

Estabelecimento de protocolo de glicerolização de membranas amnióticas para uso como curativo biológico

Establishment of amniotic membranes glycerolization protocol for use as biological dressing

André Oliveira Paggiaro¹, Mônica Beatriz Mathor², Viviane Fernandes de Carvalho³, Eugenio Pólo⁴, Marisa Roma Herson⁵, Marcus Castro Ferreira⁶

RESUMO

Introdução: Pesquisadores têm procurado explorar várias alternativas terapêuticas, biológicas ou sintéticas, capazes de assegurar condições ideais ao leito da ferida, que favoreçam o processo de cicatrização. Uma opção menos onerosa 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:** O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolo de processamento de membranas amnióticas em altas concentrações de glicerol. **Método:** Foram obtidas 3 amostras de membranas amnióticas, que preenchiam os critérios de inclusão e que as gestantes concordaram em ceder o material para pesquisa. **Resultados:** Os exames de cultura do material no momento da captação mostravam ausência de crescimento bacteriano ou de fungos. As sorologias das pacientes eram todas negativas. **Conclusão:** Nesse 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.

DESCRIPTORIOS: Queimaduras. Curativos biológicos. Projetos de pesquisa.

ABSTRACT

Background: Researchers have attempted to explore various alternative therapies, biological or synthetic, capable of providing ideal conditions to the wound bed to promote the healing process. An option 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:** The aim of this study was 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 pregnant 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 paper, we established a protocol for the conservation of membranes based on glycerol because it is a low-cost, relatively simple and easy storage of the material. Presents the disadvantage of its high cell toxicity, resulting in destruction of tissue cells, but preserves the structural integrity of tissue as shown in our results the microscopic and macroscopic.

KEY WORDS: Burns. Biological dressings. Research design.

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 (FMUSP).
2. Doutora em Tecnologia Nuclear Básica pela Universidade de São Paulo. Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Nucleares – IPEN.
3. Doutora em Ciências da Saúde pela Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP.
4. Enfermeiro do Banco de Tecidos da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP.
5. Médica, Doutora em Clínica Cirúrgica pela FMUSP.
6. Médico, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP.

Correspondência: André Oliveira Paggiaro
Laboratório de Investigação Médica (LIM 4) – Faculdade de Medicina USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 – sala 1363 – São Paulo, SP – CEP: 01246-903
E-mail: andrepaggiaro@yahoo.com.br
Recebido em: 19/1/2010 • Aceito em: 11/3/2010

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 acarretar¹. Em áreas de queimaduras de 2º grau superficial ou profundo, 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 tardias².

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 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 disponíveis no mercado, a maior parte deles não está disponível em nosso país, exigindo sua importação com elevado custo para o sistema de saúde pública³.

Uma opção menos onerosa é o uso de membranas amnióticas. Os curativos constituídos de âmion 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 local³⁻⁶. 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.⁷ utilizaram a membrana em 50 pacientes, em sua maioria com queimaduras de segundo grau, sendo que os curativos eram removidos em quinze dias, não necessitando de outros cuidados; neste estudo, os autores relataram menor formação de cicatrizes em relação ao tratamento com curativos convencionais. Ravishanker et al.⁸ 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 tecido, 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 preluam esta doação e confirmadas como sorologicamente negativas, após duas baterias de exames, 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 deste 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 uma solução de glicerol >85% com antibióticos e sob movimentação a 37°C durante duas horas. Transcorrido este 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 esta finalidade e conservadas em 4°C. Metade de cada uma destas membranas foi enviada ao IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) e submetida à esterilização terminal por irradiação à 25 kGy por 2 diferentes metodologias: aceleração de elétrons e radiação gama do cobalto 60. Depois disto, as membranas foram re-hidratadas em soro fisiológico por 30 minutos, para observar se retomavam suas características biomecânicas iniciais.

Análise macroscópica e histológica das membranas

As membranas amnióticas foram divididas em 3 grupos:

- gliceroladas e não irradiadas;
- gliceroladas e irradiadas à 25 kGy em acelerador de elétrons;
- gliceroladas e irradiadas à 25 kGy em cobalto 60.

Amostras de membranas dos 3 grupos foram re-hidratadas e avaliadas macroscopicamente quanto a suas características físicas após os diferentes tipos de processamento a 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 3 amostras de membranas amnióticas, que preenchiam os critérios de inclusão e que a 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 (glicerolização)

As três membranas amnióticas foram submetidas com sucesso ao processo de glicerolização, sendo estocadas a 4°C até que todos os resultados de cultura e sorologia se confirmassem negativos. Depois disto, foram divididas em 3 grupos, sendo que 2 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 (Figura 2) nos três grupos.

Apesar do retorno da opacidade e da elasticidade nos três grupos, isto não ocorreu igualmente entre eles. Verificamos que as membranas não irradiadas preservam muito mais as características mecânicas do tecido, sendo mais resistentes 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, podemos 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 (Figuras 3B e C).

DISCUSSÃO

A membrana amniótica é histologicamente muito similar à pele, uma vez que é originada do ectoderma embrionário, sendo um análogo à pele do embrião⁹. 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 satisfatoriamente³.

A invasão bacteriana é um obstáculo importante para o processo de restauração, ao aumentar o processo inflamatório local¹⁰. Os



Figura 1 - Amnion glicerolado.



Figura 2 - Amnion após re-hidratação.



Figura 3 - A: sem irradiação; B: acelerador; C: cobalto 60.

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 contato¹¹; ou ainda, a restauração da microcirculação local permitiria um “turn-over” acentuado de fagócitos e de fatores bacteriostáticos séricos⁵.

Um efeito importante e frequentemente relatado com o uso de membranas amnióticas é sua capacidade em acelerar a reepitelização das feridas¹². 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 estes fatores foram apontados como a causa da influência positiva da membrana amniótica sobre a proliferação epitelial⁹, mesmo que as células do âmnio sejam destruídas em vários protocolos de conservação⁸.

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 dolorosa¹⁴. Sendo que a incidência de queimaduras na infância é alta, este pode ser um argumento importante para sua eleição como curativos em crianças. Ravishanker et al.⁸ 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 onde 80% de seus pacientes queixavam-se de dor e desconforto.

Apesar destas 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 infecto-contagiosas através das membranas, é rotineiramente realizada a triagem das doadoras seguindo-se protocolos internacionalmente reconhecidos. Estes protocolos incluem a investigação de fatores de risco, determinados por meio 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 (ex: ruptura prematura da bolsa, toxemia, sinais de sofrimento fetal, mecônio, etc) ou suspeita e sinais de mal-formação congênita do concepto. As membranas são testadas ainda quanto a possíveis contaminações bacterianas e fúngicas, sendo que faz parte dos protocolos de conservação a adição de medidas bactericidas e bacteriostáticas, tais como banhos em agentes anti-sépticos.

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.¹³ 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, 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, desta forma mantendo a integridade estrutural do tecido e servindo como um método de preservação. Após re-hidratação em soro fisiológico, o tecido recupera sua pliability⁷.

Nesse 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 macro 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, acarreta também a destruição de vírus e bactérias, ocasionando um efeito sinérgico esterilizante do

material. Gajiwala et al.⁴ 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 deste 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 glicerolizadas a estas 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 intactos quando comparados ao irradiado. Estas alterações estruturais podem gerar resultados clínicos menos favoráveis, entretanto o tecido transplantado oferece muito maior segurança ao indivíduo receptor. Desta forma, o banco de tecidos deve levar em consideração todas estas 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 bactérias 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 glicerolizadas 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, Schefflan 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, Lobo Gajiwala A. 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.

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM 4) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.