoperative day, we observed that the contraction rate (Tc1-7) was higher in G3 and G4. However, on the 28th day, the contraction rate (Tc1-28) was higher in G1. Picrosirius red staining showed that type 1 (mature) collagen was predominant in all groups. However, group 4, which received SC + AM, obtained a higher mean of type 1 collagen (mature) when compared to the control group (p 0.033). The analysis of elastic fibers showed a predominance of them in the groups treated with SC and / or AM. The G2 and G4 showed the lowest expressions of TGF- β and MMP-8, but without statistical significance. The analysis of α -SMA was significantly lower in G4. **CONCLUSION:** The application of SC and AM accelerated the initial healing phase and favored the early onset of the formation of collagen and elastic fibers. SC and AM therapy in skin lesions not increased the rate of contraction of full-thickness skin lesions in the more advanced stages of healing, however can help to repair through collagen remodeling (MMP-8) and antifibrotic action (TGF- β and α -SMA).

Keywords: Wound Healing. Mononuclear stem cells. Amniotic membrane.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA.....	37
FIGURA 2 – DESENHO DO ESTUDO EXPERIMENTAL.....	39
FIGURA 3 – TÉCNICA CIRÚRGICA.....	40
FIGURA 4 – CARIMBO.....	41
FIGURA 5 – TUBO DE FALCON COM SANGUE DA MEDULA ÓSSEA CENTRIFUGADO COM GRADIENTE DE DENSIDADE.....	43
FIGURA 6 – EVOLUÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS.....	49
FIGURA 7 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DO COLÁGENO TIPO 1 e 3 (400X).....	52
FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DA FIBRA ELÁSTICA (400X).....	54
FIGURA 9 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DE MMP-8 (400X).....	58
FIGURA 10 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DE TGF-B (400X).....	59
FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DE α -AML (400X).....	60

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ANTICORPOS PRIMÁRIOS	46
---------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA TAXA DE CONTRAÇÃO.....	47
TABELA 2 – VALORES DE <i>P</i> ENTRE OS GRUPOS.....	48
TABELA 3 – ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DO COLÁGENO TIPO 1 e 3.....	51
TABELA 4 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA FIBRA ELÁSTICA ENTRE OS GRUPOS.....	53
TABELA 5 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA MMP-8 ENTRE OS GRUPOS.....	55
TABELA 6 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO TGF- β ENTRE OS GRUPOS.....	56
TABELA 7 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA α -AML ENTRE OS GRUPOS.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO COLÁGENO	
TIPO 1.....	50
GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO COLÁGENO	
TIPO 3.....	50
GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À FIBRA ELÁSTICA..	53
GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR	
MMP-8.....	55
GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR	
TGF- β	56
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR	
α -AML.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a – área da lesão
a1 – área inicial
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2 – ciclooxigenase 2
CT – células-tronco
DMEM-GIBCO – meio Dulbecco modificado por Iscove
EGF – fator de crescimento epidérmico
EUA – Estados Unidos da América
FGF – fator de crescimento de fibroblasto
HE – hematoxilina-eosina
HLA – antígeno leucocitários humanos
IL-1 – interleucina 1
KGF – fator de crescimento de queratinócitos
MA – membrana amniótica
MEC – matriz extracelular
MMP-8 – metaloproteinase 8
MMPs – metaloproteinases
PBS – tampão fosfato salino
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2 – prostaglandina E2
FCR - força centrífuga relativa
RPM – rotação por minuto
SD – desoxicolato de sódio
SDS – dodecil sulfato de sódio
ST – stem cell
Tc – taxa de contração cicatricial
TGF- α – fator de crescimento alfa
TGF- β – fator transformador de crescimento beta
TIMPs – inibidores teciduais de metaloproteinases

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

α -AML – alfa actina de músculo liso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVO GERAL	20
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. REVISÃO DA LITERATURA	21
4.1 REPARAÇÃO TISSULAR	21
4.1.1 Pele	21
4.1.2 Lesão Cutânea	21
4.2 CICATRIZAÇÃO.....	23
4.2.1 Fase Inflamatória	23
4.2.2 Fase Proliferativa	24
4.2.3 Fase de Maturação	25
4.3 ENGENHARIA TECIDUAL.....	266
4.3.1 Células-tronco	27
4.3.1.1 Classificação	277
4.3.1.2 Propriedades Biológicas.....	29
4.3.2 Membrana amniótica	32
4.3.2.1 Estrutura.....	322
4.3.2.2 Propriedades Biológicas.....	333
5. MÉTODOS	366
5.1 ÉTICA.....	366
5.2 CASUÍSTICA E PREPARAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	366
5.3 DESCELULARIZAÇÃO DA MATRIZ AMNIÓTICA.....	366
5.4 MODELO ANIMAL E CUIDADOS GERAIS	377
5.5 DESENHO EXPERIMENTAL.....	377

5.6 TÉCNICA ANESTÉSICA.....	40
5.7 TÉCNICA CIRÚRGICA	40
5.8 PUNÇÃO MEDULAR	411
5.9 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA, FRAÇÃO MONONUCLEAR	42
5.10 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	43
5.11 REOPERAÇÃO E EXERÉSE DA PELE/LESÃO	43
5.12 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS	44
5.13 ESTUDO HISTOQUÍMICO/IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	44
5.13.1 Método histoquímico Picrosirius red	45
5.13.2 Método histoquímico Verhoeff.....	45
5.13.3 Método imuno-histoquímico	455
5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6. RESULTADOS.....	47
6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS	47
6.1.1 Comparação dos grupos em relação à taxa de contração da área da ferida avaliada nos dias 7, 14, 21 e 28.....	47
6.2 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO COLÁGENO TIPO 1 E 3...49	
6.3 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À FIBRA ELÁSTICA.....52	
6.4 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AOS MARCADORES IMUNO- HISTOQUÍMICOS	54
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

A pele é a principal barreira de proteção do organismo e tem como funções básicas impedir a perda excessiva de líquidos, proteger dos agentes externos, manter a temperatura corpórea, sintetizar vitamina D com a exposição aos raios solares, agir como órgão dos sentidos e participar da termorregulação corpórea.^{1,2}

No Brasil, as feridas constituem um grave problema de saúde pública, devido ao grande número de doentes com alterações na integridade da pele, embora sejam escassos os registros desses atendimentos.³ Nesse contexto, a reparação de tecidos é um dos principais desafios da medicina regenerativa atual. Sendo assim, os objetivos primários do tratamento de feridas são o rápido fechamento e a formação de uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória.⁴ O custo com o tratamento das feridas também é um importante fator a ser considerado. A venda de insumos para o manejo em todo mundo atingiu a marca de 13 bilhões de dólares em 2013.⁵

Lesões localizadas em áreas de articulação, extensas e/ou profundas, como por exemplo, as queimaduras de terceiro grau, provocam importantes agravos à estrutura da pele e correspondem a uma das principais causas de morte por acidentes em crianças e idosos, sendo relevantes causas de morbimortalidade em todo o mundo.⁶ A mortalidade está relacionada, principalmente, ao desenvolvimento de infecções, que podem evoluir para sepse e outras consequências sistêmicas, como complicações renais, adrenais, cardiovasculares, pulmonares, musculoesqueléticas, hematológicas e gastrointestinais.⁷

Além disso, é relevante destacar que a cascata de eventos que segue uma ferida na pele é muito similar aos desencadeados após um infarto do miocárdio ou uma lesão na medula espinhal. A formação de cicatrizes ocorre de maneira similar, independente do tecido atingido.⁸ Pela sua acessibilidade, a pele consiste em um dos melhores modelos para o estudo dos mecanismos de reparo aos danos teciduais. Assim, o estudo da cicatrização e regeneração da pele tem contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias em medicina regenerativa para diversos tecidos, como o intestino, o pulmão e o fígado.⁹

Algumas complicações podem ocorrer no reparo da pele, como em casos nos quais a cicatrização é inviabilizada pela pouca elasticidade da pele, escassez de tecidos locais, infecção, associação de lesões ortopédicas com perda cutânea; e

demandam um tempo cicatricial prolongado, requerem internações frequentes, com preparo para posteriores enxertias de pele ou confecções de retalhos, gerando um impacto negativo sobre o equilíbrio psíquico, social e econômico dos pacientes. Esses tratamentos, frequentemente, evoluem para uma cicatriz inestética e pouco funcional.¹⁰ O tratamento de pacientes queimados também é bastante problemático, acompanhado de resultados insatisfatórios e até mesmo óbitos causados pela perda de fluidos, pela ocorrência de sepse ou insuficiência respiratória.

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando novas estratégias terapêuticas para lesões extensas de pele,¹¹⁻¹³ com o objetivo de melhorar a qualidade da cicatrização e diminuir o tempo de tratamento, fatores que interferem, não apenas na qualidade de vida dos pacientes, mas também nos custos orçamentários.

O uso de células-tronco (CT), em feridas agudas ou crônicas, resulta em uma aceleração no processo cicatricial, decorrente do impacto benéfico que elas trazem para todas as fases da cicatrização.¹⁴ Dessa forma, observa-se um aumento na migração epitelial, na angiogênese e na taxa de cicatrização, além da formação de uma cicatriz menos evidente.^{15,16}

A membrana amniótica (MA) atua na promoção da reepitelização, com ações anti-inflamatória, antifibrótica e antiangiogênica, tornando-se clinicamente útil nas diversas áreas da saúde. As propriedades físicas, particularmente a sua fina espessura, suavidade e transparência, também favorecem a sua utilização.¹⁷⁻¹⁹

Assim, estudos recentes em engenharia de tecidos vêm buscando a associação de diferentes tipos celulares a biomateriais acelerando o processo de reparo através da diminuição do tempo necessário para que as células do paciente ocupem a matriz implantada.^{20,21} Neste contexto, tem-se demonstrado que o uso de matrizes, como a MA, associadas com CT acelera e melhora a qualidade da reparação tecidual.²²⁻²⁴

2. JUSTIFICATIVA

As células-tronco e membrana amniótica são reconhecidas pelos potenciais terapêuticos na cicatrização de lesões cutâneas. A associação das CT e MA poderia beneficiar o processo de reparo da pele lesionada?

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da terapia com células-tronco mononucleares da medula óssea isoladas ou associadas à membrana amniótica descélularizada no processo de reparo de feridas cutâneas em modelos experimentais de ratos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de contração da lesão semanalmente por 28 dias
- Quantificar as fibras colágenas do tipo 1 e 3
- Quantificar as fibras elásticas
- Analisar o remodelamento do colágeno
- Quantificar a expressão do fator de diferenciação de fibroblastos
- Quantificar os miofibroblastos e vasos sanguíneos

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 REPARAÇÃO TISSULAR

4.1.1 Pele

A pele é constituída pela epiderme e derme. A epiderme é composta por queratinócitos que formam um epitélio estratificado pavimentoso, além de melanócitos, células de Langerhans e de Merkel e é delimitada pela lâmina basal, que a une à derme. A derme consiste em uma camada de tecido conjuntivo, formada principalmente por fibroblastos e uma matriz extracelular rica em colágeno.²⁵

Na região da derme, encontram-se vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas sebáceas e sudoríparas e terminações nervosas, além de folículos pilosos originados a partir de invaginações da epiderme. Desse modo, a derme atribui integridade estrutural, elasticidade e nutrição para a pele.²⁶ Logo abaixo da pele, situa-se o subcutâneo, a hipoderme, composta por tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo.²¹

Durante o desenvolvimento, o folheto germinativo ectodérmico origina a epiderme, enquanto o folheto mesodérmico dá origem a derme e o subcutâneo. Há exceções em algumas regiões da cabeça e pescoço, onde as células da crista neural dão origem à derme e ao subcutâneo.²⁷

4.1.2 Lesão Cutânea

Uma ferida é definida como a perda de continuidade da pele, acompanhada ou não da perda de tecido subjacente, seja ele muscular, ósseo ou nervoso.²⁸

A lesão tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. A ferida de espessura parcial (derme incompleta) ocorre após procedimentos dermatológicos como a dermoabrasão, o resurfacing por laser ou peelings químicos; pode também ser causada por traumas como escoriações e queimaduras superficiais. A reparação

ocorre pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida, que resulta em uma cicatriz praticamente imperceptível.²⁹

Já nas feridas de espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo) ocorre a formação do tecido de granulação e a epitelização, base da reparação nas feridas de espessura parcial, acontece apenas nas margens da ferida. Nesse caso, a cicatriz é notória e, muitas vezes, pronunciada.²⁹ Por isso, na ocorrência de uma ferida, imediatamente, é ativada uma cascata de eventos celulares e moleculares para garantir a integridade do tecido e a homeostase.³⁰

Existem três formas pelas quais uma ferida pode cicatrizar, que dependem da extensão e profundidade da lesão tecidual e da presença ou não de infecção: primeira, segunda e terceira intenção (fechamento primário retardado).

Na primeira intenção a cicatrização ocorre quando as bordas são suturadas ou aproximadas, havendo perda mínima de tecido e rápida reposta inflamatória. Já na cicatrização por segunda intenção há perda excessiva de tecido com a presença ou não de infecção. A aproximação primária das bordas não é possível. As feridas são deixadas abertas e se fecharão por meio de contração e epitelização. No fechamento por terceira intenção realiza-se em um segundo tempo a aproximação das margens da ferida (pele e subcutâneo), pois o fechamento primário imediato não é possível. Isto ocorre, principalmente, quando há presença de infecção na ferida que deve ser tratada, inicialmente, com desbridamento, curativos, antibioticoterapia e, após o controle, ser suturada.³¹⁻³³

Com o rompimento tecidual, inicia-se o processo de reparação que pode ser caracterizado por duas categorias distintas: cicatrização e regeneração do órgão acometido.^{34,35} Quando um tecido lesionado é substituído por outro, estrutural e funcionalmente similar, temos a regeneração, enquanto que, quando esta substituição é realizada por um tecido cicatricial não funcional, devemos classificar como cicatrização.³⁰

O processo de regeneração envolve uma completa restauração e substituição dos tecidos danificados, dando origem a um novo tecido com estrutura e funções normais, incluindo condrogênese.³⁶ A regeneração da pele, em humanos, é bastante descrita em estágio fetal.^{37,38} A capacidade regenerativa fetal é pouco compreendida, entretanto, sugere-se que a ausência da inflamação no ambiente intra-uterino seja importante para esse desfecho.³⁸ Em adultos essa capacidade é limitada, possivelmente, pela rápida deposição de tecido fibrótico no sítio de injúria,

desencadeada pela inflamação local.³⁷ Portanto, para o processo de reparo resultar em regeneração, ao invés de cicatrização, a rápida resposta fibrótica precisa ser retardada, para permitir que células-tronco multipotentes e progenitoras, presentes no tecido, possam efetuar a regeneração.⁸

4.2 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização pode ser dividida em três fases que se sobrepõem: inflamatória; proliferativa ou fase de reparo; e de maturação ou fase de remodelamento. O reconhecimento dessas fases, com base nas características macroscópicas, permite ao profissional da saúde associar os eventos microscópicos e bioquímicos; e direcionar o manejo apropriado da ferida.³⁹

4.2.1 Fase Inflamatória

Na fase inflamatória (de 0 a 3 dias após a lesão) ocorre a vasoconstrição reflexa e oclusão de pequenos vasos, com acúmulo plaquetário e deposição de coágulos de fibrina. Essa vasoconstrição tem duração de 5 a 10 minutos e é seguida por uma vasodilatação que permite a passagem de células para o espaço extravascular e dissolve substâncias tóxicas.^{39,40}

A ativação plaquetária gera a liberação de grânulos alfa, responsáveis por secretarem fatores de crescimento como o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- β .⁴¹ O PDGF, juntamente com citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), são relevantes na quimiotaxia de neutrófilos para o local da lesão.⁴²

Os leucócitos, em especial os neutrófilos e macrófagos, têm papel essencial na coordenação da inflamação, assim como na restauração do tecido.⁴³ Os neutrófilos erradicam patógenos invasores que penetram no sítio da lesão, fagocitam microrganismos e, após, se degeneram e morrem. Dessa forma, liberam enzimas que auxiliam monócitos a fagocitar os restos necróticos do local.

Os monócitos atraem fibroblastos para a ferida e os estimulam para a maturação de síntese de colágeno e se diferenciam em macrófagos quando

ingressam na ferida, fagocitando tecidos e fragmentos necróticos.^{44,45} Ao se diferenciarem em macrófagos, sintetizam e liberam proteases debridantes que retiram coágulos de fibrina e colágeno, restos e fragmentos de células mortas, além de liberarem fatores de crescimento de células endoteliais que atraem mais fibroblastos para a ferida.

4.2.2 Fase Proliferativa

A fase de proliferação (ou fibroblástica ou de reparo de 3 a 14 dias após a lesão) inicia-se por estimulação miogênica e quimiotática dos queratinócitos pelo fator transformador de crescimento alfa (TGF- α) e EGF, sendo caracterizada pela proliferação fibroblástica, neovascularização, infiltração capilar e proliferação e migração epitelial.⁴⁶

Os fibroblastos surgem por volta do segundo e terceiro dia após o trauma e tornam-se o tipo celular predominante do 7° ao 14° dia do processo de cicatrização. Estas células migram para o interior da lesão, proliferam, produzem grandes quantidades de matriz extracelular (MEC),⁴⁵ secretam TGF, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e fator de crescimento de queratinócitos (KGF), sendo este último essencial para o processo de reepitelização e, assim, para a reestruturação das funções da epiderme perdida com a lesão.¹⁰

Com o aumento do número de fibroblastos ativados para produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais denso e elástico. Esse processo é denominado de fibroplasia e sua eficiência é dependente da formação concomitante de novos vasos sanguíneos, ou seja, da neovascularização.^{46,47} Além disso, os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e, após influência dos fatores de crescimento, são ativados e migram das bordas para o centro da ferida^{48,49} e passam a exibir propriedades contráteis devido à expressão de α -AML tornando-se, então, miofibroblastos,⁵⁰ que exibem um papel essencial na contração/fechamento da ferida.⁵¹

A contração da ferida é uma tentativa para reduzir o tempo de cura da lesão. Segundo Porter, há duas teorias para a redução das áreas cruentas das feridas. A primeira, a teoria do miofibroblasto, em que os fibroblastos adquirem características

de fibras musculares lisas, ricos em microfilamentos de actina que, junto com a expressão de α -AML, contraem a ferida. Estes miofibroblastos unidos por junções desmossômicas tracionam o colágeno tipo 1 e 3, reduzem o tecido de granulação e mantêm a área contraída. Os miofibroblastos sofrem apoptose e a ferida se fecha. A velocidade 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, sugere uma força de tração no centro da matriz realizada pelos fibroblastos, que reorganiza as fibras de colágeno, levando a contração da ferida.⁵²

O TGF- β apresenta importante papel na diferenciação miofibroblástica durante os fenômenos fibrocontrativos e cicatriciais, por regular a expressão de α -AML nestas células. Por sua vez, o TGF- β é regulador multifuncional do crescimento e diferenciação celular durante desenvolvimento e reparação, influenciando a síntese de componentes da matriz extracelular, como colágenos, glicosaminoglicanas, fibronectina, laminina e elastina.

As fibras elásticas são constituídas pela elastina e microfibrilas, possuem 0,2 a 1,0 μm de diâmetro, sendo mais finas que as fibras colágenas, e são produzidas pelos fibroblastos e pelas células musculares lisas da parede dos vasos.

4.2.3 Fase de Maturação

A fase de maturação (14 dias a um ano ou mais) é a fase de remodelamento e corresponde ao final da cicatrização e restauração da estrutura normal de tecidos.⁴⁸ Ocorre o remodelamento do colágeno, com um equilíbrio entre a deposição e o catabolismo deste, e a substituição do colágeno tipo 3, característico da cicatriz imatura; pelo colágeno tipo 1, mais resistente e predominante na cicatriz madura.^{53,54} Este processo é coordenado por proteínas denominadas metaloproteinases (MMPs)^{17,18} que são produzidas pelos macrófagos, fibroblastos e células epidérmicas.

A família das metaloproteinases inclui cerca de 25 proteínas que podem ser divididas em: colagenases (MMPs 1, 8 e 13), gelatinases (MMPs 2 e 9), estromelisinases (MMPs 3, 7 e 10), matrilisinases (MMPs 7 e 26), MMPs tipo membrana (MMPs 14, 15, 16, 17 e 24) e outras MMPs, que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo com a sua estrutura.⁵⁵ A MMP-8 é uma colagenase intersticial que é secretada pelos fibroblastos, neutrófilos e macrófagos da ferida. Uma

expressão aumentada de MMP-8 em feridas crônicas é prejudicial para a reparação, causando a degradação do colágeno tipo 1.⁵⁶

As MMPs degradam os colágenos tipos 1, 2, 3, 10 e 13 e as fibras de colágeno não funcionais presentes na ferida. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à resistência à tração exercida pela ferida.⁴⁰ Durante a fase de remodelação, as quantidades de fibronectina e de ácido hialurônico da matriz extracelular são reduzidas e a quantidade de proteoglicanos se eleva.⁴⁶

Conforme a maturação da ferida progride, a rede de capilares do tecido de granulação saudável diminui, assim como sua celularidade, devido a apoptose das células. O resultado é a substituição do tecido de granulação pelo tecido cicatricial, concluindo o reparo da lesão.^{39,45}

Embora o remodelamento continue por mais de 12 meses, a cicatriz nunca recupera a resistência de uma derme normal.⁵⁷ Alterações nesse processo podem resultar, por exemplo, em feridas disfuncionais ou cicatrizes hipertróficas. Até mesmo um atraso no tempo de cicatrização é suficiente para desencadear infecções, hemorragias, desidratação ou a morte.⁵⁸

Em feridas crônicas, há o desenvolvimento de uma matriz fibrosa caracterizada pela deposição de colágeno e um declínio na quantidade de capilares.^{39,45} Ao final dessa etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e tecido glandular se regeneram de forma limitada e a coloração da cicatriz é pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipovascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares e pela hialinização do colágeno.^{40,46,48}

Assim, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando novas estratégias terapêuticas para lesões extensas de pele,¹¹⁻¹³ com o objetivo de melhorar a qualidade da cicatrização e diminuir o tempo de tratamento, fatores que interferem, não apenas na qualidade de vida dos pacientes, mas também nos custos orçamentários. Nesse contexto, a engenharia de tecidos e a terapia celular emergem como alternativas terapêuticas promissoras.

4.3 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia de tecidos envolve estratégias terapêuticas com materiais que promovem a adesão e proliferação celular e tecidual, e também com células e

moléculas bioativas ou estímulos biofísicos para direcionar a proliferação e diferenciação de células no material.⁵⁹

Quando se utiliza a engenharia tecidual com o objetivo de repor e desenvolver substitutos biológicos, trabalha-se com um novo ramo das ciências biomédicas, conhecido como medicina regenerativa. Através das células-tronco do próprio corpo e fatores de crescimento surge uma alternativa terapêutica capaz de reparar tecidos danificados, os maiores candidatos à terapia celular.⁶⁰

O alto índice de pacientes com alterações na integridade da pele constitui um grave problema de saúde pública.³ Assim, a reparação de tecidos é um dos principais desafios da medicina regenerativa atual.

Estudos recentes em engenharia de tecidos buscam a associação de diferentes tipos celulares a biomateriais para acelerar, assim, o processo de reparo através da diminuição do tempo necessário para que as células do paciente ocupem a matriz implantada.^{20,21} Neste contexto, tem-se demonstrado que o uso de matrizes, como a MA, associadas com CT acelera e melhora a qualidade da regeneração tecidual²²⁻²⁴.

4.3.1 Células-tronco

A terapia com células-tronco tem recebido uma atenção significativa devido a sua capacidade de diferenciação e autorrenovação, dando origem a múltiplas linhagens celulares, além de ter uma baixa imunogenicidade, característica que as tornam adequadas para o auto-enxerto e são capazes de exercer um efeito imunorregulador, o que traz uma nova esperança para o tratamento de diversas doenças.⁶¹

4.3.1.1 Classificação

As CT podem ser classificadas quanto a sua origem e plasticidade celular. Quanto a plasticidade podemos classificar como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As CT totipotentes são células que têm capacidade de se diferenciar em todos os tecidos do organismo humano, inclusive os gametas (óvulo e espermatozóide) e os anexos embrionários. As CT pluripotentes podem se diferenciar

em todos os tecidos e células dos três folhetos germinativos (endoderma, mesoderma e ectoderma) menos gametas e os anexos embrionários, sendo essas as células-tronco embrionárias. As CT multipotentes apresentam uma capacidade de se diferenciar mais limitada, se diferenciando em alguns tipos celulares.⁶²⁻⁶⁴

As células-tronco são divididas em dois grandes grupos em relação ao seu local de origem: podem ser células-tronco embrionárias, provenientes da massa celular interna do blastocisto embrionário; e células-tronco adultas, obtidas principalmente do sangue de cordão umbilical, da medula óssea e do sangue periférico. Adicionalmente, pesquisas indicam que existem células-tronco residentes, isto é, células-tronco para tecidos ou órgãos específicos em todo o organismo adulto,⁶⁵⁻⁶⁷ contribuindo para a homeostase tecidual.

As células-tronco adultas ou somáticas desenvolvem-se a partir do ectoderma (células epidérmicas, neurônios, células pigmentares), mesoderma (células músculo cardíaco, músculo estriado, músculo liso, tubulares do rim, sanguíneas, tecido adiposo), endoderma (células pancreáticas, das tireóides, pulmões) e células germinativas.⁶⁸

As células da medula óssea são pluripotentes e podem sofrer dois processos de diferenciação: as células mononucleares, que são indiferenciadas, e as multinucleares. A partir das células mononucleares, a linhagem hematopoiética originará as células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e a mesenquimal, que poderá originar células musculares, hepatócitos, osteócitos, tecido adiposo, condrócitos e estroma.⁶⁹

Diversos estudos têm indicado que as células-tronco adultas presentes no próprio tecido são um reservatório de células reparativas, sendo mobilizadas e diferenciadas em resposta a sinais de feridas ou doenças, contribuindo, portanto, para o processo de regeneração de diversos tecidos, como a pele.⁷⁰⁻⁷³

Logo, é possível encontrar células-tronco adultas tanto na pele como em outros órgãos. Para Rehen, as células-tronco são formadas e estão presentes na camada mais profunda da pele, a hipoderme, onde ocorre o amadurecimento destas células com posterior migração para as demais camadas, dando origem as células da epiderme e anexos cutâneos.⁷⁴

A localização das células-tronco na pele, segundo Alonso, é na camada basal da epiderme, uma membrana rica em matriz extra-celular e fatores de crescimento.⁷⁵ Periodicamente estas células interrompem seu ciclo, se diferenciam em células

terminais e migram para a superfície. Este mecanismo cria uma barreira que se perpetua e protege o organismo contra a invasão de microorganismos e a perda de líquidos essenciais ao corpo.⁷⁶

Verstappen *et al.* referiram que há duas populações de células-tronco na epiderme. A primeira estaria na camada basal, distribuída entre unidades proliferativas epidermais, que compõem a epiderme e a segunda população estaria localizada na região do bulbo dos folículos pilosos.⁷³ Alonso relatou que, geralmente, a proliferação e diferenciação de células-tronco adultas epidermais podem reparar pequenas lesões de pele, entretanto, o baixo número destas células, não permite o reparo de lesões maiores, podendo acarretar na formação de cicatrizes.⁷⁵

4.3.1.2 Propriedades Biológicas

Em relação à funcionalidade das diferentes populações de células-tronco, a manutenção da integridade da pele ocorre por intermédio das células-tronco epidermais, mais rápidas, porém, menos potentes. Pequenos reparos podem ser realizados pelas células-tronco do bulbo, que podem se diferenciar em diversos tipos de tecido. No caso de danos extensos, as células-tronco adultas presentes na medula óssea poderiam ser recrutadas, porém, é preciso um tempo maior para que consigam se deslocar do sítio de origem para a ferida, através da circulação. Esse tempo pode ser reduzido com o emprego da terapia celular, que tem como objetivo isolar um grande número de células de sítios doadores, cultivando se necessário, e devolver ao paciente⁷³.

As células-tronco proporcionam benefícios significativos durante o processo de reparo de feridas cutâneas, pois elas podem acelerar a taxa de cicatrização e reepitelização, aprimorar a qualidade e resistência do tecido regenerado, recuperar feridas crônicas que demoram para cicatrizar e minimizar a estética da cicatriz.

As principais fontes de extração de CT são a medula óssea e o tecido adiposo. Outras fontes de coleta vêm sendo estudadas como, por exemplo, os folículos pilosos como alternativa promissora para obtenção de células-tronco.⁷⁷

Existem pelos menos duas possibilidades pelas quais as CT auxiliam a cicatrização: por sinalização parácrina e por diferenciação. A primeira mostra que elas têm a capacidade de secretar vários fatores de crescimento e citocinas que são

relevantes para o reparo ou regeneração tecidual. Ao migrarem para a ferida, são ativadas ao entrarem em contato com o meio de substâncias pró-inflamatórias. A ativação das CT poderia potencializar a ação como pequenos “biorreatores” no microambiente da ferida e secretar fatores de crescimento e citocinas. A segunda possibilidade estaria relacionada com a plasticidade e habilidade que essas células possuem para se diferenciarem em uma grande variedade de tipos celulares e se integrar aos tecidos. Portanto, as CT facilitariam a cicatrização de feridas pela diferenciação em múltiplas células que residem na pele (queratinócitos, pericitos e células endoteliais).^{16,78-81} Contudo, a parcela de contribuição de cada um desses mecanismos de atuação das CT ainda não é totalmente conhecida, sendo ainda elemento de pesquisa.⁸²

O uso de CT, em feridas agudas ou crônicas, resulta em uma aceleração no processo cicatricial, decorrente do impacto benéfico que elas trazem para todas as fases da cicatrização (inflamatória, proliferativa e remodelamento).¹⁴ Dessa forma, observa-se um aumento na migração epitelial, na angiogênese e na taxa de cicatrização, além da conformação de uma cicatriz menos evidente.^{15,16}

Durante a fase inflamatória, as CT coordenam os efeitos das células inflamatórias e impedem os efeitos deletérios das citocinas inflamatórias, como o TNF e o IFN- γ .⁴⁵ Assim, o processo inflamatório da ferida ativa as CT para iniciarem as suas funções imunomodulatórias, incluindo um aumento da ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da ativação da expressão da prostaglandina E2 (PGE2), as quais têm múltiplos efeitos fibroreguladores na ferida.¹⁵ Além disso, as CT auxiliam na eliminação de infecções por meio da secreção direta de fatores antimicrobianos e estimulam a fagocitose por células imunes.⁴⁵

A capacidade das CT de promover a transição da fase inflamatória para a proliferativa é de extrema importância para o tratamento de feridas crônicas onde altos níveis de inflamação impedem a cura. As CT estimulam a neovascularização pela ação parácrina secretando FGF e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os quais promovem a proliferação, migração e diferenciação das células endoteliais dos vasos. Além disso, facilitam a neovascularização através da diferenciação em pericitos.⁴⁵

Por último, regulam a remodelação da ferida cicatrizada, promovendo a deposição organizada da MEC. Como tal, os benefícios das CT na cicatrização de feridas foram demonstrados em vários estudos pré-clínicos e clínicos. Assim, diversos

mecanismos estão envolvidos na cicatrização de feridas mediada por CT, incluindo atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, imunomoduladoras e reparadoras de tecidos.⁴⁵

Para que sejam efetivas, é fundamental que as CT permaneçam em contato com o leito da ferida e se mantenham viáveis neste microambiente hostil.⁸³ As vias usuais de aplicação de CT na cicatrização de feridas são a endovenosa e local, sendo essa a mais indicada.^{78,81,84}

Os métodos de aplicação local de CT incluem: injeção ao redor da ferida, spray tópico de fibrina e a incorporação a um *scaffold*,⁸⁵ isto é, matrizes que são estruturas que mantêm as células aderidas ao sítio alvo.⁸⁶ Quando as CT são aplicadas, diretamente na lesão ou na sua periferia, se aderem e se diferenciam em vários tipos de células cutâneas (queratinócitos, células endoteliais e pericitos) potencializando o processo de cicatrização.⁸²

As CT aplicadas por via sistêmica são capazes de migrarem e se enxertarem na região do tecido lesionado.¹⁶ Essa migração ocorre em resposta aos sinais quimiotáticos que modulam a inflamação, reparação de danos teciduais, e facilitam a regeneração.⁴⁵ A partir dessas características, aplicações de CT locais ou sistêmicas apresentam resultados semelhantes na cicatrização de feridas.^{80,81} Por outro lado, em outros estudos, a infusão sistêmica de células-tronco em ratos nos quais o diâmetro das células era maior que o dos capilares do pulmão, gerou dificuldade respiratória e fibrose em alguns animais.⁸⁷

Em 2006 Moseley *et al.* sugeriram que as células-tronco injetadas sozinhas junto ao defeito, não respondem de maneira satisfatória. Uma estratégia seria a combinação de células com alguns componentes, conhecidos como matriz ou *scaffold*, para produzir um implante bem-sucedido.⁸⁸ Lam e Longaker, afirmam que células injetadas se dissipam ou morrem no organismo, sendo que a adesão das células está diretamente relacionada à sua proliferação e diferenciação.⁸⁹ Deste modo, o desenvolvimento de estratégias em engenharia de tecidos, associando as CT às matrizes, como a membrana amniótica, consiste em tecnologias promissoras para se atingir melhores resultados.

Em 2002, Tamai *et al.* mencionaram fatores que devem ser observados para utilização bem sucedida do *scaffold*: não devem ocorrer reações inflamatórias ou tóxicas ocasionadas pela composição do biomaterial; sua apresentação deve ser tridimensional e porosa, proporcionar uma elevada área superficial que permita

adesão e crescimento celular e deve haver espaço para regeneração da matriz extracelular.⁹⁰

4.3.2 Membrana amniótica

A primeira aplicação clínica da membrana amniótica humana surgiu em 1910, quando Davis a utilizou como biomaterial no tratamento de queimaduras na pele em pacientes no Hospital Johns Hopkins, EUA.⁹¹ Na segunda metade do século XX, o uso da MA 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.⁹²

Uma enorme variedade de características, como a promoção da reepitelização e os efeitos anti-inflamatório, antifibrótico e antiangiogênico, tornam a membrana amniótica clinicamente útil nas diversas áreas da saúde. As propriedades físicas, particularmente a sua fina espessura, suavidade e transparência, também favorecem a sua utilidade.¹⁷⁻¹⁹

Atualmente a MA é usada para tratar queimaduras oculares térmicas ou químicas, Síndrome de Stevens-Johnson e cirurgia de pterígio,^{93,94} além de ser objeto de estudo como curativos biológicos para úlceras diabéticas, venosas e de pressão, queimaduras, na reconstrução da cavidade oral e bexiga, na timpanoplastia, na artroplastia, no onfalocele^{95,96} na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdômen, pelve, vagina e laringe.^{97,98}

4.3.2.1 Estrutura

A MA é uma estrutura resistente, lisa, translúcida, brilhante, flexível e delgada com uma espessura de 0,02 a 0,05 mm.⁹² É constituída por três camadas microscopicamente distintas: a camada epitelial, a membrana basal e a camada mesenquimal.⁹⁹⁻¹⁰²

A camada epitelial, adjacente à cavidade amniótica e ao líquido amniótico, é formada por uma monocamada de células epiteliais cubóides, rica em citocinas imunomoduladoras e fatores de crescimento epitelial. Ela se une através de

interdigitações à segunda camada, a membrana basal, que é fina e resistente, formada basicamente por fibras reticulares, colágeno e laminina.¹⁰³

A membrana basal é a principal responsável pela tensão e pela resistência elástica que permite a MA distender durante todo o período gestacional e resistir aos vigorosos movimentos do embrião/feto. Sabe-se que a resistência tracional, a integridade mecânica e elasticidade da membrana amniótica estão principalmente relacionadas com a expressão de colágeno do tipo 1 e 3, isoformas altamente predominantes neste tecido, assim como com a expressão de elastina.^{99,101}

A camada externa da membrana amniótica, conhecida como mesenquimal ou estromal, pode ser subdividida em três folhetos: compacto, fibroblástico e esponjoso, todos avasculares. O folheto compacto forma o principal esqueleto fibroso da MA, enquanto o fibroblástico é rico em tecido hialurônico fetal, que suprime a proliferação celular por alterar a regulação de TGF- β e diminuir a fibrose por inibir a proliferação e diferenciação dos miofibroblastos.^{104,105} O folheto esponjoso, rico em mucina, é o mais externo da MA e o mais próximo ao córion. Apresenta elevada abundância de proteoglicanos, de glicoproteínas e de colágeno, particularmente o tipo 3.^{99,101}

O perfil biofísico, fisiológico, genético e histológico da membrana amniótica varia ao longo do período gestacional e entre gestantes. Porém, como a maioria dos estudos descrevem membranas amnióticas obtidas de gestações de termo e sem complicações obstétricas, pouco se conhece sobre o perfil da MA em estágios iniciais ou intermédios do período gestacional.^{18,106}

4.3.2.2 Propriedades Biológicas

A membrana amniótica beneficia o processo de epitelização por facilitar a adesão e migração das células epiteliais basais, prevenir a apoptose e restaurar o fenótipo epitelial. Além disso, reduz os processos inflamatório, angiogênico e cicatricial e possui documentada ação antimicrobiana.^{95,104,107,108}

Pela integridade estrutural, transparência e elasticidade da membrana basal a MA torna-se um substrato ideal para o crescimento de células estaminais, por prolongar a vida celular e prevenir a apoptose das células epiteliais, o que explica a facilidade de reepitelização.^{96,105}

Apresenta características favoráveis para a sua utilização como curativo biológico, devido a presença de vários fatores de crescimento, como KGF, FGF, PDGF, EGF e VEGF. Destes, o FGF estimula a síntese e o depósito de proteínas da MEC. Além disso, a MA apresenta alguns componentes presentes também na MEC, como colágenos tipos 1-7, elastina, laminina e fibronectina. Os fatores de crescimento e os componentes de MEC conferem a MA características de reepitelização, redução da fibrose, inibição da dor, da infecção e da inflamação.¹⁰⁹ A formação da MEC é essencial para a cicatrização de feridas e a MA representa uma excelente alternativa no tratamento de feridas de pele.

A MA possui atividades metabólicas, como transporte de água e de materiais solúveis, produção de fatores bioativos como peptídeos vasoativos, fatores de crescimento e citocinas. Como curativo, a MA age como um substrato que auxilia a migração celular epitelial, melhora a adesão das células epiteliais e facilita diferenciação celular. Também promove a reparação da lesão tecidual por liberar fatores de crescimento e citocinas que facilitam a migração celular e aceleram o processo de granulação.^{99,110} Além de diminuir a contração da cicatriz em sua fase de maturação, tornando a área final com características macroscópicas mais semelhantes à da pele local.¹¹¹

A propriedade anti-inflamatória da MA também está relacionada às elevadas quantidades de ácido hialurônico presentes na membrana basal, que se ligam ao inibidor alfa da tripsina, formando um complexo ativo, que é responsável pelos seus efeitos anti-inflamatórios.¹¹² Já as atividades antiangiogênicas podem estar associadas com as grandes quantidades de proteínas extracelulares como o colágeno tipo 4 e 7, as laminina 1 e 5, a fibronectina, a angiostatina e a endostatina,⁹⁶ que estão envolvidas no processo da neovascularização.

As ações antimicrobianas e antivirais da membrana amniótica são determinadas pela sua função como barreira natural, uma vez que este tecido adere à superfície das feridas e queimaduras e evita a formação de um espaço em que a secreção serosa se acumule, reduzindo a infiltração bacteriana; mas também devido à expressão de inúmeras moléculas que promovem estas propriedades, tal como a cistatina E.^{18,108,113}

A dor do paciente durante o tratamento de feridas é um fator a ser considerado, visto que, o uso de MA reduz esse sintoma por aderir a superfície da ferida, cobrir as

terminações nervosas e reduzir a contaminação bacteriana, diminuindo assim a inflamação local.^{107,114}

O efeito antifibrótico da membrana amniótica humana pode ser explicado devido à ação inibitória deste tecido na expressão TGF- β , responsável por ativar os fibroblastos que participam do processo de cicatrização.¹⁸ Desta forma, a membrana amniótica pode modular a cicatrização através da promoção da reparação tecidual, em detrimento da formação de uma cicatriz.¹¹⁵ Outra característica da MA de extrema relevância é que as células epiteliais não expressam antígenos leucocitários humanos (HLA) A, B, C ou DR¹¹⁶ ou β -2-microglobulinas,⁹⁶ o que torna esta estrutura imunologicamente inerte, pois uma das preocupações da medicina regenerativa é a rejeição de enxertos e curativos.

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. Além disso, seu baixo custo, por ser um material de descarte, a torna vantajosa pela disponibilidade e facilidade de aceitação de doação pelas gestantes.¹¹⁷ O processo desde a adequada seleção do potencial doador, da retirada da placenta, da preparação até o transplante da MA é complexo.

A descelularização é um importante passo no preparo da MA. Não altera a resistência e a elasticidade do tecido, nem as propriedades de barreira como a ação antimicrobiana e antiviral, além disso, a membrana basal permece intacta após o processo, visto que há presença de colágeno, fibronectina e laminina. A MA descelularizada promove melhor proliferação e diferenciação celular, melhor integridade estrutural, assim como um padrão mais uniforme de crescimento celular quando comparada à MA não-descelularizada.¹¹⁸

5. MÉTODOS

5.1 ÉTICA

Este trabalho foi realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foi submetido à aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), registro número 01288 (ANEXO 1) e do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, registro número 01238 (ANEXO 2).

5.2 CASUÍSTICA E PREPARAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

As membranas amnióticas foram obtidas de parturientes (n = 2), com 36 a 40 semanas de idade gestacional, provenientes da Maternidade Victor Ferreira do Amaral, por meio da parceria com outra pesquisa intitulada “Reparação traqueal de coelhos com matriz acelular cultivadas com células tronco mesenquimais associada a nanopartículas de 15-deoxy-12, 14 prostaglandinas”, registro número 01238, aprovado pelo CEUA PUCPR em 24 de junho de 2018. As doadoras assinaram um termo de doação de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 3) de acordo com um protocolo aprovado pelo CEP PUCPR (ANEXO 2). As membranas coletadas foram processadas no período de seis a doze horas depois da cesariana.

5.3 DESCELULARIZAÇÃO DA MATRIZ AMNIÓTICA

A descelularização foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®).^{109,119} Para esse processo, as membranas foram retiradas do meio tampão fosfato salino (PBS) pH 7.2 (Gibco) e tratadas com solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0,01 % e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01 % por 24 horas a 37 graus Celsius, com auxílio de agitador mecânico (mesa agitadora 109 M, Nova Ética Ltda.). Em seguida, foram conservadas em PBS a 4 graus Celsius (FIGURA 1).



FIGURA 1 – MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA
Após a descclularização a membrana amniótica foi conservada em PBS à 4 graus Celsius.
FONTE: O autor (2021)

5.4 MODELO ANIMAL E CUIDADOS GERAIS

Quarenta ratos machos da raça Wistar, pesando entre 250 a 300 gramas, provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foram mantidos em gaiolas individuais no Laboratório de Técnica Cirúrgica da PUCPR e receberam ração comercial para ratos e água ad libitum. Além disso, houve monitorização através dos sinais clínicos e comportamentais durante toda a pesquisa (ANEXO 4).

5.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram randomizados em quatro grupos (n = 10 por grupo) e submetidos a lesão cutânea de espessura total na região dorsal. Os grupos foram denominados conforme o seguinte delineamento (FIGURA 2):

Grupo 1 (G1) – controle: a lesão cutânea foi realizada, mas não foi tratada com CT ou MA,

Grupo 2 (G2) - CT: receberam células-tronco injetadas nas bordas e no centro das feridas, por via subcutânea,¹²⁰ em oito pontos de igual distância entre si. Os pontos de aplicação foram: 1 ponto em cada vértice da lesão (4 pontos), 1 ponto central em cada lado das bordas longitudinais da ferida (2 pontos), 2 pontos equidistantes no centro da ferida, no sentido céfalo-caudal (2 pontos), totalizando 8 pontos (FIGURA 3A/3B).

Grupo 3 (G3) - MA: as feridas foram cobertas totalmente pela membrana amniótica e fixadas com um ponto simples de nylon 5-0 nos 4 vértices da lesão²² (FIGURA 3C).

Grupo 4 (G4) – CT+MA: foram realizadas aplicações de células-tronco mononucleares autólogas e cobertas com membrana amniótica, conforme descrito nos G2 e G3.

Todas as feridas foram cobertas pelo curativo rayon vaselinado¹²¹ que foi fixado com um ponto simples de nylon 5-0 nos quatro vértices da lesão para evitar contaminação e manipulação pelos animais (FIGURA 3D). Esses curativos foram retirados após 2 dias de evolução.

A FIGURA 2 representa o desenho deste estudo experimental.

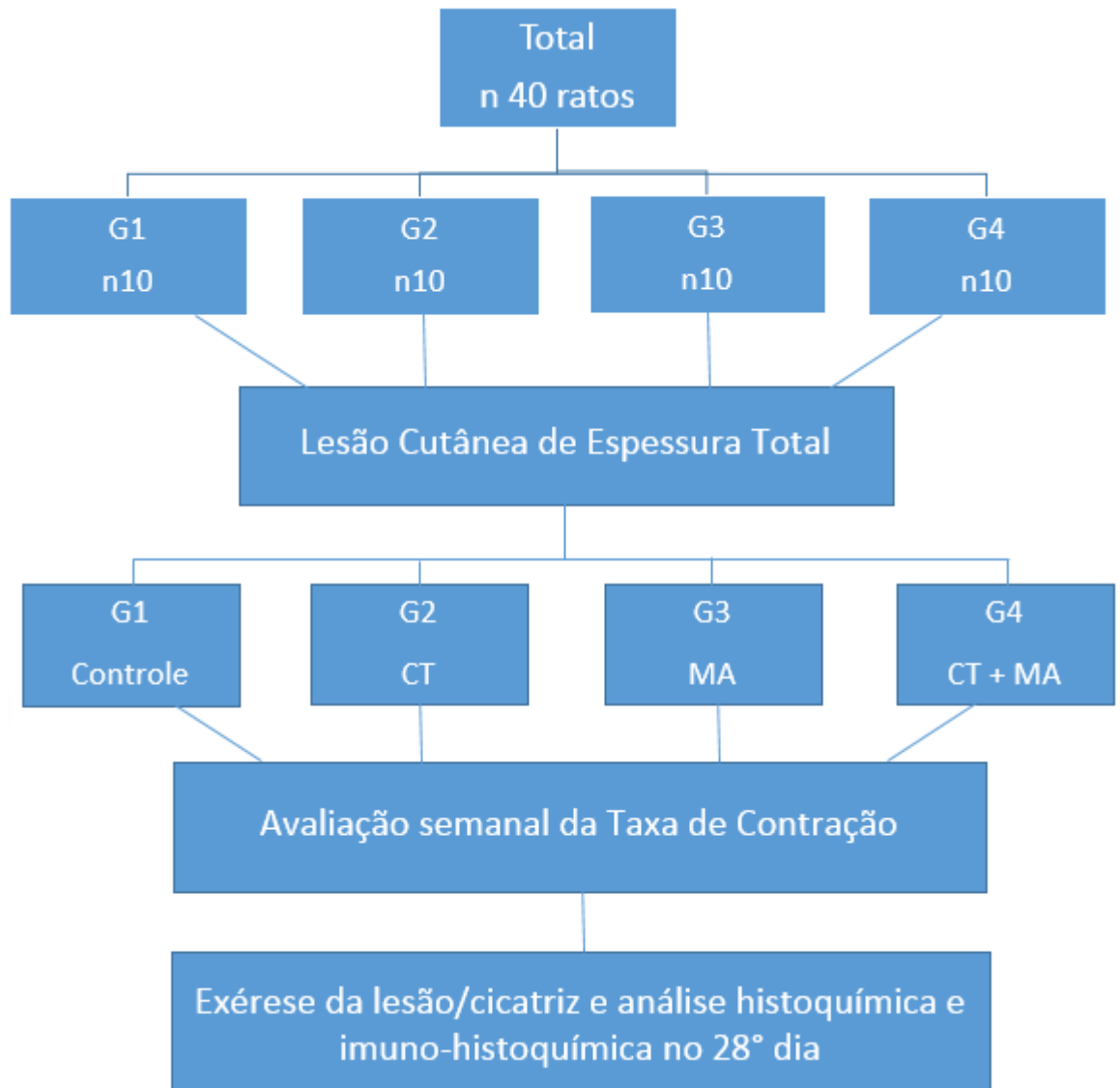


FIGURA 2 – DESENHO DO ESTUDO EXPERIMENTAL
FONTE: O autor (2021)

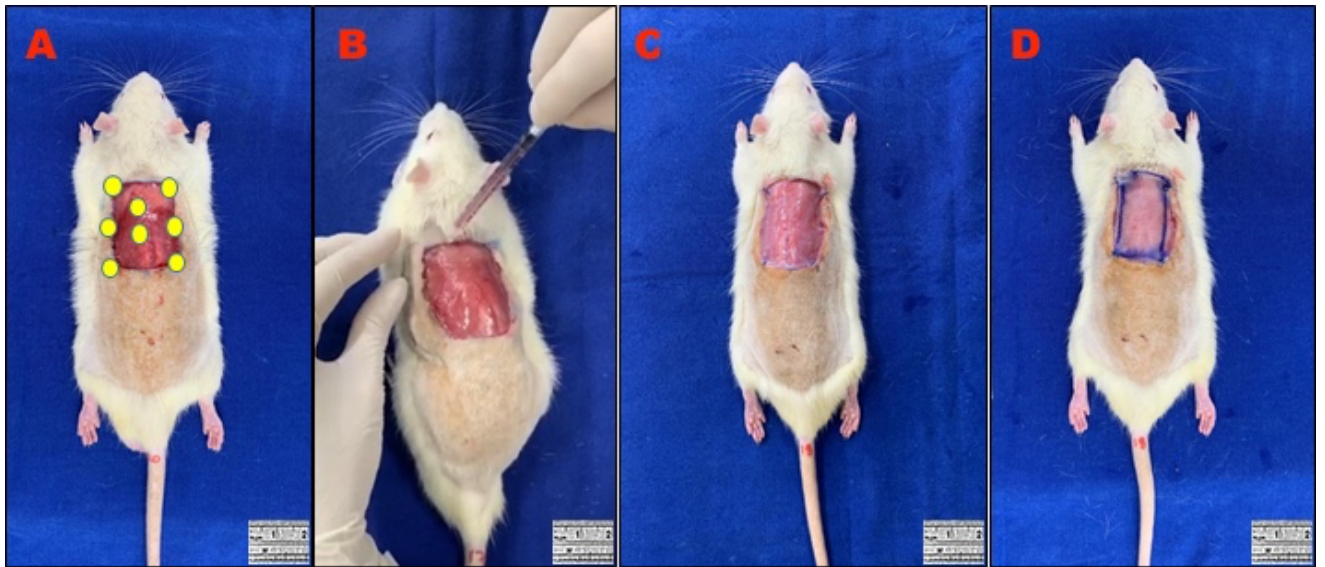


FIGURA 3 – TÉCNICA CIRÚRGICA

A: As células-tronco mononucleares foram aplicadas em oito regiões, indicadas pelos pontos amarelos, ao longo das margens e no centro da ferida; B: CT foram administrados por via subcutânea; C: a lesão cutânea foi coberta com MA e fixada nos quatro vértices com pontos simples de nylon 5-0 simples; D: as feridas foram cobertas com curativo de rayon vaselinado que também foi fixado com pontos simples de nylon 5-0 nos quatro vértices.

FONTE: O autor (2021)

5.6 TÉCNICA ANESTÉSICA

Os animais foram pesados em balança digital e submetidos à anestesia por via intramuscular, com administração de cetamina (Ketamin[®] / Cristalia – 75 mg/kg) e xilazina (Calmiun[®] 2 % / Agener União – 3 mg/kg).¹²² A obtenção do plano anestésico foi constatada através do relaxamento muscular e da ausência do reflexo palpebral.

Durante todo o período anestésico, os ratos foram monitorados, com vista a detectar complicações ou manifestações de dor, para suplementar a anestesia.

5.7 TÉCNICA CIRÚRGICA

Após a obtenção do plano anestésico, foi realizada a tricotomia no dorso dos animais, e com um molde (carimbo) retangular de 3 x 5 cm delimitou-se a área da lesão cutânea a ser induzida na região do dorso entre as duas escápulas (FIGURA 4), sendo o maior eixo no sentido céfalo-caudal.^{123,124} A seguir, foi realizada a antisepsia com solução alcoólica de iodo a 2 % e a colocação de campos operatórios.

Procedeu-se a retirada de segmento de pele de espessura total no dorso dos animais, entre as escápulas, com lâmina de bisturi número 15 e tesoura de Metzenbaum.^{123,124}



FIGURA 4 – CARIMBO
Carimbo retangular nas medidas 3 x 5 cm utilizado como molde para delimitar a área da lesão cutânea.
FONTE: O autor (2021)

5.8 PUNÇÃO MEDULAR

Os animais anestesiados foram posicionados em decúbito lateral com a perna superior flexionada e a inferior estendida, e em seguida, foi realizada a antissepsia com solução alcóolica de iodo a 2 %. A medula óssea foi aspirada através de punções em ambas as cristas ilíacas posteriores com seringas descartáveis (BD-Plastipak[®]) de 5 mL, com 0,2 mL de heparina (Liquemine[®] 5.000 UI/mL) e agulhas 25 x 8 mm G1

(BD-Precision Glide®). Foi coletado cerca de 0,5mL do sangue da medula óssea de cada rato.⁷⁰ Para cada 100 mL de meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), utilizou-se 1 mL de heparina.⁶⁹ O material foi encaminhado ao Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUCPR para o isolamento das células mononucleares.

5.9 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA, FRAÇÃO MONONUCLEAR

As células mononucleares foram isoladas utilizando o gradiente de densidade ($d = 1,077 \text{ g/m}^3$ – *Ficoll-Hypaque-Sigma*, St. Louis, MO) conforme descrito por Bøyum.¹²⁵ Além disso, foi utilizado o meio Dulbecco modificado por Iscove (DMEM-GIBCO) suplementado com 1 % de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 20 % de solução tampão. O material coletado de cada rato foi colocado em tubo estéril de centrífuga de plástico de 15 mL e completado até 12 mL com meio de cultura DMEM e homogeneizado.

Em outro tubo Falcon de 15 mL foi colocado 3 mL de solução gradiente de densidade (*Ficoll-Hypaque*) e, em seguida, foi adicionado o homogeneizado contendo a medula óssea do animal e o meio de cultura. Este tubo foi centrifugado a 1500 rpm / 402 rcf ou força g durante 40 minutos a 22 graus Celsius. Logo após, levado a fluxo novamente, e retirado o anel formado entre o meio e o gradiente (FIGURA 5). Este anel de células mononucleares foi colocado em tubo Falcon de 15 mL e completado com meio DMEM e centrifugado a 1500 rpm / 402 rcf ou força g por 10 minutos a 22 graus Celsius. Após, foi realizado um descarte do sobrenadante e ressuspensão as células para contagem destas. Esta contagem foi realizada em câmara de Neubauer e lida em microscópio óptico Olympus CX31 em objetiva de 40X.⁶⁹

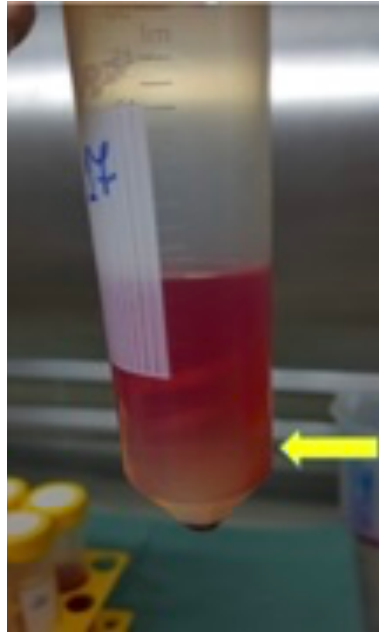


FIGURA 5 – TUBO DE FALCON COM SANGUE DA MEDULA ÓSSEA CENTRIFUGADO COM GRADIENTE DE DENSIDADE
A seta amarela indica o halo celular formado pela sedimentação das hemácias e granulócitos.
FONTE: O autor (2021)

5.10 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Após os procedimentos cirúrgicos e recuperação anestésica, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, receberam água e ração comercial. A analgesia foi realizada por meio de aplicações subcutâneas de dipirona 100 mg/kg a cada 12 horas por 3 dias consecutivos.

5.11 REOPERAÇÃO E EXERÉSE DA PELE/LESÃO

No vigésimo oitavo dia, os animais foram novamente pesados e submetidos a reoperação sob anestesia como já previamente descrita. Em seguida, a pele/lesão de todos os animais foi retirada com margem de segurança de 0,5 cm para análise histopatológica e imuno-histoquímica. As amostras coletadas foram acondicionadas em formol tamponado a 10 %. Os segmentos foram processados pela técnica rotineira de indução em parafina conforme rotina do Laboratório de Patologia da PUCPR.

Após esses procedimentos, os animais foram eutanasiados com administração de pentobarbital sódico (tiopental) 200 a 250 mg/kg,¹²⁶ por via endovenosa e descartados de acordo com orientações do Biotério da PUCPR.

5.12 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

As avaliações macroscópicas ocorreram nos 7°, 14°, 21°, 28° dias pós-operatório com os animais sedados conforme descrito anteriormente. Foram realizados registros fotográficos com câmera fotográfica Sony DSC-W, 16.4 megapixels, com a mesma luminosidade e distância em todos os dias das avaliações.

A área da lesão foi aferida através do software Image Pro Plus 4 (Media Cybernetics, Silver SPRING, Md.) sempre pelo mesmo operador,¹¹⁷ sem que o mesmo tivesse o conhecimento sobre qual era o tratamento e grupo que gerou cada material avaliado.

A taxa da contração da ferida (Tc) foi calculada a partir da fórmula $Tc = (a1 - a) \times 100/a1$, sendo a área inicial (a1), determinada no dia da primeira aferição da lesão, e a área da lesão (a), nos dias de mensuração¹¹⁷.

5.13 ESTUDO HISTOQUÍMICO/IMUNO-HISTOQUÍMICO

Os segmentos de pele fixados em formaldeído 10 % foram parafinados e submetidos a microtomia com espessura de 4 µm, a seguir, os cortes foram depositados em lâminas de vidro, desparafinados com o xileno e submetidos às passagens em álcool até receberem a coloração hematoxilina-eosina (HE) e serem cobertas com lamínulas de vidro.

A análise da derme nas lâminas foi realizada pelo profissional que não tinha conhecimento sobre qual era o tratamento ou grupo que gerou cada material avaliado. Todas as etapas dos estudos histopatológico/imuno-histoquímico foram realizadas no Laboratório de Patologia da PUCPR.

Para a quantificação da coloração, seções foram analisadas usando um microscópio Zeiss Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) e capturadas de forma aleatória vinte campos da derme de cada lâmina, englobando toda a extensão

da área cicatricial, ampliadas 400x. Todas as imagens foram analisadas usando o software Image-Pro plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Md.) conforme descrito anteriormente.¹²⁰ O número de células marcadas imunologicamente positivas e células totais em cada área foi contada, e as porcentagens de células marcadas com positivo foram calculadas.

5.13.1 Método histoquímico Picrosirius red

Todas as peças foram submetidas à técnica histoquímica com o corante Picrosirius red, que colore a proteína do colágeno, tornando-o birrefringente à luz polarizada da microscopia. O método é adequado para a visualização do colágeno, pela sua ligação específica com as moléculas do corante sirius red F3AB, que ao modificar o eixo da luz do polarizador torna-se birrefringente e brilhante.

O colágeno tipo 1 aparece como fibras espessas, fortemente birrefringentes, de coloração amarelo ou vermelho; e o tipo 3 apresenta o aspecto de fibras finas, fracamente birrefringentes e de coloração esverdeada. A porcentagem das fibras colágenas classificadas como maduras ou imaturas de acordo com a coloração permite a avaliação qualitativa das mesmas.¹²⁷

5.13.2 Método histoquímico Verhoeff

A técnica histoquímica de Verhoeff é um método de coloração utilizado para demonstrar a presença de fibras elásticas no tecido. Essa técnica baseia-se em um método regressivo no qual todo o tecido se encontra saturado de reagente, e o excesso de corante é removido de forma seletiva. As fibras elásticas devem salientarem-se em negro/vermelho contra fundo cinza claro.¹²⁸

5.13.3 Método imuno-histoquímico

A imuno-histoquímica detecta e quantifica um antígeno celular ou tecidual através da utilização de anticorpo específico dirigido contra este componente celular

e produz uma alteração de coloração visível a microscopia óptica pelo uso de cromógenos e diversas reações.¹²⁹

O remodelamento do colágeno foi avaliado através da expressão de MMP-8, o fator de diferenciação de fibroblastos foi examinado pela expressão de TGF- β . A quantificação de miofibroblastos e vasos sanguíneos foi detectada pela expressão de α -AML. Anticorpos policlonais contra MMP-8 (Abcam, EUA), TGF- β (Spring Bioscience Corp.; EUA), α -AML (Abcam, EUA) foram usados como anticorpos primários (QUADRO 1).

Anticorpo primário	Tipo de marcação	Marca	Diluição preconizada
MMP-8	Citoplasma	Abcam	1:200
TGF- β	Citoplasma	Spring Biosciene	1:200
α -AML	Citoplasma	Abcam	1:200

QUADRO 1 – ANTICORPOS PRIMÁRIOS
 FONTE: O autor (2021)

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram descritos por médias, desvios padrões, valores mínimos e máximos. Para a comparação dos grupos, em relação às variáveis do colágeno, foi usado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. As demais variáveis quantitativas foram analisadas usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Comparações entre os dias de avaliação, em relação às áreas, foram feitas considerando o teste não-paramétrico de Friedman. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

6. RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Houve 1 óbito no grupo 2 no sétimo dia pós-operatório durante a indução anestésica.

6.1.1 Comparação dos grupos em relação à taxa de contração da área da ferida avaliada nos dias 7, 14, 21 e 28

Para cada variável relativa à contração entre dois dias de avaliação (diferença percentual entre as áreas dos dois momentos), comparamos os grupos em relação a taxa contração da área da ferida (TABELA 1).

Nos grupos que receberam CT e/ou MA a taxa de contração foi significativamente maior nos sete dias iniciais do processo de reparo (Tc 1-7) (p 0,016).

TABELA 1 – ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA TAXA DE CONTRAÇÃO				
Variável	Grupo	N	Média ± desvio padrão	p^*
TAXA CONTRAÇÃO - Tc1-7	Controle	10	34,1 ± 34,3	
	CT	9	36,7 ± 5,5	
	MA	10	54,7 ± 14,8	
	CT + MA	10	52,3 ± 12,7	0,016
TAXA CONTRAÇÃO - Tc7-14	Controle	10	79,3 ± 16,5	
	CT	9	68,0 ± 3,4	
	MA	10	61,5 ± 14,4	
	CT + MA	10	64,5 ± 7,4	0,072
TAXA CONTRAÇÃO - Tc14-21	Controle	10	44,0 ± 13,5	
	CT	9	41,1 ± 8,7	
	MA	10	28,2 ± 15,5	

	CT + MA	10	21,1 ± 8,5	0,001
TAXA CONTRAÇÃO - Tc21-28	Controle	10	60,6 ± 24,8	
	CT	9	54,3 ± 20,4	
	MA	10	55,5 ± 17,5	
	CT + MA	10	39,2 ± 15,1	0,113
TAXA CONTRAÇÃO - Tc1-28	Controle	10	98,2 ± 1,2	
	CT	9	94,3 ± 3,2	
	MA	10	94,1 ± 4,1	
	CT + MA	10	92,1 ± 2,6	0,001

FONTE: O autor (2021)

Considerando-se que foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto às contrações das áreas, os grupos foram comparados dois a dois. Na TABELA 2 são apresentados os valores de p dessas comparações.

TABELA 2 – VALORES DE P ENTRE OS GRUPOS

Grupos comparados	p^*		
	Tc1-7	Tc14-21	Tc1-28
Controle x CT	0,928	0,767	0,003
Controle x MA	0,011	0,005	0,003
Controle x CT+MA	0,022	<0,001	<0,001
CT x MA	0,011	0,013	0,912
CT x CT+MA	0,020	0,001	0,077
MA x CT+MA	0,793	0,217	0,055

FONTE: O autor (2021)

A Tc1-7 foi maior no grupo 4 (CT + MA) quando comparada ao grupo 1 (controle) (52,3±12,7 versus 34,1±34,3; p 0,022).

No final de 28 dias, a Tc1-28 foi maior no grupo controle seguido do grupo 2 (CT) e 3 (MA) (p 0,001). A Tc1-28 foi maior no grupo 1 quando comparada ao grupo 4 (98,2±1,2 versus 92,1±2,6; p < 0,001).

A FIGURA 6 apresenta a evolução das feridas de acordo com os grupos estudados e os dias de evolução.

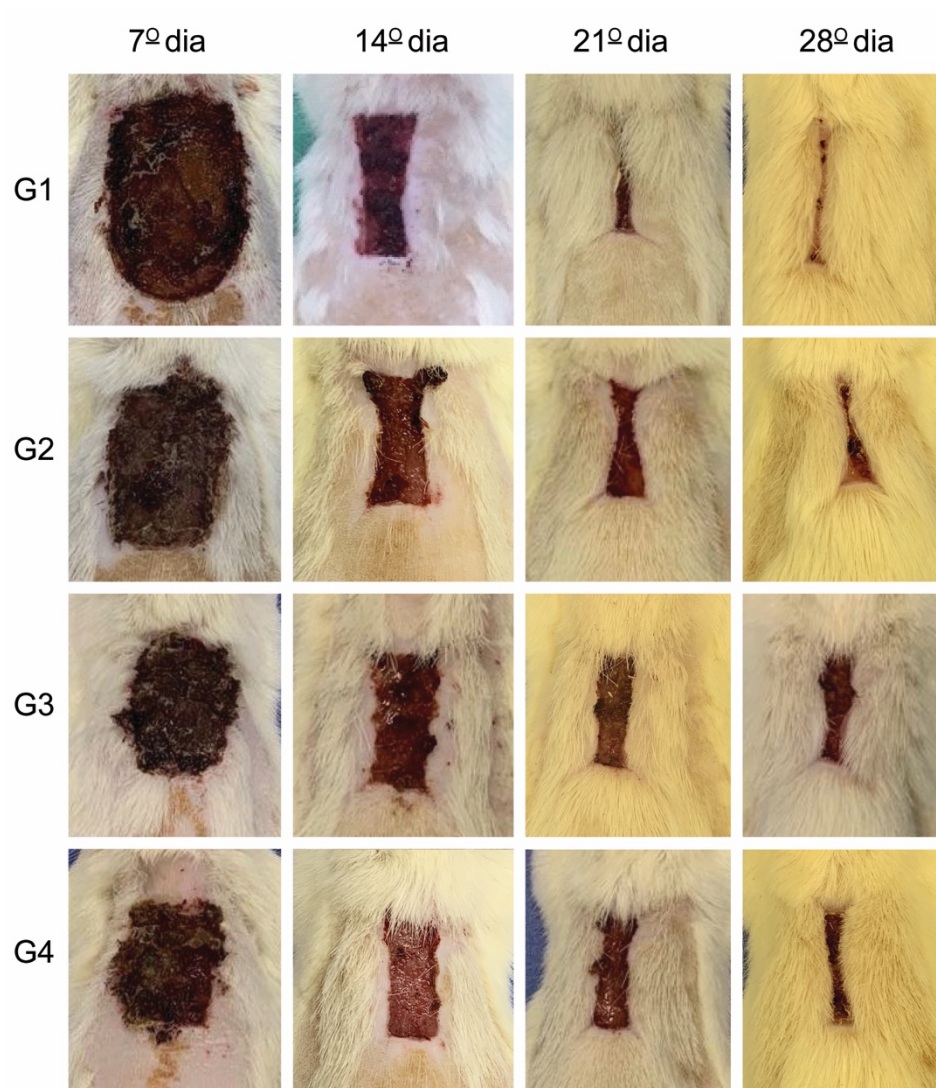


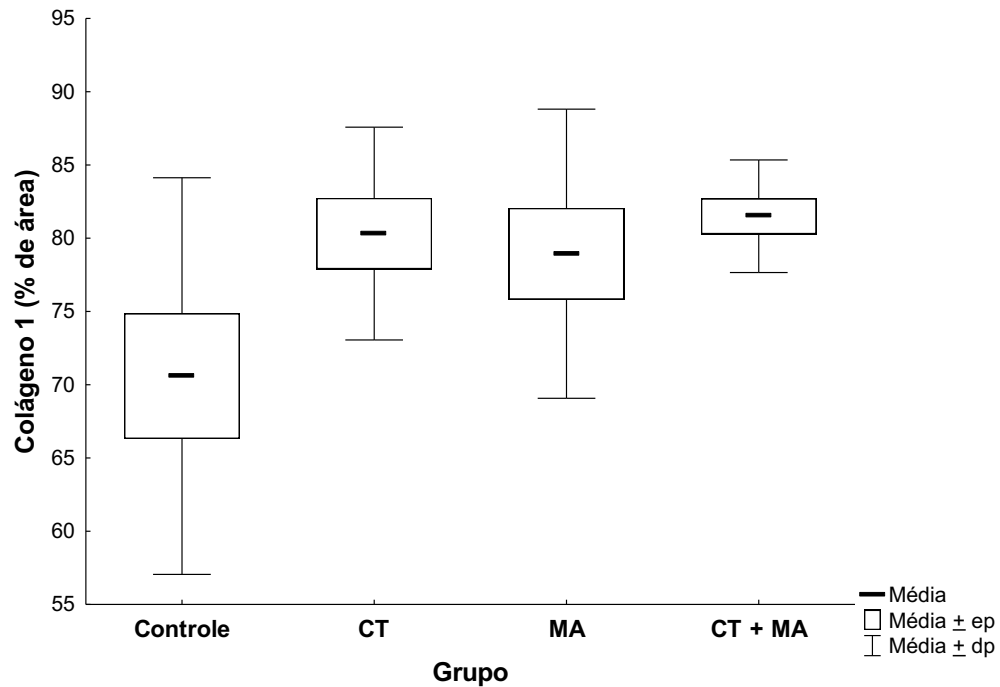
FIGURA 6 – EVOLUÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

Aspectos da ferida nos 7º, 14º, 21º e 28º dias de pós-operatório dos grupos: G1 (Controle), G2 (CT), G3 (MA), G4 (CT+MA). As lesões dos grupos que receberam CT e/ou MA estavam significativamente menores no sétimo dia do processo de reparo. Ao final de 28 dias, as lesões do grupo controle contraíram mais rapidamente do que os demais grupos.

FONTE: O autor (2021)

6.2 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO COLÁGENO TIPO 1 E 3

Comparamos os grupos em relação ao colágeno tipo 1 e 3 (GRÁFICO 1 e 2), como a soma dos colágenos é igual a 100 %, os valores de p são iguais.

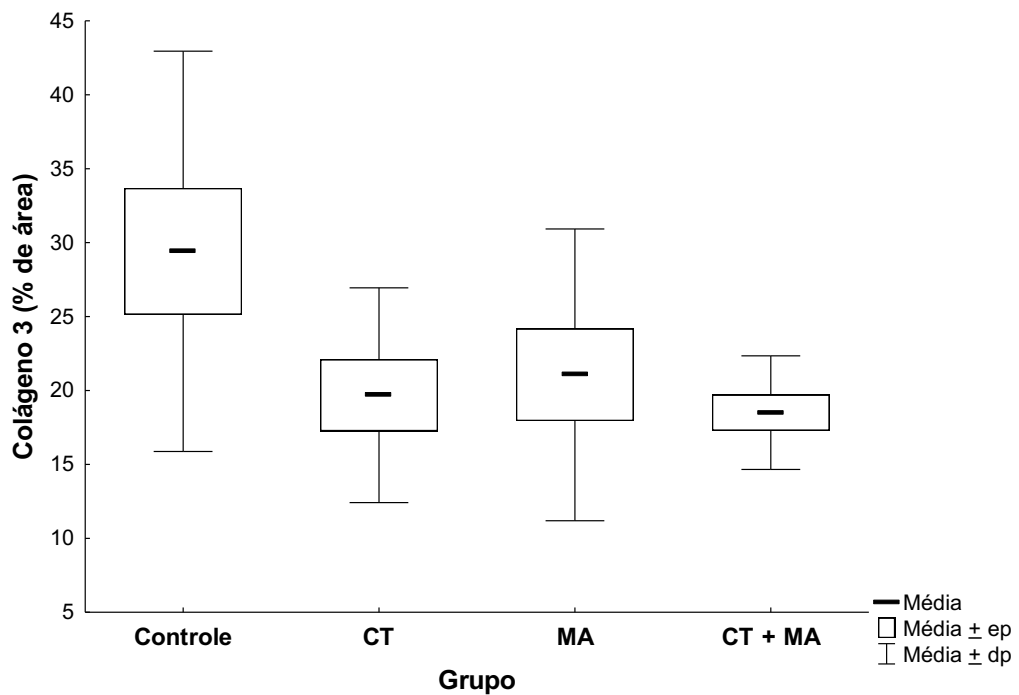


ep: erro padrão; dp: desvio padrão

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO COLÁGENO TIPO 1

Observamos a maior porcentagem de colágeno tipo 1 no grupo CT+MA.

FONTE – O autor (2021)



ep: erro padrão; dp: desvio padrão

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO COLÁGENO TIPO 3

O grupo controle apresentou a maior porcentagem de colágeno tipo 3 em relação aos demais grupos.

FONTE – O autor (2021)

As estatísticas descritivas do colágeno tipo 1 e 3 mostram predomínio de colágeno tipo 1 em todos os quatro grupos estudados. O grupo 4 (CT + MA) apresentou a maior média do colágeno tipo 1 ($70,6 \pm 13,5$; $p 0,057$). Em relação ao colágeno tipo 3, o grupo 1 teve a maior média ($29,4 \pm 13,5$; $p 0,057$).

Na TABELA 3 são apresentadas estatísticas descritivas do colágeno tipo 1 e 3 de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 3 – ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DO COLÁGENO TIPO 1 e 3

Variável	Grupo	N	Média \pm desvio padrão	p^*
Colágeno tipo 1	Controle	10	$70,6 \pm 13,5$	0,057
	CT	9	$80,3 \pm 7,3$	
	MA	10	$78,9 \pm 9,9$	
	CT+MA	10	$81,5 \pm 3,8$	
Colágeno tipo 3	Controle	10	$29,4 \pm 13,5$	0,057
	CT	9	$19,7 \pm 7,3$	
	MA	10	$21,1 \pm 9,9$	
	CT+MA	10	$18,5 \pm 3,8$	

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

FONTE – O autor (2021)

O valor de $p 0,057$ indica que há uma tendência a diferença significativa entre os 4 grupos. Ao comparar especificamente os grupos Controle e CT+MA foi encontrada diferença significativa ($p 0,033$; teste t de *Student* para amostras independentes).

A FIGURA 7 mostra o colágeno tipo 1 e 3 corado com Picrosirius red.

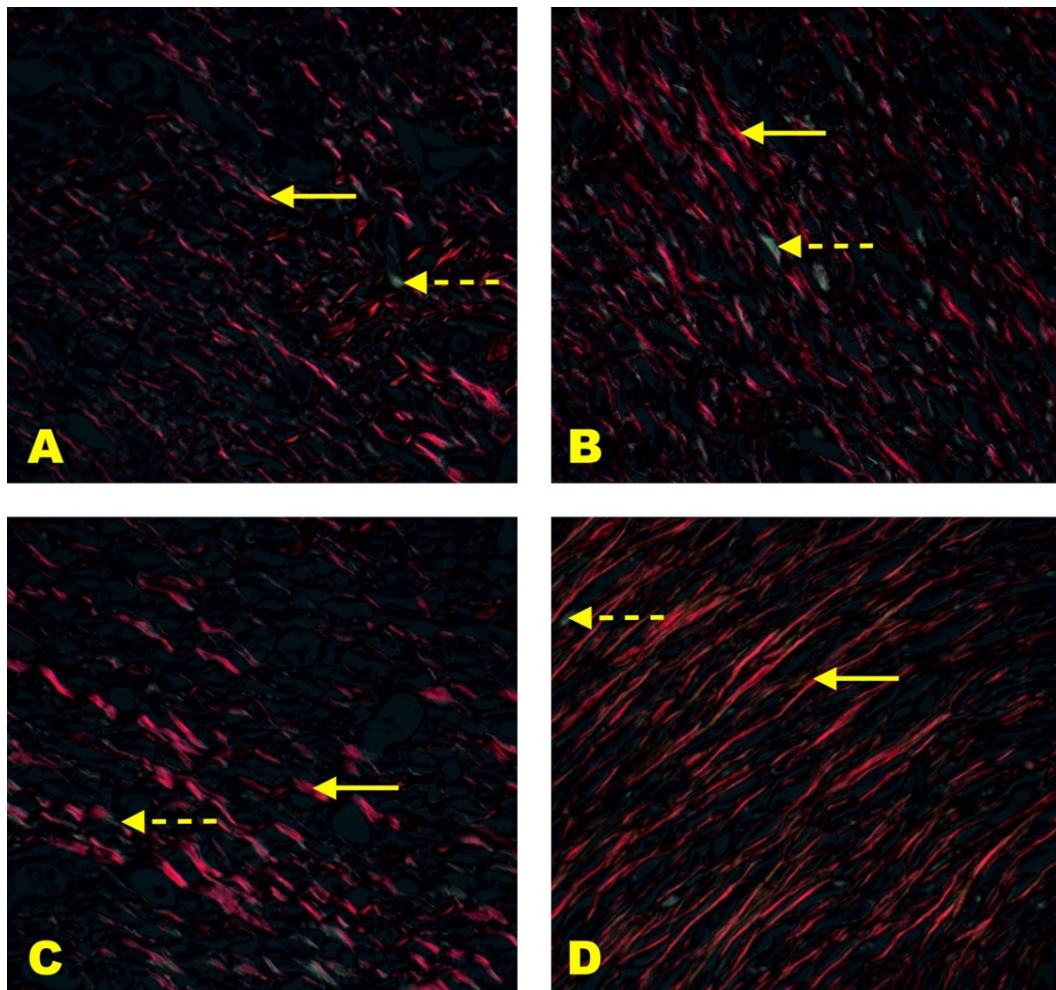


FIGURA 7 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DO COLÁGENO TIPO 1 e 3 (400X)
O Picrosirius Red cora o colágeno tipo 1 em vermelho e o colágeno tipo 3 em verde, indicado pelas setas sólidas amarelas e pontilhadas, respectivamente. A análise das imagens capturadas ao microscópio de luz polarizada mostrou predomínio de colágeno tipo 1 (maduro) em todos os grupos.

A – grupo controle; B – grupo célula-tronco; C – grupo membrana amniótica; D – grupo célula-tronco e membrana amniótica

FONTE – O autor (2021)

6.3 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À FIBRA ELÁSTICA

Comparamos os grupos em relação às fibras elásticas (GRÁFICO 3). A análise das fibras elásticas demonstrou as maiores médias nos grupos tratados com CT e/ou MA (p 0,215). Na TABELA 4 são apresentadas estatísticas descritivas da fibra elástica de acordo com os grupos e o valor de p do teste estatístico.

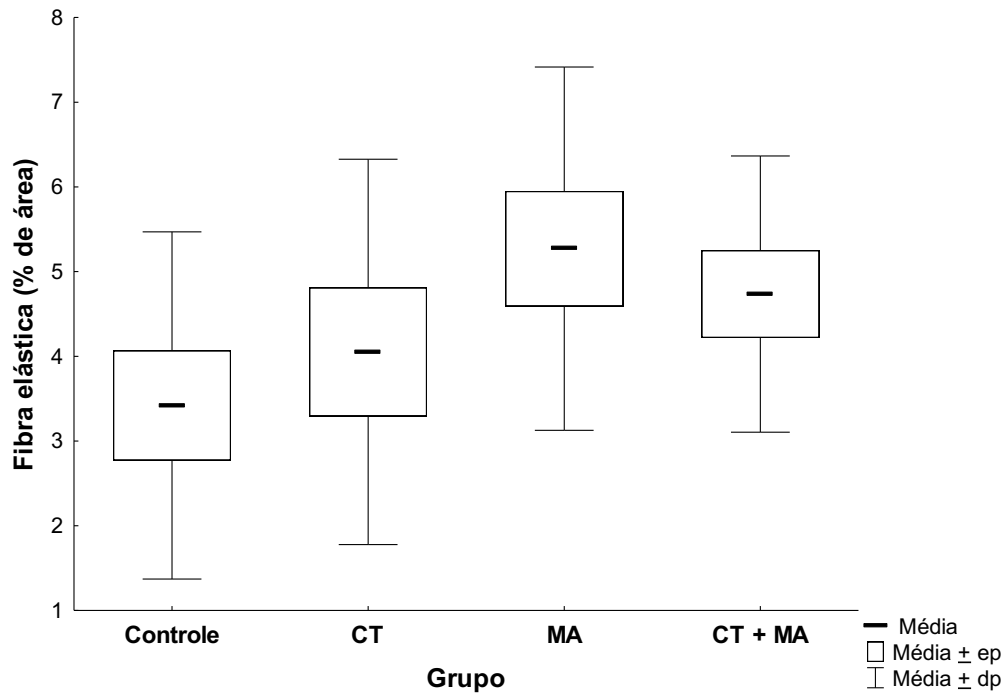


GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À FIBRA ELÁSTICA

O grupo controle apresentou a menor média de fibras elásticas quando comparada aos demais grupos estudados.

FONTE: O autor (2021)

TABELA 4 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA FIBRA ELÁSTICA ENTRE OS GRUPOS

Variável	Grupo	N	Média ± desvio padrão	<i>p</i> *
Fibra elástica (%)	Controle	10	3,4 ± 2,0	0,215
	CT	9	4,1 ± 2,3	
	MA	10	5,3 ± 2,1	
	CT+MA	10	4,7 ± 1,6	

FONTE: O autor (2021)

A FIGURA 8 mostra as fibras elásticas coradas de vermelho pela coloração de Verhoeff (400x).

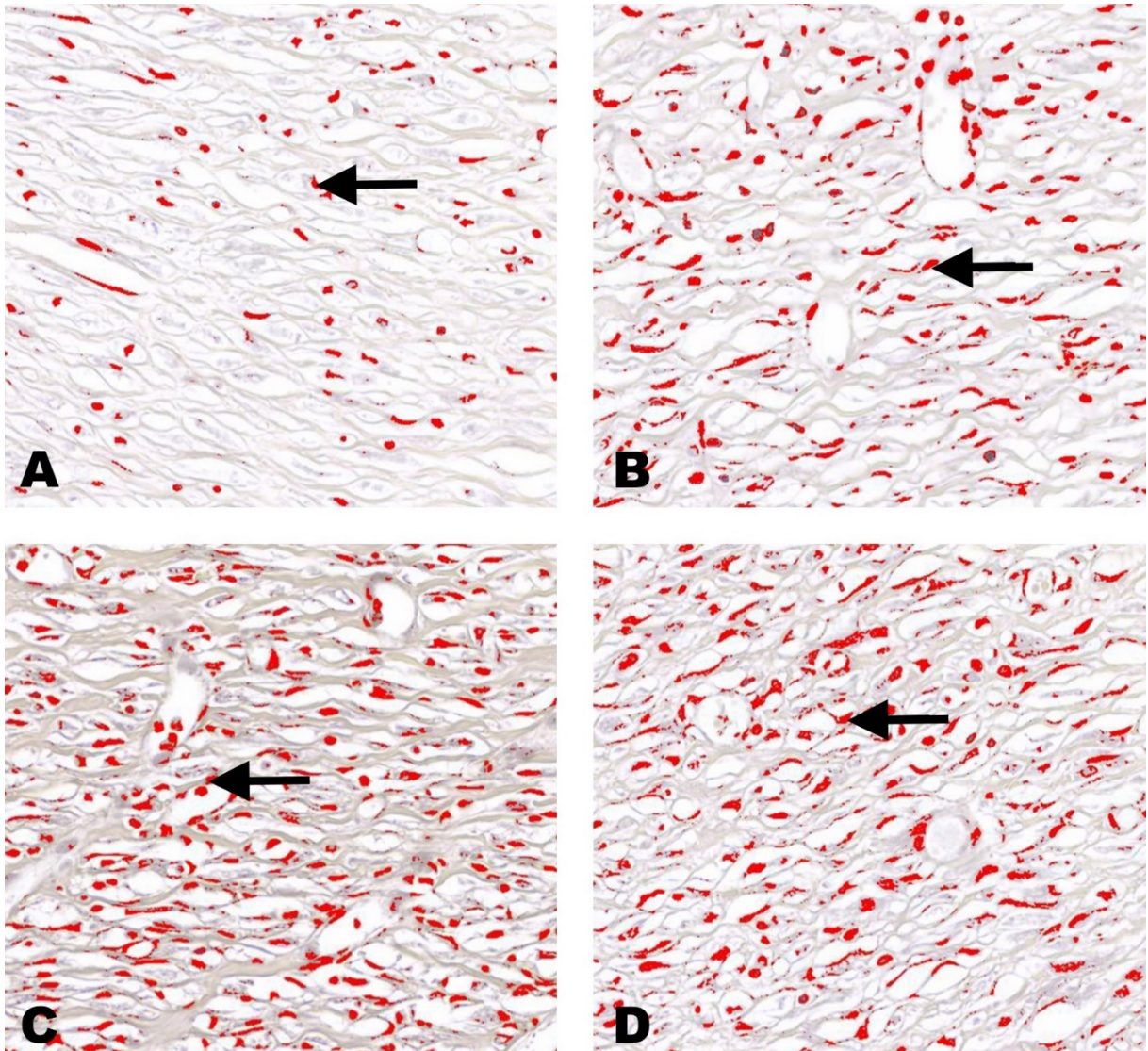


FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DA FIBRA ELÁSTICA (400X)

As setas pretas indicam as fibras elásticas coradas em vermelho pela técnica Verhoeff. Houve predomínio das fibras elásticas no grupo MA, seguido dos grupos CT + MA, CT e controle.

A – grupo controle; B – grupo célula-tronco; C – grupo membrana amniótica; D – grupo célula-tronco e membrana amniótica

Fonte – O autor (2021)

6.4 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AOS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

O remodelamento do colágeno foi analisado através da expressão de MMP-8. Os resultados revelaram uma menor expressão nos grupos 2 e 4 (CT e CT + MA) ($0,344 \pm 1,428$ e $0,646 \pm 0,765$; $p 0,699$) (TABELA 5 / GRÁFICO 4).

TABELA 5 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA MMP-8 ENTRE OS GRUPOS

Variável	Grupo	N	Média ± desvio padrão	<i>p</i> *
MMP8 (% área positiva)	Controle	10	0,991 ± 1,428	0,699
	CT	9	0,344 ± 0,373	
	MA	10	1,261 ± 1,692	
	CT+MA	10	0,646 ± 0,765	

FONTE: O autor (2021)

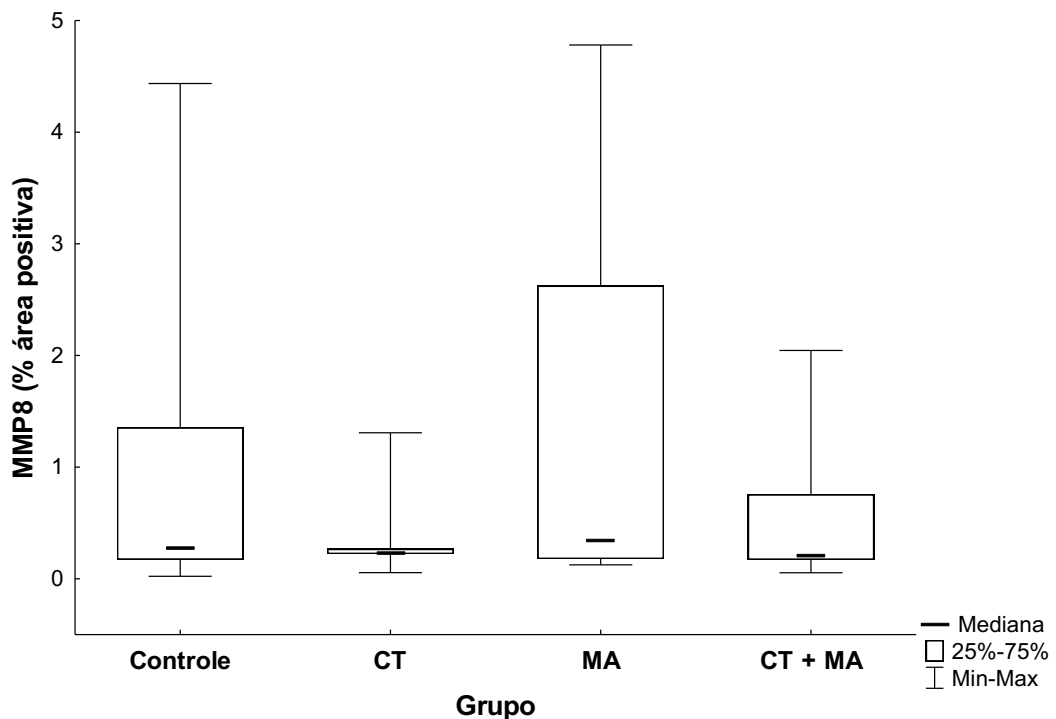


GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR MMP-8

Na análise do remodelamento do colágeno, os resultados mostraram uma menor expressão de MMP-8 nos grupos CT e CT + MA.

FONTE: O autor (2021)

A expressão de TGF- β verificou o fator de diferenciação de fibroblastos e também apresentou as menores porcentagens nos grupos 2 e 4 (2,18±1,66 e 2,73±3,33; *p* 0,468) (TABELA 6 / GRÁFICO 5).

TABELA 6 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO TGF- β ENTRE OS GRUPOS

Variável	Grupo	N	Média \pm desvio padrão	p^*
TGF- β (% área positiva)	Controle	10	3,32 \pm 3,10	0,468
	CT	9	2,18 \pm 1,66	
	MA	10	3,99 \pm 2,64	
	CT+MA	10	2,73 \pm 3,33	

FONTE: O autor (2021)

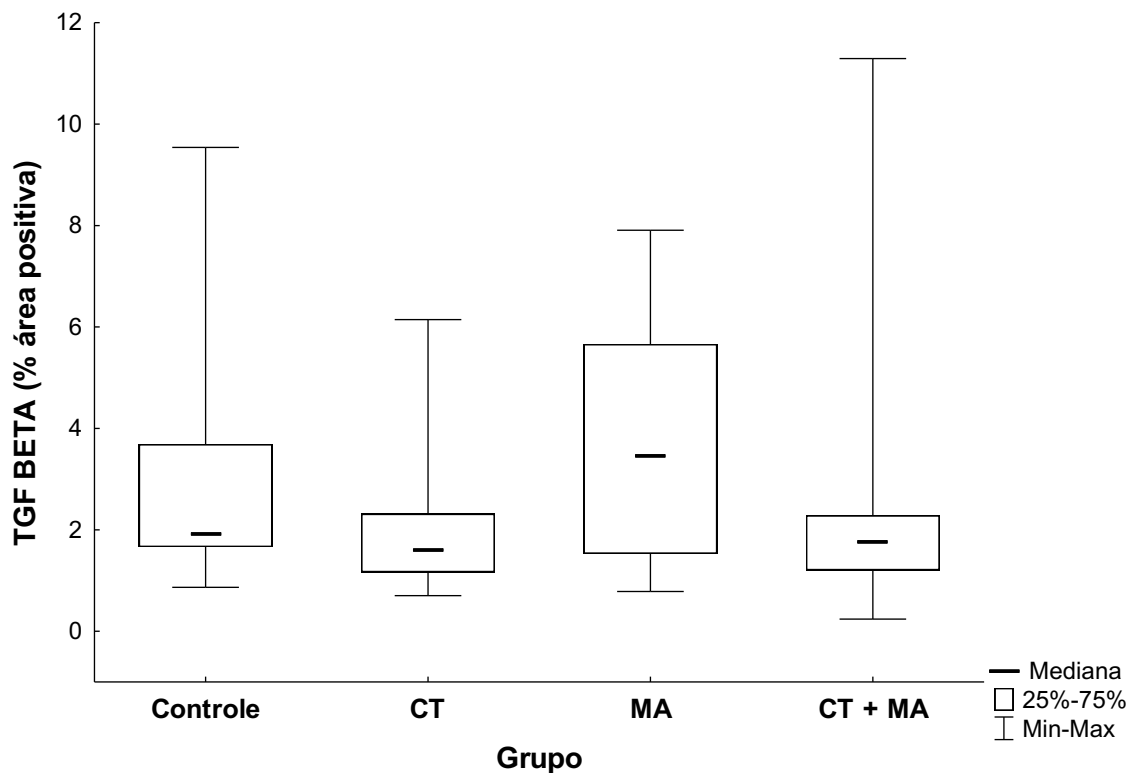


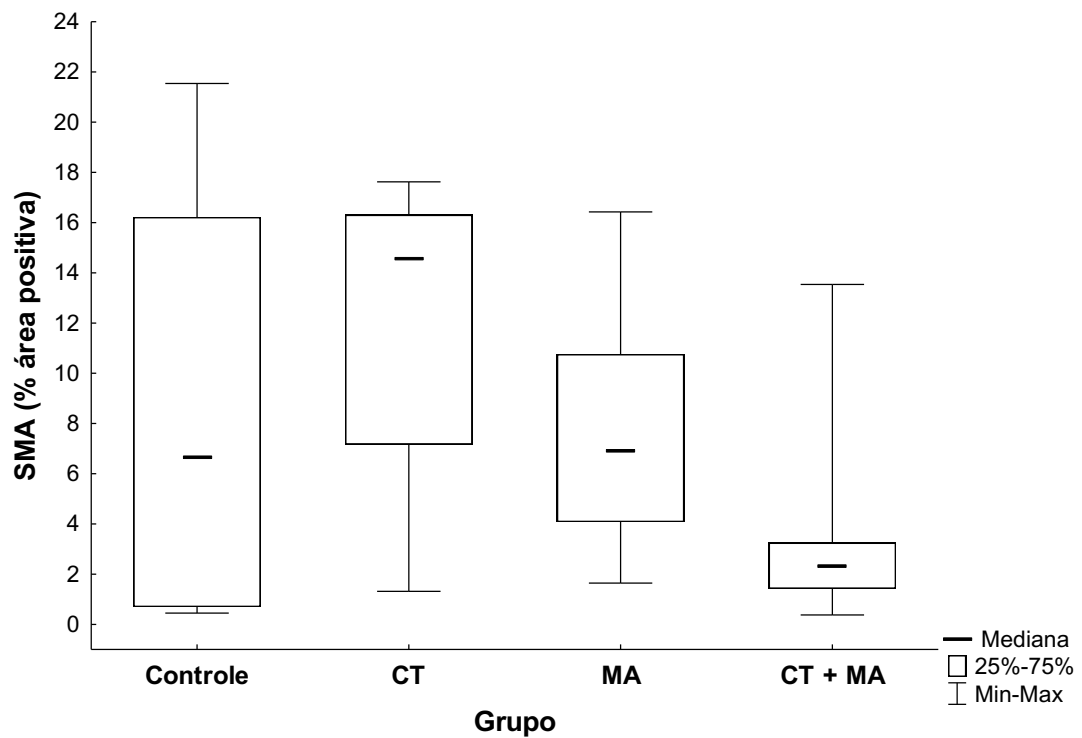
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR TGF- β
 A expressão de TGF- β apresentou os menores percentuais nos grupos CT e CT + MA.
 FONTE: O autor (2021)

Em relação a análise da quantificação de miofibroblastos e vasos sanguíneos, os resultados mostraram uma menor expressão de α -AML no grupo 4 (CT + MA) (3,89 \pm 4,45), seguido dos grupos 3, 1 e 2 (7,62 \pm 4,45; 8,23 \pm 7,89; 11,59 \pm 5,85; p 0,054) (TABELA 7 / GRÁFICO 6).

TABELA 7 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA α -AML ENTRE OS GRUPOS

Variável	Grupo	n	Média \pm desvio padrão	p^*
α -AML (% área positiva)	Controle	10	8,23 \pm 7,89	0,054
	CT	9	11,59 \pm 5,85	
	MA	10	7,62 \pm 4,45	
	CT+MA	10	3,89 \pm 4,45	

FONTE: O autor (2021)

GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR α -AML

A expressão de α -AML verificou a quantificação de miofibroblastos e vasos sanguíneos, e apresentou as menores porcentagens no grupo CT + MA, seguido pelo grupo MA, controle e CT.

FONTE – O autor (2021)

As FIGURAS 9, 10 e 11 mostram os reagentes dos marcadores MMP-8, TGF β , α -AML, corados em castanho (400x).

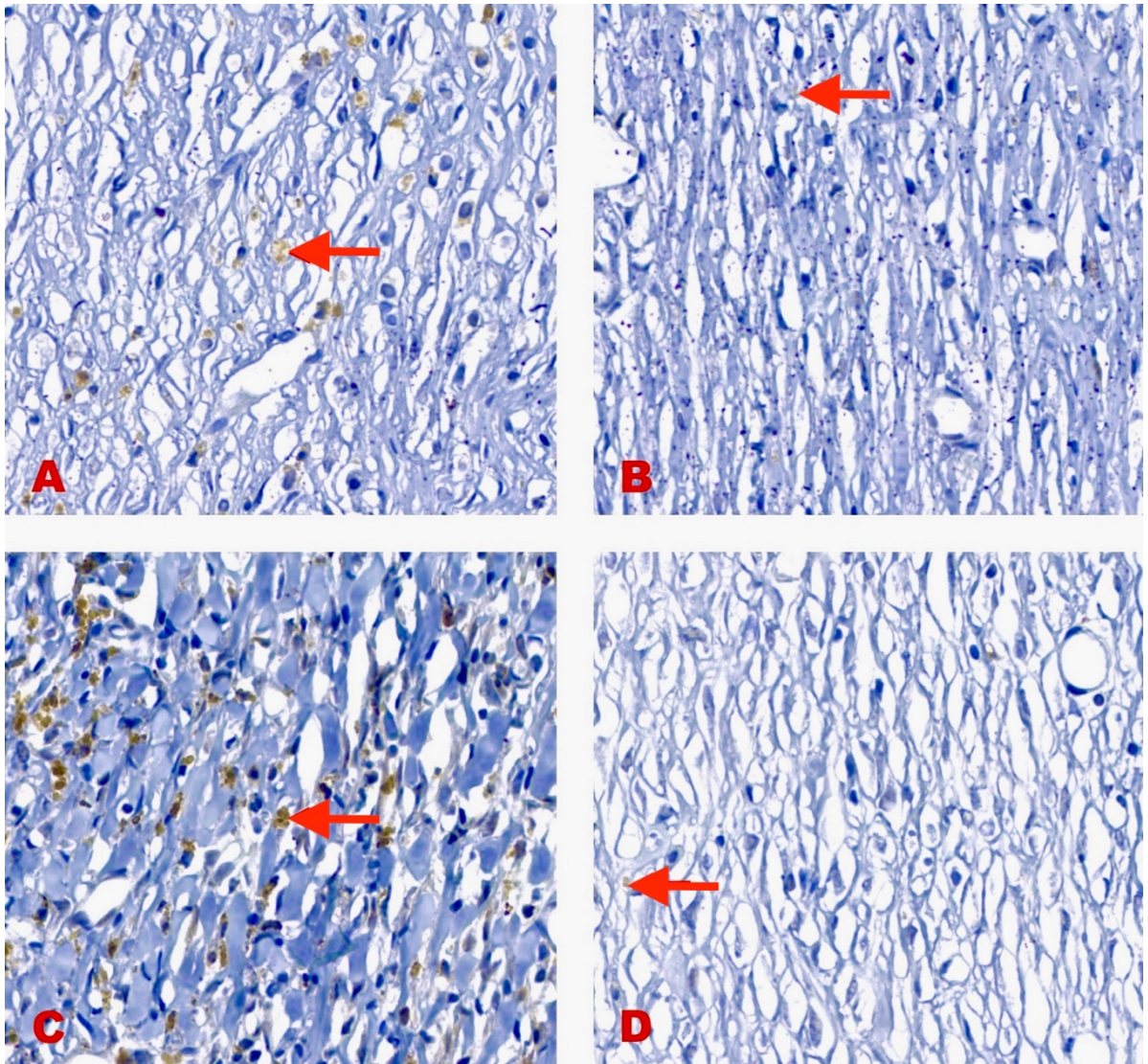


FIGURA 9 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DE MMP8 (400X)

As setas vermelhas indicam a expressão de MMP-8 corada em castanho. A avaliação imuno-histoquímica indicou que a expressão de MMP-8 foi menor nos grupos CT e CT + MA
A – grupo controle; B – grupo célula-tronco; C – grupo membrana amniótica; D – grupo célula-tronco e membrana amniótica

FONTE: O autor (2021)

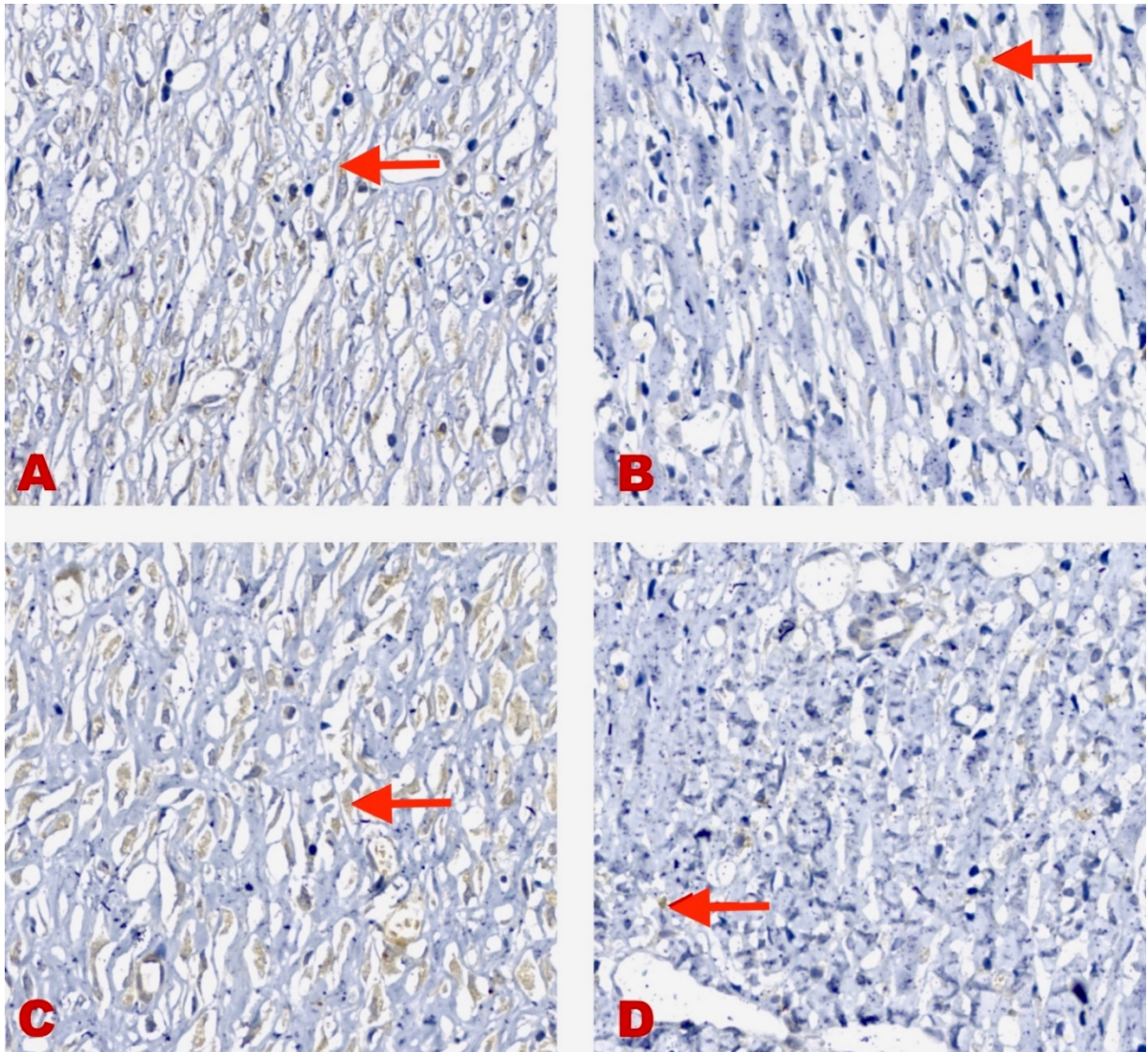


FIGURA 10 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DE TGF- β (400X)

As setas vermelhas indicam a expressão de TGF- β corada em castanho. Os grupos tratados com células-tronco, G2 e G4, apresentaram as menores expressões de TGF- β .

A - grupo controle; B – grupo célula-tronco; C – grupo membrana amniótica; D – grupo célula-tronco e membrana amniótica

FONTE: O autor (2021)

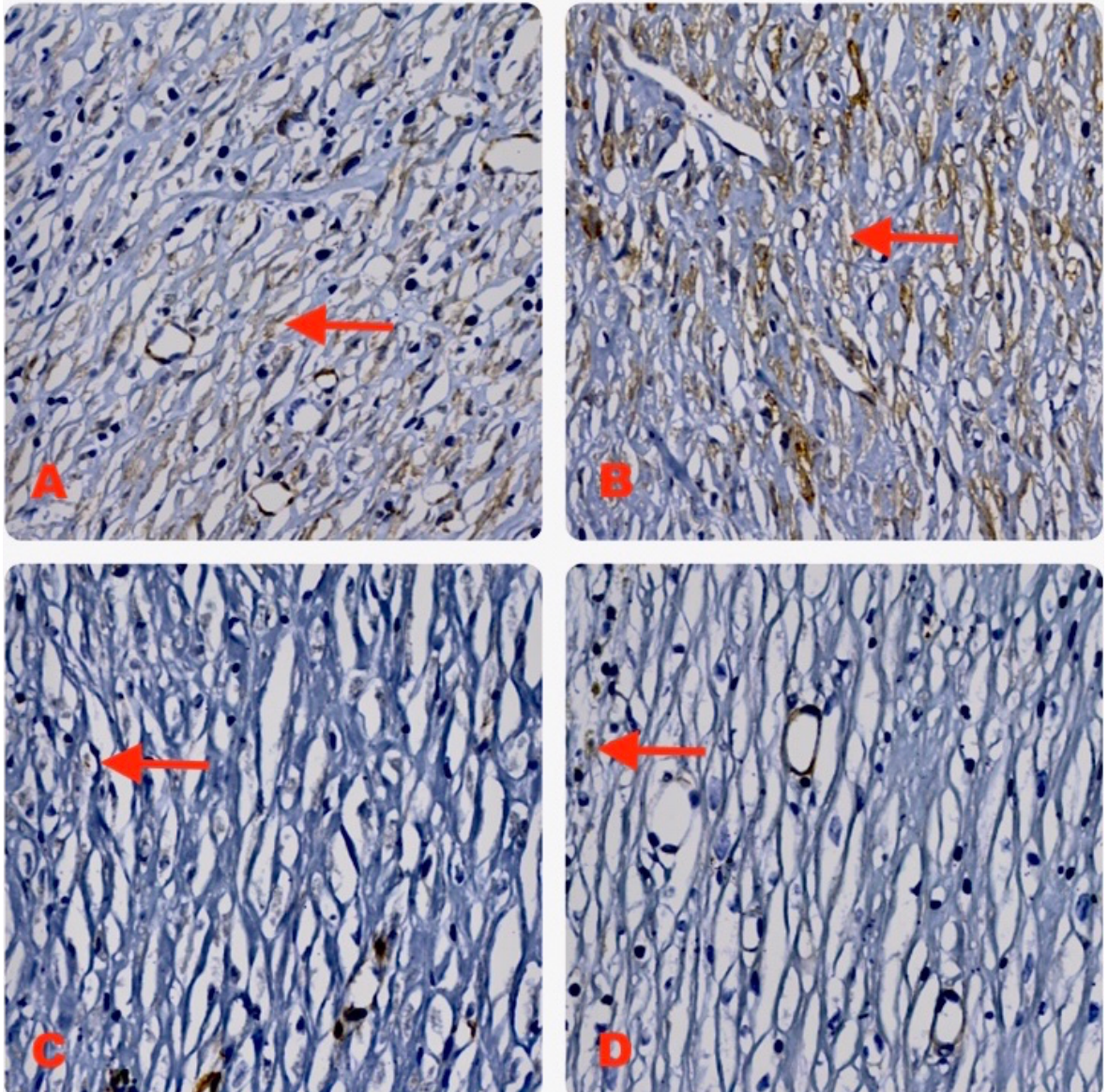


FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIA MOSTRANDO A ÁREA DE α -AML (400X)

As setas vermelhas indicam a expressão de α -AML corada em castanho. No estudo imuno-histoquímico, a expressão de α -AML foi menor no grupo CT + MA e a maior expressão foi encontrada no grupo CT.

A - grupo controle; B – grupo célula-tronco; C – grupo membrana amniótica; D – grupo célula-tronco e membrana amniótica

FONTE: O autor (2021)

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, a aplicação de células-tronco mononucleares da medula óssea autóloga demonstrou um efeito positivo por aumentar a taxa de contração das feridas nos primeiros sete dias do processo de reparo. Ao compararmos o grupo 1 (controle) com o grupo 4 (CT + MA) encontramos uma Tc1-7 cerca de 35 % maior no grupo tratado (p 0,022).

No final de 28 dias, a Tc1-28 foi maior no grupo controle, isto é, contraiu mais rapidamente, porém quando comparamos o grupo 1 com o grupo 4, temos uma taxa de contração de aproximadamente 6 % maior no grupo controle ($p < 0,001$).

Um dos questionamentos para esse resultado seria que a ação mecânica da membrana amniótica estaria prejudicando a redução da ferida, por manter os miofibroblastos com menor distensibilidade. Porém, existem outros fatores ligados a contração como a presença de fatores de crescimento, genes de conexão da zona de oclusão 1,¹³⁰ que podem ter influenciado neste resultado.

Outra hipótese poderia ser em decorrência do período de observação, visto que, não avaliamos a lesão até a sua cicatrização completa. Como as células-tronco influenciam em todas as fases de cicatrização (inflamatória, proliferativa e remodelamento)^{14,45} não pudemos ratificar toda a potencialidade do tratamento. Além disso, as CT alteram o fenótipo do processo inflamatório para um processo menos fibrinogênico.

Em um estudo experimental publicado por Longo *et al.*, não ocorreu diferença significativa nas análises planimétricas com o uso da membrana amniótica humana acelular na cicatrização de queimaduras térmicas de terceiro grau em ratos, conclusão semelhante a encontrada em nosso modelo experimental.¹³¹

Os resultados mostraram que a aplicação das CT e MA provavelmente reduziu a duração da fase inicial da cicatrização, devido a ação anti-inflamatória, o que favoreceu o início precoce da formação das fibras colágenas, na fase de remodelação, caracterizada pela substituição do colágeno tipo 3 por colágeno tipo 1. Portanto, no presente estudo, as fibras de colágeno dos animais do grupo CT+MA atingiram a maturidade mais rapidamente quando comparado ao controle.

Campelo *et al.* verificaram que o tratamento com MA acelerou o processo de cicatrização da ferida.¹⁰⁷ A ação anti-inflamatória do MA reduziu a duração da fase

inicial de cicatrização. Outro fator relevante foi a função da membrana amniótica como barreira protetora dos tecidos lesados, que favoreceu o início precoce do processo de reparo nas feridas protegidas, além de evitar a perda de fluidos e a contaminação por microorganismos. Resultado que corrobora com o da nossa pesquisa nos primeiros 7 dias de evolução.

Diversos estudos têm demonstrado o efeito benéfico promovido pelo tratamento com CT, derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo,^{14,45} incluindo atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, imunomoduladoras e reparadoras de tecidos.⁴⁵ As células-tronco possuem vários potenciais terapêuticos para regenerar a pele danificada, principalmente por sinalização parácrina e diferenciação.^{16,78-81} Os estudos sugerem que a contribuição da diferenciação de CT é limitada devido ao enxerto insuficiente e sobrevivência no local da lesão. A sinalização parácrina é provavelmente o mecanismo primário para os efeitos benéficos das CT em feridas, isto é, reduzir a inflamação, promover a angiogênese e induzir a migração e proliferação celular.⁴⁵

A análise das imagens captadas pelo microscópio de luz polarizada mostrou predomínio do colágeno tipo 1 (maduro) em todos os grupos (FIGURA 7), sendo que o grupo 4 (CT + MA) apresentou a maior média. Em relação ao colágeno tipo 3 (imaturo), o grupo 1 teve a maior média. Ao compararmos especificamente os grupos Controle e CT + MA foi encontrada diferença significativa (p 0,0033).

Em 2012, Yun *et al.*, injetaram células-tronco derivadas do tecido adiposo em cicatrizes de pele desenvolvidas após a indução de lesões de espessura total e concluiu que as CT aceleram a remodelação da cicatriz.¹³² Outra pesquisa, que também corrobora com os nossos resultados, publicada por Duarte *et al.* relatou que, no processo de cicatrização de feridas em coelhos tratados com MA, houve predomínio de fibras colágenas maduras.¹³³ Portanto, os resultados confirmam a aceleração da maturidade das fibras colágenas com o uso de MA e CT.

A técnica de Verhoeff mostrou predomínio das fibras elásticas no grupo 3, seguido dos grupos 4, 2 e 1. Evidenciando o benefício do tratamento com MA e/ou CT no reparo cutâneo. Em 2019, Hatzfeld *et al.* ratificaram os nossos achados ao demonstrarem que a cicatrização de queimaduras de espessura total em suínos tratados com MA estimulou a síntese de fibras elásticas e induziu uma rede de fibras de elastina bem formada.¹³⁴

Estudos recentes mostraram que as CT podem diminuir a síntese de elastina ou aumentar a degradação das fibras elásticas existentes. Os mecanismos moleculares que orientam esses eventos permanecem mal compreendidos, e tais hipóteses estão em conflito com descrições anteriores que demonstraram uma contribuição positiva do tratamento de CT para alterações das fibras elásticas, como aneurismas aórticos ou doença pulmonar obstrutiva crônica.¹³⁵

Em 2017, outro trabalho também confirmou os resultados desta pesquisa. Ochiai *et al.* estudaram a cicatrização de feridas lineares de pele de suínos e demonstraram que após 28 dias da cirurgia, as feridas do grupo controle apresentaram poucas fibras elásticas, em contraste com o grupo tratado com CT derivadas da medula óssea, sendo as fibras elásticas e o aspecto dos fibroblastos semelhantes ao da pele normal.¹³⁶

Diversos mecanismos relacionados a cicatrização têm sido investigados, como o remodelamento do colágeno através da expressão da MMP-8, o fator de diferenciação de fibroblastos com o TGF- β , e a quantificação de miofibroblastos e vasos sanguíneos pela expressão de α -AML.

O processo de remodelamento do colágeno, isto é, o equilíbrio entre a deposição e o catabolismo deste, e a substituição do colágeno tipo 3, característico da cicatriz imatura; pelo colágeno tipo 1, mais resistente e predominante na cicatriz madura^{53,54} é coordenado por proteínas denominadas metaloproteinases.

A família das metaloproteinases inclui cerca de 25 proteínas que podem ser divididas em: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, tipo membrana e outras MMPs, que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo com a sua estrutura.⁵⁵ A MMP-8 é uma collagenase intersticial que é secretada pelos fibroblastos, neutrófilos e macrófagos da ferida. Uma expressão aumentada de MMP-8 em feridas crônicas é prejudicial para a reparação, causando a degradação do colágeno tipo 1.⁵⁶

Em nosso estudo, na avaliação imuno-histoquímica, a expressão de MMP-8 foi menor nos grupos 2 e 4. Confirmando a maior porcentagem de colágeno tipo 1 nesses grupos, visto que, o aumento da MMP-8 favorece a quebra do colágeno maduro, prejudicando o reparo das lesões.⁵⁶

O TGF- β apresenta importante papel na diferenciação miofibroblástica durante os fenômenos fibrocontrativos e cicatriciais, por regular a expressão de α -AML nestas células. Por sua vez, o TGF- β é regulador multifuncional do crescimento e

diferenciação celular durante desenvolvimento e reparação, influenciando a síntese de componentes da matriz extracelular, como colágenos, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanas.

Os grupos tratados com células-tronco, grupo 2 e 4, apresentaram as menores expressões de TGF- β , provavelmente devido as características anti-inflamatórias das CT que podem suprimir a ativação de mastócitos e TGF- β que desempenham um papel importante na formação da cicatriz, sendo um fator de diferenciação de fibroblastos.¹³²

Os fibroblastos são ativados pela expressão de α -AML tornando-se miofibroblastos, que exibem papel essencial na contração/fechamento da ferida⁵¹ e secretam componentes de matriz extracelular, tais como colágeno, glicosaminoglicanos, fibronectina, laminina e elastina, que substituem a matriz provisória formada inicialmente.¹³⁷

A expressão de α -AML foi expressivamente menor no grupo 4 (CT + MA), no qual também foi registrada a menor taxa de contração entre os dias 1 e 28 (Tc 1-28), inclusive dos últimos sete dias (Tc 21-28) do período experimental. Por outro lado, a maior expressão foi encontrada no grupo 2 (CT), que ratifica os resultados de Yamaguchi *et al.* que mostraram que as CT da medula óssea quando aplicadas de forma tópica nas feridas cutâneas diferenciam-se em miofibroblastos e aceleram a cicatrização de feridas quando combinadas com curativos oclusivos.¹³⁸

O efeito antifibrótico da membrana amniótica humana pode ser explicado devido à ação inibitória deste tecido na expressão do TGF- β , responsável por ativar os fibroblastos que, por sua vez, são responsáveis pelo processo de cicatrização. Como resultado, o processo fibrótico é inibido.¹⁸ Desta forma, a membrana amniótica pode modular a cicatrização através da promoção da reconstrução tecidual, em detrimento da formação de uma cicatriz.¹¹⁵

Em 2012, Yun *et al.*, injetaram células-tronco derivadas do tecido adiposo em cicatrizes de pele desenvolvidas após a indução de lesões de espessura total e concluiu que as CT aceleram a remodelação da cicatriz, reduzem a atividade dos mastócitos e miofibroblastos e suprimem a ação do TGF- β em fibroblastos, o que está de acordo com os resultados encontrados em nossa pesquisa, além de aumentar os efeitos de MMP-1 na remodelação do colágeno.¹³²

8. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo sugerem que as CT mononucleares e/ou MA aceleram a taxa de contração da lesão nos primeiros sete dias do processo de reparo, por reduzir a atividade inflamatória e acelerar a maturação das fibras colágenas e elásticas. A terapia CT e MA nas lesões cutâneas não aumentou a taxa de contração das lesões cutâneas de espessura total nos estágios mais avançados da cicatrização, porém pode auxiliar no reparo por meio da remodelação do colágeno (menores expressões de MMP-8) e ação antifibrótica (menores expressões de TGF- β e α -AML).

No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação das CT e MA que ocorrem durante o processo de cicatrização de feridas cutâneas.

REFERÊNCIAS

- 1-DYCE, J.; SACK, W. O.; WENSING, C. I. G. Tratado de anatomia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. In: **Tratado de Anatomia Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, p. 233–238, 2010.
- 2-BOYKO, T. V.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. Laboratory Models for the Study of Normal and Pathologic Wound Healing. **Plast Reconstr Surg**, 139, p. 654–662, 2017.
- 3-BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas**, Brasília: Ministério da Saúde, 2002. Disponível em: (http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_feridas_final.pdf). Acessado em julho 2020.
- 4-MANDELBAUM, S. H., DI SANTIS, É. P., MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- 5-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**. Disponível em: (<https://www.medilignce.com/store/pa-ge44.html>). Acessado em julho 2020.
- 6-BRASIL. Ministério da saúde. **Sistema Único de Saúde (SUS)**, Governo Brasileiro, 2015. Disponível em: (<http://www.brasil.gov.br/saude/>). Acessado em julho 2020.
- 7-GERVASI, L. C.; TIBOLA, J.; JAYCE, I.; SCHNEIDER, C. Tendência de morbidade hospitalar por queimaduras em Santa Catarina. **Rev Bras Queimaduras**, v. 13, n. 1, p. 31–7, 2014.
- 8-GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.
- 9-EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci Transl Med**, 6, n. 265, p. 265-266, 2014.
- 10-BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, 117, n. 7 Suppl, p. 12S-34S, 2006.
- 11-HU, Y.; LIANG, D.; LI, X.; LIU, H. H.; *et al.* The role of interleukin-1 in wound biology. Part II: In vivo and human translational studies. **Anesth Analg**, 111, n. 6, p. 1534-1542, 2010.
- 12-PESSOLATO, A. G.; MARTINS, D. O. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MANÇANARES, C. A.; *et al.* Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.

- 13-KARIMI, H.; SOUDMAND, A.; OROUJI, Z.; TAGHIABADI, E.; *et al.* Burn wound healing with injection of adipose-derived stem cells: a mouse model study. **Ann Burns Fire Disasters**, 27, n. 1, p. 44-49, 2014.
- 14-HOCKING, A. M. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, 1, n. 4, p. 166-171, 2012.
- 15-JACKSON, W. M.; NESTI, L. J.; TUAN, R. S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. **Stem Cell Res Ther**, 3, n. 3, p. 20, 2012.
- 16-HASSAN, W. U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair Regen**, 22, n. 3, p. 313-325, 2014.
- 17-TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T.; NIKAIDO, T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **J Pharmacol Sci**, 105, n. 3, p. 215-228, 2007.
- 18-MAMEDE, A. C.; CARVALHO, M. J.; ABRANTES, A. M.; LARANJO, M.; *et al.* Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell Tissue Res**, 349, n. 2, p. 447-458, 2012.
- 19-SHAO, C.; SIMA, J.; ZHANG, S. X.; JIN, J.; *et al.* Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 45, n. 6, p. 1758-1762, 2004.
- 20-CHENG, A. Y.; GARCÍA, A. J. Engineering the matrix microenvironment for cell delivery and engraftment for tissue repair. **Curr Opin Biotechnol**, 24, n. 5, p. 864-871, 2013.
- 21-KAMEL, R. A.; ONG, J. F.; ERIKSSON, E.; JUNKER, J. P.; *et al.* Tissue engineering of skin. **J Am Coll Surg**, 217, n. 3, p. 533-555, 2013.
- 22-KIM, S. S.; SONG, C. K.; SHON, S. K.; *et al.* Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. **Cell Tissue Res**, 336, p. 59-66, 2009.
- 23-KIM, C. H.; KIM, S. S.; SHON, S. K.; KIM, D. H.; *et al.* The Effect of Human Amniotic Membrane, Epidermal Cells and Marrow Mesenchymal Stem Cells in Healing a Skin Defect. **J Korean Orthop Assoc**, 43, p. 276-286, 2008.
- 24-FARZAMFAR, S.; SALEHI, M.; EHTERAMI, A.; *et al.* Promotion of excisional wound repair by a menstrual blood-derived stem cell-seeded decellularized human amniotic membrane. **Biomed Eng Lett**, 8, p. 393-398, 2018.
- 25-ELDER, D. E. **Lever's histopathology of the skin**. 11 ed., Wolters Kluwer, 2014.
- 26-SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. **Clin Dermatol**, 23, n. 4, p. 403-412, 2005.

- 27-BILLON, N.; DANI, C. Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. **Stem Cell Rev Rep**, 8, n. 1, p. 55-66, 2012.
- 28-LEAPER, D. J.; HARDING, K. G. Wounds: biology and management. Oxford: **Oxford University Press**; 1998.
- 29-FAZIO, M. J.; ZITELLI, J. A.; GOSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. In: **Coleman III WP, HANKE, C. W.; ALT, T. H.; ASKEN, S. Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 18-23, 2000.
- 30-POPE, E. R. Cicatrização da pele. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, p. 178-183, 1996.
- 31-FISCHER, J. E. **Mastery of surgery**. Willianas & Willians. Philadelphia, 5st. Ed., 2007.
- 32-BRUNICARD, F. C. **Schwartz's principles of surgery**. McGrawn USA, 8th. ed. 2007.
- 33-LEONG, M.; LINDA, G.; PHILIPS. Cicatrização. In: **Sabiston - Tratado de Cirurgia – COURTNEY, M.; TOWNSEND, JR.; et al**. 17a. ed. Elsevier, p. 183-207, 2005.
- 34-CLARK, L. D.; CLARK, R. K.; HEBER-KATZ, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. **Clin Immunol Immunopathol**, 88, n. 1, p. 35-45, 1998.
- 35-CLARK, R. A. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. **J Am Acad Dermatol**, 13, n. 5 Pt 1, p. 701-725, 1985.
- 36-RAJNOCH, C.; FERGUSON, S.; METCALFE, A. D.; HERRICK, S. E.; *et al*. Regeneration of the ear after wounding in different mouse strains is dependent on the severity of wound trauma. **Dev Dyn**, 226, n. 2, p. 388-397, 2003.
- 37-EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci Transl Med**, 6, n. 265, p. 265-266, 2014.
- 38-HU, M. S.; MAAN, Z. N.; WU, J. C.; RENNERT, R. C.; *et al*. Tissue engineering and regenerative repair in wound healing. **Ann Biomed Eng**, 42, n. 7, p. 1494-1507, 2014.
- 39-HOSGOOD, G. Biologia da cicatrização de feridas. Livro Manual de Feridas em cães e gatos – WILLIAMS J.; MOORE A. Roca – 2 ed – 2013. In: **Manual de Feridas em cães e gatos**, 2 ed., Roca, 2013.
- 40-REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur. Surg. Res.** v.49, p.35-43, 2012.

- 41-BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**, 16, n. 5, p. 585-601, 2008.
- 42-TSAI, T. C.; HANTASH, B. M. Cosmeceuticals agents: a comprehensive review of the literature. **Clin Med: Dermatol**, 1, p. 1-20, 2008.
- 43-SCHREML, S.; SZEIMIES, R. M.; PRANTL, L.; LANDTHALER, M. *et al.* Wound healing in the 21st century. **J Am Acad Dermatol**, 63, n. 5, p. 866-881, 2010.
- 44-VIDINSK, B.; GÁL, P.; TOPORCER, T.; LONGAUER, F.; *et al.* Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats wound healing. **Acta Vet Bras**, v. 75, p. 197-202, 2006.
- 45-MAXSON, S.; LOPEZ, E. A.; YOO, D.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; *et al.* Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem Cells Transl Med**, 1, n. 2, p. 142-149, 2012.
- 46-HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. **Rev Bras de Ciênc Farm**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.
- 47-HARTLAPP, I.; ABE, R.; SAEED, R. W.; PENG, T.; *et al.* Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB J**, 15, n. 12, p. 2215-2224, 2001.
- 48-OLIVEIRA, I. V. D. R. V.; DIAS, R. V. C. Cicatrizes de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Vet Bras**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.
- 49-VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair Regen**, 21, n. 3, p. 382-394, 2013.
- 50-DARBY, I. A.; LAVERDET, B.; BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, 7, p. 301-311, 2014.
- 51-TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 3, n. 5, p. 349-363, 2002.
- 52-PORTER, S. The role of the fibroblast in wound contraction and healing. **Wounds UK**; 3, p. 33 – 40, 2007.
- 53-CHENG, W.; YAN-HUA, R.; FANG-GANG, N.; GUO-AN, Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. **Afr J Biotechnol**, v. 10, n. 13, p. 2524–9, 2011.
- 54-WANG, L.; HU, L.; ZHOU, X.; XIONG, Z.; *et al.* Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 13321, 2017.

- 55-RIPPKE, F.; SCHREINER, V.; SCHWANITZ, H. J. The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. **Am J Clin Dermatol**, 3, n. 4, p. 261-272, 2002.
- 56-CALEY, M. P.; MARTINS, V. L. C. EDEL; O'TOOLE, A. Metalloproteinases and Wound Healing. **Adv Wound Care**, p. 225-234, 2015.
- 57-MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing an overview. **Clin Plast Surg**, 30, n. 1, p. 1-12, 2003.
- 58-ITO, M.; COTSARELIS, G. Is the hair follicle necessary for normal wound healing? **J Invest Dermatol**, 128, n. 5, p. 1059-1061, 2008.
- 59-MURPHY, C. M.; O'BRIEN, F. J.; LITTLE, D. G.; SCHINDELER, A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. **Eur Cell Mater**, 26, p. 120-132, 2013.
- 60- ARK, B. S.; JANG, K. A.; SUNG, J. H.; PARK, J. S.; *et al.* Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. **Dermatol Surg**, 34, n. 10, p. 1323-1326, 2008.
- 61-ZHU, X.; SHI, W.; TAI, W.; LIU, F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Res**, 350, n. 2, p. 277-287, 2012.
- 62-ECKFELDT, C. E.; MENDENHALL, E. M.; VERFAILLIE, C. M. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6, n. 9, p. 726-737, 2005.
- 63-CARVALHO, A. C. C. D.; GOLDENBERG, R. C. D. S. **Células-tronco mesenquimais - Conceitos, métodos de obtenção e aplicações**, 1^a ed, ed Atheneu, p. 208. 54, 2012.
- 64-FEYEN, D. A. M.; GAETANI, R.; DOEVENDANS, P. A.; SLUIJTER, J. P. G. Stem cell-based therapy: Improving myocardial cell delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, 106, n. Pt A, p. 104-115, 2016.
- 65-AMORIN, B., VALIM, V, S., LEMOS, N. E., MORAES JR, L.; *et al.* Mesenchymal stem cells – characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications. **Rev HCPA**, v. 32, n. 1, p. 71–81, 2012.
- 66-LARREA, C. L.; VÁZQUEZ, A. L.; ÁLVAREZ, B. S. **Stem Cell Transplantation**, 1 ed, Texas: springer, p. 339, 2012.
- 67-MEIRELLES, L. DA S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, p. 2204–2213, 2006.
- 68-GOMES, R. S. Perspectivas do uso de células-tronco em Cirurgia Plástica. **Rev Bras Cir Plást**, v. 26, n. 1, p. 151-159, 2011.

- 69-GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; *et al.* A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 20, n. 3, p. 270-278, 2005.
- 70-KATAOKA, K.; MEDINA, R. J.; KAGEYAMA, T.; MIYAZAKI, M.; *et al.* Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. **Am J Pathol**, 163, n. 4, p. 1227-1231, 2003.
- 71-BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int J Biochem Cell Biol**, 36, n. 4, p. 568-584, 2004.
- 72-WU, Y.; WANG, J.; SCOTT, P. G.; TREDGET, E. E. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. **Wound Repair Regen**, 15 Suppl 1, p. S18-26, 2007.
- 73-VERSTAPPEN, J.; KATSAROS, C.; TORENSMA, R.; VON DEN HOFF, J. W. A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. **Wound Repair Regen**, 17, n. 3, p. 296-305, 2009.
- 74-REHEN, S.; PAULSEN, B. **Células-tronco: o que são? Para que servem?** Rio de Janeiro: VIEIRA, LENT, p. 90, 2007.
- 75-ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100 Suppl 1, p. 11830-11835, 2003.
- 76-FUCHS, E. Skin stem cells: rising to the surface. **J Cell Biol**, 180, n. 2, p. 273-284, 2008.
- 77-WANG, Y.; LIU, Z. Y.; ZHAO, Q.; SUN, T. Z.; *et al.* Future application of hair follicle stem cells: capable in differentiation into sweat gland cells. **Chin Med J (Engl)**, 126, n. 18, p. 3545-3552, 2013.
- 78-SASAKI, M.; ABE, R.; FUJITA, Y.; ANDO, S.; *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **J Immunol**, 180, n. 4, p. 2581-2587, 2008.
- 79-SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Res Ther**, 1, n. 4, p. 30, 2010.
- 80-WU, Y.; ZHAO, R. C.; TREDGET, E. E. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. **Stem Cells**, 28, n. 5, p. 905-915, 2010.
- 81-MCFARLIN, K.; GAO, X.; LIU, Y. B.; DULCHAVSKY, D. S.; *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair Regen**, 14, n. 4, p. 471-478, 2006.
- 82-BROWER, J.; BLUMBERG, S.; CARROLL, E.; PASTAR, I.; *et al.* Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds. **Adv Skin Wound Care**, 24, n. 11, p. 524-532; quiz 533-524, 2011.

- 83-FALANGA, V.; IWAMOTO, S.; CHARTIER, M.; YUFIT, T.; *et al.* Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. **Tissue Eng**, 13, n. 6, p. 1299-1312, 2007.
- 84-WU, Y.; CHEN, L.; SCOTT, P. G.; TREDGET, E. E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, 25, n. 10, p. 2648-2659, 2007.
- 85-HANSON, S. E.; BENTZ, M. L.; HEMATTI, P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. **Plast Reconstr Surg**, 125, n. 2, p. 510-516, 2010.
- 86-LEIBACHER, J.; HENSCHLER, R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. **Stem Cell Res Ther**, 7, p. 7, 2016.
- 87-NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **Handb Exp Pharmacol**, v. 174, p. 249–282, 2006.
- 88-MOSELEY, T. A.; ZHU, M.; HEDRICK, M. H. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. **Plast Reconstr Surg**, 118, n. 3 Suppl, p. 121S-128S, 2006.
- 89-LAM, M. T.; LONGAKER, M. T. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. **J Tissue Eng Regen Med**, 6 Suppl 3, p. s80-86, 2012.
- 90-TAMAI, N.; MYOUI, A.; TOMITA, T.; NAKASE, T.; *et al.* Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. **J Biomed Mater Res**, 59, n. 1, p. 110-117, 2002.
- 91-LITWINIUK, M.; GRZELA, T. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. **Wound Repair Regen**, 22, n. 4, p. 451-456, 2014.
- 92-BINTE ATIQUE, F.; AHMED, K. T.; ASADUZZAMAN, S. M.; HASAN, K. N. Effects of gamma irradiation on bacterial microflora associated with human amniotic membrane. **Biomed Res Int**, p. 586561, 2013.
- 93-ALIÓ, J. L.; ABAD, M.; SCORSETTI, D. H. Preparation, indications and results of human amniotic membrane transplantation for ocular surface disorders. **Expert Rev Med Devices**, 2, n. 2, p. 153-160, 2005.
- 94-PAOLIN, A.; COGLIATI, E.; TROJAN, D.; GRIFFONI, C.; *et al.* Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. **Cell Tissue Bank**, 17, n. 1, p. 51-58, 2016.
- 95-AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Br J Ophthalmol**, 83, n. 4, p. 399-402, 1999a.

- 96-DUA, H. S.; GOMES, J. A.; KING, A. J.; MAHARAJAN, V. S. The amniotic membrane in ophthalmology. **Surv Ophthalmol**, 49, n. 1, p. 51-77, 2004.
- 97-SORSBY, A.; SYMONS, H. M. AMNIOTIC MEMBRANE GRAFTS IN CAUSTIC BURNS OF THE EYE: (Burns of the second degree). **Br J Ophthalmol**, 30, n. 6, p. 337-345, 1946.
- 98-KIRSNER, R. S.; SABOLINSKI, M. L.; PARSONS, N. B.; SKORNICKI, M.; *et al.* 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**, 23, n. 5, p. 737-744, 2015.
- 99-NIKNEJAD, H.; PEIROVI, H.; JORJANI, M.; AHMADIANI, A.; *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur Cell Mater**, 15, p. 88-99, 2008.
- 100-EVANGELISTA, M.; SONCINI, M.; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**, 58, n. 1, p. 33-42, 2008.
- 101-BARADARAN-RAFII, A.; AGHAYAN, H. R.; ARJMAND, B.; JAVADI, M. A. Amniotic Membrane Transplantation. **J Ophthalmic Vis**, 1, p. 58–75, 2007.
- 102-CARUSO, M.; SILINI A.; PAROLINI O. The Human Amniotic Membrane: A Tissue with Multifaceted Properties and Different Potential Clinical Applications. In **Perinatal Stem Cells**, edited by CETRULO, K. J.; CETRULO JR, C. L.; TAGHIZADEH, R. R., ed 2, p. 177–195, Wiley-Blackwell, 2013.
- 103-NIKNEJAD, H.; PAEINI-VAYGHAN, G.; TEHRANI, F. A.; KHAYAT-KHOEI, M.; *et al.* Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. **Placenta**, 34, n. 4, p. 340-345, 2013.
- 104-MALHOTRA, C.; JAIN, A. K. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. **World J Transplant**, 4, n. 2, p. 111-121, 2014.
- 105-SANGWAN, V. S.; BURMAN, S.; TEJWANI, S.; MAHESH, S. P.; *et al.* Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. **Indian J Ophthalmol**, 55, n. 4, p. 251-260, 2007.
- 106-ABRANTES, A. M., CASALTA-LOPES, J. E.; BOTELHO, M. F. Biophysical Properties of Amniotic Membrane. In **Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications**, edited by MAMEDE, A. C.; BOTELHO, M. F., 1st ed., p. 41–56, Springer Netherlands, 2015.
- 107-COLOCHO, G.; GRAHAM, W. P.; GREENE, A. E.; MATHESON, D. W.; *et al.* Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. **Arch Surg**, 109, n. 3, p. 370-373, 1974.
- 108-TALMI, Y. P.; SIGLER, L.; INGE, E.; FINKELSTEIN, Y.; *et al.* Antibacterial properties of human amniotic membranes. **Placenta**, 12, n. 3, p. 285-288, 1991.

- 109-RIAU, A. K.; BEUERMAN, R. W.; LIM, L. S.; MEHTA, J. S. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, 31, n. 2, p. 216-225, 2010.
- 110-HANUMANTHAPPA, M. B.; GOPINATHAN, S.; GURUPRASAD, R. D. Amniotic membrane dressing versus conventional dressing in lower limb varicose ulcer: a prospective comparative study. **Int J Biol Med Res**, 3, p. 1616-20, 2012.
- 111-DEL CAMPO, Z., GRIS, O. Aplicaciones de la membrana amniótica em patologia ocular. **An Oftalmol**, 10, p. 128 – 41, 2002.
- 112-TSENG, S.; ESPANA E.; KAWAKITA T.; PASCUALE A.; *et al.* How does amniotic membrane work? **Ocul. Surf**, 2, p. 177-87, 2004.
- 113-FERNG, A. S.; MARSH, K. M.; PILIKIAN, T. R.; CONNELL, A.; *et al.* Human Amniotic Membrane Promotes Antimicrobial Microenvironment in a Device-Related Infection. **J Biomedical Science and Engineering**, 9, p. 122–126, 2016.
- 114-RAVISHANKER, R.; BATH, A. S.; ROY, R. Amnion Bank-the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. **Burns**, 29, n. 4, p. 369-374, 2003.
- 115-MANUELPILLAI, U.; TCHONGUE, J.; LOURENSZ, D.; VAGHJANI, V.; *et al.* Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl₄-treated mice. **Cell Transplant**, 19, n. 9, p. 1157-1168, 2010.
- 116-AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Br J Ophthalmol**, 83, n. 4, p. 748-752, 1999b.
- 117-CAMPELO, M. B. D.; SANTOS, J. A. F.; MAIA FILHO, A. L. M.; FERREIRA, D. C. L.; *et al.* Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cir Bras**, 33, n. 2, p. 144-155, 2018.
- 118-KOIZUMI, N.; FULLWOOD, N. J.; BAIRAKTARIS, G.; INATOMI, T.; *et al.* Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 41, n. 9, p. 2506-2513, 2000.
- 119-HOPPER, R. A.; WOODHOUSE, K.; SEMPLE, J. L. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. **Ann Plast Surg**, 51, n. 6, p. 598-602, 2003.
- 120-KUO, Y. R.; WANG, C. T.; CHENG, J. T.; WANG, F. S.; *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Plast Reconstr Surg**, 128, n. 4, p. 872-880, 2011.

- 121-SANTOS, J. A. F.; DIAS, M. B.; OLIVEIRA, R. A.; *et al.* Effects of low power light therapy on the tissue repair process of chronic wound in diabetic feet. **Photomedicine Laser Surg**, v. 36, 2018.
- 122-SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. The use of animals in experimental surgery. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.
- 123-CALISTO, F. C.; CALISTO, S. L.; SOUZA, A. P.; FRANÇA, C. M.; *et al.* Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. **Acta Cir Bras**, 30, n. 3, p. 204-208, 2015.
- 124-BIEL, M. A.; KIM, T.; TRUMP, M. J. Effect of radiation therapy and Photofrin on tissue response in a rat model. **Lasers Surg Med**, 13, n. 6, p. 672-676, 1993.
- 125-BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, 97, p. 77-89, 1968.
- 126-ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed Fiocruz, p. 388, 2002.
- 127-JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, 11, n. 4, p. 447-455, 1979.
- 128-JONES, M. L.; BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. Connective Tissues and Stains. In: BANCROFT, J. D. (Org.). **Theory and Practice of Histological Techniques**. 6. ed. New York: Elsevier, p. 151–153, 2008.
- 129-CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. Cicatrização de feridas. **ABCD, Arq Bras Cir Dig**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.
- 130-RHETT J. M.; GHATNEKAR G. S.; PALATINUS J. A.; O'QUINN M.; YOST M. J.; *et al.* Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. **Trends Biotechnol**, 26, p. 173-80, 2008.
- 131-LONGO, B.; ORTH, A. F. P. S.; HUBNER, J. Z.; CARREIRO, M. M.; *et al.* The Use of Human's Acellular Amniotic Membrane to Heal Third Degree Burns in Rats. **Rev Méd Paraná**, 71, p. 24-9 2013.
- 132-YUN, I. S.; JEON, Y. R.; LEE, W. J.; LEE, J. W.; *et al.* Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study. **Dermatol Surg**, 38, n. 10, p. 1678-1688, 2012.
- 133-DUARTE, I. G. L.; DUVAL-ARAUJO, I. Amniotic membrane as a biological dressing in infected wound healing in rabbits. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 334-339, 2014.

134-HATZFELDA S.; PASQUESOONE, L.; GERMAIN, N.; *et al.* Benefits of cryopreserved human amniotic membranes in association with conventional treatments in the management of full-thickness burns. **Int Wound J.**, p. 1–11, 2019.

135-RODRIGUES, H. W. S.; MONTEIRO, B. S.; SILVA, L. S.; CARVALHO, M. A. M.; *et al.* Stereological and Morphometric Study of Type 3 Collagen Formation in the Cutaneous Wounds of Diabetic Mice Treated with Mesenchymal Stem Cells, **Acta Sci Vet**, 46, p. 1553, 2018.

136-OCHIAI, H.; KISHI, K.; KUBOTA, Y.; OKA, A.; *et al.* Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds of pigs. **Regen Ther**, vol. 7, p. 8-16, 2017.

137-LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

138-YAMAGUCHI, Y.; KUBO, T.; MURAKAMI, T.; TAKAHASHI, M.; *et al.* Bone marrow cells differentiate into wound myofibroblasts and accelerate the healing of wounds with exposed bones when combined with an occlusive dressing. **Br J Dermatol**, 152, n. 4, p. 616-622, 2005.

ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 06 de junho de 2019.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: **01288 – (emenda)**

TÍTULO DO PROJETO: *EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES ASSOCIADA A MEMBRANA AMNIÓTICA DESCELULARIZADA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS EM RATOS*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIZ CÉSAR GUARITA SOUZA

EQUIPE DE PESQUISA

ROSSANA BAGGIO SIMEONI, ALINE LURI TAKEJIMA, MILKA LIE TAKEJIMA

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA

Escola de Medicina – Medicina

VIGÊNCIA DO PROJETO	11/2018 a 11/2020	QUANTIDADE DE ANIMAIS	<i>Ver parecer original</i>
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i>	Nº SISBIO <small>(Somente animais de vida livre)</small>	<i>Não se aplica</i>
SEXO	Macho	ATIVIDADES <small>(Somente animais de vida livre)</small>	<i>Não se aplica</i>
IDADE / PESO	Adultos / 400g	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS <small>(de vida livre)</small>	<i>Não se aplica</i>
ORIGEM DO ANIMAL	Biotério USFC	LOCAL (IS) <small>(Somente animais de vida livre)</small>	<i>Não se aplica</i>

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório á CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Recomendação: Este protocolo está aprovado com a condição de que o experimento ocorra somente nas datas estipuladas na autorização da Técnica Operatória.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

Coordenador - CEUA PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

ANEXO 2



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 24 de junho de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01238 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: REPARAÇÃO TRAQUEAL DE COELHOS COM MATRIZ ACELULAR CULTIVADAS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE 15-DEOXY-12, 14 PROSTAGLANDINAJ2

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DE TRAQUEOSTOMIAS EM COELHOS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIZ CÉZAR GUARITA SOUZA

EQUIPE DE PESQUISA

ANNA FLÁVIA RIBEIRO DOS SANTOS, FLAVIA LUCENA

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina

VIGÊNCIA DO PROJETO	06/2018 A 12/2018	QUANTIDADE DE ANIMAIS	20
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Nº SISBIO <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica
SEXO	F	ATIVIDADES <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica
IDADE / PESO	Adulto / 3,0 a 3,6 kg	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS <small>(de vida livre)</small>	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	FEGA PUCPR	LOCAL (IS) <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi APROVADO pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

ANEXO 3

1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido; ele informa a você os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Eu Márcia Cristina Aparecida da Silva RG nº 081.570.869-69 estou sendo convidada a participar de um estudo denominado "Reparação traqueal de coelhos com matriz acelular associada a nanopartículas de 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J2".

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso eu aceite participar desta pesquisa, doarei a minha placenta após o nascimento da minha criança assim como responderei a um questionário médico, se necessário.

Entendo que a placenta é um órgão da gestação e que após o término do parto sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não havendo prejuízo para a mãe e nem para o meu (minha) filho (a) recém-nascido (a).

Entendo que a placenta será utilizada para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dr. Luiz César Guarná Souza e a Mestranda em Ciências da Saúde Anna Flávia Ribeiro dos Santos com quem poderei manter contacto pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientada quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeita com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Assinatura da doadora da placenta

Pesquisador Responsável

Tel. (41)

Mestrando em Ciências da Saúde - PUCPR

Tel. (41) 996859499

Curitiba 14 de novembro de 2018.

1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido, ele informa a você os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Eu Carolina Freire Damalho, RG nº 12.226.429 estou sendo convidada a participar de um estudo denominado "Reparação traqueal de coelhos com matriz acelular associada a nanopartículas de 15-deoxy- Δ 12, 14 prostaglandina J2".

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso eu aceite participar desta pesquisa, doarei a minha placenta após o nascimento da minha criança assim como responderei a um questionário médico, se necessário.

Entendo que a placenta é um órgão da gestação e que após o término do parto sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não havendo prejuízo para a mãe e nem para o meu (minha) filho (a) recém-nascido (a).

Entendo que a placenta será utilizada para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

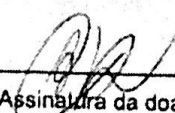
Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dr. Luiz César Guanta Souza e a Mestranda em Ciências da Saúde Anna Flávia Ribeiro dos Santos com quem poderei manter contacto pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientada quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeita com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.


Assinatura da doadora da placenta

Pesquisador Responsável

Tel: (41)

Mestrando em Ciências da Saúde - PUCPR

Tel: (41) 996859499

Curitiba 27 de setembro de 2018.

ANEXO 4

Ficha/Prontuário

Nº: _____

DATA DA CIRURGIA: __ / __ / __ .

PRÉ-OPERATÓRIO:

PESO: _____Kg.

PER-OPERATÓRIO:

INÍCIO: Anestesia: __ : __ hs. Cirurgia: __ : __ hs.

TÉRMINO: Anestesia: __ : __ hs. Cirurgia: __ : __ hs.

ANESTÉSICOS, ANALGÉSICOS E ANTIBIÓTICOS:

KETAMINA: _____mg(20mg/Kg-IM) XILAZINA: _____mg (1,0mg/Kg - IM)

COMPLICAÇÕES (hemorragia, óbito, etc.):

RECUPERAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA: (acordado, responsivo e deambulando sem sinais de torpor)

FINAL DA ANESTESIA: __ : __ hs.

FINAL DA RECUPERAÇÃO: __ : __ hs.

PÓS-OPERATÓRIO:

Comportamentos	Sim	Não
Vocalização	()	()
Perda de peso	()	()
Hipotermia	()	()
Alterações nas fezes e urina	()	()
Ato de lambar-se (falta de higiene pessoal)	()	()
Recusa em se movimentar	()	()
Automutilação	()	()

PO	DATA	HORA	ATIVO (S / N)	HIDRATAÇÃO (S / N)	ALIMENTAÇÃO (S / N)	INFECCÇÃO (S / N)	ANALGESIA (S / N)
1º							
2º							
3º							
4º							
5º							
6º							
7º							
8º							
9º							
10º							
11º							
12º							
13º							
14º							
15º							
16º							
17º							
18º							
19º							
20º							
21º							

22º							
23º							
24º							
25º							
26º							
27º							
28º							
29º							
30º							

*ATIVIDADE: movimenta-se bem ao estímulo verbal ou tátil.

* HIDRATAÇÃO: perda de brilho dos olhos e letargia.

* ALIMENTAÇÃO: ingesta de toda a ração oferecida diariamente.

*INFECÇÃO: calor, rubor, tumor e secreção.

* ANALGESIA: Dipirona SC

EUTANÁSIA:

DATA: __ / __ / __. HORA: __ : __ hs.

PESO: ____ kg. FENOBARBITAL: ____ mg(100mg/Kg - IM)

RETIRADA DA PEÇA: INÍCIO: __ : __ hs.

TÉRMINO: __ : __ hs.

EXCLUSÃO DO TRABALHO:

SIM.

NÃO.

DATA: __ / __ / __.

MOTIVO: