

# Estabelecimento de protocolo de glicerolação de membranas amnióticas para uso como curativo biológico

## *Establishing protocol glicerolação of amniotic membranes for use as a biological dressing*

André Oliveira Paggiaro<sup>1</sup>, Mônica Beatriz Mathor<sup>2</sup>, Viviane Fernandes de Carvalho<sup>3</sup>, Eugenio Pólo<sup>4</sup>, Marisa Roma Herson<sup>5</sup>, Marcus Castro Ferreira<sup>6</sup>

### RESUMO

**Introdução:** Pesquisadores têm procurado explorar várias alternativas terapêuticas (substitutos dérmicos), biológicas ou sintéticas, capazes de assegurar condições ideais ao leito da ferida que favoreça o processo de cicatrização. Uma opção de substituto dérmico menos oneroso é o uso de membranas amnióticas. Os curativos constituídos de âmnion formam uma barreira protetora contra as bactérias ambientais, aceleram a reepitelização das lesões e diminuem a dor local. **Objetivo:** Estabelecer protocolo de processamento de membranas amnióticas em altas concentrações de glicerol. **Método:** Foram obtidas três amostras de membranas amnióticas, que preenchiam os critérios de inclusão e que a gestantes concordaram em ceder o material para pesquisa. **Resultados:** Os exames de cultura do material no momento da captação demonstraram ausência de crescimento bacteriano ou de fungos. As sorologias das pacientes foram todas negativas. **Conclusão:** Neste trabalho, buscamos estabelecer um protocolo de conservação de membranas amnióticas baseado na glicerolação, pois se trata de um método de baixo custo, relativamente simples e de fácil estocagem do material. Este método apresenta como desvantagem a sua alta toxicidade celular, resultando em destruição das células do tecido, porém preserva a integridade estrutural tecidual, conforme demonstrado nos resultados macroscópicos e microscópicos obtidos neste estudo.

**DESCRITORES:** Queimaduras. Curativos biológicos. Pesquisa.

### ABSTRACT

**Introduction:** Researchers have attempted to explore various alternative therapies (dermal substitutes), biological or synthetic, capable of providing ideal conditions to the wound bed to promote the healing process. An option of dermal substitute less costly is the use of amniotic membranes. Dressings consist of amnion forms a protective barrier against environmental bacteria, accelerate reepithelialization of lesions and reduce local pain. **Objective:** To establish protocol processing of membranes in high concentrations of glycerol. **Methods:** Three samples were obtained from amniotic membranes who met the inclusion criteria and that the women agreed to donate the material for research. **Results:** The examinations of material culture at the time of capture showed no bacterial or fungal growth. The serology of the patients was all negative. **Conclusion:** In this study, we establish a protocol for the conservation of membranes based on glycerol because it is a low-cost, relatively simple and easy storage of the material. This method presents the disadvantage of its high cell toxicity, resulting in destruction of tissue cells, but preserves the structural integrity of tissue as shown in the microscopic and macroscopic results of this study.

**KEYWORDS:** Burns. Biological dressings. Research.

1. Médico Assistente da Unidade de Queimaduras da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (HC-FMUSP), SP, Brasil.
2. Doutora em Tecnologia Nuclear Básica pela Universidade de São Paulo; Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN), São Paulo, SP, Brasil.
3. Doutora em Ciências da Saúde pela Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil.
4. Enfermeiro do Banco de Tecidos da Divisão de Cirurgia Plástica do HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brasil.
5. Médica; Doutora em Clínica Cirúrgica pela FMUSP, São Paulo, SP, Brasil.
6. Médico; Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, São Paulo, SP, Brasil.

**Correspondência:** André Oliveira Paggiaro

Av. Dr. Arnaldo, 455 – sala 1363 – São Paulo, SP, Brasil – CEP: 01246-903

E-mail: andrepaggiaro@yahoo.com.br

Artigo recebido: 11/7/2012 • Artigo aceito: 1/9/2012

O objetivo primário do tratamento do grande queimado é eliminar o tecido desvitalizado e cobrir prontamente a ferida, buscando evitar complicações sépticas, metabólicas e funcionais que uma lesão colonizada e aberta pode acarretar<sup>1</sup>. Em áreas de queimaduras de 2º grau superficial ou profunda, procuramos, ainda, proporcionar condições locais ideais para a ocorrência eficiente dos fenômenos da cicatrização e de reepitelização espontânea no menor prazo de tempo. Evitando, assim, contaminações bacterianas excessivas ou depósitos exagerados de matriz extracelular, que podem resultar em sequelas funcionais e estéticas tardias<sup>2</sup>.

Na medida em que se consolidam os conceitos de microambiente da ferida e da sua interação com os materiais de curativo, os pesquisadores têm procurado explorar várias alternativas terapêuticas (substitutos dérmicos), biológicas ou sintéticas, capazes de assegurar condições ideais ao leito da ferida que favoreçam aos processos de cicatrização e reepitelização. No entanto, apesar da grande variedade de materiais existentes no mercado, a maior parte deles não está disponível em nosso país, exigindo sua importação, com elevado custo para o sistema de saúde pública<sup>3</sup>.

Uma opção de substituto dérmico menos oneroso é o uso de membranas amnióticas. Os curativos constituídos de âmnion formam uma barreira protetora contra as bactérias ambientais, aceleram a reepitelização das lesões e diminuem a dor local, por proteger as terminações nervosas e reduzir a inflamação local<sup>3-6</sup>. O uso de membranas amnióticas frescas ou processadas para curativo biológico tem sido consagrado na literatura internacional pelos inúmeros trabalhos publicados nas últimas décadas.

Rejzek et al.<sup>7</sup> utilizaram a membrana em 50 pacientes, em sua maioria com queimaduras de segundo grau, sendo que os curativos eram removidos em 15 dias, não necessitando de outros cuidados; nesse estudo, os autores relataram menor formação de cicatrizes em relação ao tratamento com curativos convencionais. Ravishanker et al.<sup>8</sup> observaram restauração em feridas superficiais em todos os 61 casos estudados, ocorridos entre 7 a 10 dias.

O desenvolvimento de técnicas para o processamento de membranas amnióticas em território nacional poderia consolidar mais uma opção de tratamento ao paciente queimado. Entre os possíveis métodos de preservação de material biológico, o uso do glicerol em altas concentrações (> 85%) pode ser considerado como bastante atrativo aos Bancos de Tecidos, pois apresenta custo reduzido, torna os materiais biológicos menos antigênicos ao tornar as células não viáveis, apresenta efeito antibacteriano e antiviral e permite a conservação dos tecidos por até 5 anos a -4°C.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolo de processamento de membranas amnióticas em altas concentrações de glicerol (>85%) no Banco de Tecidos do Instituto Central do

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BT-ICHCFMUSP), com o uso de esterilização terminal (irradiação) quando necessário, assegurando sua qualidade para uso clínico.

## MÉTODO

O projeto teve aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

### Origem das membranas

As membranas foram provenientes de doações voluntárias de três gestantes jovens (20-35 anos), com gestações sem intercorrências, pós-partos cesárea com produtos normais, sem antecedentes médico-sociais que precluam essa doação e confirmadas como sorologicamente negativas após duas baterias de exames (no caso de HIV, hepatite B e C) para contato com HIV, hepatite B e C, HTLV e doença de Chagas.

### Método de preparo das membranas

Após coleta estéril e separação do córion, as membranas amnióticas foram transportadas ao Banco de Tecido (BT-ICHCFMUSP). A partir desse momento, todo o manuseio ocorreu dentro da proteção do fluxo laminar. Após sua higiene e coleta de amostras para provas microbiológicas, foram colocadas em solução salina com antibióticos (penicilina cristalina - 1.000.000 U/L e sulfato de estreptomicina - 1g/L), entre 6 a 12 horas, a 4°C. Em seguida, após a remoção de resíduos remanescentes, as membranas foram expostas a solução de glicerol >85% com antibióticos e sob movimentação a 37°C, durante duas horas. Transcorrido esse intervalo de tempo, as membranas foram colocadas em solução fresca de glicerol >85%, abertas, apostas a papel de filtro e recortadas no formato desejado. Após amostragem do material para análise microbiológica (bactérias aeróbicas/anaeróbicas Gram +, Gram - e fungos), as membranas foram embaladas em material validado para essa finalidade e conservadas em 4°C. Metade de cada uma dessas membranas foi enviada ao Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN) e submetida à esterilização terminal por irradiação a 25 kGy por duas diferentes metodologias: aceleração de elétrons e radiação gama do Cobalto 60. Depois disso, as membranas foram reidratadas em soro fisiológico por 30 minutos, para observar se elas retomavam suas características biomecânicas iniciais.

### Análise macroscópica e histológica das membranas

As membranas amnióticas foram divididas em três grupos:

- I) gliceroladas e não irradiadas;
- II) gliceroladas e irradiadas a 25 kGy em acelerador de elétrons;
- III) gliceroladas e irradiadas a 25 kGy em cobalto 60.

Amostras de membranas dos três grupos foram reidratadas e avaliadas macroscopicamente quanto a suas características físicas, após os diferentes tipos de processamento que foram submetidas.

Foram também enviadas amostras para inclusão em parafina, cortes e coloração com hematoxilina-eosina (HE) para análise em microscopia óptica.

## RESULTADOS

### Obtenção das membranas

Foram obtidas três amostras de membranas amnióticas, que preenchiam os critérios de inclusão e que as gestantes concordaram em ceder o material para pesquisa. Os exames de cultura do material no momento da captação demonstravam ausência de crescimento bacteriano ou de fungos. As sorologias das pacientes eram todas negativas.

### Processamento das membranas amnióticas (glicerolação)

As três membranas amnióticas foram submetidas com sucesso ao processo de glicerolação, sendo estocadas a 4°C até que todos os resultados de cultura e sorologia se confirmassem negativos. Depois disto, foram divididas em três grupos, sendo que dois deles foram enviados ao IPEN para irradiação em acelerador e o outro em Cobalto 60.

### Análise macroscópica e histológica das membranas

Em todos os três grupos, quando ainda conservadas em glicerol, as membranas amnióticas possuíam aspecto inelástico e brilhante (Figura 1). Uma vez removido o glicerol pela exposição em solução salina por 30 minutos, ocorreu o retorno da opacidade e da maior elasticidade do tecido, nos três grupos (Figura 2).

Apesar do retorno da opacidade e da elasticidade nos três grupos, isto não ocorreu igualmente entre eles. Pudemos reparar que as membranas não irradiadas preservam muito mais as características mecânicas do tecido, sendo mais resistente à tração, mais fáceis de serem manipuladas e esticadas e com coloração mais semelhante ao tecido fresco. Enquanto isso, as amostras irradiadas tanto por acelerador como Cobalto 60 geram membranas com alterações significativas de sua resistência mecânica, pois acabam por romper com mais facilidade. Além disso, apresentam coloração mais acastanhada e são extremamente difíceis de serem manipuladas e esticadas.

Pode-se ainda perceber que um dos lados da membrana é mais brilhante que o outro. O lado de maior brilho é aquele em que se encontra o epitélio do tecido. Isto deve ser informado ao usuário no momento do transplante, para que o tecido seja posicionado corretamente sobre a ferida, ou seja, com o epitélio voltado para cima.

### Análise histológica

Na análise histológica, pudemos perceber que a membrana sem irradiação apresenta células epiteliais mais intactas com estrutura preservada e as lâminas conjuntivas sem vacuolização e com pouca delaminação (Figura 3A). Em contrapartida, as membranas irradiadas apresentam células epiteliais mais deterioradas, com pequenas extensões de membrana se soltando em áreas apicais e tecido conjuntivo com delaminações mais perceptíveis (Figura 3B e C).



Figura 1 – Amnion glicerolado.



Figura 2 – Amnion após reidratação



Figura 3 – A: sem irradiação; B: acelerador; C: Cobalto 60.

## DISCUSSÃO

A membrana amniótica é histologicamente muito similar à pele, uma vez que é originada do ectoderma embrionário, sendo um análogo à pele do embrião<sup>9</sup>. Assim, apresenta muitas das características da pele humana, podendo funcionar como barreira contra a invasão bacteriana, reduzir a perda de fluidos corpóreos e proteínas, aportar fatores de crescimento e moduladores da cicatrização; enfim, restabelecer as condições ideais para que os processos de cicatrização progridam satisfatoriamente<sup>3</sup>.

A invasão bacteriana é um obstáculo importante para o processo de restauração, ao aumentar o processo inflamatório local<sup>10</sup>. Os curativos de membrana amniótica formam uma barreira protetora contra as bactérias ambientais. O efeito antimicrobiano parece ocorrer devido ao contato íntimo da membrana com a ferida, promovendo uma inibição bacteriana por contato<sup>11</sup>; ou, ainda, a restauração da microcirculação local permitiria um turn-over acentuado de fagócitos e de fatores bacteriostáticos séricos<sup>5</sup>.

Um efeito importante e frequentemente relatado com o uso de membranas amnióticas é sua capacidade em acelerar a reepitelização das feridas<sup>12</sup>. As células do âmnio produzem e liberam diversos fatores de crescimento: fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador, fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento do hepatócito, fator de crescimento neural e fator de crescimento vascular endotelial. Todos esses fatores foram apontados como a causa da influência positiva da membrana amniótica sobre a proliferação epitelial<sup>9</sup>, mesmo que as células do âmnio sejam destruídas em vários protocolos de conservação<sup>8</sup>.

Ao proteger as terminações nervosas, prevenir a invasão bacteriana, diminuir a inflamação local, manter a hidratação local ideal e, principalmente, reduzir o número de trocas do curativo, o âmnio é capaz de promover uma ferida menos dolorosa<sup>14</sup>. Considerando-se que a incidência de queimaduras na infância é alta, esse pode ser um argumento importante para sua eleição como curativos em crianças. Ravishanker et al.<sup>8</sup> relataram que as crianças se acalmavam logo após a aplicação da membrana e os adultos afirmavam que o alívio era muito significativo comparado com os curativos convencionais, com os quais 80% de seus pacientes queixavam-se de dor e desconforto.

Apesar dessas vantagens, sua principal desvantagem reside no fato de ser um material biológico, de origem humana. Consequentemente, pode ser um veículo potencial de doenças infecto-contagiosas. Para reduzir ao grau mínimo o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas através das membranas, é rotineiramente realizada a triagem das doadoras seguindo-se protocolos internacionalmente reconhecidos. Esses protocolos incluem a investigação de fatores de risco, determinados através do histórico médico-social e da realização de testes sorológicos que afastem o risco de HIV, hepatites B e C, HTLV, sífilis e, em nosso meio, doença de Chagas. Os exames sorológicos para a detecção de HIV e hepatite B e C são repetidos novamente transcorridos seis meses da doação, com o intuito de eliminar janelas de risco biológico.

Ainda, são aceitas membranas fetais apenas de partos cesárea, de parturientes sem histórico de doenças ginecológicas (ex: endometrite ou doença inflamatória pélvica, endometriose, etc), alterações patológicas na gestação (exemplo: ruptura prematura da bolsa, toxemia, sinais de sofrimento fetal, mecônio, etc) ou suspeita e sinais de malformação congênita do concepto. As membranas são testadas, ainda, quanto a possíveis contaminações bacterianas e fúngicas, sendo que fazem parte dos protocolos de conservação, a

adição de medidas bactericidas e bacteriostáticas, tais como banhos em agentes antissépticos.

Sabe-se que alguns tipos de processamento dos tecidos podem gerar exposição a agentes virucidas e bactericidas, reduzindo o risco de transmissão de agentes infecciosos. Em seu estudo, Van Baare et al.<sup>13</sup> observaram que a conservação de pele em glicerol 70% ou 85% é capaz de inativar o HIV-1 intra e extracelular.

A glicerolização foi descrita pela primeira vez por Basile<sup>14</sup>, em 1982, para preservação de pele de porco. O glicerol desidrata a pele, removendo o fluido intracelular. Porém, ele não altera a concentração de íons das células, mantendo, dessa forma, a integridade estrutural do tecido e servindo como um método de preservação. Após reidratação em soro fisiológico, o tecido recupera sua plabilidade<sup>7</sup>.

Neste trabalho, buscamos estabelecer um protocolo de conservação de membranas amnióticas baseado na glicerolização, pois se trata de um método de baixo custo, relativamente simples e de fácil estocagem do material. Apresenta como desvantagem a sua alta toxicidade celular, resultando em destruição das células do tecido; porém, preserva a integridade estrutural tecidual conforme demonstrado em nossos resultados macroscópicos e microscópicos.

Como resultado de sua citotoxicidade, o glicerol em altas concentrações provoca um efeito benéfico, pois apesar de ser considerado um clássico método de preservação, ele acarreta também a destruição de vírus e bactérias, ocasionando um efeito sinérgico esterilizante do material. Gajiwala & Gajiwala<sup>4</sup> utilizaram, como método de preservação, a exposição ao glicerol 85% e armazenamento a 4°C, relatando a ausência de crescimento bacteriano por mais de um ano.

Apesar desse efeito "esterilizante", a maior parte dos Bancos de Tecido do mundo só considera o tecido completamente estéril quando submetido a um processo complementar de esterilização. Atualmente, o mais consagrado na literatura é a radioesterilização, que pode ser realizada por dois mecanismos principais: o acelerador de elétrons e as fontes de Cobalto 60. Em nossos estudos, submetemos amostras de âmnions gliceroladas a essas duas fontes de energia, não sendo encontradas diferenças significativas entre os dois, tanto macro como microscopicamente. Porém, quando se compara o tecido não irradiado com o irradiado, percebem-se diferenças claras entre os tecidos.

O material não irradiado apresenta um epitélio e estruturas do tecido conjuntivo mais intactas quando comparados ao irradiado. Essas alterações estruturais podem gerar resultados clínicos menos favoráveis, entretanto, o tecido transplantado oferece muito maior segurança ao indivíduo receptor. Dessa forma, o Banco de Tecidos deve levar em consideração todas essas informações para indicar o uso de radioesterilização complementar. Em nosso caso, indicamos só para aqueles materiais comprovadamente contaminados com bactérias gram positivas, que podem ser eliminadas pela irradiação.

Enquanto isso, para as bactéria gram negativas contraindica-se a radioesterilização, pelo risco da liberação de fatores pirogênicos.

O estabelecimento de um protocolo de processamento de membranas amnióticas em um Banco de Tecidos é fundamental para que este possa fornecer um tecido com rigoroso controle de qualidade, garantindo a menor possibilidade de riscos ao usuário. Em um país como o nosso, com extremas dificuldades financeiras para sustentabilidade da saúde pública, o uso das membranas amnióticas gliceroladas surge como um promissor método de substituto cutâneo de baixo custo e alta disponibilidade para o tratamento de pacientes queimados.

## REFERÊNCIAS

1. Quinby WC Jr, Hoover HC, Scheffan M, Walters PT, Slavin SA, Bondoc CC. Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care. *Plast Reconstr Surg*. 1982;70(6):711-7.
2. Yanaga H, Udoh Y, Yamauchi T, Yamamoto M, Kiyokawa K, Inoue Y, et al. Cryopreserved cultured epidermal allografts achieved early closure of wounds and reduced scar formation in deep partial-thickness burn wounds (DDB) and split-thickness skin donor sites of pediatric patients. *Burns*. 2001;27(7):689-98.
3. Gajiwala K, Gajiwala AL. Use of banked tissue in plastic surgery. *Cell Tissue Bank*. 2003;4(2-4):141-6.
4. Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank*. 2004;5(2):73-80.
5. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns*. 1999;25(7):625-35.
6. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns*. 1995;21(5):356-61.
7. Rejzek A, Weyer F, Eichberger R, Gebhart W. Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute. Light and electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank*. 2001;2(2):95-102.
8. Ravishanker R, Bath AS, Roy R. "Amnion bank": the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns*. 2003;29(4):369-74.
9. Bankiewicz KS, Palmatier M, Plunkett RJ, Cummins A, Oldfield EH. Reversal of hemiparkinsonian syndrome in nonhuman primates by amnion implantation into caudate nucleus. *J Neurosurg*. 1994;81(6):869-76.
10. Bose B. Burn wound dressing with human amniotic membrane. *Ann R Coll Surg Engl*. 1979;61(6):444-7.
11. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*. 1991;12(3):285-8.
12. Ward DJ, Bennett JP, Burgos H, Fabre J. The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion. *Br J Plast Surg*. 1989;42(4):463-7.
13. van Baare J, Cameron PU, Vardaxis N, Pagnon J, Reece J, Middelkoop E, et al. The 1998 Lindberg Award. Comparison of glycerol preservation with cryopreservation methods on HIV-1 inactivation. *J Burn Care Rehabil*. 1998;19(6):494-500.
14. Basile AR. A comparative study of glycerinized and lyophilized porcine skin in dressings for third-degree burns. *Plast Reconstr Surg*. 1982;69(6):969-74.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.