

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

Recebido em 28/08/2015

Aceito para publicação em 10/09/2015

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

RESUMO

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

Palavras-chave: Cicatrização; Curativos biológicos.

INTRODUÇÃO

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

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

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

³ Biólogo. Pós-Doutorado em Biociências Nucleares pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Encarregado da Divisão de Pesquisa Clínica do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias.

⁴ Médica. Residente da Clínica de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Naval Marcílio Dias.

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCIAL TEÓRICO

Cicatrização de Feridas

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

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

A segunda fase do processo de cicatrização – Proliferativa – é caracterizada pela proliferação de fibroblastos, tipo celular dominante no local da ferida. Esta proliferação ocorre devido à angiogênese local estimulada pela perda da perfusão sanguínea quando da instalação da ferida.⁹ No tecido de granulação formado, os fibroblastos estão ativados e passam a exibir propriedades contráteis graças à expressão de α -SM (actina muscular alfa) tornando-se, então, miofibroblastos.¹⁰ Estes miofibroblastos exibem papel fundamental na contração/fechamento da ferida¹¹ e secretam componentes de matriz extracelular (MEC), tais como colágeno, glicosaminoglicanos, fibronectina, laminina e elastina, que substituem a matriz provisória formada inicialmente.¹²

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

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

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

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

Os custos com o tratamento das feridas de diversas classificações também é um importante fator a ser considerado.⁴ A venda de insumos para o tratamento de feridas em todo mundo atingiu a marca de 13 bilhões de dólares em 2013.⁶ Os recursos financeiros do paciente e/ou da unidade de saúde representam um dos aspectos a serem considerados na escolha do tratamento da ferida.¹⁷

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

Membrana Amniótica Humana (MAH)

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

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

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

Outra característica da MAH de extrema importância é a ausência de imunogenicidade, visto que uma das preocupações da medicina regenerativa é a rejeição de enxertos e curativos. Os curativos baseados em MAH não apresentam tal problema uma vez que, são descritos como implantes de natureza orgânica, inertes, compostos quase que exclusivamente por colágeno, desprovidos de leucócitos²³ e apresentam pouca ou nenhuma expressão do antígeno leucocitário humano -A, B ou DR.^{18, 24-27}

Por que usar a membrana amniótica como curativo?

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

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

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

Como já mencionado, a MAH não é uma simples membrana avascular. Ela possui atividades metabólicas, como transporte de água e de materiais solúveis, produção de fatores bioativos como peptídeos vasoativos, fatores de crescimento e citocinas.³³ Como curativo, a MAH atua como um substrato que facilita a migração celular epitelial, melhora a adesão das células epiteliais³⁴ e promove diferenciação celular.³⁵ Também atua na reparação da lesão tecidual por liberar fatores de crescimento e citocinas que atuam facilitando a migração celular e contribuindo para a aceleração do processo de granulação.³⁶⁻³⁹

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

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

Alguns autores apontam como uma solução economicamente viável para o tratamento de feridas em países em desenvolvimento.⁴⁸⁻⁴⁹

Possibilidades de uso da MAH

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

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

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

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

Normatização

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

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

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

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

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

DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

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

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

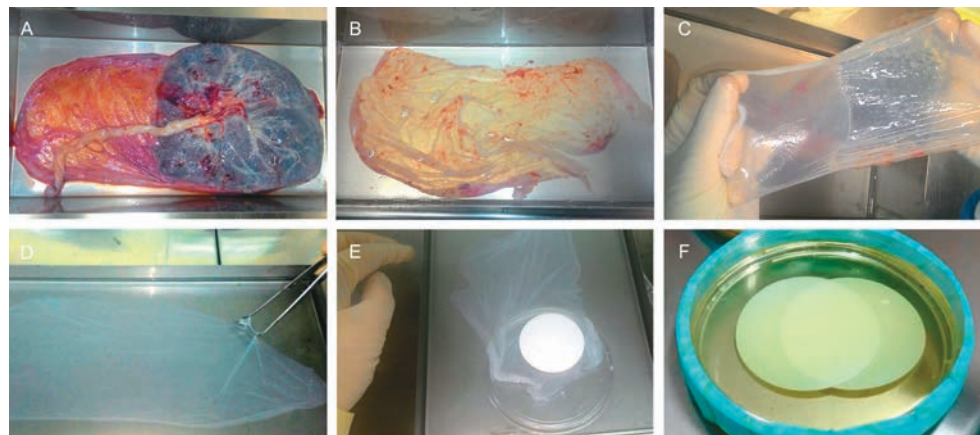
AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS

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

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



7. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.
8. Clemetson K. Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis Research*. 2012;129 (3):220-4.
9. Wietecha MS, Dipietro LA. Therapeutic approaches to the regulation of wound angiogenesis. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2(3):81-6.
10. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in woundhealing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2014;7:301-11.
11. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349-63.
12. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
13. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
14. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995;146(1):56-66.
15. Paggiaro AO, Mathor MB, Carvalho VF, Pólo E, Herson MR, Ferreira MC. Estabelecimento de protocolo de glicerolização de membranas amnióticas para uso como curativo biológico. *Rev Bras Queimaduras*. 2012;11(3):111-5.
16. Gajiwala K, Gajiwala AL. Use of banked tissue in plastic surgery. *Cell Tissue Bank*. 2003;4(2-4):141-6.
17. Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Rev Col Bras Cir*. 2008;35(3):203-6.
18. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2009;30(6):1056-65.
19. Atique BF, Ahmed KT, Asaduzzaman SM, Hasan KN. Effects of Gamma Irradiation on Bacterial Microflora Associated with Human Amniotic Membrane. *Biomed Res Int*. 2013.
20. Sangwan VS, Burman S, Tejwani S, Mahesh SP, Murthy R. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Indian J Ophthalmol*. 2007;55(4):251-60.
21. Riau AK, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-25.
22. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Engineering*. 2008;14(4):463-72.
23. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*. 1991;12(3):285-8.
24. Solomon A, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. 2001;108(3):449-60.
25. Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):1167-73.
26. Pesteil F, Drouet M, Rousanne MC, Lacroix P. Amniotic membrane: an innovative treatment of refractory vascular ulcers? *Phlebology*. 2009;16(2):259-66.
27. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:748-52.
28. Litwiniuk M, Grzela T. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. *Wound Repair Regen*. 2014;22(4):451-6.
29. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y. Antiinflammatory effect of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*. 2001;20:408-13.
30. Yatim RM, Kannan TP, Ab Hamid SS, Shamsudin SH. Effects of different processing methods of human amniotic membrane on the quality of extracted RNA. *Arch Orolfac Sci*. 2013;8(2):47-53.
31. Thomassen H, Steuhl KP, Meller D. Validation of an automatic test system for sterile testing of amniotic membranes. *Ophthalmol*. 2014;111(5):454-9.
32. Singh R, Chacharkar MP. Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. *J Tissue Viability*. 2011;20(2):49-54.
33. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ. Williams obstetrics. 21st ed. London: Slock Inc; 2001.
34. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*. 1997;124:765-74.
35. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol*. 1989;93:372-8.
36. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(1):51-77.
37. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian Alexander M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell and Mater*. 2008;15:88-99.
38. Del Campo Z, Gris O. Aplicaciones de la membrana amniótica em patología ocular. *Ann Oftal*. 2002;10:128-41.
39. Hanumanthappa MB, Gopinathan S, Guruprasad RD. Amniotic membrane dressing versus conventional dressing in lower limb varicoseulcer: a prospective comparative study. *Int J Biol Med Res*. 2012;3(2):1616-20.
40. Ravishanker R, Bath AS, Roy R. "Amnion Bank"- the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns*. 2003;29(4):369-74.
41. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns*. 1995;21(5):356-61.
42. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16(4):233-40.
43. Bennet JP, Mathews R, Faulk WP. Treatment of chronic ulceration of leg with human amnion. *Lancet*. 1980;315:1153-6.
44. Colocho G, Graham WP, Greene AE, et al. Human amniotic membranes as a physiological wound dressing. *Arch Surg*. 1974;109:370.
45. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000;19(3):348-52.



46. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981;72(8254):1003-5.
47. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16(4):233-40.
48. Alió JL, Abad M, Scorsetti DH. Preparation, indications and results of human amniotic membrane transplantation for ocular surface disorders. *Expert Rev Med Devices*. 2005;2(2):153-60.
49. Arvola R, Holopainen J. Amnion in the treatment of ocular diseases. *Duodecim*. 2015;131(11):1044-9.
50. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, Griffoni C, Grassetto A, Elbadawy HM, Ponzin D. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. *Cell Tissue Bank*. 2015 Apr/Jul.
51. Gutiérrez-Moreno S, Alsina-Gibert M, Sampietro-Colom L, Pedregosa-Fauste S, Ayala-Blanco P. Cost-benefit analysis of amniotic membrane transplantation for venous ulcers of the legs that are refractory to conventional treatment. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102(4):284-8.
52. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: burns of the second degree. *Br J Ophthalmol*. 1946;30(6):337-45.
53. Trelford JD, Trelford Sauer M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;134:833-45.
54. Kirsner RS, Sabolinski ML, Parsons NB, Skornicki M, Marston WA. Comparative effectiveness of a bioengineered living cellular construct vs. a dehydrated human amniotic membrane allograft for the treatment of diabetic foot ulcers in a real world setting. *Wound Repair Regen*. 2015 Jun.
55. Smiell JM, Treadwell T, Hahn HD, Hermans MH. Real-world experience with a decellularized dehydrated human amniotic membrane allograft. *Wounds*. 2015;27(6):158-69.
56. Pretto Neto AS, Rech DL, Martins ALM, Silveira DPM, Chem EM, Ely PB. Membrana amniótica humana: curativo biológico promissor. *Rev Bras Cir Plást*. 2013;28(supl):1-103.
57. Brasil. Decreto nº 2.268, de 30 de junho de 1997. Regulamenta a Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fim de transplante e tratamento, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 1997 jul. 01; Sec.1:13739.
58. Legislación sobre donación y trasplante de órganos, tejidos y células compilación y análisis comparado. Washington, D.C: OPS/WHO; 2013.
59. Brasil. Lei no 10.211, de 23 de março de 2001. Altera dispositivos da Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 2001 mar. 24; Sec.1:6.
60. Duarte IGL. Membrana amniótica como curativo biológico na cicatrização de feridas infectadas: estudo experimental em coelhos [dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
61. Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. São Paulo: ABTO; 2009.
62. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):93-9.
63. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-25.
64. Bellows CF, Alder A, Helton WS. Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts: present status and future opportunities. *Expert Rev Med Devices*. 2006 Set;2006;3(5):657-75.
65. Oliveira EC, Ramos G Z, Afonso VCC, Souza LB. Estudo retrospectivo da utilização do transplante de membrana amniótica em um serviço terciário de oftalmologia. *Rev Bras Oftalmol*. 2008;67(4):165-71.

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



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

Received on 8/28/2015

Accepted for publication on 9/10/2015

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

ABSTRACT

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

Keywords: *Wound healing; Biological dressings.*

INTRODUCTION

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

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

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

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

⁴ Doctor. Resident on Clínica de Ginecologia e Obstetrícia of Hospital Naval Marcílio Dias.

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

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

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

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

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

¹⁰ Bioterista the Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) of Hospital Naval Marcílio Dias e Secretário da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-HNMD).

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



Wounds can be classified according to its cause, morphology, degree of contamination, the feature of the wound bed, the characteristic of the exudate, the culture secretion, the presence of fistula, and the evolution and the type of the healing.⁴ The main types of wounds include those caused by physical, chemical, thermal and electrical agents or due to underlying diseases such as diabetic ulcers or carcinomas.⁵⁻⁶

THEORETICAL Wound Healing

Regardless of the classification, the repair of the wound must occur so that the tissue integrity and homeostasis can be guaranteed.² Under physiological conditions, this repair begins from the installation of the damage. Based on morphological changes that occur during the healing process, the wounds can be divided into three phases.⁷

During the first phase - Inflammatory phase - a provisional matrix fills the wound site and promotes the migration of various cell types to the region. Hemostasis allows the initial damage repair, triggering the formation of blood clots from the fibrin and fibronectin. Platelets release cytokines such as PDGF (platelet-derived growth factor) and TGF (transforming growth factor), which induce the recruitment of macrophages and other inflammatory cells besides inducing chemotaxis and the recruitment of fibroblasts and endothelial cells.^{1,8}

The second phase of the healing process - Proliferative phase - is characterized by the proliferation of fibroblasts, the main cell type at the wound site. This proliferation occurs due to the local angiogenesis stimulated by the loss of blood perfusion when the wound is installed.⁹ In the created granulation tissue, fibroblasts are activated and start to show contractile properties due to the α -SMA expression (alpha-smooth muscle actin) then turning into myofibroblast cells.¹⁰ These myofibroblasts have a key role in the contraction/closure of the wound¹¹ and secrete extracellular matrix components (ECM) such as collagen, glycosaminoglycans, fibronectin, laminin and elastin, replacing the provisional matrix initially created.¹²

In addition, fibroblasts also secrete TGF, FGF (fibroblast growth factor), TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) and KGF (keratinocyte growth factor), being this particular one essential to the re-epithelialization process, thus, essential to the restructuring of the epidermal functions lost in the wound.¹³

During the third phase - Regenerative phase - the events of remodeling of the granulation tissue and apoptosis of endothelial and myofibroblast cells occur.¹⁴ The synthesis of components of the extracellular matrix (ECM) is reduced and its components have the structure modified by proteolytic enzymes released in the ECM, particularly metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). Progressively, type III collagen (the main component of the granulation tissue) is replaced by type I collagen (the main structural component of the dermis), and fibrous proteins such as elastin, which were absent in the granulation tissue, are now incorporated into the new remodeled matrix.

However, in some cases, such as chronic or complicated wounds or patients with concomitant diseases, the healing process does not occur in the physiologically expected way.¹⁵ To these cases, regen-

erative medicine researchers have been looking for biological or synthetic wound dressing alternatives capable of providing proper conditions to the cicatrization and re-epithelialization of the wound.¹⁵ Nevertheless, besides the fact that most of the wound dressings available in the market are not found in Brazil, domestic products still represent a high cost to the public health system.¹⁶

The economic cost of the wound care of different classifications is also an important factor to be considered.⁴ Worldwide sale of wound healing inputs reached the mark of 13 billion dollars in 2013.⁶ The financial resources of the patient and/or the health facility represent one of the aspects to be considered when choosing the wound management.¹⁷

The search for a less expansive wound dressing with good outcomes made researchers and health professionals to turn their attention to the use of human amniotic membrane (HAM).

Human Amniotic Membrane (HAM)

HAM is the innermost layer of the fetal placenta¹⁸ ranging from 20 to 50 μ m¹⁹ in thickness and consisting of three layers: a single layer varying from columnar to cuboidal epithelial cells of ectodermal; a basement membrane consists of a network of reticulum; and finally an avascular stromal matrix divided into a compact layer, a fibroreticular layer, and a spongy layer.^{18,20} The fibroreticular layer is the thickest layer of the amniotic membrane compounded by fibroblasts resting on a reticular network.²¹ Among these layers, it worth to note that the basement membrane is morphologically similar to that found in the human skin and consists of laminin and collagen type IV, VII and XVII.²²

HAM possesses favorable characteristics in favor of its use as a biological dressing, due to the presence of different growth factors such as the already mentioned KGF, FGF, PDGF, besides EGF (epidermal growth factor) and VEGF (vascular endothelial growth factor). Among them, FGF stimulates the synthesis and storage of ECM proteins. Also, HAM has some components also presented in the ECM, such as I-VII type collagens, elastin, laminin and fibronectin.²¹

Growth factors and ECM compounds give to the HAM some characteristics, such as re-epithelialization, reduction of fibrosis, and inhibition of the pain, infection and inflammation features.²¹ The ECM formation is essential for wound healing and HAM represents an excellent tool for treating skin wounds due to the above mentioned features.

Another HAM feature of great importance is the lack of immunogenicity, once graft and dressings rejection is one of the big concerns of the regenerative medicine. HAM based dressings do not present this kind of issue since they are described as organic nature, inert implants, composed almost exclusively of collagen; devoid of leukocyte cells²³ and express little or no amount of human leukocyte A, B or DR antigens.^{18, 24-27}

Why use amniotic membrane as a wound dressing?

Historically, the use of amniotic membrane originates in the traditional Chinese Medicine. The first scientific report of its use is from 1910, when Davis used it as surgical treatment of skin burns in human patients at the Johns Hopkins Hospital.²⁸ Later, Sabella described its fresh use for treating burns and skin ulcers and noted the



reduction of pain and increased of the re-epithelialization rate.²⁹ In the second half of the twentieth century, the use of MAH gained popularity as a biological dressing in the management of skin wounds of acid ulcers and bedsores origin, among others, in addition to its use as a substitute for ocular tissues,¹⁹ thus proving to be an excellent biological support for the cell growth and migration.²⁸

Despite the advantages, the use of HAM was abandoned for years because of the risk of infection originating from natural childbirth of non serologically tested women. However, nowadays the products obtained from cesarean section can be frozen and tested serologically and also sterilized by different methods.^{26,30-32}

As already mentioned, the MAH is not just a simple avascular membrane. It has multiple metabolic functions such as water and soluble materials transport and also production of bioactive factors such as vasoactive peptides, growth factors and cytokines.³³ As a wound dressing, HAM acts as a substrate which facilitates epithelial cell migration, improves the adhesion of epithelial cells³⁴ and promotes cell differentiation.³⁵ HAM also acts on the repair of tissue damage by releasing growth factors and cytokines that act facilitating cell migration and contributing to the acceleration of the granulation process.³⁶⁻³⁹

Of particular importance is the pain of the patient during the treatment specially of complex wounds. The use of MAH reduces pain by adhering to the wound surface, covering the nerve endings, reducing bacterial contamination and thus reducing local inflammation.⁴⁰⁻⁴⁴

All these characteristics contribute to its potential occlusive wound (including irregular areas such as hands and face) and consequently, to the reduction of patient treatment time. Additionally, its low cost, as a waste material, makes it advantageous for the availability and ease of acceptance of donation by pregnant women⁴⁵⁻⁴⁶, in addition to the decreasing frequency of exchanges and dressing withdrawal facility, which leads to a lower cost of the procedures and less discomfort to the patient.⁴⁷

Some authors suggest the HAM as an economically viable solution for the treatment of wounds in developing countries.⁴⁸⁻⁴⁹

Possibilities of HAM use

Currently, the HAM is most commonly used in ophthalmology to treat thermal or chemical burns, Stevens-Johnson syndrome and in pterygium surgery,⁴⁸⁻⁵¹ but its use has extended to other areas of medicine as biological dressings for diabetic foot ulcers, burns, venous ulcers, pressure ulcers and for the prevention of tissue adhesion in surgery of the head, abdomen, pelvis, vagina and larynx.⁵²⁻⁵⁵

Data collected from the computerized medical records (PIN) and the Statistical Office of the Marcilio Dias Naval Hospital (HNMD) show that a demand of patients attended in 2014 could have been benefited by the use of biological dressing from HAM. For example, fourteen patients were hospitalized due to burn injury at the Clinic of Plastic Surgery and Reconstructive and 166 surgeries of pterygium were performed at the Clinic of Ophthalmology. Even more significant data were observed in The Department of Nursing, being listed 814 cases of developed pressure ulcers and diabetic ulcers in patients underwent hospitalization and 374 attended due to diabetic ulcers. By the other hand, HAM is of easy capitation in the HNMD, once 714 cesarean sections were performed in 2014.

The ability to come up with an effective and rapid response to an accident of large magnitude represents a strategic advantage and ensures care improvement of critically ill patients. The fire occurred at Kiss Nightclub (Santa Maria, RS) in January 2013 revealed the importance of creating a tissue bank for storage and readily supply of biological dressing in cases of accidents involving large numbers of patients. At that time, due to the large demand of victims of the fire accident, Brazil had to import a large volume of amniotic membrane from tissue banks of Argentina and Uruguay, demonstrating the immediate need of creation of a national bank.⁵⁶

Regulation

In Brazil, the removal of body tissues for transplantation and treatment is regulated by 9434/1997 and 10,21/2001 laws. The transplantation or tissue grafts is authorized only after the realization of all screening tests, in the donor, for diagnosis of infection and infestation required by the Health Ministry regulation.⁵⁷⁻⁵⁹ There is also the need of previous approbation of the Hospital Ethics Committee to the use of HAM in patients.⁶⁰ The National legislation needs a specific technical regulation concerning the procurement, preparation and use of HAM.⁶¹

PREPARATION OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE BY THE INSTITUTE OF BIOMEDICAL RESEARCH (IPB)

There are countless of described methods of achievement, sterilization and storage of HAM, in different situations of application and advantage. Considering the existing IPB infrastructure in the HNMD as well as the comparative analysis of data collected in the literature, the following methodology was chosen for the development of associated projects.

After the approval of the Informed Consent (IC), elective cesarean section women negatively tested for HIV-1 and -2, HTLV-1 and -2, hepatitis B and C, syphilis and CMV, have the placenta collected. Under sterile conditions, the placenta is washed in phosphate-buffered saline solution (PBS; pH 7.4) several times to remove debris, blood and clots.⁶² The placenta is then sectioned 2 cm from the placental disc because in this area there is a higher concentration of growth factors.²⁸ The placenta is washed with saline containing 10,000 IU of penicillin, 50 ug/ml of streptomycin and 50 ug/ml of amphotericin B27,⁶² and then the amniotic membrane is manually separated from the chorion. To remove the epithelium (decellularization), HAM is maintained in 0.25% trypsin-EDTA solution into a water bath (37° C) for 30 minutes. After neutralization of trypsin with DMEM, a gentle scraping is performed by the use of the blind side of a scalpel blade.⁶³ HAM is sterilized in peracetic acid solution (PAA) 0.1% (v/v) in PBS without calcium and magnesium (pH 7.2-7.4) for three (3) hours at 25° C under gentle shaking followed by three (3) washes of TBS.18 Then HAM is spread epithelial side up, on nitrocellulose paper.⁶² This paper containing HAM is storage under -80° C in Medium Eagle solution Modified Dulbecco's Medium (DMEM) and glycerol (1: 1).⁶² HAM is maintained this way for three (3) months when the re-test of the donor is performed. With the negative results of the serological examination of the donor, the MAH is ready for use after thawing at room temperature and washing with saline solution (Figure 1).

DISCUSSION

The rate of patients with disturbance in the integrity of the skin is high, thus constituting a serious public health problem.⁴ In this context, the tissue replacement is one of the major challenges for the current regenerative medicine. Due to the extremely favorable characteristics and the potential use as a biological dressing, the clinical use of amniotic membrane came to light in recent years. With the advances in knowledge about the healing process, more and more the HAM is revealed as a wound dressing option for minimizing the risk of opportunistic infections, decreasing pain and promoting the development of healthy granulation tissue that will provide healing.

The characteristics of an ideal dressing are easily found in the MAH: rapid use and acceptable shelf life, easy sterilization, resistant to manipulation, hypoallergenic, non-corrosive, non-teratogenic, easily removed without morbidity, and also moldable to the application site.⁶⁴⁻⁶⁵

The new interest of using HAM has generated a number of new clinical indications, as the demand of new and intriguing pathological conditions grows. Like all new procedures in medicine, these indications have to be continually evaluated and more controlled clinical trials are needed in order to prove the new hypothesis.⁶¹

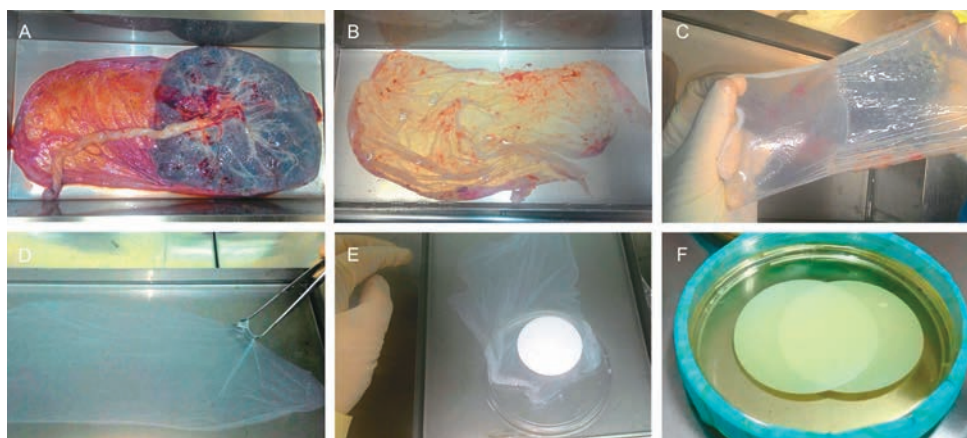
The occurrence of radiological accidents of great magnitude all over the world, together with the solid possibility of using nuclear or radiological source materials in assaults or terrorist attacks associated with the need for strategic use of nuclear energy in the naval environment, demonstrate the need for an increasingly large arsenal for the treatment of radiation-induced injury. In turn, HNMD presents itself as a national reference hospital for the care of radiological and nuclear accident victims, with accreditation by the National Nuclear Energy Commission (CEN).

CONCLUSION

The HNMD, besides the assessment of a large demand of patient suffering from wound susceptible to the use of HAM, also has the potential for the use of this biological dressing in more complex wounds in which HAM has not been tested yet.

The goal of the MAH research started at IPB is to develop dressing of simple technologies, readily available and inexpensive but equally effective compared to synthetic dressings offered by the international market, allowing the continued search for the improvement of the patient quality of life.

Figure 1: Processing HAM for use as a biological dressing. In A, newly collected placenta is washed in PBS (pH 7.4). Amnion/corion is collected and incubated in antibiotic solution for 2 hours (B) and, then HAM is manually separated from corion (C). After decellularization and sterilization, MAH is washed in saline buffer (D), gently placed on nitrocellulose paper with the epithelial face up (E), stored at - 80oC, in DMEM : glycerol solution (1:1) and ready-to-use.



ACKNOWLEDGEMENT

To CF (Md) Jaime César Estumano and CF (Md) Claudia Fiorot, at the HNMD Ophthalmology Clinic; to CF (Md) Raquel Imazaki and CC (Md) Angélica Schettini at the Clinic of Plastic Surgery and Reconstructive; and CT (S) Marília Cristina and CT (S) Patrícia Oliveira, at the pre diabetic Department of Nursing, for the gently informed data presented here in this text.

REFERENCES

1. Leaper DJ, Harding KG. Wounds: biology and management. Oxford: Oxford University Press; 1998.
2. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol. 2007;127:514-25.
3. Clivatti GM, Cavichiolo FA, Teles FB, Nasr A. Feridas superficiais: fatores técnicos associados a complicações locais. Rev Med UFPR. 2015;2(1):8-16.
4. Ferreira AM, Frola OP, Rigotti MA, Almeida WA, Moura ES, Christofletti G. Terapia tópica de feridas: disponibilidade e utilizações em uma rede de atenção primária à saúde. Rev Enferm UFPE. 2015;9(Supl 2):8401-10.
5. Hutchinson J. The Wound Programme. Centre for Medical Education Dundee. Dundee: University of Dundee; 1992.
6. MedMarket LLC. Worldwide Wound Management, Forecast to 2021: established and emerging products, technologies and markets in the Americas, Europe, Asia/Pacific and rest of world. [acesso em ago 2015]. Disponível em: <https://www.medilignce.com/store/page44.html>
7. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999;341(10):738-46.
8. Clemetson K. Platelets and primary haemostasis. Thrombosis Research. 2012;129 (3):220-4.
9. Wietecha MS, Dipietro LA. Therapeutic approaches to the regulation of wound angiogenesis. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013;2(3):81-6.
10. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in woundhealing. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. 2014;7:301-11.
11. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue modelling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(5):349-63.

12. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
13. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
14. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995;146(1):56-66.
15. Paggiaro AO, Mathor MB, Carvalho VF, Pólo E, Herson MR, Ferreira MC. Estabelecimento de protocolo de gliceração de membranas amnióticas para uso como curativo biológico. *Rev Bras Queimaduras*. 2012;11(3):111-5.
16. Gajiwala K, Gajiwala AL. Use of banked tissue in plastic surgery. *Cell Tissue Bank*. 2003;4(2-4):141-6.
17. Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Rev Col Bras Cir*. 2008;35(3):203-6.
18. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2009;30(6):1056-65.
19. Atique BF, Ahmed KT, Asaduzzaman SM, Hasan KN. Effects of Gamma Irradiation on Bacterial Microflora Associated with Human Amniotic Membrane. *Biomed Res Int*. 2013.
20. Sangwan VS, Burman S, Tejiwani S, Mahesh SP, Murthy R. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Indian J Ophthalmol*. 2007;55(4):251-60.
21. Riau AK, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-25.
22. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Engineering*. 2008;14(4):463-72.
23. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*. 1991;12(3):285-8.
24. Solomon A, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. 2001;108(3):449-60.
25. Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I167-73.
26. Pesteil F, Drouet M, Rousanne MC, Lacroix P. Amniotic membrane: an innovative treatment of refractory vascular ulcers? *Phlebology*. 2009;16(2):259-66.
27. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:748-52.
28. Litwiniuk M, Grzela T. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. *Wound Repair Regen*. 2014;22(4):451-6.
29. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y. Antiinflammatory effect of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*. 2001;20:408-13.
30. Yatim RM, Kannan TP, Ab Hamid SS, Shamsudin SH. Effects of different processing methods of human amniotic membrane on the quality of extracted RNA. *Arch Orolfac Sci*. 2013;8(2):47-53.
31. Thomasen H, Steuhl KP, Meller D. Validation of an automatic test system for sterile testing of amniotic membranes. *Ophthalmol*. 2014;111(5):454-9.
32. Singh R, Chacharkar MP. Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. *J Tissue Viability*. 2011;20(2):49-54.
33. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ. *Williams obstetrics*. 21st ed. London: Slock Inc; 2001.
34. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*. 1997;124:765-74.
35. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol*. 1989;93:372-8.
36. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(1):51-77.
37. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian Alexander M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell and Mater*. 2008;15:88-99.
38. Del Campo Z, Gris O. Aplicaciones de la membrana amniótica em patologia ocular. *Ann Oftal*. 2002;10:128-41.
39. Hanumanthappa MB, Gopinathan S, Guruprasad RD. Amniotic membrane dressing versus conventional dressing in lower limb varicoseulcer: a prospective comparative study. *Int J Biol Med Res*. 2012;3(2):1616-20.
40. Ravishanker R, Bath AS, Roy R. "Amnion Bank"- the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns*. 2003;29(4):369-74.
41. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns*. 1995;21(5):356-61.
42. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16(4):233-40.
43. Bennet JP, Mathews R, Faulk WP. Treatment of chronic ulceration of leg with human amnion. *Lancet*. 1980;315:1153-6.
44. Colucho G, Graham WP, Greene AE, et al. Human amniotic membranes as a physiological wound dressing. *Arch Surg*. 1974;109:370.
45. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000;19(3):348-52.
46. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981;72(8254):1003-5.
47. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16(4):233-40.
48. Alió JL, Abad M, Scorsetti DH. Preparation, indications and results of human amniotic membrane transplantation for ocular surface disorders. *Expert Rev Med Devices*. 2005;2(2):153-60.



49. Arvola R, Holopainen J. Amnion in the treatment of ocular diseases. *Duodecim*. 2015;131(11):1044-9.
50. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, Griffoni C, Grassetto A, Elbadawy HM, Ponzin D. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. *Cell Tissue Bank*. 2015 Apr/Jul.
51. Gutiérrez-Moreno S, Alsina-Gibert M, Sampietro-Colom L, Pedregosa-Fauste S, Ayala-Blanco P. Cost-benefit analysis of amniotic membrane transplantation for venous ulcers of the legs that are refractory to conventional treatment. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102(4):284-8.
52. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: burns of the second degree. *Br J Ophthalmol*. 1946;30(6):337-45.
53. Trelford JD, Trelford Suaer M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;134:833-45.
54. Kirsner RS, Sabolinski ML, Parsons NB, Skornicki M, Marston WA. Comparative effectiveness of a bioengineered living cellular construct vs. a dehydrated human amniotic membrane allograft for the treatment of diabetic foot ulcers in a real world setting. *Wound Repair Regen*. 2015 Jun.
55. Smiell JM, Treadwell T, Hahn HD, Hermans MH. Real-world experience with a decellularized dehydrated human amniotic membrane allograft. *Wounds*. 2015;27(6):158-69.
56. Pretto Neto AS, Rech DL, Martins ALM, Silveira DPM, Chem EM, Ely PB. Membrana amniótica humana: curativo biológico promissor. *Rev Bras Cir Plást*. 2013;28(supl):1-103.
57. Brasil. Decreto nº 2.268, de 30 de junho de 1997. Regulamento a Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fim de transplante e tratamento, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 1997 jul. 01; Sec.1:13739.
58. Legislación sobre donación y trasplante de órganos, tejidos y células compilación y análisis comparado. Washington, D.C: OPS/WHO; 2013.
59. Brasil. Lei no 10.211, de 23 de março de 2001. Altera dispositivos da Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 2001 mar. 24; Sec.1:6.
60. Duarte IGL. Membrana amniótica como curativo biológico na cicatrização de feridas infectadas: estudo experimental em coelhos. [dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007. Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina.
61. Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. São Paulo: ABTO; 2009.
62. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):93-9.
63. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-25.
64. Bellows CF, Alder A, Helton WS. Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts: present status and future opportunities. *Expert Rev Med Devices*. 2006 Set;2006;3(5):657-75.
65. Oliveira EC, Ramos G Z, Afonso VCC, Souza LB. Estudo retrospectivo da utilização do transplante de membrana amniótica em um serviço terciário de oftalmologia. *Rev Bras Oftalmol*. 2008;67(4):165-71.

How to cite this article: Souza MAF, Munro RM, Guerra RJA, Polito PR, Santos RA, Ferreira APM, et al. Human amniotic membrane as a biological dressing for wounds of difficult resolution and possible uses in the HNMD. *Arq Bras Med Naval*. 2015 Jan/Dez;76(1)69-74.

