

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA EDUARDA ANASTÁCIO BORGES CORRÊA

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DESCELULARIZADA E SOLUBILIZADA
COM ÁCIDO HIALURÔNICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR**

CRICIÚMA, 2021

MARIA EDUARDA ANASTÁCIO BORGES CORRÊA

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DESCELULARIZADA E SOLUBILIZADA
COM ÁCIDO HIALURÔNICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emílio Luiz Streck

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C824e Corrêa, Maria Eduarda Anastácio Borges.

Efeitos da aplicação de membrana amniótica descelularizada e solubilizada com ácido hialurônico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos wistar / Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa. - 2021.

50 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: Emílio Luiz Streck.

Coorientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 380

Com início às 14h (quatorze horas) do vinte e oito de junho de 2021 (dois mil e vinte e um), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **MARIA EDUARDA ANASTÁCIO BORGES CORRÊA**, sob a orientação do Prof. Dr. Emilio Luiz Streck e coorientação do Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira, intitulada “EFEITOS DA APLICAÇÃO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DESCELULARIZADA E SOLUBILIZADA COM ÁCIDO HIALURÔNICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS Wistar”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Rodrigo Plentz (Universidade Federal em Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 28 (vinte e oito) de junho de 2021 (dois mil e vinte e um).

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

Folha Informativa

A dissertação foi elaborada seguindo a Vancouver e foi apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instituições do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Univesidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

*Dedico este trabalho à minha mãe, **Jucilene**, por sempre estar ao meu lado e nunca medir esforços para que eu tenha sucesso, abdicando muitas vezes de seus próprios sonhos para que eu realize os meus.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Jucilene Anastácio, quem eu amo mais que tudo, por sempre me incentivar, me fazer acreditar que sou capaz, me guiar para as melhores decisões e sempre estar ao meu lado independente de qualquer coisa.

Ao meu pai, Jorge Luiz Borges Corrêa, por mesmo de longe se fazer presente e me fazer saber que tenho seu apoio e admiração, assim como meus irmãos, Alan e Pablo, e sobrinhas, Camile e Sofia.

Ao meu namorado, Maicon, por sempre acreditar em mim, me fazer uma pessoa melhor e estar ao meu lado em todos os momentos os quais nem sempre foram fáceis.

Aos meus orientadores, Emílio, por me acolher como aluna, e Paulo, por me mostrar o caminho que gostaria de seguir como profissional e por todo conhecimento pelo qual tenho grande apreço.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa que estão comigo desde a iniciação científica compartilhando desta jornada, por me aguentarem todos os dias e sempre estarem dispostos a ajudar, nada disso seria possível sem vocês. Muito obrigada.

A todos do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, pelo convívio de todos os dias.

A todos meus amigos que estiveram comigo durante todo este caminho, aguentando meus surtos.

A qualquer pessoa que se fez presente e de alguma forma me acompanhou neste processo, muito obrigada por fazer parte desta história.

RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, que envolve uma série de eventos coordenados com múltiplos níveis de complexidade, visando restaurar a integridade tecidual local. A membrana amniótica (MA) tem sido usada recentemente como suporte para a transferência de células para as feridas pois apresenta características importantes como promover reepitelização, apresentar propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, de inibição da fibrose e apresentar resistência. Pesquisa indicam que o ácido hialurônico (AH) é capaz de estimular o desenvolvimento de fibrina, a atividade fagocitária, a mobilidade dos neutrófilos, dos macrófagos e a migração de fibroblastos. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação da membrana amniótica descelularizada e solubilizada com ácido hialurônico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em modelo experimental. Foram utilizados 96 ratos Wistar machos de 60 dias com 250-300g divididos em 2 grupos de 48 animais em cada, sendo um grupo submetido à eutanásia no sétimo dia de tratamento e o outro no décimo quarto dia, objetivando avaliar a evolução da ferida e as fases inflamatórias nestes dois tempos. Os ratos foram submetidos à anestesia e então à lesão cutânea por excisão na região do dorso. Logo após os mesmos foram randomizados e divididos em quatro grupos com n=12: I–Lesão epitelial (LE); II–LE+MA; III–LE+AH; IV–LE+MA+AH. Avaliou-se a contração da ferida quantificando sua área no primeiro, no sétimo e no décimo quarto dia. Após a retirada da pele, nos animais do Grupo II, III e IV as feridas foram cobertas totalmente pela MA e/ou AH conforme randomização. No sétimo e décimo quarto dia após eutanásia a área lesionada dos animais de cada grupo foi retirada para análise histológica, bioquímica e molecular. Observou-se um aumento significativo na contração da ferida nos grupos LE+MA, LE+AH e LE+MA+AH no décimo quarto dia. A média do número de fibroblastos aumentou significativamente no grupo LE+MA+AH em relação ao grupo LE e as fibras de colágeno apresentaram um aumento no grupo LE+MA em relação ao controle no sétimo dia; a média de infiltrado inflamatório diminuiu significativamente no LE+MA+AH em relação ao grupo LE no décimo quarto dia. Os níveis de mRNA de NF- κ B diminuíram significativamente nos grupos LE+MA e LE+MA+AH em relação ao controle no sétimo dia. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1 β e IL6 apresentaram uma redução no grupo LE+MA+AH em relação ao grupo LE tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia; já os níveis de citocinas anti-inflamatórias IL10, IL4 e TGF- β apresentaram um aumento significativo no grupo LE+MA+AH em relação ao controle principalmente no décimo quarto dia. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, os níveis de nitrito diminuíram no grupo de terapia combinada quando comparado ao grupo controle, bem como o dano oxidativo (carbonil), no sétimo dia. Na defesa antioxidante ocorreu um aumento da GSH e da SOD no grupo de terapia combinada tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia. Com os resultados foi possível observar que as terapias propostas contribuíram para aceleração do processo inflamatório com antecipação da fase de reparo.

Palavras-chave: feridas, membrana amniótica, ácido hialurônico, inflamação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Wound healing is a dynamic process, which involves a series of coordinated events with multiple levels of complexity, aiming to restore local tissue integrity. The amniotic membrane (AM) has recently been used as a support for the transfer of cells to wounds because it has important characteristics such as promoting reepithelialization, presenting antimicrobial and anti-inflammatory properties, inhibiting fibrosis and presenting resistance. Research indicates that hyaluronic acid (HA) is able to stimulate the development of fibrin, phagocytic activity, the mobility of neutrophils, macrophages and the migration of fibroblasts. Thus, the general objective of this work was to evaluate the effect of the application of the decellularized and solubilized amniotic membrane with hyaluronic acid in the healing process of cutaneous wounds in an experimental model. 96 male 60-day Wistar rats weighing 250-300g were divided into 2 groups of 48 animals each, one group being euthanized on the seventh day of treatment and the other on the fourteenth day, aiming to evaluate the evolution of the wound and the inflammatory phases in these two times. The rats were submitted to anesthesia and then to cutaneous lesion by excision in the region of the dorsum. Soon after, they were randomized and divided into four groups with $n = 12$: I – Epithelial lesion (LE); II – LE + MA; III – LE + AH; IV – LE + MA + AH. Wound contraction was assessed by quantifying its area on the first, seventh and fourteenth day. After removing the skin, in the animals of Group II, III and IV the wounds were covered completely by MA and / or HA according to randomization. On the seventh and fourteenth day after euthanasia, the injured area of the animals in each group was removed for histological, biochemical and molecular analysis. We observed a significant increase in wound contraction in the LE + MA, LE + AH and LE + MA + AH groups on the fourteenth day. The mean number of fibroblasts increased significantly in the LE + MA + AH group compared to the LE group and the collagen fibers showed an increase in the LE + MA group compared to the control on the seventh day; the mean of inflammatory infiltrate decreased significantly in LE + MA + AH in relation to the LE group on the fourteenth day. The levels of NF- κ B mRNA decreased significantly in the LE + MA and LE + MA + AH groups compared to the control on the seventh day. The levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL1 β and IL6 showed a reduction in the LE + MA + AH group in relation to the LE group on both the seventh and the fourteenth day; the levels of anti-inflammatory cytokines IL10, IL4 and TGF- β showed a significant increase in the LE + MA + AH group in relation to the control mainly on the fourteenth day. Regarding oxidative stress parameters, nitrite levels decreased in the combined therapy group when compared to the control group, as well as oxidative damage (carbonyl), on the seventh day. In the antioxidant defense, there was an increase in GSH and SOD in the combined therapy group on both the seventh and the fourteenth day. With the results it was possible to observe that the proposed therapies contributed to accelerate the inflammatory process with anticipation of the repair phase.

Keywords: wounds, amniotic membrane, hyaluronic acid, inflammation, oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estágios da cicatrização de feridas.	17
Figura 2: Apresentação esquemática da estrutura da membrana fetal. Os componentes da matriz extracelular de cada camada são mostrados.....	19
Figura 3: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de contração da ferida.	28
Figura 4: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de análise histológica no sétimo dia.....	29
Figura 5: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de análise histológica no décimo quarto dia.....	30
Figura 6: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros da expressão gênica dos marcadores Nf-k β e Nrf2 no sétimo dia.....	31
Figura 7: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas pró-inflamatórias no sétimo dia..	32
Figura 8: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas pró-inflamatórias no décimo quarto dia.	33
Figura 9: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas anti-inflamatórias no sétimo dia.	34
Figura 10: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas anti-inflamatórias no décimo quarto dia.....	35
Figura 11: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros oxidativos no sétimo dia.	36
Figura 12: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros oxidativos no décimo quarto dia.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Ácido Hialurônico

CD44 – Receptor de adesão da superfície celular

DCFH-DA – Diclorofluoresceína

DTNB – Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês, *Epidermal growth factor*)

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, *Fibroblast growth factor*)

GAGs – Glicosaminoglicanos

GPX – Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

H&E – Hematoxilina-eosina

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, *Hepatocyte growth factor*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High performance liquid chromatography*)

IFN- γ – Interferon Gama

IGF1 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (do inglês, *Insulin-like growth factor*)

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

KGF – Fator de crescimento de queratinócito (do inglês, *Keratinocyte growth factor*)

MA – Membrana Amniótica

NADPH – Adenosina Nicotinamina Fosfato Oxidase (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*)

NF- κ B – Factor Nuclear Kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B*)

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês, *Platelet-derived growth factor*)

PFA – Paraformaldeído

pH – Potencial hidrogeniônico

SOD – Superóxido Dismutase

TGF- α – Fator de Crescimento de Transformação - α (do inglês, *Transforming growth factor alpha*)

TGF- β – Fator de Crescimento de Transformação - β (do inglês, *Transforming growth factor beta*)

TNB – Tetrametilbenzidina

TNF – Fator de Necrose Tumoral do inglês tumor necrosis factor

VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (do inglês, *Vascular endothelial growth factor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 FERIDAS.....	14
1.2 A PELE E A CICATRIZAÇÃO	15
1.3 MEMBRANA AMNIÓTICA.....	18
1.4 ÁCIDO HIALURÔNICO.....	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	23
3.2 MEMBRANA AMNIÓTICA.....	23
3.3 ANIMAIS.....	23
3.4 TRATAMENTO..	24
3.5 EUTANÁSIA.....	24
3.6 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS	24
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	24
3.8 ENSAIOS.....	25
3.8.1 RT-PCR.....	25
3.8.2 Imunoensaio Enzimático.....	25
3.8.3 Determinação intracelular de ROS e óxido nítrico	25
3.8.3 Marcadores de dano oxidativo	26
3.8.4 Defesas antioxidantes	26
3.8.5 Conteúdo de Proteínas	27
3.9 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DADOS.....	27
4 RESULTADOS	28
4.1 ANÁLISE DA CONTRAÇÃO DA FERIDA.....	28
4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	28
4.3 RT-PCR.....	30
4.4 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO	31
4.4.1 Citocinas Pró-Inflamatórias	31
4.4.2 Citocinas Anti-Inflamatórias.....	33
4.5 PARÂMETROS OXIDATIVOS.....	35
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO 1 – CERTIFICADO DO CEUA	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 FERIDAS

Todos os tipos de feridas têm potencial para se tornarem crônicas e, como tal, as feridas crônicas são tradicionalmente divididas etiologicamente. Identificar e tratar a etiologia subjacente de uma ferida crônica, como insuficiência venosa, perfusão arterial, diabetes ou pressão não aliviada, bem como fatores sistêmicos, como estado nutricional, imunossupressão e infecção que podem contribuir para a má cicatrização da ferida, são essenciais para o tratamento bem-sucedido da ferida (Mustoe et al., 2006).

As feridas crônicas são frequentemente identificadas pela presença de uma margem elevada, hiperproliferativa, mas não avançada. Fibroblastos derivados do leito de feridas crônicas de várias etiologias representam um fenótipo senescente, prematuro ou diferenciado, que responde ineficientemente às mensagens estimulatórias normais. O ambiente local da ferida, rico em produtos inflamatórios, e citocinas pró-inflamatórias manifestam um meio enzimático desequilibrado, consistindo em um excesso de metaloproteases de matriz e uma redução em seus inibidores, resultando na destruição da matriz extracelular (Menke et al., 2007).

Acredita-se que o estado inflamatório profundo resultante seja um fator significativo que influencia e retarda a cura. A inflamação crônica, uma característica marcante da ferida que não cicatriza, pode, em última instância, predispor esses locais da ferida a uma possível alteração maligna. Em geral, a hipóxia local do tecido com lesão de isquemia-reperusão repetitiva é considerada comum patogênese no desenvolvimento de feridas crônicas (Werdin et al., 2009).

Em relação à prevalência de feridas crônicas, destaca-se que, na maior parte dos países, há escassez de dados epidemiológicos e se observa que, entre os dados disponíveis, existem grandes variações dessa taxa. No Brasil, os registros estatísticos sobre feridas na população ainda são incipientes, principalmente sobre as do tipo crônico, além de que, esta prevalência varia de acordo com condições e etiologias, como insuficiência venosa, má perfusão arterial, diabetes ou pressão alta. No Brasil, estudos apontam alta prevalência e incidência de feridas em pessoas idosas residentes em instituições e durante a internação hospitalar (Vieira e Araújo, 2018).

As feridas causam dor e sofrimento, reduzem a qualidade de vida, aumentam os custos com saúde, prolongam a hospitalização e aumentam a morbidade (Groom et al., 2010).

Com o avanço da idade da população, o aumento do peso e as comorbidades resultantes de diabetes e insuficiência venosa, foi relatado um aumento no número de pacientes com feridas crônicas. Estima-se que aproximadamente 1% da população desenvolverá ulceração ao longo da vida. Só nos Estados Unidos, as feridas crônicas afetam de 3 milhões a 6 milhões de pacientes e o tratamento dessas feridas custa cerca de US\$ 5 bilhões a US\$ 10 bilhões a cada ano. De particular preocupação, observa-se um aumento no número de pacientes que foram tratados de forma insuficiente para suas feridas crônicas em cursos prolongados (Strausberg et al., 2007).

Acredita-se que as vias de tratamento estabelecidas para feridas crônicas podem ser altamente relevantes na prática diária e como resultado delineamos conceitos atuais sobre o tratamento de feridas crônicas, enfocando os princípios fundamentais do tratamento.

1.2 A PELE E A CICATRIZAÇÃO

A pele é composta por duas camadas principais: a epiderme, que funciona como uma barreira do ambiente externo, e a camada mais profunda, a derme, que é composta de tecido conjuntivo, e fornece à pele suas propriedades mecânicas. A epiderme consiste em um epitélio queratinizado estratificado que é intercalado com folículos pilosos e glândulas. Subjacente à epiderme está a derme, subdividida na derme "papilar" superior e na derme "reticular" inferior, que diferem na densidade de suas fibras de colágeno. Durante a cicatrização cutânea, as propriedades mecânicas e de barreira da pele são restauradas pelas ações de vários tipos de células que sofrem proliferação, diferenciação, migração e apoptose para reconstruir a pele (Bielefeld et al., 2013).

Existem várias razões para danos à pele, incluindo fatores genéticos, distúrbios, trauma agudo, feridas crônicas ou intervenções cirúrgicas. No momento em que a pele é lesionada, uma série complexa de eventos começa: células imunes são atraídas para o local da lesão, nova matriz tecidual é gerada por fibroblastos, seguida pela reepitelização dos queratinócitos e, eventualmente, a revascularização da ferida (Midwood et al., 2004). Este processo de cicatrização é estimulado e controlado por vários fatores de crescimento e citocinas (Diegelmann e Evans, 2004).

Os defeitos da pele podem ser divididos com base na profundidade da lesão, como I) epidérmica, II) espessura parcial superficial, III) espessura parcial profunda e IV) feridas na pele com espessura total. As feridas das categorias I a III podem se regenerar pela capacidade de autocura da pele, iniciando a migração de queratinócitos pelas bordas da ferida ou pelos folículos capilares e glândulas sudoríparas na derme restante (Papini, 2004). Em contraste, as feridas cutâneas de espessura total mais severas são especificadas por uma destruição completa dos elementos regenerativos epiteliais que residem na derme. Portanto, somente a epitelização das bordas desse tipo de ferida é possível. O tamanho da ferida é um fator crítico para a epitelização. Feridas de espessura total com mais de 1 cm de diâmetro precisam de enxerto de pele para evitar a formação extensa de cicatrizes, resultando em mobilidade reduzida e deformidades cosméticas (Shevchenko et al., 2010).

Feridas profundas que destroem completamente a epiderme e parte da derme também têm impactos funcionais, como comprometimento da oxigenação da pele e efeitos na capacidade de cicatrização do tecido. As consequências podem ser muito graves em termos de gerenciamento de fluidos, com a possibilidade de levar à desidratação e choque. A perda de proteínas também pode ser grave, bem como o risco de contrair infecções. Para evitar todas essas consequências dramáticas, a cobertura imediata de feridas é uma medida essencial a ser tomada. O procedimento clínico padrão compreende escarectomia precoce, seguida de reconstrução imediata do tecido com enxerto de pele (Longinotti, 2014).

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que consiste em quatro fases contínuas, sobrepostas e programadas com precisão (Figura 1). Os eventos de cada fase devem ocorrer de maneira precisa e regulada, pois qualquer interrupção ou até o prolongamento do processo pode levar a um atraso na cicatrização ou a uma ferida crônica que não cicatriza. A cicatrização ideal de feridas envolve os seguintes eventos: (1) hemostasia rápida; (2) inflamação apropriada; (3) diferenciação, proliferação e migração de células para o local da ferida; (4) angiogênese adequada; (5) reepitelização imediata e (6) síntese adequada do colágeno para fornecer força ao tecido cicatrizado (Guo e Dipietro, 2010).

A fase inflamatória é caracterizada por aumento da permeabilidade capilar e infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos na ferida. Após vasoconstrição inicial durante a hemostasia, ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. O aumento do fluxo sanguíneo e o extravasamento de líquidos combinados ao bloqueio da drenagem linfática causam os sinais clássicos de inflamação, incluindo calor, rubor e edema (Mickelson et al., 2016).

O desbridamento da ferida começa com a migração dos glóbulos brancos para a ferida. As plaquetas dentro do tampão de fibrina liberam fatores de crescimento e citocinas, que recrutam células inflamatórias para a ferida. Os neutrófilos em circulação começam a entrar na ferida minutos após o ferimento, atingindo o pico nas primeiras 24 horas e são os principais responsáveis pela fagocitose (Portou et al., 2015).

Os monócitos se acumulam dentro de 12 horas após a lesão e sofrem diferenciação dos macrófagos maduros da ferida sob a influência de citocinas locais. Os macrófagos são a célula inflamatória dominante dentro de três a cinco dias após a lesão e desempenham um papel fundamental na transição da inflamação para o reparo. Além disso, eles liberam citocinas pró-inflamatórias que propagam a resposta inflamatória e fatores de crescimento que estimulam a conversão de células mesenquimais em fibroblastos e promovem a síntese e angiogênese do colágeno (Pazyar et al., 2014).

Na fase proliferativa, aproximadamente 3 a 4 dias após a lesão, há fibroplasia, angiogênese e epitelização. Sob a influência de fatores de crescimento, os fibroblastos dérmicos proliferam, migram e se diferenciam, sendo críticos para a produção de matriz extracelular (MEC), composta por colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e elastina. O TGF- β (fator de crescimento de transformação - β) é um dos mediadores mais importantes da formação da matriz de colágeno. Estimula os fibroblastos a produzir fibronectina, que é fundamental para facilitar a ligação celular e o movimento dos próprios fibroblastos (Ozturk; Ermertcan, 2011).

A epitelização envolve proliferação e migração de queratinócitos epidérmicos das bordas da ferida, diferenciação de células progenitoras epiteliais em uma epiderme estratificada e restauração da membrana basal que conecta a epiderme à derme subjacente (Pazyar et al., 2014). As células epiteliais se movem para o centro da ferida deslizando sobre os depósitos de fibrina ou lâmina basal. As células epiteliais migram sob o coágulo da ferida e sobre o tecido de granulação, fazendo com que a crosta se separe da ferida por secreção de enzimas proteolíticas. À medida que as células migram mais longe da borda da ferida, a migração diminui e a camada inicial formada tem apenas uma camada celular de espessura. A contração ocorre tipicamente cinco a nove dias após a lesão inicial. O

tecido existente nas bordas da ferida é puxado para dentro por contração, e a pele ao redor se estende, diminuindo o tamanho total da ferida (Fossum; Hedlund, 2007).

A maturação normalmente começa uma semana após a lesão após a deposição de colágeno na ferida e é a fase mais longa da cicatrização, continuando por semanas a meses após a lesão. A principal atividade que ocorre durante esta fase é o fortalecimento e a remodelação do colágeno recém-formado; o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I (Mickelson et al., 2016).

O enxerto perfeito deve estar prontamente disponível, sem afetar a resposta imune, cobrir e proteger o leito da ferida, melhorar o processo de cicatrização, diminuir a dor do paciente e resultar em pouca ou nenhuma formação de cicatriz (Groeber et al., 2011).

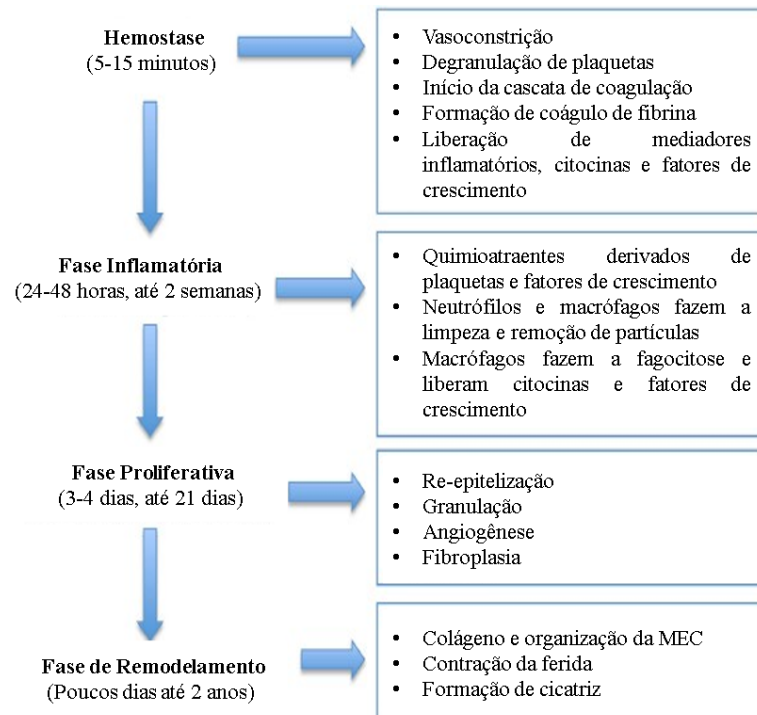


Figura 1: Estágios da cicatrização de feridas. Fonte: Adaptada de Mickelson et al., 2016.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) elevadas têm sido associados à reparação de feridas prejudicada em feridas crônicas que não cicatrizam. O excesso de ROS pode degradar direta ou indiretamente as proteínas da matriz extracelular por meio da ativação da proteólise. No entanto, as ROS de baixo nível desempenham um papel fundamental na resposta normal de cicatrização de feridas; elas agem como mensageiros secundários para recrutar muitos imunócitos e células não linfóides para o local da ferida e promover a reparação do tecido. Assim, a manipulação de ROS apresenta um caminho promissor para acelerar a cicatrização de feridas quando estas se encontram estagnadas (Fan et al., 2019).

1.3 MEMBRANA AMNIÓTICA

A estrutura da MA e o fato de que contém diversos fatores de crescimento a tornam um material biológico ideal para curativos. Além disso, apresenta características importantes, como a promoção de reepitelização, propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias e inibição da fibrose e formação de cicatrizes. A maioria dessas características é baseada na presença principal de colágeno tipos I, II, III, IV, laminina e fibronectina na membrana basal, além dos fatores de crescimento (EGF, TGF α e β , KGF, HGF, FGF, VEGF, PDGF) (Nouri et al., 2018).

As membranas amnióticas se desenvolvem a partir de tecido extra-embriônico e consistem em um componente fetal (a placa coriônica) e um componente materno (as deciduas). O componente fetal inclui as membranas fetais amniótica e coriônica, as quais separam o feto do endométrio. A membrana amniocoriônica forma os limites externos do saco que envolve o feto, enquanto a camada mais interna do saco é a MA, que consiste em uma monocamada epitelial, uma membrana basal espessa e um estroma avascular (Figura 2). A camada mais interna, mais próxima do feto, é chamada epitélio amniótico e consiste em uma única camada de células dispostas uniformemente na membrana basal. A membrana basal é uma das membranas mais espessas encontradas em todos os tecidos humanos (Niknejad et al., 2008).

A camada compacta da matriz estromal adjacente à membrana basal forma o esqueleto fibroso principal da MA. Os colágenos da camada compacta são secretados por células mesenquimais situadas na camada de fibroblastos. Os colágenos intersticiais (tipos I e III) predominam e formam feixes paralelos que mantêm a integridade mecânica da MA. Os colágenos do tipo V e VI formam conexões filamentosas entre os colágenos intersticiais e a membrana basal epitelial. A camada intermediária (camada esponjosa ou zona esponjosa) da matriz estromal fica adjacente à membrana coriônica. Seu conteúdo abundante de proteoglicanos e glicoproteínas produz uma aparência esponjosa nas preparações histológicas e contém uma malha não fibrilar do colágeno principalmente do tipo III, por fim, a camada esponjosa é frouxamente conectada à membrana coriônica; portanto, a MA é facilmente separada do córion por meio de dissecação contundente (Parry e Strauss, 1998).

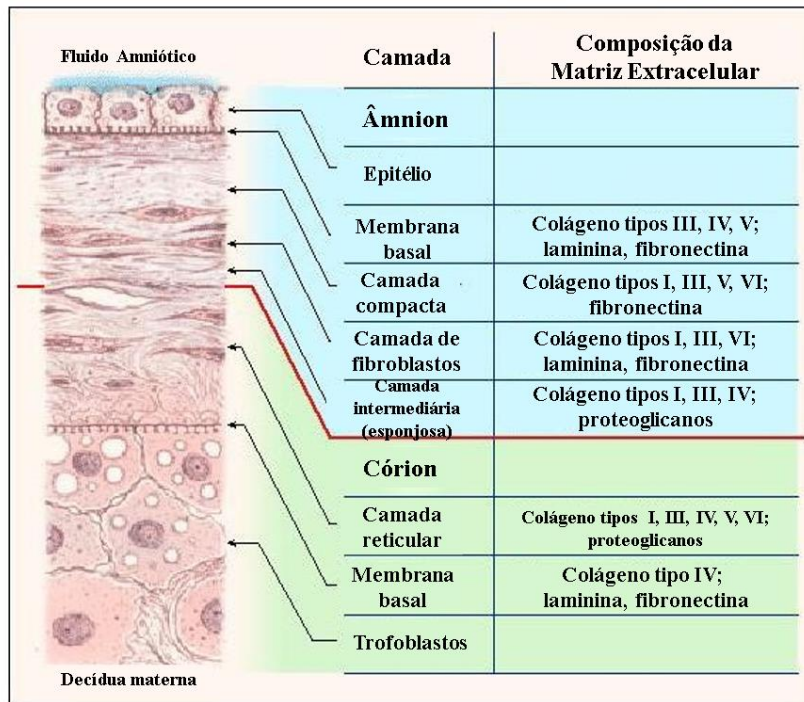


Figura 2: Apresentação esquemática da estrutura da membrana fetal. Os componentes da matriz extracelular de cada camada são mostrados. Fonte: Adaptada de Niknejad et al., 2008.

A posse de características clinicamente importantes, incluindo comportamento anti-inflamatório, propriedade angiogênica, indução de epitelização e antimicrobiana, não-imunigênica, bem como a presença de vários fatores importantes de crescimento, fizeram da MA uma potencial candidata à cicatrização de feridas (Schulze et al., 2012; Garfias et al., 2010).

A MA pode ser usada fresca ou conservada, intacta ou descelularizada, dependendo das instalações disponíveis e tipo de ferida. Até o momento, muitos métodos foram desenvolvidos para preparação, preservação e esterilização da MA. Cada um desses métodos afeta notavelmente os comportamentos mecânicos, físico-químicos e biológicos da membrana (Riau et al., 2010).

A MA inibe a cicatrização pela regulação negativa do TGF- β , responsável pelas respostas fibróticas induzidas através da ativação dos fibroblastos (Mamede et al., 2012). O inibidor primário do TGF- β na MA é o ácido hialurônico existente na porção mesenquimal (Fairbairn et al., 2014). Verificou-se que a reepitelização tardia e a inflamação crônica, essencialmente causadas por infecções, são os principais fatores indutores na formação de tecido cicatricial. A MA também minimiza a formação de cicatrizes nas feridas da pele através da secreção de EGF (fator de crescimento epidérmico), KGF (fator de crescimento de queratinócitos) e HGF (fator de crescimento de hepatócitos) que são fatores de crescimento essenciais envolvidos na epitelização e na cicatrização de feridas. A MA exerce sua atividade anti-inflamatória através do fator inibidor da migração (MIF) e regulação negativa da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL1. Além disso, a MA possui atividades antibacterianas de amplo

espectro que permitem prevenir infecções pós-feridas, o estímulo mais importante das respostas inflamatórias (Gholipourmalekabadi et al., 2019).

1.4 ÁCIDO HIALURÔNICO

Uma variedade de biomateriais tem sido desenvolvida nos últimos anos e grandes esforços foram dedicados ao desenvolvimento de novos polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, que devem liberar produtos de degradação seguros, que entram na via metabólica normal. Muitos enxertos usados no tratamento feridas consistem em biomateriais feitos de vários componentes da matriz extracelular (MEC) e são teorizados para favorecer a cicatrização, fornecendo um andaime estrutural e os sinais importantes para interações celulares complexas durante as fases de cicatrização. Entre uma série de possíveis materiais, a química do AH representa uma opção interessante e valiosa para o desenvolvimento de dispositivos médicos para tratamento de feridas epidérmicas e dérmicas (Longinotti, 2014).

O AH é dito um polímero natural da família dos glicosaminoglicanos (GAGs) e consiste de uma unidade básicas de dois açúcares, ácido glucurônico e N- acetilglucosamina. O corpo humano pesando 70 kg contém cerca de 15 g de AH. A maior quantidade do composto está presente na pele (cerca da metade do total de AH), líquidos sinoviais, no corpo vítreo e no cordão umbilical. Também pode ser encontrado nos locais onde ocorre o atrito: articulações, tendões, bainhas, pleura, e o pericárdio (Salwowska et al., 2016).

Foi demonstrado que a molécula de AH contribui como modulador de muitos dos processos biológicos, graças às suas características físico-químicas e biológicas.

Por exemplo, foi relatado que altas concentrações teciduais de AH estão presentes durante a ativação de processos biológicos importantes, como remodelação, regeneração e morfogênese (Juhlin, 1997).

O AH é o principal componente hidrodinâmico não proteico do líquido sinovial das articulações, de muitos tecidos e órgãos, e suas propriedades visco-elásticas únicas conferem notáveis habilidades de absorção e lubrificação a tecidos e fluidos. O AH restringe a entrada de grandes proteínas e células plasmáticas nos fluidos, mas facilita a troca de solutos entre os capilares sinoviais e a cartilagem e outros tecidos articulares. Além disso, o AH pode formar um revestimento pericelular ao redor das células, interagir com mediadores pró-inflamatórios e se ligar aos receptores celulares, onde modula a proliferação celular, a migração e a expressão gênica. Todas essas propriedades físico-químicas e biológicas do AH demonstraram ser dependentes da massa molar (Volpi, 2009).

Uma das propriedades mais distintivas do AH é sua viscoelasticidade no estado hidratado. Tanto a viscosidade quanto a elasticidade podem variar com a taxa de cisalhamento ou movimento oscilatório. Como consequência, o movimento rápido reduz a viscosidade do AH, que se reflete na força necessária para superar o atrito interno. Isso também aumenta a elasticidade, que armazena energia e permite a recuperação da deformação. Esse fenômeno é familiar como edema "cutâneo" em tecidos subcutâneos normalmente moles. Após recuo breve e

rápido na mesma profundidade, o tecido recupera imediatamente sua forma original. Finalmente, as propriedades de viscosidade e elasticidade estão positivamente relacionadas, de maneira complexa, à massa molar e à concentração, um ponto que deve ser considerado nos usos cirúrgicos e médicos de várias preparações de AH para viscoproteção e viscosuplementação (Fraser et al., 1997).

O AH atua nas células, ligando-se aos receptores CD44 e RHAMM. A primeira delas está envolvida em processos inflamatórios, aterosclerose e carcinogênese. O segundo receptor é responsável pela motilidade das células, cicatrização de tecidos e carcinogênese. A interação entre o AH e o receptor CD44 afeta a proliferação, sobrevivência, motilidade, invasividade e a quimiorresistência das células. Por outro lado, a superexpressão do receptor RHAMM está associada à promoção de crescimento tumoral e metástase. Foi provado que o AH de baixo peso molecular promove a motilidade das células tumorais por meio de interações com os receptores CD44. Acredita-se que o AH de alta massa molar molecular seja responsável pela migração, diferenciação celular e coleção de tecidos de células progenitoras (Sugahara et al., 2003).

Considerando estudos prévios que já estabelecem o uso do ácido hialurônico para o tratamento de feridas e distúrbios da pele, e os dados apresentados sobre a membrana amniótica e seus promissores efeitos na cicatrização que ainda precisam de mais estudos para investigação, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da aplicação da membrana amniótica descelularizada e solubilizada com ácido hialurônico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em modelo experimental de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da aplicação da membrana amniótica descelularizada (MA) e solubilizada com ácido hialurônico (AH) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em modelo experimental de ratos no sétimo e décimo quarto dia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o tamanho de área da ferida através da medida da área usando imagens fotográficas e analisadas pelo software image J no sétimo e décimo quarto dia;
- Avaliar os efeitos da aplicação de MA e AH sobre os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL1 β , TNF- α , IL6, IL4, IL10 e TGF β) em um modelo de lesão epitelial na pele de ratos Wistar;
- Avaliar a expressão gênica de NF-k β e Nrf2 através de RT-PCR em um modelo de lesão epitelial na pele de ratos Wistar;
- Avaliar os efeitos da aplicação de MA e AH sobre a produção de oxidantes, sistema antioxidante e dano oxidativo em um modelo de lesão epitelial na pele de ratos Wistar;
- Avaliar os efeitos da aplicação de MA e AH sobre o infiltrado inflamatório, novos vasos, fibroblastos e produção de colágeno através de análise histológica em um modelo de lesão epitelial na pele de ratos Wistar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC sob protocolo nº 17/2020 (anexo 1) tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7).

3.2 MEMBRANA AMNIÓTICA

As membranas amnióticas foram obtidas em parceria com a PUC-PR, onde foram processadas e as recebemos prontas para o uso no experimento.

As membranas amnióticas foram obtidas de parturientes (n=2, com 36 a 40 semanas de idade gestacional), depois que cada mãe assinou um termo de doação de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR. As membranas coletadas foram processadas no período de seis a 12 horas depois do parto normal.

A descelularização da matriz amniótica foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®). Para esse processo, as membranas foram retiradas do meio (PBS) tampão fosfato pH 7.2 (Gibco) e tratadas com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% por 24 horas a 37°C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109 M, Nova Ética Ltda.). Depois foram conservadas em PBS a 4° C. De acordo com a metodologia descrita por Hopper et al. (2003).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 96 ratos Wistar machos (2 meses pesando entre 250 – 300 g) divididos em 2 grupos de 48 animais em cada, para que um desses grupos fosse submetido à eutanásia no 7º e outro no 14º dia, objetivando avaliar todo o processo de reparo tecidual, desde a fase inflamatória até a de remodelamento. Além disso, cada grupo de 48 animais foi subdividido em 4 grupos com 12 animais cada, agrupados em gaiolas específicas, com temperatura ambiente controlada entre 20±°C, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água ad libitum.

Os animais foram anestesiados com isoflurano 4% via inalatória e a região dorsal de cada animal foi tricotomizada e esterilizada com álcool 70%. Os ratos foram submetidos à lesão cutânea com um molde de 2 cm de comprimento e 2 cm de largura para delimitação da área da lesão a ser induzida. Após a demarcação com o molde, foi realizada a exérese do segmento de pele de espessura total na região do dorso entre as duas escápulas, seguindo modelo de lesão epitelial descrito por Carvalho et al. (2006) e adaptado pelo grupo.

Os animais foram divididos randomicamente em 4 grupos com n=12/ cada:

- I. Ferida;
- II. Ferida + Ácido Hialurônico (AH);
- III. Ferida + Membrana Amniótica (MA);
- IV. Ferida + MA + AH.

3.4 TRATAMENTO

Após a retirada da pele, nos animais do grupo I (controle) as feridas induzidas foram cobertas por curativo transparente e adesivo (Tegaderm), e a cicatrização se deu por segunda intenção. Já nos animais dos Grupos II, III e IV as feridas foram cobertas totalmente pela MA e/ou AH conforme aleatorização. Esta aplicação foi feita uma única vez.

Todos os animais foram anestesiados com isoflurano 4% na forma inalatória para assegurar a imobilização e aplicação correta dos tratamentos.

A eficácia do protocolo foi avaliada após um período de cicatrização de 7 dias em metade dos animais e em 14 dias na outra metade, objetivando avaliar a evolução da ferida e as fases inflamatórias nestes dois tempos.

3.5 EUTANÁSIA

Após esses procedimentos, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e mortos por decapitação em guilhotina, no sétimo e décimo quarto dia de tratamento. Em seguida, a pele/lesão de quatro animais de cada grupo foi retirada com margem de segurança de 0,5 cm para análise histopatológica e os oito restantes foram para análises bioquímicas e moleculares.

3.6 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS

O método fotográfico é uma alternativa precisa para medir a área da ferida, sendo uma técnica apropriada para feridas limpas, contaminadas ou não. Imagens digitais das feridas foram feitas na resolução: 3264 x 2448 pixels e analisadas pelo software IMAGEJ® 1.51. As imagens das lesões foram obtidas nos dias 0, 7 e 14 do tratamento, para verificação visual da evolução do processo de cicatrização e mensuração do tamanho delas (área, comprimento e largura) calculando a variação das áreas das feridas neste período em cm². Essas mensurações foram feitas pelo mesmo pesquisador, sendo realizadas 5 mensurações de cada ferida e utilizado o valor médio.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de tecido epitelial do 7 e 14º dia foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As amostras retiradas foram fixadas por 24 horas na mesma solução (PFA

10%), e posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5 μ m de espessura. Quantificações histológicas da infiltração de leucócitos, fibroblastos, vasos sanguíneos e deposição de colágeno ocorreram com hematoxilina-eosina e tricrômio de Gomori, respectivamente. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, e foram capturados quatro campos oculares por corte (4 animais / grupo). As imagens foram gravadas com o auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas no software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear de células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (OD).

3.8 ENSAIOS

3.8.1 RT-PCR

As análises de expressão gênica dos marcadores NF- κ B e Nrf2 foram realizadas através de PCR – Real Time, em amostras do sétimo dia após tratamento. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies) e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O RNA obtido foi solubilizado em 30 μ l de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20°C. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria em absorbância a 260 nm e 280nm. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm estavam entre 1,8 e 2,0. Logo após, o DNA complementar foi sintetizado através da transcriptase reversa M-MLV, que promove uma fita de DNA complementar a partir de RNA de fita simples. A parte final incluiu a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, por meio do sistema do corante SYBR Green, que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação.

3.8.2 Imunoensaio Enzimático

As amostras foram processadas e após, a placa foi sensibilizada para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, TGF- β) foi utilizado o método enzyme-linked immuno absorbent assay (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

3.8.3 Determinação intracelular de ROS e óxido nítrico

3.8.3.1 Diclorofluoresceína – DCFH-DA

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ROS de acordo com o método descrito anteriormente por Dong (2010), com algumas modificações.

3.8.2.2 Indicador da formação de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N1 (naphthylethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em $\mu\text{mol Nitrito/mg proteína}$ (Chae et al., 2004).

3.8.3 Marcadores de dano oxidativo

3.8.3.4 Conteúdo de Sulfidrina

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor (DTNB), que reduzirá os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), que foi mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

3.8.3.5 Carbonilação de proteínas

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹. Cm⁻¹.

3.8.4 Defesas antioxidantes

3.8.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). Os volumes de 5, 10 e 15ul foram retirados das amostras de homogenado de tecido epitelial, nas quais 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175•185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5ul adrenalina (60mM em água destilada +15ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

3.8.4.2 Glutationa (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado no homogenado de tecido epitelial após precipitação de proteína com 1mL proteína de ácido

tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ M DTNB. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutatona reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.8.5 Conteúdo de Proteínas

O teor de proteína a partir do homogenado de tecido epitelial foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). Reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar-se à proteína. Absorbância foi lida a 750nm.

3.9 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (StatisticalPackage for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

4.3 ANÁLISE DA CONTRAÇÃO DA FERIDA

A figura 3 representa a área de contração da ferida em cm^2 . No sétimo dia após a indução da ferida (figura 3A) os grupos não apresentaram diferença significativa. Contudo, quando analisamos no décimo quarto dia após a indução da ferida (figura 3B), foi possível ver uma diferença significativa na contração da ferida nos grupos em todos os grupos tratados em relação ao grupo Ferida, sendo que nos grupos Ferida+MA e Ferida+MA+AH a diferença significativa foi maior ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

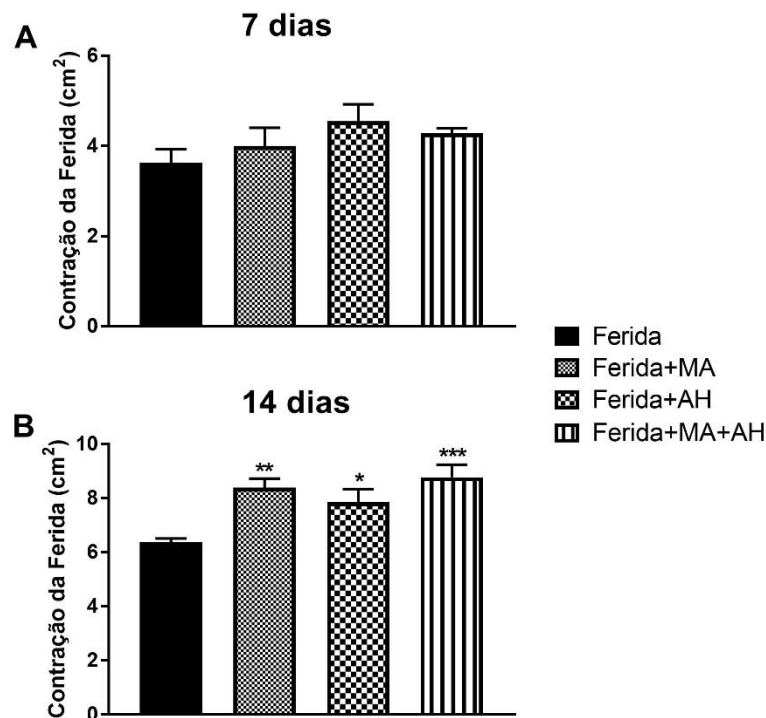


Figura 3: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de contração da ferida em que (A) contração da ferida em 7 dias e (B) contração da ferida em 14 dias. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; *** $p < 0,001$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na figura 4A observa-se imagens representativas de cortes histológicos do sistema tegumentar no sétimo dia após a indução da ferida, ao qual foram realizadas quantificações da média de número de infiltrado inflamatório (figura 4B) e da média do número de vasos sanguíneos (figura 4C), os quais não apresentaram diferença significativa. Já a média de número de fibroblastos (figura 4D) apresentou um aumento significativo no grupo das terapias combinadas (Ferida+MA+AH) em relação ao grupo Ferida enquanto na análise da compactação das fibras de colágeno (figura 4E) houve um aumento significativo no grupo Ferida +MA em relação ao controle.

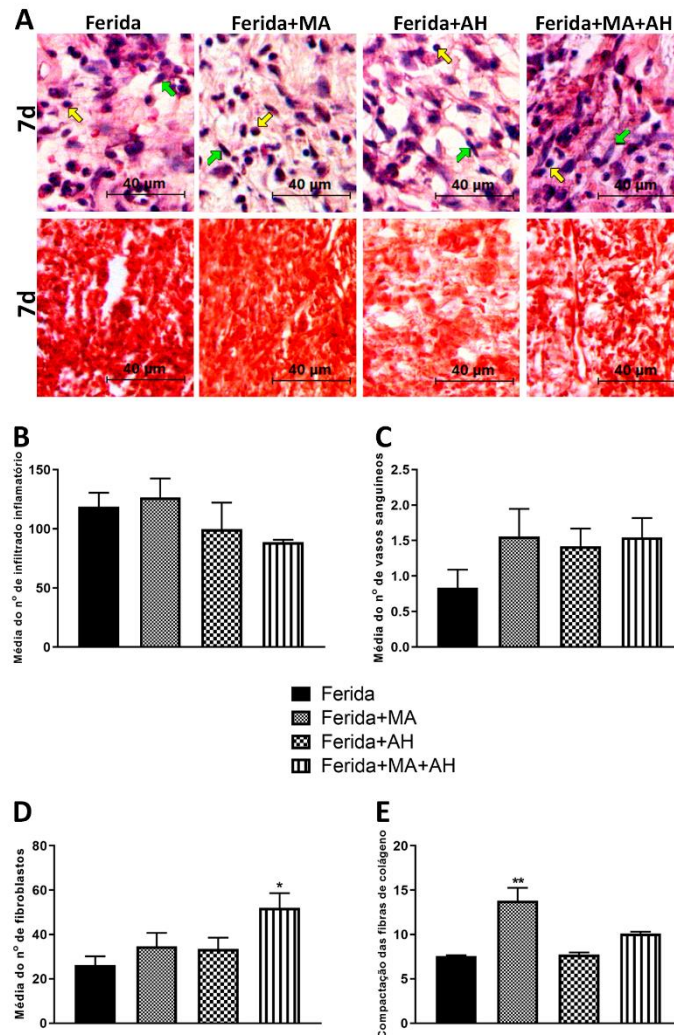


Figura 4: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de análise histológica no sétimo dia. (A) imagens representativas de cortes histológicos; (B) média do nº de infiltrado inflamatório; (C) média do nº de vasos sanguíneos; (D) média do nº de fibroblastos; (E) compactação das fibras de colágeno. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

Na figura 5A tem-se imagens representativas de cortes histológicos do sistema tegumentar agora no décimo quarto dia após a indução da ferida. Na quantificação da média de número de infiltrado inflamatório (figura 5B) houve uma diminuição significativa no grupo das terapias combinadas (Ferida+MA+AH) em relação ao grupo Ferida. Em relação à média do número de vasos sanguíneos (figura 5C), média de número de fibroblastos (figura 5D) e compactação das fibras de colágeno (figura 5E) não houve diferença significativa.

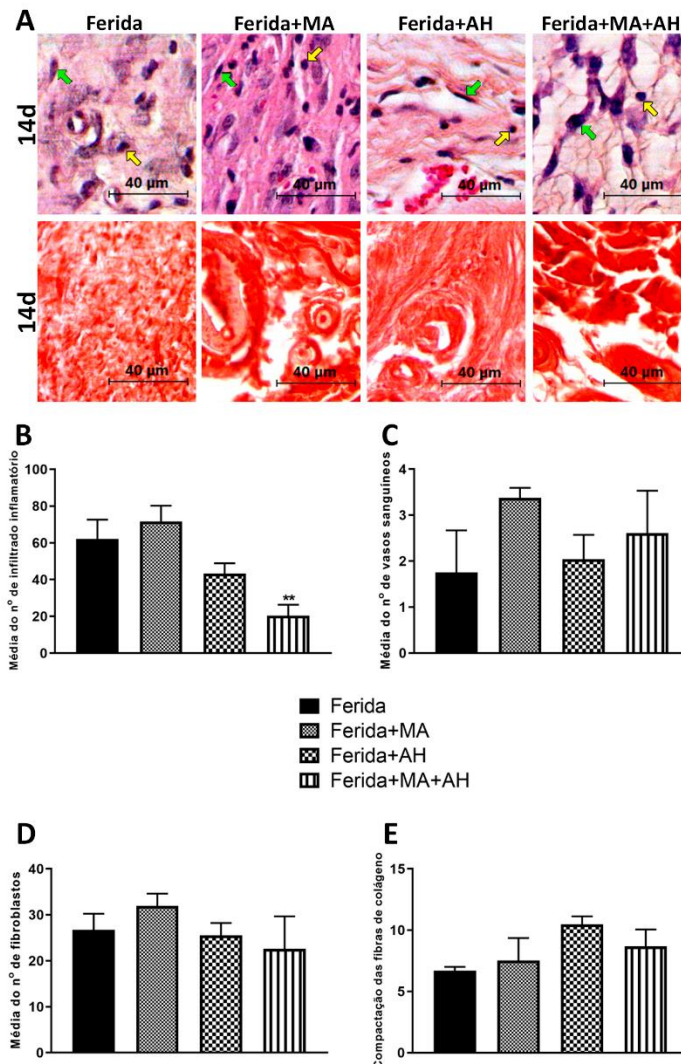


Figura 5: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de análise histológica no décimo quarto dia. (A) imagens representativas de cortes histológicos; (B) média do nº de infiltrado inflamatório; (C) média do nº de vasos sanguíneos; (D) média do nº de fibroblastos; (E) compactação das fibras de colágeno. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

4.5 RT-PCR

Na figura 6 está representada a análise da expressão gênica dos marcadores Nf- κ B e Nrf2 no sétimo dia após a indução da ferida. Quando analisado o conteúdo de mRNA de Nf- κ B (figura 6A), houve uma diminuição significativa nos grupos Ferida +MA e Ferida +MA+AH em relação ao grupo Ferida ($p < 0,05$). Já na análise do conteúdo de mRNA do Nrf2 (figura 6B) não houve diferença significativa entre os grupos.

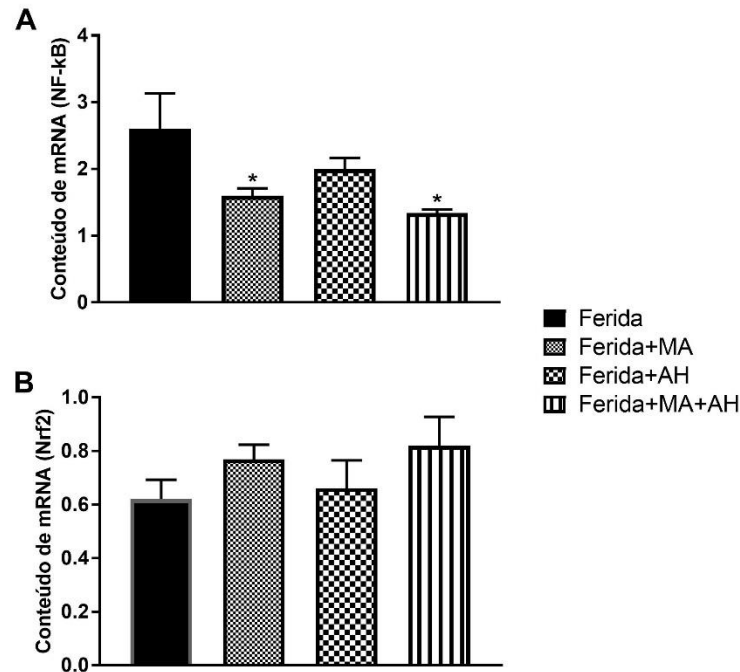


Figura 6: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros da expressão gênica dos marcadores Nf-k β e Nrf2 no sétimo dia. (A) conteúdo de mRNA (Nf-k β); (B) conteúdo de mRNA (Nrf2). Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida. (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

4.6 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

4.6.1 Citocinas Pró-Inflamatórias

Na figura 7 estão representados os níveis proteicos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1 β e IL6 no sétimo dia após a indução da ferida. Quando avaliados os níveis de TNF- α (figura 7A), houve uma diminuição significativa em todos os grupos em relação ao grupo Ferida, sendo que esta diferença foi maior ($p < 0,01$) para o grupo Ferida +AH; o mesmo aconteceu com os níveis da citocina IL6 (figura 7C). Já os níveis de IL1 β (figura 7B) apresentaram uma diminuição significativa somente no grupo Ferida +MA+AH em relação ao grupo Ferida.

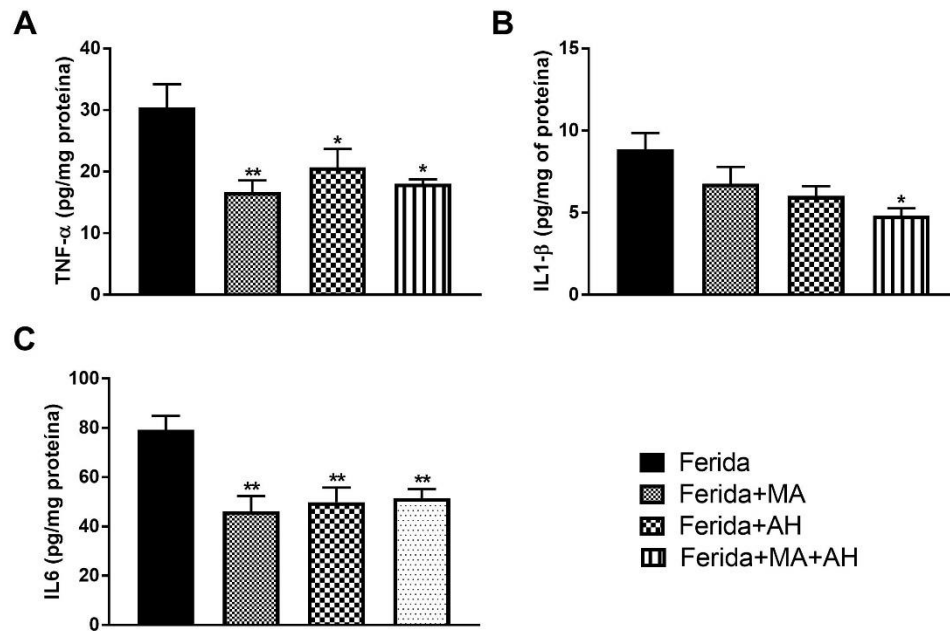


Figura 7: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas pró-inflamatórias no sétimo dia em que (A) TNF- α ; (B) IL1 β ; (C) IL6. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

Agora na avaliação das citocinas pró-inflamatórias no décimo quarto dia após a indução da ferida, os níveis de TNF- α (figura 8A) apresentaram uma diminuição significativa em todos os grupos em relação ao grupo Ferida ($p < 0,001$), assim como nos níveis de IL1 β (figura 8B), em que houve uma diminuição significativa de todos os grupos em relação ao grupo Ferida ($p < 0,01$), sendo que nos grupos Ferida+MA e Ferida+MA+AH a diferença foi significativamente maior ($p < 0,0001$). Em relação aos níveis de IL6 não houve diferença significativa.

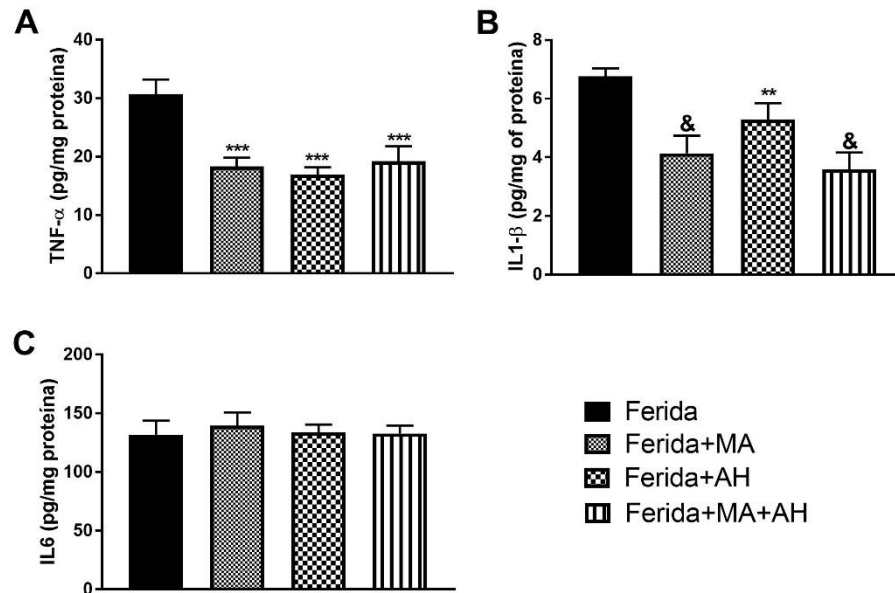


Figura 8: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas pró-inflamatórias no décimo quarto dia em que (A) TNF- α ; (B) IL1 β ; (C) IL6. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; *** $p < 0,001$ v.s Grupo Ferida; & $p < 0,0001$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

4.4.2 Citocinas Anti-Inflamatórias

Na figura 9 estão representados os níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias (IL10, IL4 e TGF- β) no sétimo dia após a indução da ferida. Somente houve diferença significativa nos níveis de IL4 (figura 9B) onde observa-se um aumento significativo no grupo de terapias combinadas (Ferida+MA+AH) em relação ao controle.

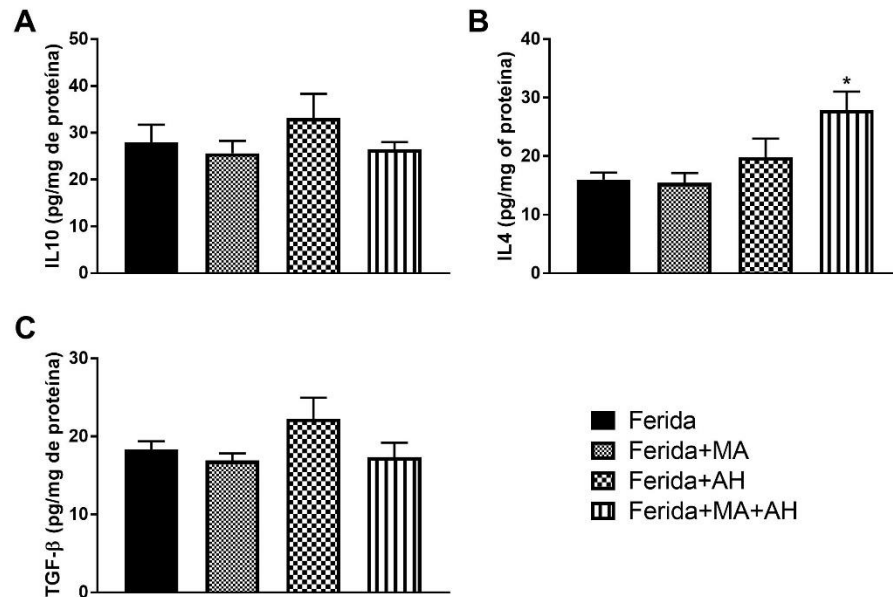


Figura 9: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas anti-inflamatórias no sétimo dia em que (A) IL10; (B) IL4; (C) TGF- β . Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

Os níveis proteicos das citocinas anti-inflamatórias no décimo quarto dia após a indução da ferida estão representados na figura 10. Observou-se um aumento muito significativo da citocina IL10 (figura 10A) no grupo Ferida+MA+AH em relação ao grupo Ferida ($p < 0,0001$); o mesmo ocorreu com os níveis de IL4 ($p < 0,001$) (figura 10B).

O fator de crescimento TGF- β (figura 10C) apresentou um aumento significativo em todos os grupos em relação ao grupo Ferida, sendo que no grupo Ferida +MA essa diferença foi de $p < 0,01$; no grupo Ferida+AH de $p < 0,05$ e no grupo Ferida+MA+AH de $p < 0,0001$.

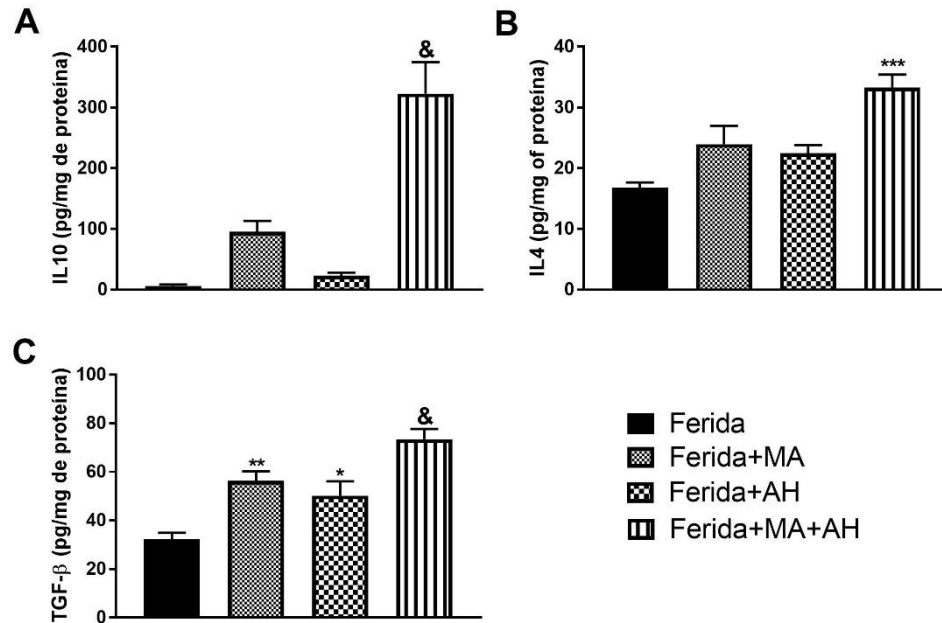


Figura 10: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros de citocinas anti-inflamatórias no décimo quarto dia em que (A) IL10; (B) IL4; (C) TGF-β. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; *** $p < 0,001$ v.s Grupo Ferida; & $p < 0,0001$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

4.7 PARÂMETROS OXIDATIVOS

Foi feita a análise de oxidantes, dano oxidativo e antioxidantes em 7 e 14 dias; na figura 11 temos os resultados do sétimo dia após a indução da ferida.

Para avaliação dos oxidantes analisou-se os níveis de DCF e Nitrito. Os resultados de DCF (figura 11A) no sétimo dia não apresentaram diferença significativa; já os níveis de nitrito (figura 11B) mostram uma diminuição significativa no grupo Ferida+MA+AH em relação ao grupo Ferida ($p < 0,05$).

Afim de avaliar o dano oxidativo, mediu-se os níveis de Carbonil e conteúdo de Sulfidril. Obtivemos uma redução significativa nos níveis de grupos carbonila (figura 11C) nos grupos Ferida+AH ($p < 0,05$) e Ferida+MA+AH ($p < 0,01$) em relação ao grupo Ferida. O conteúdo de sulfidril (figura 11D) não apresentou diferença significativa.

Em relação aos efeitos antioxidantes, foram medidas as enzimas SOD e GSH. Os níveis da SOD (figura 11E) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo das terapias combinadas (Ferida+MA+AH) em relação ao controle; o mesmo ocorreu com os níveis de GSH ($p < 0,01$).

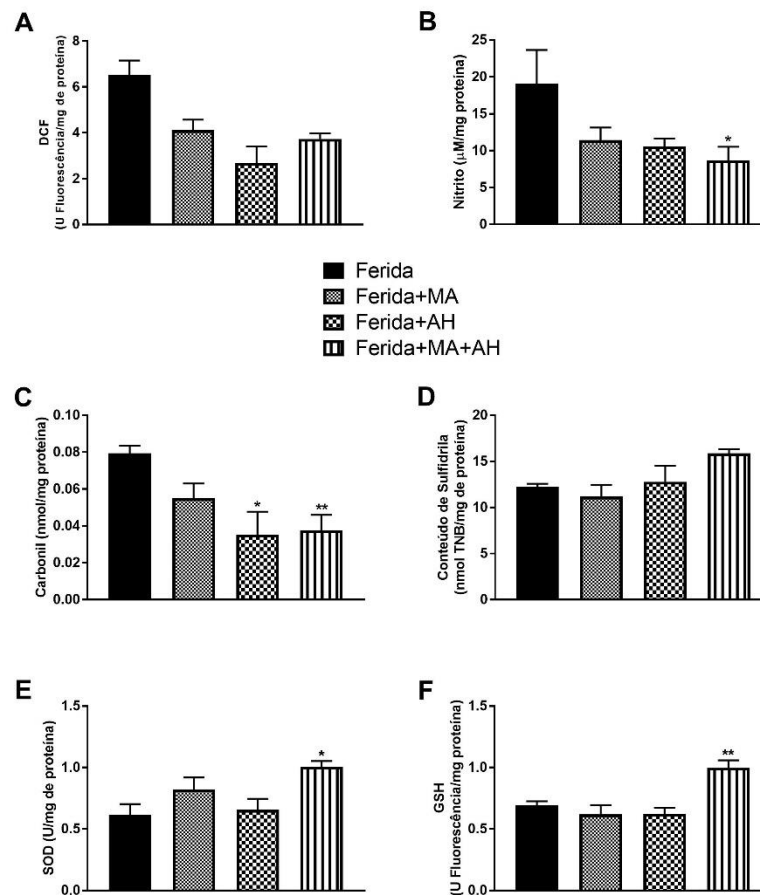


Figura 11: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros oxidativos no sétimo dia em que (A) DCF; (B) Nitrito; (C) Carbonil; (D) Conteúdo de sulfidril; (E) SOD; (F) GSH. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

Na figura 12 temos os resultados de parâmetros oxidativos no décimo quarto dia após a indução da ferida.

Observou-se que os resultados dos oxidantes DCF e Nitrito (figura 12 A e B) já não apresentaram diferença significativa, assim como aconteceu com os marcadores de dano oxidativo Carbonil e Sulfidril (figuras 12 C e D).

Porém, em relação ao sistema antioxidante, foram medidas as enzimas SOD e GSH e os níveis da SOD (figura 12E) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo das terapias combinadas (Ferida+MA+AH) em relação ao controle; o mesmo ocorreu com os níveis de GSH ($p < 0,01$).

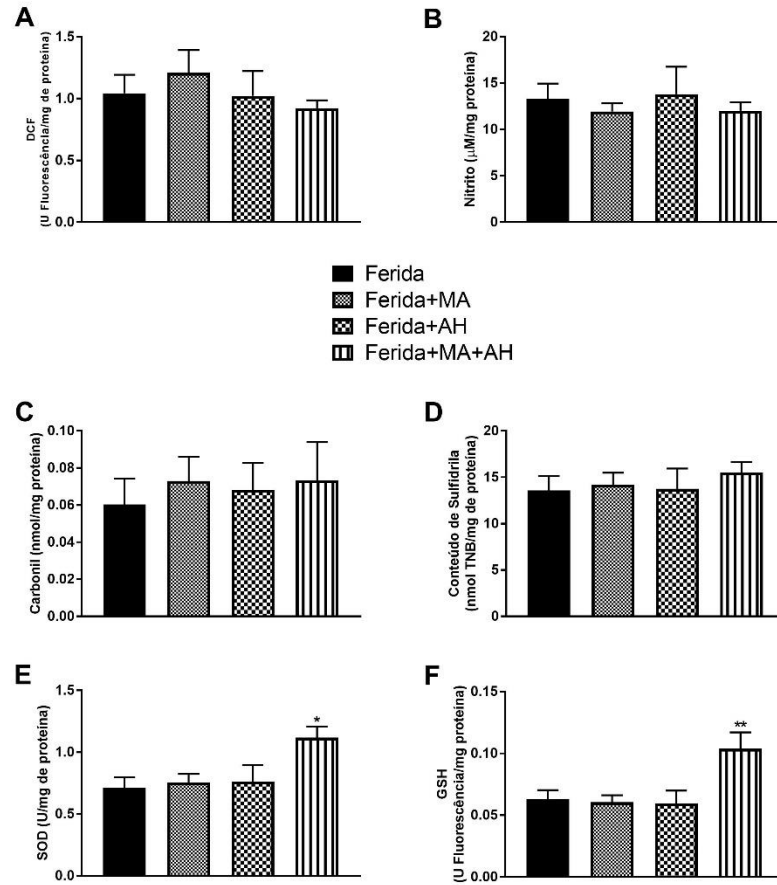


Figura 12: Efeitos do tratamento com Membrana Amniótica e Ácido Hialurônico sobre parâmetros oxidativos no décimo quarto dia em que (A) DCF; (B) Nitrito; (C) Carbonil; (D) Conteúdo de sulfidril; (E) SOD; (F) GSH. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Ferida; ** $p < 0,01$ v.s Grupo Ferida; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as lesões de um modo geral são responsáveis por 9% da mortalidade global, com um número muito maior de hospitalizações associadas e visitas a departamentos de emergência em comparação com outras causas de mortalidade. Muitas das lesões são acompanhadas por feridas na pele (OMS, 2017).

Na ocorrência de uma lesão de pele, fato que pode decorrer de vários fatores, o processo de cicatrização tem início, sendo estimulado e controlado por vários fatores de crescimento e citocinas (Diegelmann e Evans, 2004). Feridas profundas que destroem completamente a epiderme e parte da derme têm impactos funcionais, como comprometimento da oxigenação da pele e efeitos na capacidade de cicatrização do tecido, com a possibilidade de levar à desidratação, choque e contração de infecções. Para que isso não ocorra, a cobertura imediata das feridas é uma medida essencial a ser tomada.

Curativos com propriedades semelhantes a um hidrogel têm sido uma boa aplicação clínica para o tratamento de feridas, uma vez que fazem uma melhor cobertura de ferida que curativos secos tradicionais, além de serem eficazes em reter e criar um ambiente úmido dentro da ferida para facilitar a cicatrização (Wang et al., 2020).

Para um processo de cicatrização bem sucedido é necessário um microambiente de tecido com altos níveis de proteínas bioativas, como fatores de crescimento, fibroblastos funcionais, queratinócitos e células endoteliais vasculares. Em contrapartida, a inflamação persistente, senescência celular, deficiências de fator de crescimento, altos níveis de biocarga, concentrações elevadas de proteases destrutivas e deficiências de células-tronco são características inerentes a feridas crônicas, prejudiciais ao processo de reparo. Produtos avançados de tratamento de feridas, como curativos a base de membrana amniótica, podem melhorar essas propriedades destrutivas que geralmente estão presentes em feridas crônicas; fornecendo uma oportunidade para uma cura mais rápida e completa, o que reduz o risco de morbidade significativa associada à infecção; e pode muito bem reduzir os custos dos cuidados de saúde (Tettelbach et al., 2019).

A primeira aplicação de membrana amniótica (MA) documentada há mais de cem anos foi relatada como um curativo biológico para acelerar o processo de cicatrização em úlceras de pele. Imunomodulação, epitelização, características anti-inflamatórias, anti-angiogênicas e anti-fibroblásticas podem promover a cura de vários tipos de feridas. O campo mais conhecido de uso da MA revisado por diferentes autores é a engenharia de tecidos para cicatrização de feridas (Nejad et al., 2018).

O ácido hialurônico possui muitas propriedades que o tornam um material desejável na cicatrização de feridas. É um componente de glicoaminoglicano da matriz extracelular que ocorre naturalmente na pele, cartilagem e tecidos conjuntivos. Diversos estudos clínicos demonstram que os curativos à base de AH são eficazes no tratamento de feridas impedindo que tornem-se crônicas, principalmente em termos de segurança e eficácia (Voinchet et al., 2006).

A partir do exposto, este trabalho avaliou o efeito da aplicação da membrana amniótica descelularizada e solubilizada com ácido hialurônico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em pele de ratos Wistar no sétimo e décimo quarto dia após a indução da ferida. Ao analisarmos os dados do décimo quarto dia, é possível observar que o tratamento proposto através da combinação de membrana amniótica e ácido hialurônico foi capaz de acelerar a cicatrização de feridas, tendo em vista que houve um aumento significativo no nível de contração da ferida nos grupos Ferida+AH, Ferida+MA e Ferida+MA+AH em relação ao grupo Ferida. Estes dados corroboram com o estudo de Castellanos et al. (2017) que propõe que a MA pode exercer seus efeitos na cicatrização de feridas, acelerando a migração de queratinócitos da borda da ferida e que fatores de crescimento e células progenitoras liberadas pela MA podem mediar o efeito estimulatório na epitelização, assim como dados recentes de Zhao et al. (2016) indicam fortemente que fatores de crescimento e citocinas devem ser responsáveis pelo efeito da MA na migração.

A inexistência de diferenças entre os grupos no sétimo dia em relação à contração das feridas, parece indicar que o processo de cicatrização ainda estava em fase aguda, resultado este que corrobora com o estudo de Murphy et al. (2017), onde percebe-se existentes limitações significativas a este modelo, como o fato de que os animais utilizados no estudo tem um melhor potencial de regeneração que os humanos, onde grandes feridas agudas dificilmente cicatrizam sem intervenção.

Além disso, as células amnióticas têm a capacidade de expressar b-defensinas, um grupo de peptídeos com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias cujos efeitos podem facilitar a migração dos queratinócitos sobre o leito da ferida (Higa et al., 2005).

O resultado discutido acima correlaciona-se ao obtido na análise histológica deste estudo, no qual observa-se ainda no sétimo dia após a indução da ferida um aumento significativo do número de fibroblastos no grupo Ferida+MA+AH e um aumento significativo das fibras de colágeno no grupo Ferida+MA em relação ao controle, resultados estes que vão de encontro ao de Chrissouli et al. (2010) que mostraram que as células do âmnion podem estimular a proliferação de fibroblastos durante a cicatrização de feridas. Esses efeitos podem ser atribuídos à presença de fatores de crescimento no líquido amniótico, especialmente FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (Nouri et al., 2018). Ressalta-se que os fibroblastos são essenciais na formação de granulação, contração da ferida, síntese da matriz, reparo da ferida e formação da cicatriz (Deng et al., 2018). Eles também produzem nova MEC, inicialmente rica em colágeno III, fibronectina e ácido hialurônico. O colágeno III é de produção rápida, com a matriz inicial atuando como uma barreira aos patógenos e à perda de soro e fluidos. Este é posteriormente degradado por proteases e remodelado pelos fibroblastos para ser substituído pelo colágeno tipo I, que tem uma resistência à tração muito maior, mas leva mais tempo para se depositar (Bainbridge, 2013).

John et al. (2019) desenvolveram a MA descelularizada como substituto da pele, sendo submetida à cultura de fibroblastos e queratinócitos nas faces cório e epidérmica. O efeito das células-tronco do líquido

amniótico humano na cicatriz fibrótica também mostrou o aumento do processo de cicatrização de feridas semelhante à cicatrização de feridas fetais no estudo de Fukutake (2019).

No décimo quarto dia foi possível observar uma redução significativa no número de infiltrado inflamatório presente no local da ferida no grupo Ferida+MA+AH em relação ao controle, o que nos propõe que mesmo numa fase mais avançada do processo inflamatório ainda houve diferença no número de células.

Sugere-se que o processo de cicatrização neste estudo tenha se dado de forma adequada devido aos efeitos conjuntos da membrana amniótica e do ácido hialurônico. O ácido hialurônico medeia a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular e também é uma molécula sinalizadora extracelular. Além disso, tem mostrado extensas atividades farmacológicas, incluindo imunorregulatória, anti-inflamatória, antioxidante e antienvhecimento. O ácido hialurônico foi recentemente usado como principal matéria-prima para construir andaimes de biomateriais em engenharia de tecidos (Luo et al., 2019). Além disso, acredita-se que tenham sido importantes os efeitos da membrana amniótica como aceleração da formação de tecido de granulação, o aumento da proliferação de fibroblastos, a melhoria da formação de capilares sanguíneos e o desenvolvimento de feixes de colágeno que já foram mostrados como resultado dos experimentos de Momeni et al. (2018) e Rahman et al. (2019).

A fase inflamatória é uma fase importante da cicatrização de feridas, com liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL1 β e IL6 via ativação de NF- κ B, um fator de transcrição que resulta em uma resposta inflamatória via recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da ferida (Kandhare et al., 2014). Além disso, o NF- κ B regula a ativação, diferenciação e função efetora das células T inflamatórias. Não surpreendentemente, a ativação desregulada do NF- κ B é uma marca registrada das doenças inflamatórias crônicas (Liu et al., 2017). Em nossos resultados vê-se que no sétimo dia de análise houve uma diminuição significativa dos níveis de expressão deste marcador nos grupos Ferida+MA e Ferida+MA+AH, indicando que a MA pode ter agido inibindo os efeitos do NF- κ B, corroborando com os resultados de Bauer et al. (2012), cujos indicam que a MA influencia a via do NF- κ B provavelmente por meio de uma interação de fatores relacionados a MA com as subunidades IKK α/β , resultando em fosforilação suprimida de P-Ik β e fosforilação diminuída de NF- κ B. Outros estudos sugerem que o AH de alto peso molecular também regula negativamente o NF- κ B por via de seu receptor CD44 (Altman et al., 2019).

Neste estudo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1 β e IL6 apresentaram uma redução significativa de seus níveis nos grupos tratados em relação ao controle tanto nas análises do sétimo quanto do décimo quarto dia, o que nos sugere que as terapias propostas contribuíram para que o processo inflamatório ocorresse de forma mais rápida e satisfatória. A redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL1 β é importante para o reparo, dado que estes mediadores são capazes de causar apoptose e diminuir a proliferação de fibroblastos, resultando em retardo na cicatrização de feridas (Kandhare et al., 2016). Além disso, o TNF- α tem potencial para inibir a expressão do gene do TGF- β e do colágeno in vivo (Buck et al., 1996). Há ainda, evidências de que o TNF- α , na pele, induz moléculas de adesão e quimiocinas, levando à fixação de células inflamatórias aos vasos, rolamento, emigração e, eventualmente, quimiotaxia na pele. Além disso, células endoteliais dérmicas secretam

citocinas adicionais que formam um loop de feedback positivo em quimiocinas, citocinas e outras vias pró-inflamatórias induzidas por TNF- α . (Bashir et al., 2009).

Ademais, este estudo também identificou um aumento das citocinas anti-inflamatórias IL10, IL4 e TGF- β no grupo de terapias combinadas (Ferida+MA+AH) principalmente no décimo quarto dia de análise. Sabe-se que o aumento das citocinas anti-inflamatórias é essencial para o reparo final da ferida, já que as fibras de colágeno, principal componente funcional da camada de tecido da derme e essenciais para a resistência da ferida (chamada de "cicatriz"), são promovidas pelo TGF- β ; e a IL-10 desempenha um papel importante no controle da inflamação, danos aos tecidos mediados por imunidade e na redução do potencial de cicatrização (Nguyen, 2017), além de suprimir a liberação e a função de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL1, TNF- α e IL6, o que é um fator de feedback endógeno normal para o controle das respostas imunológicas e inflamatórias (Menon et al., 2006).

Os resultados deste estudo a cerca da expressão de citocinas vão de encontro aos apresentados acima, assim como com os obtidos no estudo de Solomon et al. (2001), onde foi observada redução da expressão de IL-1 α e β e aumento da citocina anti-inflamatória IL1RA em células cultivadas em MA após exposição ao LPS.

Curiosamente, o estudo de Ruiz-Cañada et al. (2018) mostrou que a inibição da sinalização de TGF- β , durante a estimulação de migração por MA, diminuiu parcialmente a migração de células induzida pela MA. Isso indica que um sinal de TGF ativo é necessário para que o MA desempenhe um papel melhor na migração celular; e a MA foi capaz de sintonizar definitivamente essa sinalização de TGF, assim como foi visto o aumento significativo deste fator de crescimento neste trabalho.

Acredita-se que os resultados do presente trabalho são justificados por alguns dos mecanismos anti-inflamatórios já conhecidos da membrana amniótica e do ácido hialurônico, mostrados a seguir.

Estudos sugerem que a membrana amniótica tenha ações anti-inflamatórias que atenuam os mediadores inflamatórios e aliviam a dor. Mais especificamente, os tecidos amnióticos mostraram regular negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL6, induzir a apoptose de células pró-inflamatórias, como neutrófilos ativados e macrófagos M1 e promover a polarização de células anti-inflamatórias, como o macrófago M2 e a citocina IL10. Embora a MA contenha uma miríade de fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular, existe uma hipótese de que os efeitos terapêuticos mencionados anteriormente se mostraram vir principalmente de um complexo molecular conhecido como HC-HA/PTX3 (Bennett, 2019; Tseng, 2015).

O complexo de cadeia pesada (HC)-hyaluronan(HA)/pentaxina 3(PTX3), é indicado como o componente chave no complexo cumulus-oócito que envolve o oócito ovulado para garantir a fertilização. Foi relatado que este composto promove significativamente a apoptose de neutrófilos recém-isolados após ativados por fMLP ou LPS, mas poupando neutrófilos em repouso. Da mesma forma, promove de forma dependente a apoptose de macrófagos ativados por IFN- γ ou LPS, mas não por macrófagos em repouso. A eliminação de neutrófilos apoptóticos por macrófagos M2 é essencial para resolver a inflamação. Portanto, HC-HA/PTX3 suprime as respostas pró-inflamatórias de neutrófilos e macrófagos envolvidos nas respostas imunes inatas (Tseng, 2015).

Um efeito anti-inflamatório também pode ser observado no ácido hialurônico; um dos mecanismos sugeridos é por meio de seu receptor de superfície celular para AH, o ICAM-1. A regulação positiva na expressão de receptores ICAM foi observada em tecidos inflamados e malignos. O sistema regulador da transcrição NF- κ B/I- κ B é um componente crítico da resposta inflamatória do hospedeiro, induzida pela ativação dos receptores de superfície celular mencionados anteriormente. Este sistema tem um papel essencial na transdução de sinais que levam à expressão de inúmeros genes envolvidos no processo inflamatório incluindo a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β , IL6 e IL8, bem como TNF- α (Altman et al., 2019). Além disso, Shao et al. (2013) observaram o impacto de ICAM-1 na terapia de AH em um modelo experimental de rato de cistite não bacteriana grave. Níveis elevados de ICAM-1, TNF- α e IL-6 foram observados no modelo de inflamação. Após o tratamento com AH, uma diminuição significativa em ICAM-1 foi observada, sugerindo que uma redução de ICAM-1 pode desempenhar um papel no efeito anti-inflamatório do AH.

Além disso, o ácido hialurônico de alto peso molecular também promove efeitos anti-inflamatórios por meio de outros receptores como CD44 e RHAMM. Através da ligação ao receptor CD44, regula negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e suprime a ativação de NF- κ B (Altman et al., 2019). Em relação ao RHAMM (receptor de motilidade mediada por ácido hialurônico), três estudos de Tolg et al. (2003; 2006; 2012) tiveram resultados efetivos demonstrando que o bloqueio da sinalização desse receptor em culturas de células de músculo liso inibiu a capacidade de migração das células, estimulou a proliferação de fibroblastos *in vitro* e provaram que o bloqueio da sinalização de AH com um peptídeo mimético de RHAMM foi capaz de reduzir a inflamação e fibrogênese em um modelo de ferida cutânea excisional. Corroborando com estes resultados, o presente trabalho foi capaz de demonstrar uma ação anti-inflamatória do ácido hialurônico isoladamente quando este foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α , IL1 β e IL6 e aumentar os níveis de TGF- β .

A MA descelularizada mostra propriedades anti-inflamatórias proeminentes e forneceu proteção mecânica e suporte funcional para a fixação, proliferação e migração celular. Sua matriz extracelular (MEC) é muito semelhante a muitos outros tecidos do corpo e o processo de descelularização não altera sua composição; é composta de glicoproteínas como laminina, fibronectina, além de colágeno dos tipos I, III, IV, V e VI. Além disso, contém ácido hialurônico fetal, que suprime a expressão de TGF- β 1, β 2 e β 3, bem como a expressão do receptor de TGF, proporcionando um efeito antifibrogênico (Wassmer e Berishvili, 2020).

O processo inflamatório leva à liberação de EROS (espécies reativas de oxigênio), que contribuem para a patogênese das feridas. O fator de transcrição Nrf2 é um potente ativador da transcrição e desempenha um papel central na expressão induzível de muitos genes citoprotetores em resposta a estresses oxidativos. Os genes alvo de Nrf2 estão envolvidos na síntese de glutatona, eliminação de espécies reativas de oxigênio e transporte de drogas (Taguchi et al., 2011). Neste trabalho a análise de Nrf2 no sétimo dia após tratamento não apresentou diferença significativa entre os grupos, o que nos leva a deduzir que não era mais necessário neste período, já tendo realizado a sua função anteriormente.

Ainda assim, foram avaliados neste estudo parâmetros oxidativos. Ressalta-se que as EROS são radicais de oxigênio altamente reativos, citotóxicos porque causam peroxidação dos fosfolípidios da membrana, o que resulta em aumento da permeabilidade e perda da integridade da membrana, inativação da enzima e dano estrutural ao ácido desoxirribonucléico, todos os quais levam à morte celular. Antioxidantes, por outro lado, neutralizam os efeitos desses radicais livres e, assim, protegem as membranas celulares da peroxidação lipídica. O estresse oxidativo ocorre quando há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio ou quando a capacidade antioxidante total diminui (Attaran et al., 2000).

Células não fagocíticas como os fibroblastos também geram EROS quando estimuladas por citocinas inflamatórias como PDGF, TNF- α , EGF e IL1 (Bankoti, 2020).

Quando foi observada uma redução dos níveis de espécies reativas de nitrogênio no grupo de terapias combinadas em relação ao controle no sétimo dia deste estudo, relacionamos com o estudo de Burlingame (2003) que demonstrou a existente capacidade antioxidante total do líquido amniótico; juntamente com a redução dos níveis do marcador de dano oxidativo Carbonil e também o aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH. Sugere-se que a MA é capaz de remover ROS de seu ambiente, já que quando foi exposta a várias concentrações de peróxido de hidrogênio (como uma fonte exógena de radicais livres), foi observado que houve captação das espécies reativas pela MA. A demonstração de sua capacidade antioxidante fornece evidências de sua ação “*scavenger*”, ou seja, sua capacidade de neutralizar radicais livres (Lockington et al., 2014).

Assim como no trabalho de Bankoti (2020), em que foi criada uma matriz dérmica descelularizada, solubilizada e bioativa, combinada com quitosana, pontos quânticos de carbono modificados com ROS e células tronco derivadas da membrana amniótica; foi observado que possui boa propriedade *scavenger* de ROS e potencial pró-angiogênico além de promover a migração de células in vitro. O potencial de eliminação de ROS neste caso é importante por diminuir o estresse oxidativo excessivo na área da ferida levando assim ao fechamento mais rápido da ferida.

Propõe-se que os mecanismos de redução do estresse oxidativo do ácido hialurônico também tenham estado envolvidos neste processo de redução dos marcadores oxidativos e aumento dos antioxidantes, por mais que ainda não sejam completamente compreendidos. O ácido hialurônico de alto peso molecular é uma molécula anti-inflamatória e imunossupressora potente. É bem conhecido que é capaz de regular negativamente os genes do NF- κ B e de várias interleucinas, além de ser capaz de neutralizar ROS intra e extracelulares (Meszaros et al., 2020).

O AH de alto peso molecular possui grupos funcionais hidroxila, que podem absorver ROS de forma presumida. Além disso, o AH interage com o receptor CD44 ativando as vias envolvidas na regulação do estado redox celular e na geração de ROS intracelular e também forma um revestimento citoprotetor na membrana celular e, como resultado, protege a célula da apoptose (Litwiniuk et al., 2016). Um estudo recente de Pereira et al. (2020) mostrou que o ácido hialurônico suprimiu o recrutamento de neutrófilos e a produção de citocinas em um modelo murino de inflamação aguda.

Por fim, nota-se que os mecanismos envolvidos na reepitelização da pele induzida por MA ainda são amplamente desconhecidos, porém já foi demonstrado que pode exercer seu efeito cicatrizante por meio da aceleração da migração de queratinócitos da borda da ferida e indução de sua diferenciação, contribuindo para a geração de epitélio intacto (Insausti et al., 2010). Já Niknejad et al. (2008) considerou que o efeito estimulatório na epitelização da borda da ferida é mediado por fatores de crescimento e células progenitoras liberadas pela MA.

Ressalta-se que a janela de cicatrização de feridas de 14 dias observada neste estudo nos fornece a oportunidade de comparar a influência dos tratamentos nas taxas de epitelização, fechamento da ferida e contração, porém pensamos que essas melhorias teriam um impacto ainda maior em feridas que demoram a cicatrizar.

Analisando os resultados como um todo, supõe-se que as terapias propostas agiram em conjunto para que houvesse uma aceleração do processo inflamatório para a fase de reparo, como pôde ser visto no resultado de contração das feridas, que se mostrou aumentada nos grupos tratados no décimo quarto dia. Observou-se ainda, redução do marcador NF- κ B, redução de citocinas pró-inflamatórias tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia, aumento de citocinas anti-inflamatórias principalmente no décimo quarto dia e atenuação do estresse oxidativo. Pelos resultados histológicos, observou-se um aumento do número de fibroblastos no grupo de terapias combinadas e um aumento das fibras de colágeno no grupo tratado com MA no sétimo dia, indicando a eficácia do processo de cicatrização.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a proposta de terapia combinada de membrana amniótica e ácido hialurônico favorece o processo de reparo tecidual da lesão epitelial.

Os resultados apresentaram redução de citocinas pró-inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias, aumento de TGF- β e atenuação do estresse oxidativo, reduzindo a resposta inflamatória aguda e promovendo o início do reparo tecidual.

O uso da membrana amniótica para o tratamento de feridas mostra-se promissor de acordo com seus vários mecanismos de ação e principalmente por sua rica composição de fatores auxiliares para o processo de cicatrização, ainda mais quando associada ao ácido hialurônico que já tem uso estabelecido nesta área.

Futuros estudos utilizando destes tratamentos serão válidos para melhor compreensão de seus mecanismos, inclusive sobre o metabolismo do colágeno e fenotipagem M1 e M2, além da descoberta de outras possíveis utilizações.

REFERÊNCIAS

- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001;302(2):141-45.
- Altman R, Bedi A, Manjoo A, Niazi F, Shaw P, Mease P. Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. *Cartilage*. 2019;10(1):43-52.
- Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med*. 2000;45(5):314-20.
- Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care*. 2013;22(8):407-8, 410-12.
- Bankoti K, Rameshbabu AP, Datta S, Roy M, Goswami P, Roy S, Das AK, Ghosh SK, Dhara S. Carbon nanodot decorated acellular dermal matrix hydrogel augments chronic wound closure. *J Mater Chem B*. 2020;8(40):9277-94.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 2006;32:279-312.
- Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF-alpha production in the skin. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(1):87-91.
- Bauer D, Hennig M, Wasmuth S, Baehler H, Busch M, Steuhl KP, Thanos S, Heiligenhaus A. Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor- γ positive alternatively activated macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(2):799-810.
- Bennett DS. Cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord particulate for managing pain caused by facet joint syndrome: A case series. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(10):e14745.
- Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70:2059–2081.
- Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha1(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol*. 1996;149(1):195-204.
- Burlingame JM, Esfandiari N, Sharma RK, Mascha E, Falcone T. Total antioxidant capacity and reactive oxygen species in amniotic fluid. *Obstet Gynecol*. 2003;101(4):756-61.
- Carvalho PTC, Mazzer N, Reis FA. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21:177–83.
- Castellanos G, Bernabé-García Á, Moraleta JM, Nicolás FJ. Amniotic membrane application for the healing of chronic wounds and ulcers. *Placenta*. 2017;59:146-53.
- Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomater Sci*. 2004;25(5):843-50.

- Chrissouli S, Pratsinis H, Velissariou V, Anastasiou A, Kletsas D. Human amniotic fluid stimulates the proliferation of human fetal and adult skin fibroblasts: the roles of bFGF and PDGF and of the ERK and Akt signaling pathways. *Wound Repair Regen.* 2010;18(6):643-54.
- Deng ZH, Yin JJ, Luo W, Kotian RN, Gao SS, Yi ZQ, Xiao WF, Li WP, Li YS. The effect of earthworm extract on promoting skin wound healing. *Biosci Rep.* 2018;38(2):BSR20171366.
- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 2004;9:283–89.
- Dong J, Sulik KK, Chen, S. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett.* 2010;193(1):94-100.
- Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014;67(5):662-75.
- Flohé L, Gunzler W. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
- Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 1997;242:27-33.
- Fukutake M, Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Sato Y, Otani T, Sakai S, Aramaki-Hattori N, Shimoda M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Kanai Y, Kishi K, Tanaka M. Human amniotic fluid stem cells have a unique potential to accelerate cutaneous wound healing with reduced fibrotic scarring like a fetus. *Hum Cell.* 2019;32(1):51-63.
- Garfias Y, Zaga-Clavellina V, Vadillo-Ortega F, Osorio M, Jimenez-Martinez MC. Amniotic Membrane is an Immunosuppressor of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Immunological Investigations.* 2010;40(2):183–96.
- Gholipourmalekabadi M, Farhadhosseinabadi B, Faraji M, Nourani MR. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? *Burns.* 2019;S0305-4179(18)30500-X.
- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering – in vivo and in vitro applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011;63(4–5):352–66.
- Groom M, Shannon RJ, Chakravarthy D, Fleck CA. An Evaluation of Costs and Effects of a Nutrient-Based Skin Care Program as a Component of Prevention of Skin Tears in an Extended Convalescent Center. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2010;37(1):46–51.
- Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(2):619-624.
- Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219–29.
- Hedlund, CS. Surgery of the Integumentary System. In: Fossum TW, editor. *Small Animal Surgery.* 3rd ed. St. Louis: Mosby, Inc; 2007. p.159-228.

Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea*. 2005;24(2):206-12.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1):214-226.

Hopper R, Woodhouse K, Semple JL. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering. *Ann Plast Surg*. 2003; 51(6):598-602.

Insausti CL, Alcaraz A, García-Vizcaíno EM, Mrowiec A, López-Martínez MC, Blanquer M, Piñero A, Majado MJ, Moraleda JM, Castellanos G, Nicolás FJ. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen*. 2010;18(4):368-77.

John S, Kesting MR, Paulitschke P, Stöckelhuber M, von Bomhard A. Development of a tissue-engineered skin substitute on a base of human amniotic membrane. *J Tissue Eng*. 2019;10:2041731418825378.

Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J Intern Med*. 1997; 242(1): 61–66.

Kandhare AD, Alam J, Patil MV, Sinha A, Bodhankar SL. Wound healing potential of naringin ointment formulation via regulating the expression of inflammatory, apoptotic and growth mediators in experimental rats. *Pharm Biol*. 2016;54(3):419-432.

Kandhare AD, Ghosh P, Bodhankar SL. Naringin, a flavanone glycoside, promotes angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis through modulation of inflammatory and growth factor expression in diabetic foot ulcer in rats. *Chem Biol Interact*. 2014;219:101-12.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186: 464-478.

Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds*. 2016;28(3):78-88.

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Trans Tar Ther*. 2017;2:170-23.

Lockington D, Agarwal P, Young D, Caslake M, Ramaesh K. Antioxidant properties of amniotic membrane: novel observations from a pilot study. *Can J Ophthalmol*. 2014;49(5):426-30.

Longinotti C. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: a review. *Burn Trauma*. 2014;2(4):162-8.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.

Luo Y, Ya-Wei C, Chang-Yin Y, Ru-Ming L, Yu-Jie Z, Dai-Xiong C, Jian-Jiang Z, Jian-Hui X. Effects of hyaluronic acid on differentiation of human amniotic epithelial cells and cell-replacement therapy in type 1 diabetic mice. *Exp. Cell Res*. 2019;384(2):111642.

Mamede A, Carvalho M, Abrantes A, Laranjo M, Maia C, Botelho M. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res*. 2012;349:447–58.

- Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25:19–25.
- Menon R, Ismail L, Ismail D, Meriardi M, Lombardi SJ, Fortunato SJ. Human fetal membrane expression of IL-19 and IL-20 and its differential effect on inflammatory cytokine production. *J Matern Fetal Neonatal.* 2006;19(4):209–14.
- Meszaros M, Kis A, Kunos L, Tarnoki AD, Tarnoki DL, Lazar Z, Bikov A. The role of hyaluronic acid and hyaluronidase-1 in obstructive sleep apnoea. *Sci Rep.* 2020;10(1):19484.
- Mickelson MA, Mans C, Colopy SA. Principles of Wound Management and Wound Healing in Exotic Pets. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2016; 19(1):33-53.
- Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36:1031–1037.
- Momeni M, Zarehaghghi M, Hajimiri M, Khorasani G, Dinarvand R, Nekookar A, Sodeifi N, Khosravani P, Shayanasl N, Ebrahimi M. In vitro and in vivo investigation of a novel amniotic-based chitosan dressing for wound healing. *Wound Repair Regen.* 2018;26(1):87-101.
- Mustoe TA, O’Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *J Plast Reconstr Surg.* 2006;117:35–41.
- Nejad AR, Hamidieh AA, Amirkhani MA, Sisakht MM. Update review on five top clinical applications of human amniotic membrane in regenerative medicine. *Placenta.* 2018;103:104-119
- Nguyen VL, Truong CT, Nguyen BCQ, Vo TV, Dao TT, Nguyen VD, Trinh DT, Huynh HK, Bui CB. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* Linn. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185674.
- Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater.* 2008; 15:88–99.
- Nouri M, Ebrahimi M, Bagheri T, Fatemi MJ, Najafbeygi A, Araghi S, Molaei M. Healing Effects of Dried and Acellular Human Amniotic Membrane and Mepitelas for Coverage of Skin Graft Donor Areas; A Randomized Clinical Trial. *Bull Emerg Trauma.* 2018; 6(3):195-200.
- Organização Mundial de Saúde. Injuries. Geneva: WHO; 2017.
- Ozturk F, Ermertcan AT. Wound healing: a new approach to the topical wound care. *Cutan Ocul Toxicol.* 2011;30:92–99.
- Papini R. Management of burn injuries of various depths. *BMJ.* 2004; 329:158–160.
- Parry S, Strauss JF 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998; 338:663-670.

- Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E. Skin wound healing and phytomedicine: a review. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014; 27:303–10.
- Pereira PAT, Bitencourt CS, Reis MB, Frantz FG, Sorgi CA, Souza COS, Silva CL, Gardinassi LG, Faccioli LH. Immunomodulatory activity of hyaluronidase is associated with metabolic adaptations during acute inflammation. *Inflamm Res*. 2020;69(1):105-13.
- Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. *Vascul Pharmacol*. 2015;71:31-6.
- Rahman MS, Islam R, Rana MM, Spitzhorn LS, Rahman MS, Adjaye J, Asaduzzaman SM. Characterization of burn wound healing gel prepared from human amniotic membrane and Aloe vera extract. *BMC Complement Altern Med*. 2019;19(1):115.
- 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):216–225.
- Salwowska NM, Bebenek KA, Zadlo DA, Welslo-Dziadecka DL. Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *J Cosmet Dermatol*. 2016; 15(4):520-526.
- Schulze U, Hampel U, Sel S, Goecke TW, Thäle V, Garreis F, Paulsen F. Fresh and cryopreserved amniotic membrane secrete the trefoil factor family peptide 3 that is well known to promote wound healing. *Histochem Cell Biol*. 2012; 138(2):243–250.
- Shao Y, Lu G, Shen ZJ, He H. Reduction of intercellular adhesion molecule 1 may play a role in anti-inflammatory effect of hyaluronic acid in a rat model of severe non-bacterial cystitis. *World J Urol*. 2013;31:535-40.
- Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J. R. Soc. Interface*. 2010; 7:229–258.
- Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(4):444-9.
- Sugahara SC, Murai T, Nishinakamura H. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem*. 2003; 278:32259–65.
- Strausberg J, Lehmann N, Kroger K, Maier I, Schneider H, Niebel W. Changes in secondary care may explain increasing pressure ulcer rates in an University Clinic in Germany. *Wound Management*. 2007;5:194–8.
- Taguchi K, Motohash H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011;16(2):123-140.
- Tettelbach W, Cazzell S, Reyzelman AM, Sigal F, Caporusso JM, Agnew PS. A confirmatory study on the efficacy of dehydrated human amnion/chorion membrane dHACM allograft in the management of diabetic foot ulcers: A prospective, multicentre, randomised, controlled study of 110 patients from 14 wound clinics. *Int Wound J*. 2019; 16:19–29.

Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko KA, et al. Rhamm^{-/-} fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol.* 2006;175(6):1017-28.

Tolg C, Hamilton SR, Zalinska E, et al. A RHAMM mimetic peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds. *Am J Pathol.* 2012;181(4):1250-1270.

Tolg C, Poon R, Fodde R, Turley EA, Alman BA. Genetic deletion of receptor for hyaluronan-mediated motility (Rhamm) attenuates the formation of aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene.* 2003;22(44):6873-6882.

Tseng SCG. HC-HA/PTX3 purified from amniotic membrane as novel regenerative matrix: insight into relationship between inflammation and regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(5):ORSFh1-8.

Vieira CPB, Araújo TME. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. *Rev Esc Enferm USP.* 2018;52:e03415.

Voinchet V, Vasseur P, Kern J. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of acute wounds. *Am J Clin Dermatol.* 2006; 7:353-357.

Volpi N, Schiller J, Stern R. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem.* 2009; 16:1718-45.

Wang B, Li W, Harrison J. An Evaluation of Wound Healing Efficacy of a Film Dressing Made from Polymer-integrated Amnion Membrane. *Organogenesis.* 2020;16(4):126-136.

Wassmer CH, Berishvili E. Immunomodulatory Properties of Amniotic Membrane Derivatives and Their Potential in Regenerative Medicine. *Curr Diab Rep.* 2020;20(8):31.

Werdin F, Tennenhaus M, Schaller HE, Rennekampff HO. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty.* 2009;9:e19.

Zhao B, Liu JQ, Zheng Z, Zhang J, Wang SY, Han SC, Zhou Q, Guan H, Li C, Su LL, Hu DH. Human amniotic epithelial stem cells promote wound healing by facilitating migration and proliferation of keratinocytes via ERK, JNK and AKT signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 2016;365(1):85-99.

ANEXO 1 – Certificado do CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 26/05/2020.

Título do projeto	Efeitos da aplicação de membrana amniótica descelularizada e solubilizada com ácido hialurônico na cicatrização de feridas cutâneas
Project title	Effects of the application of decellularized and solubilized amniotic membrane with hyaluronic acid on the healing of skin wounds
Número do protocolo Protocol number	17/2020
Pesquisador principal Principal Investigator	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores Researchers	Maria Eduarda Anastácio Borges Corêa, Laura de Roch Casagrande, Gustavo de Bem Silveira, Carolini Mendes, João Vítor Silvano Bittencourt, Lariani Tamires Witt Tietbohl, Germano Duarte Porto, Ligia Milanez Venturini, Leandro Almeida da Silva.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2020 a 01/08/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Idade/Peso	60 dias/250-300 g
Número de animais	Masculino = 96
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Criciúma-SC, 26 de maio de 2020.