RAFAEL AUGUSTO DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DA MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA,
TRATADA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO 0,01% E PRESERVADA EM GLICERINA
98%, USADA COMO ENXERTO EM SUBSTITUIÇÃO À PAREDE ABDOMINAL DE
RATOS WISTAR**

SÃO PAULO

2017

RAFAEL AUGUSTO DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DA MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA,
TRATADA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO 0,01% E PRESERVADA EM GLICERINA
98%, USADA COMO ENXERTO EM SUBSTITUIÇÃO À PAREDE ABDOMINAL DE
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Angelo João Stopiglia

SÃO PAULO

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3562
FMVZ

Azevedo, Rafael Augusto de

Avaliação macro e microscópica da membrana amniótica equina, tratada com dodecil sulfato de sódio 0,01% e preservada em glicerina 98%, usada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos Wistar / Rafael Augusto de Azevedo. -- 2017. 90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Angelo João Stopiglia.

1. Abdômen. 2. Âmnion. 3. Biomateriais. 4. Decelularização. 5. Músculo. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação macro e microscópica da membrana amniótica equina, tratada com Dodecil Sulfato de Sódio 0,01% e preservada em glicerina 98%, usada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos Wistar", protocolada sob o CEUA nº 5412230615, sob a responsabilidade de **Angelo João Stopiglia e equipe; Rafael Augusto de Azevedo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 28/10/2015.

We certify that the proposal "Macro and microscopic evaluation of equine amniotic membrane, treated with Sodium Dodecyl Sulfate 0,01% and preserved in glycerin 98%, used as graft in replacement of abdominal wall in Wistar rats", utilizing 20 Heterogenics rats (20 females), protocol number CEUA 5412230615, under the responsibility of **Angelo João Stopiglia and team; Rafael Augusto de Azevedo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/28/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **12/2016**

Área: **Clínica Cirúrgica Veterinária**

Origem: **Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **20**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **a**

Resumo: As membranas fetais são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento embrionário. Atualmente, dá-se muita importância ao âmnion, caracterizado por ser o material extra embrionário mais interno, cujos estudos concretizaram sua utilização como item adjuvante em algumas terapias. O âmnion, juntamente ao líquido amniótico, é considerado fonte de células-tronco e suas células podem ser caracterizadas como multipotentes. Apesar da existência de muitos trabalhos descritos, ainda permanece pouco observada a utilização deste material em defeitos de musculaturas abdominais. O objetivo do presente projeto é de avaliar o comportamento da membrana amniótica equina preservada em glicerina 98% e dos tecidos adjacentes, quando utilizada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos. Serão utilizados 20 ratos da espécie wistar. Defeitos abdominais abrangendo a musculatura abdominal ventral e o peritônio, medindo 2,0cm x 1,5cm serão criados para justaposição da membrana amniótica como enxerto. Serão criados 4 grupos de 5 animais para realização do procedimento e avaliações. O acompanhamento para coleta de dados será realizado até os 28 dias de pós-operatório, sendo nos dias 7, 14, 21 e 28. O acompanhamento será feito a cada grupo, separadamente. Serão avaliados aspectos macroscópicos (aderências de vísceras, fibroma, seroma e cicatrização) e histológicos. O objetivo da coleta de material para exame histológico, é avaliar a intensidade de reação inflamatória e cicatricial, baseando-se em infiltrados inflamatórios, tecido fibroso e fibroblastos. Para análise estatística será utilizado um delineamento inteiramente casualizado. A verificação de normalidade dos resultados será feita pelo teste Shapiro-Wilk e as variâncias comparadas pelo teste F, adotando-se nível de significância de 5%.

Local do experimento:

São Paulo, 13 de setembro de 2017

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Claudia Madalena Cabrera Mori

Vice-Presidente

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 27 de outubro de 2016
CEUA N 5412230615

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Angelo João Stopiglia

Área: Clínica Cirúrgica Veterinária

Angelo João Stopiglia (orientador)

Título da proposta: "Avaliação macro e microscópica da membrana amniótica equina, tratada com Dodecil Sulfato de Sódio 0,01% e preservada em glicerina 98%, usada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos Wistar".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Notificação (versão de 22/setembro/2016) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitação de aumento do N amostral do presente trabalho para 48 animais: Após exame de qualificação, a banca examinadora, a qual aprovou a qualificação apresentada, sugeriu alguns ajustes na metodologia. Dentre tais sugestões, o aumento do N amostral do presente trabalho. O motivo deste aumento se dá pela necessidade de inclusão de mais grupos de animais, de modo a avaliar a membrana amniótica equina como enxerto em diferentes condições. Não somente em glicerina 98%. A decelularização de materiais é um procedimento utilizado atualmente com o objetivo de remover as células, bem como seus debris e DNA, acarretando na diminuição das reações adversas apresentadas pelo animal receptor, melhorando sua biocompatibilidade e permitindo melhor sustentação e trabalho da matriz extracelular no processo de cicatrização e reconstrução. Portanto, serão avaliadas no presente trabalho, membranas preservadas em glicerina 98% e, também, membranas decelularizadas, de modo a concluir qual é o método mais eficaz de preparação, manutenção da matriz extracelular (estrutura fundamental para criação de biomateriais e reparação tecidual) e preservação deste material. Neste trabalho serão realizados processos simples de decelularização, associando um método físico (congelamento) com um método químico (detergente SDS 1%). A inclusão de mais grupos, para utilização do material também nestas condições, permitir-nos-á avaliação mais precisa, no que se refere à qualidade da matriz extracelular da membrana amniótica, trazendo-nos um trabalho mais completo, com confiabilidade consideravelmente maior nos resultados que serão obtidos. Segue nova metodologia e divisão de grupos no documento anexado."

Comentário da CEUA: "Projeto aprovado."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Claudia Madalena Cabrera Mori

Vice-Presidente

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 13 de setembro de 2017
CEUA N 5412230615

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Angelo João Stopiglia

Área: Clínica Cirúrgica Veterinária

Angelo João Stopiglia (orientador)

Título da proposta: "Avaliação macro e microscópica da membrana amniótica equina, tratada com Dodecil Sulfato de Sódio 0,01% e preservada em glicerina 98%, usada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos Wistar".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Notificação (versão de 12/setembro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Encaminhamos novo resumo, atualizado, para readequação no sistema CEUA, assim como no certificado que será emitido. Julgamos necessário, visto que o certificado deve ser incluído à dissertação com o mesmo texto. Portanto, segue abaixo: Os procedimentos de reconstrução de parede abdominal são importantes na rotina cirúrgica de pequenos animais e, apesar da sua baixa casuística, normalmente são realizados por consequência de traumas ou neoplasias. O material ideal a ser utilizado permanece sem unanimidade e sua busca é constante. Diversos materiais de origem sintética e biológica são pesquisados, apresentando prós e contras. Entretanto, a maior utilização aparenta ser a malha de polipropileno. Em contrapartida, a membrana amniótica é estudada atualmente, demonstrando melhor aceitação dos pacientes, assim como menor reatividade. Junto às boas informações sobre a membrana amniótica, se tem estudado processos de decelularização de tecidos como técnicas de bioengenharia tecidual, o qual criam-se materiais imunologicamente compatíveis, aumentando sua biocompatibilidade, com melhor resposta cicatricial e menor inflamação do hospedeiro no período pós-operatório. O presente trabalho objetivou avaliar macro e microscopicamente a membrana amniótica equina mantida em meio de preservação tradicional (glicerina 98%) e tratada com solução utilizada para decelularização, em baixa concentração (detergente Dodecil Sulfato de Sódio □ Sodium Dodecyl Sulfate □ SDS 0,01%), a fim de mensurar possíveis diferenças de resultados apresentados pelos hospedeiros. Foram formados dois grupos (grupo I e grupo II) contendo 15 animais em cada. Os animais do grupo I receberam a membrana amniótica tratada com SDS 0,01%, assim como os animais do grupo II receberam a membrana preservada em glicerina 98%. Cada grupo foi dividido em três subgrupos, contendo cinco animais em cada. O primeiro subgrupo foi avaliado aos sete dias de pós-cirúrgico (M1), o segundo aos 20 dias (M2), e o terceiro aos 40 dias (M3). Após anestesia geral, segmento de aproximadamente 2,0cm x 1,5cm foi retirado da parede abdominal de cada rato, para criação de defeito abdominal, e substituído pelo material a ser avaliado, suturado com fio náilon 5-0 em padrão simples interrompido, seguido de sutura cutânea em □U□ horizontal com fio náilon 4-0. Informações macro e microscópicas foram coletadas e analisadas estatisticamente. As avaliações macroscópicas não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, mostrando bons resultados quanto a prevenção das aderências viscerais ao implante. A avaliação microscópica mostrou diferença importante de contagem celular no terceiro momento de avaliação (M3) entre os grupos, sendo que o grupo I apresentou menor intensidade de células inflamatórias em comparação ao grupo II ($p=0,002973$). A eficiência do detergente SDS 0,01% não foi boa, devido manutenção de conteúdo nuclear ao avaliar o material em lâminas histológicas. Pode-se concluir com o presente estudo que, a membrana amniótica equina pode ser utilizada para reconstrução de parede abdominal em ratos Wistar, pois, mostrou bom resultado, não causando aderências viscerais e, consequentemente, sem comprometimento de quaisquer funções. O grupo I mostrou importante queda na contagem celular em comparação ao grupo II, levantando a hipótese de possível efeito do tratamento com SDS 0,01%. Porém, a total eficiência para decelularização avaliada ao final, não foi boa, sugerindo melhores abordagens aos protocolos de decelularização, aumentando a concentração da substância, o tempo de tratamento, assim como a associação com outras técnicas para melhor efetividade na total remoção do conteúdo celular da membrana amniótica equina."

Comentário da CEUA: "Foi apresentado o resumo com os dados obtidos no projeto justificando, inclusive, a redução do número de animais inicialmente proposto. "

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Claudia Madalena Cabrera Mori

Vice-Presidente

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AZEVEDO, Rafael Augusto

Título: **Avaliação macro e microscópica da membrana amniótica equina, tratada com dodecil sulfato de sódio 0,01% e preservada em glicerina 98%, usada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos meus pais **Antonio Mauricio** e **Teresa**, pelo irrestrito apoio e suporte ao longo de toda a vida, e à minha irmã **Isabella**, pelo imensurável carinho, companheirismo e sensibilidade em todos os momentos que vivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por me guiar em mais uma etapa e me permitir esse grande aprendizado técnico e evolução moral.

Ao professor Dr. Angelo João Stopiglia pela atenção, paciência, orientação e pela oportunidade concedida de ter essa experiência.

A todos os professores e pós-graduandos que, de alguma forma, estiveram envolvidos e apoiaram a realização do projeto.

À secretária do programa de pós-graduação do departamento de Clínica Cirúrgica Veterinária (VCI) Livia dos Santos Gimenes, pelo suporte, auxílio e paciência nos diversos momentos.

A todos os funcionários e enfermeiros que, também de alguma forma, auxiliaram na realização deste projeto.

“A felicidade e a saúde são incompatíveis com a ociosidade.”

Aristóteles

RESUMO

AZEVEDO, R. A. Avaliação macro e microscópica da membrana amniótica equina, tratada com dodecil sulfato de sódio 0,01% e preservada em glicerina 98%, usada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos Wistar. [Macro and microscopic evaluation of equine amniotic membrane, treated with Sodium Dodecyl Sulfate 0,01% and preserved in glycerin 98%, used as graft in replacement of abdominal wall in Wistar rats]. 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os procedimentos de reconstrução de parede abdominal são importantes na rotina cirúrgica de pequenos animais e, apesar da sua baixa casuística, normalmente são realizados por consequência de traumas ou neoplasias. O material ideal a ser utilizado permanece sem unanimidade e sua busca é constante. Diversos materiais de origem sintética e biológica são pesquisados, apresentando prós e contras. Entretanto, a maior utilização aparenta ser a malha de polipropileno. Em contrapartida, a membrana amniótica é estudada atualmente, demonstrando melhor aceitação dos pacientes, assim como menor reatividade. Junto às boas informações sobre a membrana amniótica, se tem estudado processos de decelularização de tecidos como técnicas de bioengenharia tecidual, o qual criam-se materiais imunologicamente compatíveis, aumentando sua biocompatibilidade, com melhor resposta cicatricial e menor inflamação do hospedeiro no período pós-operatório. O presente trabalho objetivou avaliar macro e microscopicamente a membrana amniótica equina mantida em meio de preservação tradicional (glicerina 98%) e tratada com solução utilizada para decelularização, em baixa concentração (detergente Dodecil Sulfato de Sódio – *Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS 0,01%), a fim de mensurar possíveis diferenças de resultados apresentados pelos hospedeiros. Foram formados dois grupos (grupo I e grupo II) contendo 15 animais em cada. Os animais do grupo I receberam a membrana amniótica tratada com SDS 0,01%, assim como os animais do grupo II receberam a membrana preservada em glicerina 98%. Cada grupo foi dividido em três subgrupos, contendo cinco animais em cada. O primeiro subgrupo foi avaliado aos sete dias de pós-cirúrgico (M1), o segundo aos 20 dias (M2), e o terceiro aos 40 dias (M3). Após anestesia geral, segmento de aproximadamente 2,0cm x 1,5cm foi retirado da parede abdominal de cada rato, para criação de defeito abdominal, e substituído pelo material a ser avaliado, suturado com fio náilon 5-0 em padrão simples interrompido, seguido

de sutura cutânea em “U” horizontal com fio náilon 4-0. Informações macro e microscópicas foram coletadas e analisadas estatisticamente. As avaliações macroscópicas não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, mostrando bons resultados quanto a prevenção das aderências viscerais ao implante. A avaliação microscópica mostrou diferença importante de contagem celular no terceiro momento de avaliação (M3) entre os grupos, sendo que o grupo I apresentou menor intensidade de células inflamatórias em comparação ao grupo II ($p=0,002973$). A eficiência do detergente SDS 0,01% não foi boa, devido manutenção de conteúdo nuclear ao avaliar o material em lâminas histológicas. Pode-se concluir com o presente estudo que, a membrana amniótica equina pode ser utilizada para reconstrução de parede abdominal em ratos Wistar, pois, mostrou bom resultado, não causando aderências viscerais e, conseqüentemente, sem comprometimento de quaisquer funções. O grupo I mostrou importante queda na contagem celular em comparação ao grupo II, levantando a hipótese de possível efeito do tratamento com SDS 0,01%. Porém, a total eficiência para decelularização avaliada ao final, não foi boa, sugerindo melhores abordagens aos protocolos de decelularização, aumentando a concentração da substância, o tempo de tratamento, assim como a associação com outras técnicas para melhor efetividade na total remoção do conteúdo celular da membrana amniótica equina.

Palavras-chave: Abdômen. Âmnion. Biomateriais. Decelularização. Músculo.

ABSTRACT

AZEVEDO, R. A. **Macro and microscopic evaluation of equine amniotic membrane, treated with Sodium Dodecyl Sulfate 0,01% and preserved in glycerin 98%, used as graft in replacement of abdominal wall in Wistar rats.** [Avaliação macro e microscópica da membrana amniótica equina, tratada com dodecil sulfato de sódio 0,01% e preservada em glicerina 98%, usada como enxerto em substituição à parede abdominal de ratos Wistar]. 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Abdominal wall reconstruction procedures are important in the surgical routine of small animals and, despite their low casuistry, are usually performed as a consequence of traumas or neoplasias. There is no unanimity as to the ideal material to be used in these procedures and, therefore, their demand is constant. Several materials, both of synthetic and biological origin, were and are researched nowadays, presenting advantages and disadvantages in its use. The preference, however, appears to be the polypropylene mesh. On the other hand, the amniotic membrane, currently studied, has demonstrated better patient acceptance as well as lower reactivity. In addition to the good information about the amniotic membrane, tissular decellularization processes have been studied as tissue bioengineering techniques, in which immunologically compatible materials are created, increasing their biocompatibility, with better cicatricial response and less inflammation of the host in the postoperative period. The aim of the present work was to evaluate the equine amniotic membrane maintained in a traditional preservation medium (glycerin 98%) and treated with a low concentration decellularization solution (Sodium Dodecyl Sulfate detergent - SDS 0,01%), in order to measure possible differences of results presented by the hosts. Two groups were formed (group I and group II) containing 15 animals each. The animals in group I received the amniotic membrane treated with SDS 0,01% while the animals in group II received the membrane preserved in glycerin 98%. Each group was divided into three subgroups, each containing five animals. The first subgroup (from each group) was evaluated at seven days postoperative (M1), second at 20 days (M2), and third at 40 days (M3). After a general anesthesia, a segment of approximately 2,0cm x 1,5cm was removed from the abdominal wall of each animal, to create abdominal defect, and replaced by the material to be evaluated, sutured with 5-0 nylon thread in a simple interrupted pattern, followed by horizontal “U” shaped skin suture

with 4-0 nylon thread. Macro and microscopic information were collected and analyzed statistically. The macroscopic evaluations did not present statistical differences between the groups, showing good results regarding the prevention of the visceral adhesions to the implant. Microscopic evaluation showed a significant difference in cell counts in the third evaluation period (M3) between groups, and group I presented lower inflammatory cell intensity compared to group II ($p=0,002973$). The efficiency of the SDS detergent 0,01% was not good, due to the maintenance of nuclear content, verified when evaluating the material in histological slides. It is concluded with the present study that equine amniotic membrane can be used for abdominal wall reconstruction in Wistar rats, demonstrating good results in not causing visceral adhesions and without compromising any functions. Group I showed an important decrease in the cell count in comparison to group II, raising the hypothesis of possible treatment effect with SDS 0,01%. However, the efficiency for the total decellularization evaluated at the end was not good, suggesting that there are better approaches within the decellularization protocols, such as increasing the concentration of the substance, the time of treatment, and the association with other techniques for better effectiveness in the total removal of the cellular contents of the equine amniotic membrane.

Keywords: Abdomen. Amnion. Biomaterials. Decellularization. Muscle.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Local onde os animais ficaram nos períodos pré e pós-cirúrgico. A) Prateleiras e caixas com capacidade para até cinco animais. B) Estrutura para entrada e saída de ar e controle de temperatura40
- Figura 2 - Para entendimento das marcas de identificação com canetas nas cores preta e verde. Abaixo, animal pertencente ao grupo I, M342
- Figura 3 - Amostras em frascos individualizados, submersos em solução de SDS 0,01% em aparelho homogeneizador43
- Figura 4 - Placa de cultivo com seis poços onde os fragmentos de membrana amniótica equina foram mantidos em PBS 1x + ATB 0,5%44
- Figura 5 - Etapas do procedimento cirúrgico realizado em cada animal. A) Incisão cutânea e visualização da linha alba. B) Criação do defeito abdominal, com parte da janela ainda mantida em região medial. C) Defeito abdominal criado completamente, com janela em região medial já removida. D) Membrana amniótica equina suturada com pontos simples interrompidos, utilizando fio náilon 5-0, substituindo a parede abdominal muscular e peritônio46
- Figura 6 - Amostra coletada para análise histopatológica após avaliação macroscópica. A) Representa 50% da circunferência do enxerto. B) As linhas pretas indicam as três regiões onde foram feitos os cortes histológicos (região cranial, média e caudal)48
- Figura 7 - Fotomicrografia em aumento de 4x para ilustração do funcionamento do *software* "ImageJ". A) Região de interface (seta preta), indicando tecido muscular saudável (MUSC.) e tecido amniótico coberto por infiltrado celular (MAE). B) Imagem em 8 bit, com retângulo amarelo selecionando da região de interface até o meio da imagem49
- Figura 8 - Região selecionada em amarelo (imagem 7, B). A) Imagem transformada em preto e branco. B) Após a contagem, as estruturas pretas selecionadas são marcadas em tom azulado50

- Figura 9 - Nova fotomicrografia em aumento de 40x para melhor visualização e entendimento. A) Fotomicrografia normal. B) Fotomicrografia transformada em imagem de 8 bit pelo *software* "ImageJ". C) Imagem de 8 bit transformada em preto e branco. D) Estruturas marcadas em azul são quantificadas50
- Figura 10 - Janela aberta pelo *software* "ImageJ" mostrando o número de estruturas contadas, circulado em verde.....51
- Figura 11 - Acesso do abdômen dos animais com incisão em "U" horizontal, de modo a rebater a musculatura abdominal lateralmente para avaliação macroscópica da região operada. A) Animal pertencente ao grupo I, M1 sem aderências de estruturas abdominais. B) Animal pertencente ao grupo I, M2 com aderência somente de omento maior (seta preta). C) Animal pertencente ao grupo I, M3, com aderências de omento maior (seta preta) e alça intestinal (seta vermelha)54
- Figura 12 - Acesso do abdômen dos animais em "U" horizontal para avaliação macroscópica. A) Animal pertencente ao grupo II, M1 com aderência de omento maior (seta preta). B) Animal pertencente ao grupo II, M2 com aderência de omento maior (seta preta) e gordura abdominal (seta vermelha). C) Animal pertencente ao grupo II, M3 sem aderências.....54
- Figura 13 - Fotomicrografias de animais pertencentes ao grupo I, em aumento de 4x. Musculatura abdominal saudável (MUSC.) e interface (seta preta). A) Animal pertencente ao M1. Nota-se tecido amniótico (MAE) limpo, ainda não coberto por células inflamatórias, porém, com atividade de células inflamatórias (C.I.) ao redor do material. B) Animal pertencente ao M2. Nota-se infiltrado celular sobre o material amniótico, já com dificuldade de delimitar aonde exatamente está a membrana amniótica. C e D) Animais pertencentes ao M3. Nota-se menor intensidade celular com maior predominância de tecido conjuntivo, sem contato direto entre musculatura e região de enxerto na interface, porém, sem remodelamento construtivo61
- Figura 14 - Fotomicrografias de animais pertencentes ao grupo II, em aumento de 4x. Musculatura abdominal saudável (MUSC.) e interface (seta preta). A e B)

Animais pertencentes ao M1. Nota-se tecido amniótico (MAE) limpo, ainda não coberto por células inflamatórias, porém, com atividade de células inflamatórias (C.I.) ao redor do material. C) Animal pertencente ao M2. Nota-se infiltrado celular sobre o material amniótico, já com dificuldade de delimitar aonde exatamente está a membrana amniótica. D) Animal pertencente ao M3. Nota-se padrão semelhante ao M2, com grande estrutura, espessa, mantendo celularidade no local onde foi realizado o enxerto. Imagens A, B, C e D com interface sem contato direto entre musculatura e local de enxerto.....62

Figura 15 - Fotomicrografia em aumento de 10x, de animal pertencente ao grupo II. Nota-se interface com espaço, mostrado pela seta preta de dois sentidos, apontando para musculatura e para região do enxerto e, portanto, sem contato direto da musculatura com local do enxerto63

Figura 16 - Fotomicrografia em aumento de 4x de animal pertencente ao grupo I, M3. Nota-se ausência de espaço entre musculatura abdominal saudável (MUSC.) e região do enxerto (MAE), mostrando contato direto entre as estruturas63

Figura 17 - Fotomicrografia referente à figura 16, porém em aumento de 10x. Nota-se ausência de espaço entre as estruturas e contato direto, com tecido conjuntivo mais denso64

Figura 18 - Fotomicrografia em aumento de 20x da membrana amniótica equina íntegra, não submetida a tratamento algum. Percebe-se material rico em tecido conjuntivo.....65

Figura 19 - Fotomicrografia em aumento de 40x da membrana amniótica equina tratada com detergente SDS 0,01%. Nota-se material nuclear (setas pretas) e, portanto, não foi efetivamente decelularizada65

Figura 20 - Fotomicrografia em aumento de 40x da membrana amniótica equina preservada em glicerina 98% durante período de 30 dias65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de p obtidos pelo teste de Wilcoxon não pareado.....	55
Tabela 2 - Valores das medianas e respectivos intervalos interquartis	55
Tabela 3 - Valores de p obtidos pelo teste de Friedman para os grupos I e II, referente às comparações entre os diferentes momentos para cada grupo	55
Tabela 4 - Valores das médias e respectivos desvios-padrão	57
Tabela 5 - Valores de p obtidos pelo teste T de Student.....	57
Tabela 6 - Valores de p obtidos pelo teste de Friedman (Total) para o Grupo I com os respectivos valores encontrados para cada comparação entre os momentos.....	58
Tabela 7 - Valores de p obtidos pelo teste de Friedman (Total) para o Grupo II.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - O gráfico mostra a comparação dos grupos nos três momentos de avaliação. Nota-se queda importante do bloco referente ao grupo I, em M358
- Gráfico 2 - Avaliação entre os tempos pós-cirúrgicos do grupo I, feito pelo teste de Friedman, indicando queda do bloco em M3, justificando diferença estatística entre M1 e M359
- Gráfico 3 - Avaliação entre os tempos pós-cirúrgicos do grupo II, feito pelo teste de Friedman, indicando ausência de diferença estatística entre os momentos60

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Dados referentes à avaliação de aderências de estruturas abdominais, utilizando escore entre “ausente” e “3+”56
- Quadro 2 - Dados referentes às contagens celulares. Valores obtidos pelo *software* “ImageJ”. À frente da identificação do animal, seguem os três números referentes às três regiões de corte das amostras. Abaixo da identificação do animal nota-se valor único, referente à média dos três valores obtidos. Dados referentes aos animais do grupo I.....66
- Quadro 3 - Dados referentes às contagens celulares. Valores obtidos pelo *software* “ImageJ”. À frente da identificação do animal, seguem os três números referentes às três regiões de corte das amostras. Abaixo da identificação do animal nota-se valor único, referente à média dos três valores obtidos. Dados referentes aos animais do grupo II.....66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	A RECONSTRUÇÃO DE PAREDE ABDOMINAL	25
2.1.1	Materiais utilizados na reconstrução de parede abdominal	25
2.2	A MEMBRANA AMNIÓTICA	29
2.2.1	Características físicas e funcionais	31
2.2.2	Aspectos histológicos	32
2.2.3	Aplicabilidade na medicina veterinária	33
2.3	ARMAZENAMENTO E PRESERVAÇÃO EM GLICERINA 98%	35
2.4	DECELULARIZAÇÃO NA BIOENGENHARIA TECIDUAL	36
3	OBJETIVO	39
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	DOS ANIMAIS	40
4.2	DELINEAMENTO	41
4.3	DA MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA	42
4.4	PREPARAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA	45
4.5	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	45
4.6	DAS AVALIAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS	47
4.6.1	Avaliação macroscópica	47
4.6.2	Avaliação microscópica	48
4.6.3	Análise estatística	52
5	RESULTADOS	53
5.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	53
5.2	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	56
5.3	EFICIÊNCIA DO DETERGENTE SDS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,01%	64
6	DISCUSSÃO	67
6.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	67
6.2	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	73
6.3	EFICIÊNCIA DO DETERGENTE SDS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,01%	78
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Os procedimentos para reconstrução de parede abdominal não são de grande casuística na rotina cirúrgica de pequenos animais, porém, apresentam sua importância devido sua incidência, na maioria das vezes, por consequência de traumas e neoplasias. Os trabalhos e a busca para o melhor material a ser utilizado neste procedimento reconstrutivo são intensos, não havendo ainda um consenso, no que se refere à melhor opção cirúrgica (GRECA et al., 2004; LEE et al., 2013).

Materiais biológicos e sintéticos já foram utilizadas para auxílio no reparo de defeitos musculares como, pericárdio bovino, malha de poliéster, polipropileno, peritônio e, até mesmo, músculo diafragma homólogo para correção de ruptura diafragmática em cães. Porém, considera-se que, as reações causadas por estes materiais, como por exemplo, intensas inflamações, aderências de estruturas abdominais, reduzida incorporação aos tecidos e fistulações, tornam as utilizações dos mesmos, pouco vantajosas (GOMES et al., 1999; MAZZANTI et al., 2001; QUITZAN et al., 2003; STELMANN et al., 2010; LEAL et al., 2014).

Em contraponto, a membrana amniótica vem sendo estudada em algumas lesões tanto na veterinária quanto medicina, demonstrando melhor aceitação do organismo e reações adversas menos intensas. Trabalho relacionado à oftalmologia veterinária, que descreve possível recuperação funcional da córnea tratada com membrana amniótica e reparo de lesão duodenal promovendo epitelização na região, mostram o potencial para melhor aceitação do organismo e melhor resposta a longo prazo, assim como trabalhos descrevendo a utilização deste material à fim de eliminar problemas referentes às aderências de estruturas abdominais ao local manipulado, o que é extremamente comum nos tratamentos convencionais de lesões e reparos em parede abdominal, relacionando inclusive, a face correta da membrana a ser direcionada à cavidade abdominal, com a intensidade de aderências viscerais (RENNEKAMPFF et al., 1994; BARROS et al., 1998; SCHIMIDT et al., 2010; PONTES et al., 2011).

Associado às boas informações no que se refere à membrana amniótica, tem-se estudado processos relacionados a bioengenharia tecidual, onde os materiais biológicos passam por procedimentos de decelularização. Estes procedimentos objetivam a remoção de componentes celulares e manutenção da matriz extracelular

(MEC), diminuindo, portanto, a carga de DNA, formando os biomateriais denominados “scaffolds”, conforme demonstram CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; MAZZA et al., 2015. Este procedimento da origem a estes biomateriais que, por sua vez, apresentam resultados melhores e mais eficientes devido a sua maior biocompatibilidade e menor resposta inflamatória e imune do paciente que recebe o enxerto. A matriz extracelular (MEC) preparada por estes procedimentos, quando apresentam os devidos componentes, promovem estimulação do tecido adjacente e melhor cicatrização com formação de tecido mais denso e remodelamento mais construtivo.

Com base na busca incessante do material ideal para este tipo de procedimento e, ainda sem consenso determinado, o presente trabalho é realizado para auxiliar nesta busca, tratando de apresentar um primeiro passo para a aproximação das técnicas de bioengenharia tecidual na rotina cirúrgica de pequenos animais. Pois, estes procedimentos, são capazes de criar biomateriais com maior biocompatibilidade e melhores capacidades de cicatrização e remodelamento, o que poderá ocasionar na abertura de novas possibilidades de estudos e, desta forma, colocar fim à estagnação dos resultados obtidos até a atualidade, no que se refere aos procedimentos de reconstrução de parede abdominal em pequenos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A RECONSTRUÇÃO DE PAREDE ABDOMINAL

Os procedimentos de reconstrução de parede abdominal são aqueles em que se faz necessário a substituição do tecido muscular abdominal e peritônio, por materiais capazes de sustentar o abdômen do paciente, assim como a estrutura anatômica normal o fazia anteriormente, corrigindo o defeito abdominal ocasionado por lesão. Os casos em que se observa perda de musculatura abdominal ou necessidade de remoção de determinada porção desta, com consequente aparecimento do defeito, são diversos. Os defeitos de parede abdominal podem ser observados em consequência de traumas severos, ressecção cirúrgica de tumores agressivos, lesões necrosantes e, até mesmo, alterações congênitas (GRECA et al., 2004; LEE et al., 2013). Esta alteração, torna inevitável o procedimento de reconstrução abdominal e utilização de enxertos.

Apesar da casuística relativamente baixa deste procedimento nos centros médico veterinários de pequenos animais, a busca pelo material ideal permanece sendo desenvolvida em diferentes estudos há muitos anos e diversos materiais biológicos e sintéticos já foram avaliados. Trabalhos com a utilização do pericárdio bovino, centro frênico, peritônio e submucosa intestinal já foram descritos, assim como as malhas sintéticas não absorvíveis e absorvíveis (QUITZAN et al., 2003; BRUN et al., 2004; GRECA et al., 2004; LEAL et al., 2014; GRUBER-BLUM et al., 2016; QIAO et al., 2017).

2.1.1 Materiais utilizados na reconstrução de parede abdominal

Dos materiais biológicos, estes podem ser classificados como autógenos, homólogos, isógenos ou xenólogos. Materiais autógenos, diz respeito àqueles em que o doador é, ao mesmo tempo, o receptor. Nos implantes homólogos, o doador e receptor, são de mesma espécie, porém não apresentam antígenos de histocompatibilidade. No que se refere aos implantes isógenos, estes são referidos aos doadores e receptores que possuem antígenos de histocompatibilidade. E por fim, os casos de enxertos xenólogos, tratam-se de quando o doador e receptor são de diferentes espécies (ALVARENGA, 1992).

Com membranas biológicas, ou seja, materiais oriundos de estruturas corpóreas de animais, autores demonstram que, a resposta inflamatória é consideravelmente menos intensa quando comparadas aos materiais sintéticos, que geram maior resposta tecidual e aderências viscerais. Contudo, todos estes materiais, tanto biológicos, quanto sintéticos, atuam somente como “arcabouço”, auxiliando na sustentação e suporte, para que o processo cicatricial seja concluído (BRUN et al., 2002; QUITZAN et al., 2003; ARAÚJO et al., 2009; BARBUTO et al., 2015).

O pericárdio, trata-se de membrana biológica utilizada comumente na medicina veterinária para cirurgias reconstrutivas de diversos tipos. Esta membrana, normalmente preservada em glicerina 98%, já foi empregada, experimentalmente, para tratamento de reconstrução de paredes torácica e abdominal, esofagoplastia, herniorrafia perineal, entre outros (STOPIGLIA et al., 1986; BRUN et al., 2002; CUNHA et al., 2003; ZERWES et al., 2011). Há relatos da utilização do pericárdio, inclusive, no tratamento de lesões abdominais em humanos, porém com o material decelularizado (D'AMBRA et al., 2012). Este material é um dos principais e mais utilizados para procedimentos reconstrutivos na medicina veterinária e há relatos de trabalho experimental com utilização deste material associado a células-tronco (VIDOR et al., 2013).

O centro frênico tendíneo. Trata-se da região central do músculo diafragma. Este material considera-se de fácil obtenção e baixo custo. O centro frênico mostra relatos de sua utilização, além de reconstrução de parede abdominal em trabalhos experimentais, para tratamento de defeitos diafragmáticos no cão (MAZZANTI et al., 2001; BRUN et al., 2004; LEAL et al., 2014). Segundo Mazzanti et al. (2001), o centro frênico para correção de defeito diafragmático no cão, assim como a maioria dos materiais biológicos, mostrou boa aceitação do receptor, sem reações de rejeição em aspecto macroscópico, porém, com eficácia duvidosa para esta finalidade. Já que a força de resistência não aparentou ser satisfatória.

O peritônio também é utilizado para cirurgias reconstrutivas, principalmente àquelas de reconstrução de parede abdominal. Esta estrutura trata-se de membrana que reveste a cavidade abdominal dos animais e é considerada a mais extensa do organismo. Esta membrana consiste na face parietal, que reveste a parede abdominal, internamente, e a face visceral, relacionando-se diretamente com a superfície externa dos órgãos abdominais (COSTA NETO et al., 1999; FRANDSON et al., 2005; LEAL et al., 2014).

Assim como o pericárdio e o centro frênico, o peritônio é considerado material de baixo custo, fácil obtenção, baixa reação tecidual, e fácil manutenção. Este surge como opção, pelo fato da busca de materiais para esta finalidade ser intensa, visando baixa reatividade e boa resistência. Bons relatos foram descritos com a utilização do peritônio como adjuvante em tratamentos há alguns anos. Entretanto, os estudos deste material para tratamento de reconstruções abdominais são pouco mais recentes (ALVARENGA, 1992; DALECK et al., 1992; COSTA NETO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2008; LEAL et al., 2014).

Bastos et al. (2006), estudaram a utilização do peritônio bovino como opção para reconstrução de parede abdominal e notaram crescimento de tecido fibrocolagenoso no local do enxerto, além de apresentar custo menor quando comparado ao polipropileno, segundo material utilizado no estudo.

O peritônio de paca, em trabalho que avaliou características de resistência à tração, mostrou que a membrana apresenta resistência semelhante ao pericárdio bovino conservado em glicerina 98% (CAMARGO, 2009).

O peritônio de paca, foi implantado em parede abdominal de ratos comparando dois meios de conservação diferentes. Entretanto, as reações inflamatórias intensas e complicações como fístulas e abscessos, estiveram presentes e não houve relato de reestruturação tecidual, formando somente um tecido fibroso em sua fase final. No mesmo trabalho, concluiu-se que o material pode ser utilizado para esta finalidade, apesar da incidência de reações adversas considerável. O fator a que se foi atribuído tais reações adversas, diz respeito a presença de gordura no implante, pois a presença de tecido adiposo do animal doador no material, é fator importante para indução de rejeição do receptor ao material. Portanto, sugere-se que o peritônio coletado da região mais ventral do abdômen da paca, mostre maior eficácia, devido à escassez de tecido adiposo na região, quando comparado à região mais dorsal (LEAL et al., 2014).

Outros materiais biológicos utilizados para esta finalidade, são as matrizes extracelulares de vaso sanguíneo (NOWACKI et al., 2015) e as submucosas intestinais (LEE et al., 2013). Ambos os estudos com tais materiais, foram realizados de forma experimental, com utilização de ratos e mostraram que, tanto a matriz de vaso sanguíneo quanto a submucosa de intestino, podem ser alternativas para reconstrução de parede abdominal. Além de Nowacki et al. (2015) mencionar material decelularizado.

Quanto aos materiais sintéticos para reconstrução de parede abdominal, o principal material de estudo, tanto na medicina, quanto na veterinária, é a malha de polipropileno. Trabalhos mostram a utilização deste material tanto de forma isolada, quanto em associação com outras membranas ou células. A malha de polipropileno trata-se de material composto por fio monofilamentar, entremeada por poros e com superfície áspera. Esta superfície permite a infiltração de fibroblastos e a produção de colágeno (AMID et al., 1994; SZABO et al., 2000; ARAÚJO, et al., 2009; RICCIARDI et al., 2012; SCHMALTZ et al., 2014; BARBUTO et al., 2015).

A principal adversidade na utilização das malhas sintéticas como o polipropileno é que, normalmente, estes materiais apresentam maior reatividade no organismo do animal receptor, com maior intensidade de inflamação e aderências de estruturas abdominais, quando comparadas às membranas biológicas. Clarke et al. (1996), já mostram resultados mais satisfatórios com o material biológico quando comparado com a malha de polipropileno.

As malhas de polipropileno, vêm sendo amplamente utilizadas na veterinária. Entretanto, os efeitos adversos deste material, como aderências viscerais, continuam sendo descritos, mesmo na busca de alternativas para a diminuição do problema. A utilização do polipropileno em associação com o ácido poliglicólico, também mostrou reatividade pelo receptor e aderências mais intensas. Neste trabalho, o material é comparado com poliéster associado a colágenos e as malhas apresentaram resultados semelhantes neste quesito (ARAÚJO et al., 2009).

Para Ricciardi et al. (2012), uma alteração de manejo do material pode melhorar sua reatividade. Em seu trabalho, compararam a malha de polipropileno isolada com o polipropileno associado a tecido fibroso do próprio receptor. Os resultados mostrados pelos animais que receberam a malha associada ao tecido fibroso, mostraram menor reatividade e menos aderências de estruturas abdominais. Em contrapartida, Riet et al. (2004), mostram que o polipropileno associado a colágeno pode induzir maior risco de infecções, mesmo mantendo menor intensidade de aderências de estruturas abdominais.

Outra malha também estudada para esta finalidade, é a malha de poliéster. Porém, assim como o polipropileno, este material proporciona maior reatividade pelo receptor e alguns trabalhos mostram estes acontecimentos. Com o objetivo de comparar material de poliéster com membrana de pericárdio bovino para correção de defeito muscular em parede abdominal, um trabalho mostrou resultados interessantes;

sendo que houve resposta fibroblástica no grupo de animais que recebeu malha de poliéster e menor resposta naqueles que receberam membrana de pericárdio bovino. Entretanto, as aderências das vísceras no grupo que recebeu malha de poliéster foram intensas, o que não houve no grupo com a membrana de pericárdio bovino (QUITZAN et al., 2003).

A malha de poliéster não é utilizada com frequência na rotina clínico cirúrgica para reconstrução de parede abdominal. Sua presença ainda permanece em maior escala em trabalhos experimentais. Araújo et al. (2009), mostraram que o poliéster associado ao colágeno diminui as aderências viscerais. Entretanto, esta diferença não foi significativa quando analisada estatisticamente, o que passou a considerar o material com eficácia semelhante ao do comparado.

2.2 A MEMBRANA AMNIÓTICA

A membrana amniótica ou âmnion, trata-se de estrutura transparente, delgada e elástica que, compõe as membranas fetais, consideradas fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do feto. Esta estrutura, caracteriza-se por ser o material extraembrionário mais interno, estabelecendo contato íntimo somente com líquido amniótico e feto (MIGLINO et al., 2006; FERNER; MESS, 2011).

Após o momento de fecundação do ovócito pelo espermatozoide e origem do zigoto, estrutura inicial unicelular, inicia-se um longo processo de multiplicação celular. Este processo denomina-se “clivagem”. Inicialmente, ocorre segmentação do zigoto. Trata-se de uma série de divisões mitóticas e multiplicações das células embrionárias, que ao deixar de ser unicelular, passam a ser denominadas blastômeros. Os blastômeros promovem as suas multiplicações e os tamanhos das células diminuem a medida em que o processo evolui, pois, a relação nuclear/citoplasmática, no início, é baixa e, a estrutura não aumenta de tamanho. Este processo prossegue até o momento em que se nota grande número de células compactadas e, a partir de 16 blastômeros ou mais, a estrutura passa a denominar-se mórula (HAFEZ; HAFEZ, 2004; CAIXETA et al., 2008).

Esta estrutura, a qual denomina-se mórula, percorre o caminho do ovário até o útero. Durante este período, a estrutura é preenchida por líquidos, formando a primeira cavidade ou blastocelo e, a massa celular interna, caracterizada pelo agrupamento das células compactadas em um único polo. Esta estrutura passa a denominar-se

blastocisto. O blastocisto é distinguido pela sua massa celular interna, uma cavidade denominada blastocele e delimitado por uma camada de células chamada de trofotoderme, área em que irá se aderir ao endométrio e originará a formação da placenta. Assim como a trofotoderme fará aderência ao endométrio formando a placenta, a massa celular interna, em breve, ocasionará a formação do embrião e feto (BETTERIDGE, 2000; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As células da massa celular interna, por meio de multiplicação celular, originam dois tipos celulares. O primeiro em formato cilíndrico, a qual passa a denominar-se epiblasto e, a segunda, composta por células cuboides, próxima à blastocele, o hipoblasto. Esta diferenciação celular, caracteriza a estrutura como um disco bilaminar e a blastocele passa a denominar-se cavidade vitelínica primitiva. Simultaneamente a este processo, as células cilíndricas do epiblasto, se afastam em direção ao centro da blastocele devido ao preenchimento por líquidos deste espaço, originando a segunda cavidade, que diz respeito à cavidade amniótica primitiva e, âmnion primitivo, composto por células que passam a denominar-se amnioblastos. Contudo, a amniogênese, é resultado de deslocamento gradual das células do epiblasto. Juntamente a este processo, a blastocele é cercada pelas células do hipoblasto e passa a se tratar de cavidade vitelínica primitiva (MOORE; PERSAUD, 2008).

Após esta fase, inicia-se o processo de gastrulação, onde ocorre a formação dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme) e o âmnio envolve todo o embrião. Deste modo, a cavidade amniótica tem como seu teto, os amnioblastos e, como assoalho, o epiblasto e, o disco embrionário até então bilaminar, se tornará trilaminar, onde cada um dos três folhetos dará origem a tecidos e órgão específicos. Este processo se baseia na multiplicação, migração e diferenciação celular (CAIXETA et al., 2008; MOORE; PERSAUD, 2008).

O início do processo de gastrulação se dá pela formação de uma linha primitiva na superfície do epiblasto e, ao final desta linha, acontece proliferação celular para formação do nódulo primitivo. As células do epiblasto se deslocam no sentido da linha primitiva, onde é iniciado processo de multiplicação celular, o que causa o desprendimento do hipoblasto, ocasionando a formação da endoderme embrionária. As células geradas pelo epiblasto na linha primitiva, permanecem entre a endoderme embrionária e o epiblasto, o que origina a mesoderme. O conjunto de células do epiblasto que se mantém, torna-se a ectoderme. O final deste processo chamado gastrulação, caracteriza a estrutura em disco trilaminar. A ectoderme, mesoderme e

endoderme, são responsáveis pelo desenvolvimento de todo o corpo e órgãos do feto e, nesta etapa, já é iniciada a primeira fase de desenvolvimento de alguns sistemas, como sistema nervoso e coração (MOORE; PERSAUD, 2008).

Tendo visto o processo embriológico, a origem da membrana amniótica provém da estrutura denominada epiblasto; mesma estrutura que, durante o processo de gastrulação, originará os três folhetos embrionários, para posterior desenvolvimento de todos os tecidos e órgãos do feto (NIKNEJAD et al., 2008).

2.2.1 Características físicas e funcionais

A membrana amniótica, tem como características físicas, a sua transparência, elasticidade e espessura pequena, que recobre o feto durante todo o período gestacional. Esta estrutura delgada, compõe as membranas fetais e, é caracterizada por ser a membrana fetal mais interna, sendo estrutura com maior “intimidade” com o feto. Somente há contato com líquido amniótico e feto. O líquido amniótico é limpo e translúcido, assim como a membrana amniótica e, apresenta característica mucoide com presença até o final do período gestacional. Sua quantidade varia, mas aumenta rapidamente da primeira metade da gestação, podendo chegar em grande volume (DUA; AZUARA-BLANCO, 1999; MIGLINO et al., 2006; FERNER; MESS, 2011).

O âmnio, oferece ao feto, proteção mecânica, amortecendo impactos e favorecendo a movimentação, hidratação, nutrição e lubrificação do canal do parto. Para isto, esta estrutura é formada no período inicial de gestação, logo nas primeiras semanas após a concepção, com crescimento rápido após formação, de modo a exercer todas as funções necessárias (OKAZAKI et al., 1981; MIGLINO et al., 2006; CAIXETA et al., 2008).

A membrana amniótica, nada mais é do que uma “dobra” da ectoderme embrionária e, assim como outras estruturas, recebem uma camada de suporte mesenquimal. Em sua composição histológica, há uma região mesenquimal avascular. O fato da estrutura considerar-se avascular, faz com que a nutrição aconteça por outras vias. Este suporte nutricional da membrana amniótica, se dá pelo fluido coriônico, líquido amniótico e vasos da superfície fetal (TODA et al., 2007).

O âmnio, possui considerável resistência, sendo capaz de suportar carga do líquido amniótico quando submetido à pressão e diversas outras pressões menores. A região mesenquimal da membrana amniótica, é composta por diversos tipos de

colágenos, o que lhe confere viscoelasticidade e em sua utilização como enxerto, é capaz de suportar cargas semelhantes às normalmente suportadas em período gestacional. Estas capacidades deste material, o torna boa opção para enxerto em cirurgias reconstrutivas. Uma das principais características do âmnion, é a boa aceitação do organismo que a recebe como enxerto. Muitas são as propriedades da membrana amniótica para a boa aceitação mencionada logo acima e, discute-se diversos fatores que contribuem para isto. O âmnion é considerado bom material para engenharia de tecidos, também chamado de “scaffold”, estrutura base para o desenvolvimento das células e processos de reparo (NIKNEJAD et al., 2008; RIAU et al., 2010; FRANCISCO et al., 2013).

2.2.2 Aspectos histológicos

A membrana amniótica, é composta, histologicamente, por três camadas. São elas: Camada epitelial, espessa membrana basal e, após membrana basal, uma região mesenquimal avascular. Esta região mesenquimal, caracteriza-se por ser a matriz extracelular, que por sua vez, divide-se em mais três folhetos. São estes: camada compacta, camada de fibroblastos e camada esponjosa. O tecido conjuntivo presente na membrana amniótica, é constituído por colágenos de diversos tipos, como III, IV, VII (NIKNEJAD et al., 2008).

A camada epitelial desta estrutura, é composta por camada simples, de células cuboides e núcleo bem definido. Logo abaixo, segue a membrana basal, constituída de fibras reticulares. A camada compacta, caracteriza-se por ser desprovida de células, composta somente por estrutura estreita e está intimamente ligada à membrana basal. A camada de fibroblastos que segue abaixo, é diferenciada das demais, por ser a camada mais espessa da membrana amniótica. Esta é composta por fibroblastos e células de Hofbauer. E por fim, a camada esponjosa, caracterizada por ser a porção mais externa da membrana amniótica e rica em mucina (NIKNEJAD et al., 2008; RIAU et al., 2010; FRANCISCO et al., 2013).

As células epiteliais, são quem, supostamente, podem conservar as características das células do epiblasto, na fase de blastocisto, antes de sofrer o processo de gastrulação e originar os três folhetos embrionários. Alguns estudos relacionados à membrana amniótica, revelam a presença de diversos fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento epidérmico, de transformação,

queratinócitos, hepatócitos, vascular endotelial e de derivados de plaquetas (NIKNEJAD et al., 2008; MUTTINI et al., 2012).

2.2.3 Aplicabilidade na medicina veterinária

O uso das membranas biológicas vem aumentando conforme estes materiais são estudados e suas ações acabam sendo mais esclarecidas. A membrana amniótica, em especial, contém propriedades que permitem a utilização como item adjuvante no tratamento de feridas, bem como enxertias para outras terapias regenerativas (PLUMMER, 2009).

O início da sua utilização, em 1910, abriu portas para o entendimento deste material tão estudado atualmente, pois utilizando-o como enxerto cutâneo, notou-se utilidade para outros tecidos, tais como a vagina, bexiga e cavidade oral, ampliando assim as aplicações desta membrana. Muito utilizada para lesões oculares, este material foi implantado pela primeira vez na região supracitada em 1940, juntamente com córion. Os resultados deste trabalho não foram muito satisfatórios e tem-se por motivo a presença do córion, pois poucos anos mais tarde, quando utilizada somente a membrana amniótica, foram obtidos bons resultados (PLUMMER, 2009).

Em 1960, Pigeon mostrou a eficiência do âmnion para o tratamento de queimaduras e citou principalmente o alívio rápido da dor existente antes da colocação do material sobre a lesão.

Embora estudos existentes vinculando a aplicação da membrana amniótica associada ao córion não tenham se apresentado devidamente satisfatórios, tal membrana, isoladamente, vem sendo o material mais aceito para tratamento de lesões em superfície ocular, pois, a sua integridade estrutural, elasticidade da membrana basal e transparência favorecem a migração de células epiteliais, diferenciação e adesão (SANGWAN et al., 2014).

Muito utilizada atualmente, a membrana amniótica equina promove ações anti-inflamatórias e anti-angiogênicas. Entretanto, para alguns autores, por enquanto não há muitas evidências a respeito da eficiência deste anexo fetal (SANGWAN et al., 2014).

Na área de oftalmologia veterinária, a utilização deste material permanece bastante estudado. Trabalhos com a utilização da membrana amniótica para reconstrução de superfícies oculares é comum. Estes trabalhos mostram bons

resultados, ocorrendo boa evolução pós-cirúrgica com recuperação funcional da região e de transparência da córnea (BARROS et al., 1998).

A comparação de pós-cirúrgico em reconstrução de superfície ocular em cães, entre flap conjuntival 360º e enxerto com membrana amniótica equina, mostra melhor evolução do quadro quando utilizada a membrana amniótica, com maior sucesso e menores complicações. Estes resultados, foram por meio de auxílio no controle de vascularização com restabelecimento da integridade da superfície da córnea, de forma mais organizada e próximo do fenótipo natural (FERREIRA et al., 2013).

Curiosamente, ainda na oftalmologia, trabalhos descrevem possíveis ações de regeneração tecidual com a presença da membrana amniótica. Em trabalho que avaliou o enxerto deste material em córnea, foi relatado bom reestabelecimento das camadas corneanas e acredita-se até em recuperação funcional da estrutura ocular no local onde foi colocado o enxerto (BARROS et al., 1998).

Já Schmidt et al. (2010), descrevem a utilização da membrana amniótica para reparo e lesões duodenais mostrando resultados interessantes relacionados à ação da membrana aplicada como enxerto, pois notou-se reestruturação tecidual, especificamente em mucosa e camada muscular. Essas informações mostram que a membrana amniótica pode ter ações muito benéficas nos tecidos apesar de ainda ser pouco observada quando o assunto é relacionado às alterações musculares e, conseqüentemente, nota-se carência de informação vinculada a estas enfermidades.

Entretanto, a utilização da membrana amniótica para terapias na medicina veterinária, ainda permanece, de certo modo, “estacionada”. Este material não é de grande utilidade nas rotinas clínico cirúrgicas, principalmente de pequenos animais. São utilizadas em poucas ocasiões, tais como para o tratamento de lesões cutâneas em equinos, com alguns relatos em lesões cutâneas em cães (OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998; PAULO, 1998).

A utilização deste material para tratamento em lesões cutâneas, principalmente nos equinos, se dá pelo controle da inflamação local e estímulo da epitelização, levando a um processo cicatricial mais eficiente e acelerado. O fato de ser bastante flexível e elástica, faz com que haja boa oclusão na lesão, dificultando infecções secundárias. Outro ponto positivo no tratamento de lesões cutâneas em equinos é que, feridas tratadas com membrana amniótica preservada em glicerina 98%, controlam o crescimento exacerbado do tecido de granulação, evitando uma das

principais intercorrências no tratamento de lesões tegumentares em equinos (OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998).

Com tudo, estudos mostrando a utilização deste material para tratamento de lesões tegumentares em pequenos animais, não mostram vantagens como nos equinos (PAULO, 1998).

2.3 ARMAZENAMENTO E PRESERVAÇÃO EM GLICERINA 98%

A solução de glicerina 98%, aparenta ser o principal meio de conservação de materiais biológicos na medicina veterinária. Esta solução apresenta ação antisséptica, mantendo fácil manuseio do material e com bons resultados. Este meio de conservação, está incluído nos meios em que não mantém a vitalidade celular da estrutura a ser preservada. A solução de glicerina 98% apresenta como principal função, a sua capacidade de desidratação do tecido, o que impede a proliferação de bactérias no material. Isto se dá pela sua alta hidrofília. Estudos mostram que, materiais conservados em glicerina 98%, devem ser mantidos completamente submersos ao meio por, no mínimo, 30 dias. Tempo este, suficiente para suas devidas ações (BRUN et al., 2004; GIOVANI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; VULCANI; MACORIS; PLEPIS, 2009).

O material conservado neste meio, deve ser reidratado antes do uso como enxerto em procedimentos cirúrgicos. Este procedimento consiste em manter a porção a ser utilizada, submersa em solução fisiológica NaCl 0,9% por determinado tempo. A manutenção do material em solução fisiológica para reidratação, apresenta variação de tempo. Entretanto, o tempo mínimo de 15 a 30 minutos, foi descrito por Oliveira et al. (2009) com eficiência. Contudo, este tempo deve variar conforme o material a ser reidratado, podendo chegar em até 24 horas (COSTA NETO et al., 1999; BRUN et al., 2004).

Trabalhos são descritos comparando a força de tração de determinados materiais a fresco e em glicerina 98% e, não mostram diferenças consideráveis com relação a sua capacidade de tensão nestas condições. Além da tração, são avaliados histologicamente, também mostrando poucas alterações nas estruturas dos materiais (BATISTA et al., 1996).

A variedade de materiais biológicos preservados em glicerina 98% é grande. Além da membrana amniótica, o pericárdio bovino e equino, centros frênicos de

diferentes espécies, peritônio, dura-máter, entre outros, são conservados neste meio. Grande maioria presentes em trabalhos referentes à reconstrução de parede abdominal (COSTA NETO et al., 1999; MOTA et al., 2003; QUITZAN et al., 2003; BRUN et al., 2004; RABELO et al., 2004; LEAL et al., 2014).

2.4 DECELULARIZAÇÃO NA BIOENGENHARIA TECIDUAL

A decelularização é o procedimento que diz respeito à remoção das células, DNA e seus debris do material biológico que será utilizado, na maioria das vezes, para procedimentos reconstrutivos. Este procedimento visa tratar o material de tal forma, que tais componentes sejam eliminados, havendo manutenção somente da matriz extracelular (MEC). Os procedimentos de decelularização de materiais biológicos são realizados a fim de preparar o material antes do uso, de modo a diminuir a atividade inflamatória e imune do paciente receptor e, com isso, proporcionar um melhor e mais efetivo processo cicatricial, devido sua maior biocompatibilidade (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Este processo, o qual leva à manutenção somente da MEC, origina o chamado “scaffold”, que se traduzido para a língua portuguesa, nos dá a palavra “andaime”. Este termo é utilizado, pois, a MEC atua somente como estrutura sustentadora, no que se refere a dar o devido apoio, para que seus componentes realizem suas atividades e leve à estimulação do tecido adjacente. Esta estimulação é relacionada à melhor processo cicatricial, proporcionando contato celular, migração, proliferação e organização tridimensional. Estas estimulações podem levar a um tipo de resposta de remodelamento mais construtivo. Em contrapartida, a presença de componentes celulares na MEC, leva normalmente, à deposição de tecido conjuntivo denso e cicatrização por fibrose. Resultado este, notado nos mais diversos trabalhos relacionados à reconstrução de parede abdominal em medicina veterinária (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FU et al., 2014).

Os biomateriais considerados compatíveis e aceitáveis para utilização em procedimentos reconstrutivos devem obedecer alguns parâmetros para que haja, de certa forma, garantia de que não haverá resposta imune exacerbada por parte do paciente receptor. O material deve conter quantidade menor que 50ng de fita dupla de DNA por mg de MEC; não conter material nuclear visível nos cortes histológicos em coloração por hematoxilina-eosina (H.E.) e, por fim, os fragmentos de DNA

remanescentes no biomaterial devem apresentar tamanho menor que 200 pares de base. Para que estas exigências sejam atingidas, muitas vezes, faz-se necessário a utilização de um ou mais métodos de decelularização (ZHENG et al., 2005; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Os procedimentos de decelularização podem ser realizados por meio de diversos métodos. Estes métodos incluem técnicas físicas, químicas e enzimáticas. Os métodos físicos consistem principalmente nos gradientes de temperatura, recebimento de pressões e ondas sonoras pelo tecido em que se deseja decelularizar. Os métodos físicos para estes procedimentos, são considerados àqueles com maior eficiência na preservação da MEC e suas funções de estimulação, bem como seus fatores de crescimento. O congelamento do material em que se objetiva decelularizar, provoca a formação de cristais nas células, o que acarreta na ruptura da membrana celular. Contudo, este método não apresenta boa eficiência na remoção dos debris celulares que permanecem no material, tornando necessária a associação deste método com demais técnicas químicas, por exemplo (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

As decelularizações por gradientes de pressão, também causam morte celular e podem ser associados com outros métodos para melhor sua eficiência, assim como o uso da alta pressão hidrostática (*High Hydrostatic Pressure* – HHP). Estes mecanismos auxiliam e possibilitam que o material fique, posteriormente, menos exposto aos detergentes mais agressivos (ZHENG et al., 2005; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

O recebimento de ondas sonoras pelas soluções líquidas, também pode causar morte e rompimento celular quando utilizada a frequência adequada. Pois, a frequência a ser utilizada, está diretamente ligada à intensidade de sua decelularização (AZHIM et al., 2014; FU et al., 2014).

Já os métodos químicos, são considerados os mais eficientes na remoção das células propriamente ditas, porém, se não houver a devida cautela em suas utilizações, poderá comprometer também a estrutura da matriz extracelular do material, algo que não se objetiva quando o intuito é criar os denominados “scaffolds”. Este método de decelularização faz a utilização de detergentes, ácidos e bases, soluções hipertônicas ou hipotônicas e quelantes de cálcio (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Os principais detergentes utilizados para estes procedimentos são o Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS) e o Triton X-100 e, suas concentrações nos trabalhos publicados são bastante variáveis. Os detergentes para decelularização são, de certo modo, mais agressivos do que os métodos físicos e junto com a sua remoção celular, espera-se também, alterações em componentes importantes na MEC (FU et al., 2014).

As substâncias ácidas e bases eliminam os componentes celulares com base em desnaturação proteica, rompimento da membrana celular, solubilização dos componentes celulares e alteração de ácidos nucleicos. Porém, assim como os detergentes, estes podem alterar a estrutura de componentes na MEC do material utilizado para decelularização. Uma das substâncias referentes aos ácidos, é o ácido paracético ou peroxiacético (*paracetic acid* – PAA) (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FU et al., 2014).

Quando se mencionam as soluções hipertônicas ou hipotônicas, estas realizam a quebra das células por meio de choque osmótico e podem ser feitas com lavagens alternadas com os dois tipos de soluções (FU et al., 2014).

O EDTA e EGTA (ácido etilenodiamino tetra-acético e ácido etileno glicol tetracético, respectivamente), quelantes de cálcio, se ligam a cátions presentes nos lugares de aderência entre células e entre célula e matriz, o que torna mais fácil a retirada do conteúdo das células do material manipulado (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FU et al., 2014).

Por fim, os métodos enzimáticos para este procedimento na bioengenharia tecidual, podem ser exemplificados com a tripsina e as endonucleases (DNase e RNase). Estas substâncias rompem as células e as comunicações peptídicas que as mantêm, de certa forma, presas à MEC do material manipulado. Os métodos enzimáticos são efetivos para a remoção de debris que permanecem sobre a MEC e seu uso deve ter a devida cautela para que não haja considerável alteração e perda dos componentes da MEC. Estes métodos, assim como outros mencionados acima, podem ser associados com outros métodos e substâncias para melhor efetividade na decelularização e criação do biomaterial (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; FU et al., 2014).

3 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a membrana amniótica tratada com SDS 0,01% e preservada em glicerina 98%, macro e microscopicamente, com intuito de iniciar a aproximação de técnicas referentes à bioengenharia tecidual à rotina cirúrgica de pequenos animais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os aspectos macroscópicos do procedimento cirúrgico, no que se refere à sustentação do abdômen, coloração, neovascularizações e, principalmente, aderências de estruturas abdominais ao local operado;
2. Avaliar a intensidade de células inflamatórias infiltradas em cada momento pré-determinado, visando possíveis diferenças entre os tratamentos da membrana amniótica realizados em fase pré-cirúrgica;
3. Avaliar a eficiência do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) na concentração de 0,01% para decelularização de membrana amniótica equina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DOS ANIMAIS

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP, o projeto foi desenvolvido com a utilização de animais referentes à experimentação. Ratos da espécie *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, com peso inicial de aproximadamente 200g, procedentes do Biotério do Departamento de Patologia (VPT), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, foram utilizados no projeto, junto ao Laboratório de Cirurgia Córdio-Torácica (LCCT), do Departamento de Cirurgia (VCI/FMVZ-USP). O número de animais para esta pesquisa é de 30. Estes animais foram mantidos em caixas específicas de manutenção em biotérios, com água e ração *ad libitum*. As caixas mencionadas acima, apresentam capacidade para cinco animais. Após o procedimento, os animais ficaram em caixas individuais, também com água e ração *ad libitum*.

Estes animais requerem ambiente específico e controlado, no que se refere à temperatura, umidade, tempo de exposição à luz e controle de microrganismos. Portanto, durante todo o período pré e pós cirúrgico, ficaram em suas respectivas caixas, dentro de salas capazes de exercerem devido controle, localizadas no biotério do VPT.

Figura 1 - Local onde os animais ficaram nos períodos pré e pós-cirúrgico. A) Prateleiras e caixas com capacidade para até cinco animais. B) Estrutura para entrada e saída de ar e controle de temperatura.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

As caixas onde ficaram acomodados os animais, são forradas com maravalha, com boa capacidade de absorção de líquidos. Estas, devem ser trocadas para

controle sanitário e manutenção de ambiente viável, duas vezes por semana. Entretanto, pela existência de procedimento cirúrgico no experimento, esta frequência é aumentada para três trocas semanais, de modo a proporcionar maior controle sanitário no ambiente de manutenção dos animais e, desta forma foi procedido.

4.2 DELINEAMENTO

Conforme mencionado acima, o número de animais para o presente projeto foi de 30. Estes animais foram divididos em dois grupos (grupo I e grupo II) compostos por 15 animais respectivamente. O grupo I recebeu a membrana amniótica tratada com detergente Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS 0,01% como enxerto e, o grupo II, recebeu a membrana amniótica preservada em glicerina 98% durante período de 30 dias.

Cada grupo foi avaliado em três diferentes momentos, denominados momento 1 (M1), momento 2 (M2) e momento 3 (M3), onde cada momento é composto por cinco animais. O momento 1 é referente à avaliação ao sétimo dia de pós-cirúrgico; o momento 2 trata-se da avaliação ao 20º dia de pós-cirúrgico; e, por fim, o momento 3 diz respeito à avaliação ao 40º dia de pós-cirúrgico. Segue ilustração em método hierárquico abaixo.

Para identificação de cada animal na fase pós-operatória, foram feitas marcas em suas respectivas caudas por meio da utilização de canetas nas cores preta e verde. A cor preta da referência a qual grupo o animal pertence (se grupo I ou grupo II), assim como a cor verde da referência de qual momento será avaliado (M1, M2 ou M3).

Portanto, apenas uma marca na cor preta, indica animal do grupo I, assim como duas marcas na cor preta, indica animal pertencente ao grupo II. Ao lado da marcação preta foram colocadas as marcas na cor verde, para indicar o momento de avaliação de cada animal. Uma marca verde, indica primeiro momento (M1), duas marcas na cor verde indicam segundo momento (M2) e, por fim, três marcas verdes indicam o terceiro momento (M3).

Figura 2 - Para entendimento das marcas de identificação com canetas nas cores preta e verde. Abaixo, animal pertencente ao grupo I, M3.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

4.3 DA MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA

As membranas amnióticas foram coletadas de animais da espécie equina, raça manga-larga marchador, puras, registradas, idades com variações entre seis e 13 anos, saudáveis. Os materiais foram recebidos por doação, proveniente da Estância Braleste, situada no município de Itu-SP. Estes materiais passaram por processos de higienização, lavados com água corrente, removendo coágulos e outras partículas que não interessam ao estudo e, recortadas em fragmentos suficientes para os enxertos. Posteriormente, os fragmentos foram acondicionados em recipientes, banhados em solução fisiológica NaCl 0,9% e congelados a -20°C, para devida conservação.

Os fragmentos tratados com detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), na concentração de 0,01%, anteriormente ao início deste tratamento, foram descongelados naturalmente, em temperatura ambiente e colocados em recipientes menores, individualmente, submersos em solução de SDS 0,01%, de modo a dar início ao procedimento para diminuição de componentes celulares, DNA e debris. À solução de SDS 0,01%, foi adicionado antibiótico a 0,5%, composto por penicilina e estreptomicina, a fim de minimizar chances de contaminação da solução. Os frascos são colocados sobre o aparelho homogeneizador ao longo do tempo de ação do detergente SDS. Os fragmentos de membrana amniótica equina passaram por este tratamento no período de 18 horas, até que o procedimento foi cessado. A finalização do tratamento foi determinada, pois, os materiais mostraram sinais de fragilidade, onde notou-se o material mais friável quando comparado ao tecido nativo. Ao notar a alteração, o procedimento foi interrompido, de modo a evitar inviabilidade de manipulação cirúrgica e aplicação de suturas. Para manutenção do material na condição em que se encontrava, as amostras foram individualmente congeladas em temperatura de -20°C e mantidas até o dia antecedente ao procedimento cirúrgico em que seria utilizado a membrana amniótica tratada com detergente SDS 0,01%.

Figura 3 - Amostras em frascos individualizados, submersos em solução de SDS 0,01% em aparelho homogeneizador.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

O preparo pré-cirúrgico do material tratado mencionado acima é baseado no descongelamento das amostras e lavagem dos fragmentos com solução Tampão Fosfato Salino 1x (*Phosphate Buffered Saline – PBS*), associado a antibiótico (ATB) a 0,5%, também composto por penicilina e estreptomicina. Esta lavagem consiste em

colocar os fragmentos submersos na solução de PBS 1x + ATB 0,5% e manter no aparelho homogeneizador durante 15 minutos. O procedimento é realizado por três vezes consecutivas. Ao término das lavagens, os fragmentos foram colocados em uma placa para cultivo de células com seis poços (figura 4), em PBS 1x + ATB 0,5%, devidamente identificados e, por fim, esterilizados em luz ultravioleta (UV) durante uma hora. Após o término da esterilização, a placa com os fragmentos era mantida sob refrigeração (4°C) até o momento do uso.

Figura 4 - Placa de cultivo com seis poços onde os fragmentos de membrana amniótica equina foram mantidos em PBS 1x + ATB 0,5%.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Os fragmentos de membrana amniótica utilizados no grupo II, após coleta e lavagem do material conforme mencionado no início deste tópico, foram colocados em frasco contendo glicerina 98%, onde foram mantidos por período de 30 dias consecutivos. Após o período de 30 dias em preservação pela solução de glicerina 98%, o material foi colocado em solução fisiológica NaCl 0,9% para devida reidratação, pois, a glicerina 98% age com desidratação dos tecidos. O período de reidratação foi de uma hora, havendo troca de solução fisiológica após 30 minutos devido saturação da solução, para manutenção durante mais 30 minutos.

Após o material reidratado, estes foram cortados em fragmentos menores, correspondentes ao tamanho das lesões em que seriam enxertados e colocados em placa de cultivo celular com seis poços (figura 4), em PBS 1x + ATB 0,5%. Assim como o material do grupo I, este foi esterilizado em luz ultravioleta durante período de uma hora e refrigerado (4°C) até momento do uso.

4.4 PREPARAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA

Os animais foram encaminhados para a sala de cirurgia individualmente, somente no momento do procedimento, de modo que, não houveram outros indivíduos na sala durante qualquer procedimento, diminuindo o estresse de todos os animais.

Momentos antes da cirurgia, os animais foram pesados para determinação precisa do peso individual. Com base no peso de cada um, as anestésias foram realizadas em aplicação única, utilizando-se 60mg/kg de cloridrato de cetamina, 5mg/kg de cloridrato de xilazina e 5mg/kg de cloridrato de tramadol, aplicados por via intraperitoneal (IP). Após anestesia e perda de reflexo de endireitamento, é realizada ampla tricotomia da região abdominal para seguir com as devidas técnicas e cuidados de antisepsia. Soluções de álcool e PVPI tópico foram utilizados para antisepsia pré-cirúrgica.

4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após tricotomia da região abdominal ventral e antisepsia, os animais foram mantidos em posição de decúbito dorsal para o procedimento. O campo cirúrgico foi preparado com compressas estéreis e a caixa de instrumentais cirúrgicos necessários para o procedimento, trata-se de caixa básica para cirurgia geral de tecidos moles.

O procedimento cirúrgico foi feito por meio de incisão na pele em linha média ventral e subcutâneo até acesso do plano muscular dos animais e visualização da linha alba. Posteriormente, divulsão do tecido subcutâneo na região a se criar o defeito abdominal foi realizada, a fim de liberar a pele do plano muscular. Defeitos abdominais, abrangendo todas as camadas musculares e peritônio, com tamanho de aproximadamente 2,0cm x 1,5cm, foram criados em antímero esquerdo nos animais supracitados para subsequente justaposição do material a ser analisado como enxerto.

Os fragmentos de membrana amniótica foram fixados às bordas da musculatura abdominal, através de pontos simples interrompidos, as quatro regiões cardeais com utilização de fio náilon 5-0. Após sutura dos quatro pontos cardeais e posicionamento do enxerto, o restante da membrana amniótica foi fixado com a mesma técnica de sutura para total aposição com musculatura abdominal no restante

das bordas. Rafia cutânea em padrão “U” horizontal, interrompido, utilizando fio náilon 4-0, foi realizada para fechamento após justaposição da membrana amniótica.

Após recuperação anestésica, os animais foram colocados em caixas individuais e avaliados, com base em seus comportamentos, a eficiência da analgesia. Comportamentos diferenciados, tais como, inatividade, arqueamento de coluna, pelos eriçados, vibrissas e orelhas fletidas, podem indicar analgesia insuficiente.

Figura 5 - Etapas do procedimento cirúrgico realizado em cada animal. A) Incisão cutânea e visualização da linha alba. B) Criação do defeito abdominal, com parte da janela ainda mantida em região medial. C) Defeito abdominal criado completamente, com janela em região medial já removida. D) Membrana amniótica equina suturada com pontos simples interrompidos, utilizando fio náilon 5-0, substituindo a parede abdominal muscular e peritônio.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

A antibiótico terapia e analgesia pós-cirúrgica, foi realizada com cefalotina sódica na dose de 60mg/kg e cloridrato de tramadol na dose de 5mg/kg aplicadas a cada 12 horas, durante os quatro dias subsequentes ao procedimento cirúrgico. Este tratamento seria prolongado somente em casos de necessidade.

4.6 DAS AVALIAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

Foram avaliados aspectos macroscópicos e histológicos para o presente trabalho e, para o procedimento de avaliação, os animais foram eutanasiados. O processo de eutanásia foi realizado de forma individual, por meio de aprofundamento anestésico em câmara fechada. Para este procedimento, os animais foram colocados no interior de estrutura cilíndrica transparente, adaptada, vedada, junto à seringa preenchida com algodão embebido em anestésico inalatório Isoflurano. Qualquer manipulação para avaliação pós-operatória somente foi iniciada após certificação do intenso aprofundamento anestésico e posterior parada cardiorrespiratória.

A etapa subsequente à eutanásia dos animais, consiste no acesso do abdômen dos mesmos, para avaliação do enxerto. Este acesso foi realizado por meio de incisão de pele e parede abdominal em “U” horizontal, de modo a rebater pele e abdômen lateralmente. Esta forma de acesso possibilita a visualização da região cirúrgica e visualização total do enxerto, assim como a cavidade abdominal e suas estruturas. Portanto, a abertura permite visualização simultânea e facilidade para observação de possíveis aderências de estruturas abdominais ao local operado.

4.6.1 Avaliação macroscópica

Após eutanásia e acesso do abdômen com incisão acima explicada, as avaliações macroscópicas das regiões onde realizaram-se os enxertos, foram feitas com base na observação da coloração do enxerto, presença de neovascularização, capacidade para sustentação do abdômen e aderências de estruturas abdominais.

As aderências de estruturas abdominais foram classificadas conforme a sua intensidade e quantidade de estruturas aderidas. Utilizando a seguinte classificação: em casos de nenhuma estrutura aderida, caracteriza-se como “ausente”; somente omento maior aderido à região cirúrgica, caracteriza-se como “1+”; em casos de aderência de outra estrutura além de omento maior, caracteriza-se como “2+”; e, por fim, a aderência de duas ou mais estruturas abdominais além do omento maior, caracteriza-se como “3+”.

No que se refere a avaliação da capacidade para sustentação do abdômen, esta foi verificada com base no alinhamento do abdômen do animal, por meio da

procura de alterações de convexidade na região do enxerto, capaz de denotar peso de vísceras e força não suficiente para sustentação.

4.6.2 Avaliação microscópica

Após o término das avaliações macroscópicas, foram coletadas amostras significativas da região cirúrgica, especificamente da interface músculo/membrana, para avaliação histológica. A amostra coletada foi referente à 50% da circunferência cirúrgica e fixadas em formol a 10%.

As amostras fixadas foram encaminhadas e realizados os procedimentos histotécnicos para inclusão em parafina. As amostras foram cortadas em três regiões diferentes. O primeiro corte em região caudal da amostra, o segundo corte em região média da amostra e, por fim, o terceiro corte em região cranial da amostra. Estes cortes seriados na mesma amostra em região cranial, média e caudal, é com objetivo de adquirir resultados mais homogêneos da amostra como um todo, analisando diferentes áreas do material, visto que uma única região não indica igualdade em toda a amostra. Porém, o método utilizado ainda se caracteriza como subjetivo e os números permanecerão relativos.

Figura 6 - Amostra coletada para análise histopatológica após avaliação macroscópica. A) Representa 50% da circunferência do enxerto. B) As linhas pretas indicam as três regiões onde foram feitos os cortes histológicos (região cranial, média e caudal).

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Após processamento histotécnico e inclusão das amostras em parafina, foram feitos cortes de 5µm, com a utilização do micrótomo. Estes cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (H.E.) para avaliação do infiltrado celular e sua contagem.

A avaliação microscópica foi realizada principalmente para observação e contagem do infiltrado celular inflamatório para devida avaliação da intensidade destas células. Esta contagem foi realizada por meio de método quantitativo, relativo, com auxílio de *software* chamado "ImageJ", onde este, fará a contagem das células da imagem aberta no programa.

O *software*, com base na configuração realizada, transforma a foto em imagem de 8 bit e posteriormente a transforma em imagem preta e branca. Naturalmente, após estas configurações, os núcleos celulares ficam na cor preta. Após a programação do tamanho de partículas a serem detectadas e suas respectivas circunferências, o *software* cora em tom azulado as estruturas marcadas e realiza a contagem das mesmas, conforme ilustram as figuras sete, oito e nove.

A contagem celular para o presente estudo, foi unicamente para avaliar a intensidade celular infiltrada entre os grupos e entre os momentos, sem diferenciação de cada célula inflamatória, nos diferentes momentos de avaliação.

Figura 7 - Fotomicrografia em aumento de 4x para ilustração do funcionamento do *software* "ImageJ". A) Região de interface (seta preta), indicando tecido muscular saudável (MUSC.) e tecido amniótico coberto por infiltrado celular (MAE). B) Imagem em 8 bit, com retângulo amarelo selecionando da região de interface até o meio da imagem.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 8 - Região selecionada em amarelo (imagem 7, B). A) Imagem transformada em preto e branco. B) Após a contagem, as estruturas pretas selecionadas são marcadas em tom azulado.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 9 - Nova fotomicrografia em aumento de 40x para melhor visualização e entendimento. A) Fotomicrografia normal. B) Fotomicrografia transformada em imagem de 8 bit pelo *software* "ImageJ". C) Imagem de 8 bit transformada em preto e branco. D) Estruturas marcadas em azul são quantificadas.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Para melhor entendimento relacionado à coloração na tonalidade azul e marcação das estruturas contadas, a figura nove exemplifica com imagem microscópica de maior aumento para melhor visualização.

Após a contagem das estruturas marcadas em tom azulado, o *software* abre uma janela, onde informa o número de estruturas contabilizadas, conforme segue em figura 10. Portanto, com base nos valores contabilizados mostrados na coluna “*Count*” do *software*, foram adquiridos os dados referentes à contagem celular para avaliação das intensidades em ambos os grupos e momentos pós-operatórios.

Figura 10 - Janela aberta pelo *software* "ImageJ" mostrando o número de estruturas contadas, circulado em verde.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

4.6.3 Análise estatística

Os dados referentes à quantificação celular foram submetidos ao Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk, para averiguar se apresentavam distribuição normal, e ao Teste de Bartlett, para verificar se os valores apresentavam variâncias iguais, para então decidir qual o teste estatístico seria utilizado.

Como os dados apresentaram distribuição normal e as variâncias não foram iguais, foi utilizado o teste T de Student com variâncias diferentes para comparação entre os grupos, e o teste de Friedman para comparar os diferentes momentos dentro do mesmo grupo.

Para os valores de escore utilizados na avaliação macroscópica, foram utilizados o teste de Wilcoxon não pareado para comparação entre grupos, e o teste de Friedman para comparar os diferentes momentos dentro do mesmo grupo.

O grau de significância estabelecido para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$). Os testes estatísticos foram realizados por meio do auxílio de *software* (RStudio, Version 0.99.903 – © 2009-2016 RStudio, Inc.).

5 RESULTADOS

Neste capítulo serão descritos os resultados obtidos no experimento, considerando os métodos utilizados já mencionados anteriormente. Estes resultados serão também ilustrados em forma de figuras e tabelas.

5.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Nas avaliações macroscópicas, em ambos os grupos experimentais, foram observadas as vascularizações no enxerto de cada animal, bem como sua coloração, eficiência para sustentação das estruturas abdominais e aderências de estruturas abdominais. Os parâmetros, apresentaram-se de maneira semelhante em todos os animais, em ambos os grupos (I e II), com exceção da avaliação das aderências de estruturas abdominais.

Áreas de neovascularizações foram observadas em todos os exemplares examinados, bem como a sustentação das estruturas abdominais, visto que, nenhum animal apresentou região cirúrgica abdominal com aspecto de convexidade.

A coloração do enxerto mostrou-se de forma padrão, tornando os enxertos de coloração com tonalidade marrom, semelhante ao tecido muscular adjacente.

As avaliações das aderências de estruturas abdominais foram feitas com a utilização de escore, conforme descrito em material e métodos, variando entre “ausente” e “3+”. Esta avaliação não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos I e II ($p=0,4237$ para M1; $p=0,177$ para M2; $p=0,233$ para M3; considerando $p<0,05$, já que o nível de significância estabelecido foi de 5%), embora tenha sido observado principalmente variação entre ausente e 1+. Somente um animal, integrante do grupo I, em terceiro momento de avaliação (M3), mostrou aderência de alça intestinal, caracterizando como 2+.

No grupo I, três animais apresentaram classificação “ausente”, enquanto que, no grupo II, somente um animal foi classificado como “ausente”. Dos três animais classificados como “ausente” no grupo I, dois são pertencentes ao M2, e apenas um animal pertencente ao M1. Já o único animal com esta classificação no grupo II, compôs o M3. O restante dos animais, em ambos os grupos, apresentou classificação “1+”.

Figura 11 – Acesso do abdômen dos animais com incisão em “U” horizontal, de modo a rebater a musculatura abdominal lateralmente para avaliação macroscópica da região operada. A) Animal pertencente ao grupo I, M1 sem aderências de estruturas abdominais. B) Animal pertencente ao grupo I, M2 com aderência somente de omento maior (seta preta). C) Animal pertencente ao grupo I, M3, com aderências de omento maior (seta preta) e alça intestinal (seta vermelha).

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 12 – Acesso do abdômen dos animais em “U” horizontal para avaliação macroscópica. A) Animal pertencente ao grupo II, M1 com aderência de omento maior (seta preta). B) Animal pertencente ao grupo II, M2 com aderência de omento maior (seta preta) e gordura abdominal (seta vermelha). C) Animal pertencente ao grupo II, M3 sem aderências.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Abaixo seguem tabelas com os resultados dos testes estatísticos, mostrando valores de p obtidos pelo teste de Wilcoxon (tabela 1) e valores das medianas e intervalos interquartis (tabela 2), para melhor entendimento e visualização da ausência de diferença estatística entre os grupos I e II, para análise macroscópica.

Tabela 1. Valores de p obtidos pelo teste de Wilcoxon não pareado.

Grupos/Momentos	M1	M2	M3
Grupo I	0,4237	0,177	0,233
Grupo II			

Legenda: Valores de p todos maiores do que 0,05. O que demonstra ausência de diferença estatística.

Tabela 2. Valores das medianas e respectivos intervalos interquartis.

Grupos/Momentos	M1	M2	M3
Grupo I	1 (1-1)	1 (0-1)	1 (1-1)
Grupo II	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)

Legenda: Valores de medianas e intervalos interquartis uniforme, o que demonstra pouca variação na avaliação e, portanto, sem diferença estatística.

As informações completas dos escores de avaliação de aderências de estruturas abdominais encontram-se no quadro 1.

A avaliação entre os tempos de avaliação pós-operatórios em ambos os grupos, dos aspectos macroscópicos, também não mostrou diferença estatística. Os valores totais de p obtidos pelo teste de Friedman foram de $p=0,1472$ para o grupo I, assim como $p=0,4385$ para o grupo II. Segue abaixo tabela 3 com valores de p obtidos.

Tabela 3. Valores de p obtidos pelo teste de Friedman para os grupos I e II, referente às comparações entre os diferentes momentos para cada grupo.

Grupos	Friedman Test
Grupo I	0,1472
Grupo II	0,4385

Legenda: Valores de p todos maiores do que 0,05. O que demonstra ausência de diferença estatística.

A tabela 3, mostrada acima, apresenta apenas o valor total de p obtido pelo teste de Friedman, sem os valores específicos de comparação entre cada momento. Isso ocorre quando o valor total encontrado é maior que 5% (0,05), assim não existe a necessidade de especificar os valores entre os momentos separadamente, pois o teste primário já não encontrou diferença estatística entre os momentos.

Quadro 1 - Dados referentes à avaliação de aderências de estruturas abdominais, utilizando escore entre “ausente” e “3+”.

G1M1A1	1+	G2M1A1	1+
G1M1A2	Ausente	G2M1A2	1+
G1M1A3	1+	G2M1A3	1+
G1M1A4	1+	G2M1A4	1+
G1M1A5	1+	G2M1A5	1+
G1M2A1	1+	G2M2A1	1+
G1M2A2	Ausente	G2M2A2	1+
G1M2A3	1+	G2M2A3	1+
G1M2A4	1+	G2M2A4	1+
G1M2A5	Ausente	G2M2A5	1+
G1M3A1	1+	G2M3A1	Ausente
G1M3A2	1+	G2M3A2	1+
G1M3A3	1+	G2M3A3	1+
G1M3A4	1+	G2M3A4	1+
G1M3A5	2+	G2M3A5	1+

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

5.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A avaliação microscópica foi realizada de modo a verificar a intensidade de células infiltradas em ambos os grupos, para futura comparação, sem diferenciação do tipo celular.

Na comparação entre os grupos, no mesmo momento, houve diferença estatística somente no último momento de avaliação, ou seja, M3 ($p=0,002973$), a qual notou-se significativa queda da intensidade de células infiltradas contadas pelo *software* “imageJ” no grupo I, o qual recebeu a membrana amniótica tratada com Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS) 0,01%, quando comparado ao grupo II, que recebeu a membrana amniótica preservada em glicerina 98% e, que permaneceu com a contagem celular elevada mesmo em M3. O primeiro e segundo momentos de avaliação (M1 e M2), não mostraram diferença estatística significativa referente à intensidade de infiltrado celular na comparação entre os grupos I e II ($p=0,6833$ para M1; $p=0,0957$ para M2).

Abaixo seguem as tabelas referentes a comparação entre os grupos I e II, com os devidos valores de média e desvio-padrão (tabela 4) e valores de p encontrados

pelo teste T de Student (tabela 5). Os valores exatos das contagens celulares feitas por meio do *software* “imageJ”, encontram-se no quadro 2 (grupo I) e quadro 3 (grupo II).

Tabela 4. Valores das médias e respectivos desvios-padrão.

Grupos/Momentos	M1	M2	M3
Grupo I	7080 ± 733*	6086 ± 1358	3861 ± 1685 ^a
Grupo II	7423 ± 1624	7403 ± 202	7995 ± 1345 ^a

Legenda: ^a indica diferença estatística ($p = 0,002973$) entre os grupos I e II no referido momento.

* indica diferença estatística significativa ($p = 0,01221$) entre os momentos.

Tabela 5. Valores de p obtidos pelo teste T de Student.

Grupos/Momentos	M1	M2	M3
Grupo I			
	0,6833	0,0957	0,002973
Grupo II			

Legenda: Valor de p menor do que 0,05 somente em M3, indicando diferença estatística.

As avaliações estatísticas feitas para percepção de diferença significativa entre os momentos de avaliação pós-operatória, foi por meio do teste de Friedman e, este, mostrou diferença importante somente no grupo I, onde o valor de p encontrado foi de 0,01231. Ao encontrar este valor de p , uma segunda etapa do teste de Friedman é realizada para detectar aonde exatamente aparece esta diferença, visto que a primeira etapa do teste mostra diferença, porém, sem dizer-nos entre quais momentos está, mostrando apenas o valor total de p .

A segunda etapa mostra que, a diferença estatística encontrada na primeira etapa, aparece entre os momentos M1 e M3 de avaliação pós-operatória ($p=0,01221$), e, sem diferença estatística significativa entre os momentos M1 e M2, assim como também entre os momentos M2 e M3 ($p=0,6094$ entre momentos M1 e M2; e, $p=0,1393$ entre momentos M2 e M3).

No grupo II, não houve diferença estatística significativa entre nenhum dos momentos de avaliação e, portanto, tem-se o valor total de p (0,8022). Isto é justificado pelo fato de que, quando a primeira etapa do teste de Friedman não mostra diferença, não há necessidade de se obter os valores individuais de p para comparação entre cada momento.

Abaixo seguem as tabelas com os valores de p obtidos pelo teste de Friedman (tabelas 6 e 7) para avaliação estatística entre os momentos, dentro do mesmo grupo.

A tabela 7, referente ao grupo II, mostra somente o valor total de p , pois, como a primeira etapa não mostrou diferença, não há necessidade de encontrar valores específicos para comparação entre os momentos, conforme mencionado anteriormente.

Tabela 6. Valores de p obtidos pelo teste de Friedman (Total) para o Grupo I com os respectivos valores encontrados para cada comparação entre os momentos.

Grupo I	M1	M2	M3	Total
M1	-	0,6094	0,01221	0,01231
M2		-	0,1393	

Legenda: Grupo I indica diferença estatística pelo valor total de p e, portanto, os valores específicos de cada tempo são necessários, mostrando diferença entre M1 e M3.

Tabela 7. Valores de p obtidos pelo teste de Friedman (Total) para o Grupo II.

Grupo II	M1	M2	M3	Total
M1	-	-	-	0,8022
M2		-	-	

Legenda: Grupo II não indica diferença estatística pelo valor total de p e, portanto, não há necessidade dos valores específicos para cada tempo.

Estas diferenças estatísticas podem ser melhor entendidas e ilustradas por meio de gráficos, para melhor visualização da diferença de contagem celular entre os grupos I e II (gráfico 1), onde percebe-se queda importante no terceiro momento de avaliação pós-operatória (M3).

Gráfico 1 - O gráfico mostra a comparação dos grupos nos três momentos de avaliação. Nota-se queda importante do bloco referente ao grupo I, em M3.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

O teste de Friedman utilizado para avaliação de diferenças entre os momentos no mesmo grupo, mostrado em forma de gráficos para melhor entendimento. Abaixo seguem os gráficos referentes ao grupo I (gráfico 2) e grupo II (gráfico 3), considerando os valores para comparação entre os momentos dentro do mesmo grupo, onde nota-se queda importante em M3 no grupo I, mostrando caimento do bloco em relação aos demais momentos. Diferença estatística ($p=0,01221$) entre M1 e M3, porém sem diferença estatística entre M1 e M2 ($p=0,6094$), assim como M2 e M3 ($p=0,1393$).

Gráfico 2 - Avaliação entre os tempos pós-cirúrgicos do grupo I, feito pelo teste de Friedman, indicando queda do bloco em M3, justificando diferença estatística entre M1 e M3.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Gráfico 3 - Avaliação entre os tempos pós-cirúrgicos do grupo II, feito pelo teste de Friedman, indicando ausência de diferença estatística entre os momentos.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

No gráfico referente ao grupo II, nota-se ausência de diferença estatística ($p=0,8022$) e, conseqüentemente, sem ilustração de considerável queda de infiltrado celular.

Estas diferenças de intensidade de células inflamatórias infiltradas também são possíveis a percepção por meio da visualização de fotos histológicas, onde tornou-se difícil perceber diminuição de intensidade no grupo II nos três momentos de avaliação. Em contrapartida, o grupo I, foi possível a percepção da diminuição da intensidade celular no terceiro momento de avaliação. Entretanto, esta percepção é considerada subjetiva, tornando melhor a sua confiabilidade somente após contagem por meio da utilização do *software* “imageJ”.

Seguem fotos das lâminas utilizadas para avaliação microscópica, onde nota-se, de forma subjetiva e comparativa, manutenção da intensidade entre as fotos referentes aos momentos 1 e 2 (M1 e M2), com posterior notoriedade em diminuição de intensidade de células nas imagens referentes ao terceiro momento de avaliação (M3) do grupo I (figura 13).

Posteriormente, na figura 14, referente às fotos das lâminas utilizadas para avaliação microscópica do grupo II, nota-se manutenção de intensidade celular nos três momentos de avaliação pós-operatórias. Pois, não é possível notar certa discrepância semelhante ao observado nas fotos do grupo I.

Figura 13 - Fotomicrografias de animais pertencentes ao grupo I, em aumento de 4x. Musculatura abdominal saudável (MUSC.) e interface (seta preta). A) Animal pertencente ao M1. Nota-se tecido amniótico (MAE) limpo, ainda não coberto por células inflamatórias, porém, com atividade de células inflamatórias (C.I.) ao redor do material. B) Animal pertencente ao M2. Nota-se infiltrado celular sobre o material amniótico, já com dificuldade de delimitar aonde exatamente está a membrana amniótica. C e D) Animais pertencentes ao M3. Nota-se menor intensidade celular com maior predominância de tecido conjuntivo, sem contato direto entre musculatura e região de enxerto na interface, porém, sem remodelamento construtivo.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 14 - Fotomicrografias de animais pertencentes ao grupo II, em aumento de 4x. Musculatura abdominal saudável (MUSC.) e interface (seta preta). A e B) Animais pertencentes ao M1. Nota-se tecido amniótico (MAE) limpo, ainda não coberto por células inflamatórias, porém, com atividade de células inflamatórias (C.I.) ao redor do material. C) Animal pertencente ao M2. Nota-se infiltrado celular sobre o material amniótico, já com dificuldade de delimitar aonde exatamente está a membrana amniótica. D) Animal pertencente ao M3. Nota-se padrão semelhante ao M2, com grande estrutura, espessa, mantendo celularidade no local onde foi realizado o enxerto. Imagens A, B, C e D com interface sem contato direto entre musculatura e local de enxerto.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

O aumento da biocompatibilidade pode ser evidenciado também pelo contato direto da região onde foi realizado o enxerto com a musculatura do hospedeiro, e não o isolamento por estrutura fibrosa da estrutura enxertada. Esta imagem de contato direto foi evidenciada somente em um animal pertencente ao grupo I, aquele em que se utilizou membrana amniótica equina tratada com detergente SDS 0,01% (figuras 16 e 17).

Figura 15 - Fotomicrografia em aumento de 10x, de animal pertencente ao grupo II. Nota-se interface com espaço, mostrado pela seta preta de dois sentidos, apontando para musculatura e para região do enxerto e, portanto, sem contato direto da musculatura com local do enxerto.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 16 – Fotomicrografia em aumento de 4x de animal pertencente ao grupo I, M3. Nota-se ausência de espaço entre musculatura abdominal saudável (MUSC.) e região do enxerto (MAE), mostrando contato direto entre as estruturas.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 17 – Fotomicrografia referente à figura 16, porém em aumento de 10x. Nota-se ausência de espaço entre as estruturas e contato direto, com tecido conjuntivo mais denso.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

5.3 EFICIÊNCIA DO DETERGENTE SDS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,01%

O detergente Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS) na concentração de 0,01%, foi utilizado na tentativa de realização do procedimento de decelularização do tecido em questão, por motivos já descritos anteriormente no presente trabalho. Este, trata-se de um dos métodos químicos de decelularização. Porém, a concentração utilizada no presente estudo não mostrou eficiência para completa decelularização do tecido em questão quando utilizada durante o período de 18 horas. O parâmetro utilizado para a obtenção deste resultado, foi o de visualização de diversos materiais nucleares presentes no corte histológico ao avaliar a lâmina corada com hematoxilina-eosina (H.E.).

Abaixo seguem fotos das membranas amnióticas natural, tratada com detergente SDS 0,01% e preservada em glicerina 98% após reidratação (imagem do material como foi implantado).

Figura 18 - Fotomicrografia em aumento de 20x da membrana amniótica equina íntegra, não submetida a tratamento algum. Percebe-se material rico em tecido conjuntivo.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 19 - Fotomicrografia em aumento de 40x da membrana amniótica equina tratada com detergente SDS 0,01%. Nota-se material nuclear (setas pretas) e, portanto, não foi efetivamente decelularizada.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Figura 20 - Fotomicrografia em aumento de 40x da membrana amniótica equina preservada em glicerina 98% durante período de 30 dias.

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Quadro 2 - Dados referentes às contagens celulares. Valores obtidos pelo *software* “ImageJ”. À frente da identificação do animal, seguem os três números referentes às três regiões de corte das amostras. Abaixo da identificação do animal nota-se valor único, referente à média dos três valores obtidos. Dados referentes aos animais do grupo I.

G1M1A1 7056	4308 8268 8592	G1M2A1 7110	7418 7231 6682	G1M3A1 6590	7656 4925 7190
G1M1A2 6103	6280 6099 5930	G1M2A2 4063	4253 3498 4439	G1M3A2 2742	2454 2929 2843
G1M1A3 7980	7947 7721 8273	G1M2A3 5725	6769 5747 4660	G1M3A3 4313	4952 3811 4176
G1M1A4 6696	8379 6869 4840	G1M2A4 5996	6522 6330 5138	G1M3A4 2423	2421 2150 2699
G1M1A5 7565	5942 7852 8901	G1M2A5 7535	7904 6596 8107	G1M3A5 3235	2887 3685 3134

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

Quadro 3 - Dados referentes às contagens celulares. Valores obtidos pelo *software* “ImageJ”. À frente da identificação do animal, seguem os três números referentes às três regiões de corte das amostras. Abaixo da identificação do animal nota-se valor único, referente à média dos três valores obtidos. Dados referentes aos animais do grupo II.

G2M1A1 7394	6429 7658 8095	G2M2A1 7342	6470 8572 6984	G2M3A1 6715	5268 8269 6610
G2M1A2 5946	7311 6273 4254	G2M2A2 7427	6565 7588 8128	G2M3A2 9000	9955 11498 5547
G2M1A3 8020	5721 8485 9854	G2M2A3 7736	8628 5440 9141	G2M3A3 6357	6569 5261 7243
G2M1A4 9825	9956 9235 10285	G2M2A4 7215	7084 7989 6573	G2M3A4 9139	9063 9993 8362
G2M1A5 5928	4957 6128 6699	G2M2A5 7293	9218 6124 6537	G2M3A5 8765	7551 8074 10671

Fonte: (AZEVEDO, R. A., 2017)

6 DISCUSSÃO

Os procedimentos de reconstrução de parede abdominal não são tão frequentes na rotina clínico cirúrgica de pequenos animais, embora eventualmente faz-se necessária a realização do procedimento, principalmente para reconstruções traumáticas e/ou procedimentos oncológicos (LEE et al., 2013).

As diferenças entre resultados macroscópicos e microscópicos são realidade entre os materiais estudados. A discussão do presente trabalho objetiva elucidar as diferenças e igualdades destes materiais já estudados, bem como relacionar informações recentes sobre materiais preparados com técnicas de bioengenharia tecidual, a fim de gerar novos questionamentos e necessidades de novos estudos, aproximando gradativamente a bioengenharia tecidual da rotina cirúrgica de pequenos animais.

6.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Uma gama de trabalhos científicos já publicados, tendem a nos ilustrar a maior eficiência de materiais biológicos quando o ponto a ser abordado se trata de aderências viscerais, em procedimentos de reconstrução abdominal. Embora o material mais comumente utilizado na rotina cirúrgica de pequenos animais para esta finalidade seja a malha de polipropileno, é notável que sua reatividade, assim como de outros materiais sintéticos, apresenta-se maior, ocasionando maior incidência e intensidade no quesito “aderência visceral”. Porém, algumas exceções devem ser colocadas (QUITZAN et al., 2003; ARAÚJO et al., 2009; RICCIARDI et al., 2012; LEAL et al., 2014).

No atual estudo, a membrana amniótica equina não apresentou diferenças durante manipulação cirúrgica entre um grupo e outro. Tanto o material tratado com SDS 0,01% quanto preservado em glicerina 98%, apresentaram a mesma característica de maleabilidade, não comprometendo o procedimento cirúrgico, permitindo igualmente o manuseio e sutura do material. A membrana amniótica equina mostrou-se com bom comportamento, induzindo pouca aderência de estruturas abdominais. Ambos os grupos mantiveram o mesmo padrão para este quesito, com exceção de um animal, pertencente ao grupo I, M3. Em questões práticas, o material em questão ocasionou somente aderências de omento maior, o que de certa forma,

ao colocar em pauta as funções do omento, torna-se uma aderência previamente esperada. Esta afirmação se dá, pois, dos 30 animais utilizados neste experimento, somente um apresentou aderência de uma alça intestinal, classificando este indivíduo como “*outlier*”. Estes bons resultados, com poucas aderências ocasionadas por materiais biológicos, já eram descritos por Quitzan et al. (2003), que ao comparar o pericárdio bovino preservado em glicerina com a malha de poliéster para este procedimento, notou grande diferença, mantendo padrão semelhante do material biológico em relação ao resultado obtido neste experimento, apesar da maior sustentabilidade da malha de poliéster. Assim como Greca et al. (2004), ao utilizar malha de polipropileno e submucosa de intestino delgado, Leal et al. (2014), ao utilizar peritônio de paca para o mesmo procedimento, Nowacki et al. (2015), ao utilizar matriz de vaso sanguíneo em comparação com malha de polipropileno, evidenciando relatos descritos a seguir.

Leal et al. (2014), descrevem o uso do peritônio de paca preservado em solução hipersaturada de açúcar 300% e glicerina 98% para reconstrução de parede abdominal e menciona aderências somente de omento maior, corroborando com os resultados desta pesquisa e, dando maior confiabilidade na informação de que materiais biológicos apresentam melhor eficácia para não aderências viscerais. Entretanto, algumas alterações foram notadas em 57,5% dos animais pertencentes aos grupos em que utilizaram o material biológico mencionado neste estudo. Informações estas que, permanecem ausentes no presente estudo, pois, nenhuma intercorrência descrita por Leal et al (2014) ocorreu (aparecimento de abscessos, fístulas, seroma) com a utilização da membrana amniótica em ambos os grupos no presente trabalho, independente do momento de avaliação. Ainda que, estas intercorrências descritas, são relacionadas à presença de gordura no material utilizado (peritônio de paca) e, segundo Alvarenga (1992), a presença de tecido adiposo favorece reações de rejeição do material que, teoricamente, deveria apresentar-se de forma mais inerte, com predominância de tecido conjuntivo. Ainda sobre o trabalho de Leal et al. (2014), no que se refere à metodologia adotada, não há relato da utilização de antibiótico sistêmico nos animais em período de pós-operatório, o que pode facilitar a contaminação da região cirúrgica e aparecimento de abscessos, conforme relatado. A realização da antibiótico terapia em nosso trabalho é variável importante ao considerar a ausência deste tipo de intercorrência neste estudo.

Brun et al. (2002), ao utilizarem pericárdio canino conservado em solução hipersaturada de sal para reparo do musculo reto abdominal em ratos, notaram aderências ao enxerto, somente de estruturas ligamentares, além do omento maior. Portanto, também excluem as aderências viscerais ao mencionar ligamento largo do útero, ligamento lateral da bexiga e omento maior, corroborando com a teoria de que materiais biológicos são melhores na abordagem de aderências de estruturas abdominais, pois, estas estruturas mencionadas que normalmente aderem ao enxerto de natureza biológica, não trazem consequências que comprometam o paciente receptor do enxerto. Dados que permite concluir o bom resultado de nossa pesquisa neste quesito.

Os materiais sintéticos tendem a mostrar maior reatividade neste quesito. Araújo et al. (2009) mostra a comparação de dois materiais sintéticos (poliéster com colágeno e polipropileno com ácido poliglicólico) e, mesmo com a utilização de fatores que teoricamente diminuiriam este problema, as aderências de alças intestinais estiveram presentes em ambos os grupos, com pequena diferença entre eles, sem diferenças estatísticas. Contudo, é importante ressaltar que, sua metodologia difere de forma considerável daquela utilizada neste trabalho, visto que, em publicação feita por Araújo et al. (2009), faz-se a lesão abdominal bilateral para colocação dos dois materiais. Deste modo, a intensificação do processo inflamatório intra-abdominal não pode ser descartada quando comparada à metodologia do presente estudo. Ademais, o período final de avaliação para esta publicação é de 60 dias, ao passo que no presente experimento utilizou-se o período de 40 dias.

Concordando com os resultados obtidos neste estudo e, ainda abordando o melhor desempenho de materiais biológicos para não aderências, em artigo publicado por RICCIARDI et al. (2012), é utilizada a tela de polipropileno para reconstrução de parede abdominal em ratos Wistar, mesma linhagem de animal utilizada neste projeto. Ao dividir os animais em dois grupos, o autor compara a malha de polipropileno íntegra com a malha de polipropileno envolta por tecido fibroso do próprio animal receptor. Ao analisar os dados estatisticamente, notou-se diferença estatística entre os grupos, onde o grupo que recebeu o material envolto por tecido fibroso apresentou menor quantidade e intensidade de aderências viscerais. O autor faz a avaliação com a utilização de escore, variando de grau 0 (ausência de aderências) a grau 5 (aderências firmes à manipulação, entre alças intestinais e entre alça e abdômen), sendo que, no grau 2, já é considerada a aderência de estruturas além do omento maior, como as

alças intestinais por exemplo. Contudo, em ambos os grupos, não houve isenção de aderências, o que corrobora com a informação de que, de modo geral, há maior reatividade e maiores aderências de estruturas quando se utiliza material sintético. Estes dados corroboram, pois, ao relacionar componente natural do corpo, as aderências foram menores quando comparadas àqueles em que receberam o material sem componente natural, ou seja, malha sintética voltada diretamente ao abdômen do paciente.

Apesar destas informações adquiridas, alguns autores descrevem variações. Clarke et al. (1996), compara a malha de polipropileno com a submucosa intestinal suína. Nesta publicação, o autor não evidencia aderências de alças intestinais ou qualquer outra estrutura importante. Para todos os animais do experimento, somente foram evidenciadas aderências de omento maior. Porém, uma avaliação que coloca em porcentagem a extensão do enxerto acometida por aderência de omento maior, mostra que os animais que receberam a submucosa intestinal suína tiveram menor extensão do enxerto acometida por aderências, assim como os animais que receberam a tela de polipropileno apresentaram maior extensão acometida. Entretanto, é importante ressaltar que a metodologia utilizada para esta publicação difere de forma grosseira com àquela utilizada no presente trabalho, pois, em publicação de Clarke et al. (1996), são utilizados cães, enquanto este trabalho utiliza roedores da espécie *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar. As lesões são bilaterais, enquanto neste trabalho é unilateral, assim como o material de sutura (fio polidioxanona, o qual diz respeito a material sintético reabsorvível; e, fio náilon, utilizado neste trabalho, o qual trata-se de material sintético não absorvível) e o tempo de avaliação pós-operatória (período máximo de quatro meses para publicação de Clarke et al. (1996) e período máximo de 40 dias no presente projeto). Apesar de diferença não tão significativa, os dados corroboram, pois, o material de origem biológica mostrou melhores números.

Ao comparar a malha de polipropileno com a submucosa de intestino delgado, Greca et al. (2004) notou a mesma tendência que foi discutida até o momento. Pois, ao realizarem eutanásia nos animais após quatro semanas de pós-operatório, evidenciaram aderências de omento maior em ambos os grupos, porém, com aderências de intestino ao enxerto, somente no grupo em que recebeu a tela de polipropileno, ainda que a diferença estatística não tenha sido de grande importância ($p=0,087$).

Ainda favorecendo os resultados obtidos no presente experimento e correlacionando as informações, a comparação entre a malha de polipropileno e a submucosa intestinal foi realizada novamente por Lee et al. (2013), porém, neste caso, a submucosa intestinal utilizada era de natureza canina. Os resultados obtidos por este autor e seus colaboradores são positivos, fortalecendo ainda mais a maior reatividade dos materiais sintéticos, mostrando aderências viscerais nos animais em que receberam a malha de polipropileno e sem aderências nos animais em que receberam a submucosa intestinal canina. Neste artigo, além destas constatações, em seus resultados, o autor relata melhor processo de regeneração muscular autóloga, melhor remodelamento dos tecidos adjacentes e respostas inflamatórias menos intensas. Em dado momento no artigo, os autores relatam a submucosa intestinal canina decelularizada, apesar deste processo não estar descrito em sua metodologia. Esta informação corrobora com as hipóteses abordadas no presente trabalho e que serão discutidas em breve. Apesar dos bons resultados destes autores, faz-se necessário a realização de mais estudos, pois, o tempo de degradação do biomaterial em relação a reposição do tecido hospedeiro permanece desequilibrado e necessita encontrar este equilíbrio.

Fortalecendo as informações já obtidas na literatura e pelo resultado visto no presente estudo, Nowacki et al. (2015), também já menciona em sua publicação a melhor efetividade dos materiais de origem biológica para não aderências de estruturas abdominais ao comparar a matriz de vaso sanguíneo em duas formas diferentes com a malha de polipropileno, evidenciando diferença importante com maiores aderências nos animais que receberam a malha de polipropileno.

Estes dados discutidos até o momento, ainda não envolvem a membrana amniótica propriamente dita. Mas baseia-se em elucidar a maior eficiência de materiais de natureza biológica quando o objetivo é prevenir, ou ao menos, minimizar as aderências de estruturas abdominais, tornando o resultado obtido pelo presente experimento, positivo neste aspecto, corrobora com a grande maioria dos autores. Ademais, curiosamente, a partir deste momento abordando a própria membrana amniótica, estudos são publicados dando enfoque às prevenções de aderências viscerais e, uma destas formas, é por meio da utilização da membrana amniótica (RENNEKAMPFF et al., 1993; SZABO et al., 2000). Rennekampff et al. (1993) em sua publicação relaciona, inclusive, a posição da membrana amniótica e se foi armazenada ou não em solução salina. Com relação ao posicionamento do material,

o autor e seus colaboradores relatam que, ao colocar a membrana amniótica com a face estromal voltada à cavidade abdominal, há maior tendência ao aparecimento de aderências. Ao passo que em posição epitelial voltada à cavidade abdominal e, com o material viável ou “fresco”, as aderências são menores. Apesar das diferenças entre formas de armazenamento e posicionamento, o resultado por nós obtido concorda com o autor quando se refere a eficiência da membrana amniótica como estrutura para evitar ou minimizar aderências de estruturas abdominais. Ainda que, em nosso trabalho, não foi correlacionado ou levado em consideração o posicionamento da face epitelial e estromal.

Szabo et al. (2000), compararam a membrana amniótica com material sintético absorvível (seprafilme) como materiais para evitar aderências de estruturas abdominais em procedimentos de reconstrução de parede abdominal em ratos utilizando malha de polipropileno. Os autores deste experimento dividiram os animais em três grupos, sendo (i) grupo controle (*PPM*), o qual recebeu somente a tela de polipropileno; (ii) grupo que recebeu a membrana amniótica como material antiaderente (*HAM*); e, por fim, (iii) grupo que recebeu seprafilme como material antiaderente (*seprafilm*). Os dois grupos que apresentavam os materiais para minimizar aderências, mostraram ótima capacidade antiaderente destas estruturas, pois, os animais em que receberam somente a tela de polipropileno mostraram de forma significativa maior intensidade de aderências. Estas informações descritas acima, corroboram com os dados encontrados na presente pesquisa.

Em contraponto, Barbuto et al. (2015), não mostram diferença de aderências intra-abdominais ao utilizar a membrana amniótica para esta finalidade. Porém, nesta publicação, os autores não fazem comparação com qualquer outra estrutura antiaderente. Ao realizar procedimento para reconstrução de parede abdominal em ratos utilizando tela de polipropileno, somente avalia a membrana amniótica em diferentes locais (abaixo da malha sintética, em contato com interior abdominal; ou, entre a pele e a malha sintética, com a malha em contato com o interior abdominal). Neste caso, Barbuto et al. (2015), não relatam diferenças entre as duas técnicas, apesar de não ficar claro em sua publicação quais estruturas foram acometidas. Embora algumas informações permaneçam subentendidas nesta publicação, como esta mencionada logo acima, suas conclusões contrapõem a maioria dos autores, assim como os próprios resultados obtidos pelo presente experimento.

6.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A avaliação microscópica do presente trabalho foi para observar a intensidade do processo inflamatório gerado em cada grupo, com base na contagem das células e notar possíveis diferenças. As decelularizações, como técnicas realizadas para bioengenharia tecidual, tem como objetivo, criar materiais imunologicamente compatíveis, com considerável menor resposta imune e inflamatória, inclusive, criando biocompatibilidade interespecies. Pois, a remoção do material genético e manutenção somente da matriz extracelular permite tal compatibilidade (MAZZA et al., 2015).

Os resultados obtidos ao avaliar o grupo II do presente experimento, grupo que recebeu a membrana amniótica equina preservada em glicerina 98%, mostrou resultado semelhante ao de diversos autores que trabalham com reconstrução de parede abdominal utilizando material biológico, porém sem processamento para diminuição de carga genética (BRUN et al., 2002; QUITZAN et al., 2003; BRUN et al., 2004; GRECA et al., 2004; LEAL et al., 2014).

Os resultados obtidos por estes autores, nada mais mostram que, é natural o processo inflamatório que acompanha o evento cicatricial após a implantação do material. Pois, o organismo do receptor tende a isolar o material, com suas células de defesa, por entender que se trata de “corpo estranho” (QUITZAN et al., 2003). Este processo mostra ao final, degradação do material implantado com processo de fibrose no local quando utilizado material de origem biológica (BRUN et al., 2002; LEAL et al., 2014).

Estas informações corroboram com os achados do presente estudo se analisado principalmente o grupo II, o qual passou por procedimento semelhante ao dos autores mencionados logo acima, assim como preservação semelhante (glicerina 98%) do material biológico. Pois, as imagens histológicas mostram resultados semelhantes ao deste experimento quando comparados aos dos autores mencionados.

GRECA et al. (2004) ao compararem a malha de polipropileno com a submucosa de intestino delgado para reconstruir abdômen de ratos, percebeu infiltrado inflamatório crônico aos 30 dias de pós-operatório, em 30% dos animais e infiltrado inflamatório moderado em 40% dos animais que receberam a submucosa de intestino delgado, entretanto, a sua metodologia para mensuração foi com base em escore. Neste trabalho, os resultados mostram menor intensidade inflamatória no

grupo que recebeu a malha de polipropileno. Resultado que traz à tona nova discussão, pois, quando se considerou aderências viscerais, o polipropileno mostrou maior incidência. Independente da menor intensidade de infiltrado celular inflamatório no grupo que recebeu a submucosa intestinal, GRECA et al. (2004) mostram que a reação acontece e que, por sua vez, pode perdurar e se manter por períodos mais longos até que o material seja degradado e a fibrose seja instalada.

Assim como GRECA et al. (2004), LEAL et al. (2014) perceberam que o infiltrado inflamatório mononuclear esteve presente em todos os tempos de avaliação (sete, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia) após procedimento de reconstrução com peritônio de Paca conservado em dois diferentes meios. Esta informação entra em acordo com os dados obtidos no presente trabalho, onde percebemos o mesmo tipo de infiltrado celular nos três momentos de avaliação pós-operatória. Tanto o resultado por nós obtido, quanto LEAL et al. (2014) mostram que estes processos permanecem por tempos prolongados, visto que neste projeto o período máximo de avaliação é aos 40 dias e para o autor mencionado é de 60 dias. Ao final deste prazo de 60 dias, os autores relatam fibrose em todos os animais e ausência do enxerto, o que leva a hipótese de biodegradação do material.

Estas informações corroboram com os resultados obtidos neste trabalho e também com BRUN et al. (2002). Pois, da mesma forma, estes autores notam infiltrado inflamatório mononuclear na maioria dos tempos, com exceção principalmente dos dois primeiros momentos de avaliação, assim como o processo de fibrose instalado aos 30 dias de pós-operatório. Embora os resultados destes autores acordem com àqueles obtidos por este trabalho no grupo II, é importante ressaltar diferenças nas metodologias, pois, a intensificação por nós abordada foi realizada com auxílio de *software* para contagens, já os autores mencionados acima, abordam de forma semiquantitativa, com base em escore.

QUITZAN et al. (2003), mostra resultados que conflitam com àqueles discutidos até o momento. Em sua publicação, os autores comparam a malha de poliéster com o pericárdio bovino para reconstrução de parede abdominal em ratos e, relatam presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear até os 15 dias de pós-operatório, referindo a processo inflamatório agudo ainda aos 15 dias, dados que diferem dos autores mencionados acima. Contudo, a reação inflamatória em todos os tempos de avaliação foi menos intensa no grupo que recebeu o material biológico. Informação que contrapõe resultado de GRECA et al. (2004), onde notou maior intensidade no

grupo que recebeu o material biológico, e BARBUTO et al. (2015), que ao usar membrana amniótica junto com malha sintética, obteve maior intensidade inflamatória naqueles que receberam o âmnion.

Apesar de haverem poucas diferenças, estas informações adquiridas por estes autores, nos mostra o processo normal de cicatrização após enxerto com materiais biológicos, percebendo que, se o material não passa por processamento algum a fim de melhorar a biocompatibilidade, e somente se faz manutenção em soluções de preservação, os resultados e eventos encontrados são semelhantes há muito tempo.

O grupo I do presente projeto utilizou a membrana amniótica equina tratada com detergente Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS) na concentração de 0,01%. Esta solução se trata de um método químico de decelularização e preparo de materiais de origem biológica para utilização em tratamentos e procedimentos reconstrutivos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

O resultado obtido neste estudo com o material tratado com SDS 0,01%, foi semelhante nos dois primeiros momentos de avaliação (M1 e M2), mas mostrando importante diferença no terceiro momento de avaliação (M3), onde observou-se queda considerável na contagem de células inflamatórias quando comparado ao grupo II. Esta informação mostra que, a membrana amniótica tratada com detergente SDS 0,01% apresentou maior tendência em cessar o processo mais rapidamente. Esta informação corrobora com alguns autores que trabalharam com materiais decelularizados (KEANE et al., 2012; MAZZA et al., 2015).

Embora o resultado não tenha sido de total satisfação, a importante diminuição na contagem celular na fase M3 do grupo I, levanta hipóteses e abre perguntas para futuros trabalhos envolvendo técnicas referentes a bioengenharia tecidual. Ao considerar o resultado não satisfatório, refere-se ao processo inflamatório relacionado aos outros momentos de avaliação e ao não remodelamento efetivo do enxerto, já que Brown et al. (2009) e Turner; Badylak, (2013), mencionam melhor cicatrização e remodelamento mais construtivo na utilização de materiais decelularizados. Porém, o não remodelamento ideal obtido neste trabalho, pode ser justificado pela não decelularização efetiva da membrana amniótica, já que após o processo de tratamento com SDS 0,01%, notou-se quantidade importante de material nuclear quando o material, por nós, foi avaliado.

Os tecidos decelularizados tendem a estimular maior ativação de macrófagos do tipo 2, ou seja, macrófagos pró-regenerativos. Estes macrófagos tipo 2, são

responsáveis por realizar melhor cicatrização e melhor remodelamento. Por isso a informação de que materiais decelularizados mostram remodelamento mais construtivo. Já os materiais com material celular e, conseqüentemente, material genético, tendem a estimular maior ativação de macrófagos tipo 1, também denominados macrófagos pró-inflamatórios. Estes, por sua vez, causam maiores respostas inflamatórias, com reações de corpo estranho ao material implantado, levando a fibrose e/ou encapsulamento (BROWN et al., 2009; TURNER; BADYLAK, 2013).

Mazza et al. (2015), ao utilizarem fígado humano decelularizado para implante em subcutâneo e intra-abdominal de ratos, avaliaram aos sete e 21 dias após a implantação. Aos sete dias, notou-se atividade inflamatória ao redor do implante decelularizado, porém, aos 21 dias após implantação, observou-se pouco, ou quase isenção de células inflamatórias ao redor do implante e contato direto com o tecido receptor, o que demonstra maior biocompatibilidade ao cessar rapidamente o processo inicial e não perdurar o processo isolando o biomaterial com reações de corpo estranho, observando inclusive, biocompatibilidade interespecies de materiais decelularizados, visto que, o fígado decelularizado era de origem humana, sendo implantado em roedor.

Estes resultados de Mazza et al. (2015), não exatamente corroboram com os resultados obtidos neste presente estudo, todavia, há, de certa forma, uma aproximação das informações. Isto se dá pela importante queda na contagem de células inflamatórias aos 40 dias de pós-operatório, quando comparado ao grupo II, que manteve a contagem elevada. Visto que, Mazza et al. (2015) mostra quase isenção de células inflamatórias ao redor do implante aos 21 dias após implantação.

KEANE et al. (2012), também descreve sobre as diferenças e conseqüências na resposta do paciente receptor quando o processo de decelularização não é efetivo. Nesta publicação, o autor menciona a decelularização com ácido paracético durante uma e duas horas, avaliando o receptor dos implantes aos 14 e 28 dias após procedimento. Em relação ao grupo que recebeu material somente mantido em solução de PBS, os dois tempos de decelularização mostraram infiltrado celular inflamatório de forma consideravelmente menor. Apesar desta diminuição importante, a comparação entre os diferentes tempos de decelularização não mostraram diferença considerável, apontando, inclusive, contagem pouco acima no dia 28 após implantação. Entretanto, ao avaliar a proporção de macrófagos do tipo M1 e M2,

notou-se melhor resposta de M2 no grupo que recebeu material decelularizado por mais tempo, apesar da não diferença estatística. Como já descrito anteriormente, a predominância de macrófagos do tipo M2 é fundamental para o melhor remodelamento dos tecidos.

Estas informações, da mesma forma ao comparar Mazza et al. (2015), não corroboram totalmente com os resultados por nós obtido. Porém, traz aproximação das informações e levanta hipóteses e questionamentos para trabalhos futuros utilizando técnicas de bioengenharia tecidual. Visto que, a diferença celular foi evidente e algumas imagens mostram indícios de possível melhor biocompatibilidade da membrana amniótica tratada com detergente SDS 0,01% quando comparado aos animais que receberam o material somente preservado em glicerina 98%.

Nowacki et al. (2015), mostra em sua publicação, ao utilizar matriz de vaso sanguíneo, a melhor biocompatibilidade do material decelularizado também pela sua superfície de contato com o tecido nativo. A imagem mostra claramente que, não há isolamento do material pelo organismo do receptor, mas sim contato direto da região de enxerto com a musculatura nativa, pouco ou quase isenção de infiltrado celular inflamatório com colagenização densa. Porém, nesta publicação, o autor mostra um fator que pode auxiliar positivamente no processo, pois inclui células tronco mesenquimais em um dos grupos de utilização do material decelularizado. Estas informações, assim como com Keane et al. (2012) e Mazza et al. (2015), não exatamente corroboram com o presente experimento, mas também fazem estreitamento das informações. Visto que, esta imagem de contato direto do material enxertado com o tecido muscular nativo, sem mostrar isolamento do material, é evidenciada em nosso resultado somente em um animal, correspondente ao grupo I, em terceiro momento de avaliação (M3).

Ainda com informações que concordam com os resultados obtidos pelo presente experimento, Lee et al. (2013), compara a tela de polipropileno com a submucosa de intestino delgado que, em dado momento, refere que o material se apresenta decelularizado, mostra que o biomaterial preparado previamente, apresentou melhor indicativo de regeneração muscular e menores índices de inflamação durante o processo após procedimento cirúrgico. Assim como Mirsadraee et al. (2007), que compara o pericárdio humano em diversas formas de preparo, que notou cápsula fibrosa exacerbada no material preservado em glutaraldeído e mínima quantidade de células inflamatórias no material decelularizado implantado em ratos.

Fortalecendo, junto com Mazza et al. (2015), a biocompatibilidade interespecies dos materiais decelularizados, visto que, o pericárdio utilizado é de origem humana.

Estas informações colocadas em questão na presente discussão, não torna o resultado do grupo I deste trabalho, satisfatório. Porém, mesmo com as diferenças de metodologias de cada autor mencionado, levantam-se questionamentos para futuras abordagens com materiais de origem biológica decelularizados.

6.3 EFICIÊNCIA DO DETERGENTE SDS NA CONCENTRAÇÃO DE 0,01%

Foi testada a eficiência do detergente SDS na concentração de 0,01% no presente projeto e, este, por sua vez, não apresentou eficiência e decelularização da membrana amniótica equina suficientemente adequada para o procedimento de reconstrução de parede abdominal em ratos, quando mantido o material pelo tempo mencionado no item material e métodos. Esta concentração foi avaliada, pois, colocou-se em ponderação as condições do material em questão. A membrana amniótica equina, por se tratar de material extremamente delgado, rico em tecido conjuntivo e sem celularidade exacerbada, optou-se por avaliar a eficiência do SDS em menor concentração. Este resultado de não decelularização efetiva da membrana amniótica equina, justifica a ausência do termo “decelularizada” no título deste projeto e, portanto, considerou-se que, o material foi submetido a tratamento com a substância mencionada acima.

Esta concentração do detergente SDS para decelularização de membrana amniótica não foi encontrada ao realizar o levantamento, principalmente de forma isolada, o que fortalece a conclusão da sua insuficiência. Song et al. (2017) ao decelularizar membrana amniótica humana para utilização em lesões cutâneas, apesar de não usar o mesmo detergente, associou três métodos diferentes para seu procedimento. Em sua metodologia, o autor descreve a decelularização do material utilizando método físico por agitação, químico e enzimático, onde a substância química, no momento de sua utilização, trata-se de Triton X-100 na concentração de 1%, ainda com associação do método físico anterior a este, e enzimático posterior a este.

MAHMOUDI-RAD et al. (2013), também associa método físico com enzimático e quelante de cálcio para decelularização de membrana amniótica humana. Em sua metodologia o autor relata três ciclos de congelamento e descongelamento e,

posteriormente, manutenção do material ao longo da noite em tripsina-EDTA. Estas informações corroboram com os resultados por nós obtido no presente estudo, visto que, não foi eficiente o procedimento somente com método químico isolado de baixa concentração e o autor associa diferentes métodos, mostrando em seu tratamento, a necessidade de abordagem pouco mais agressiva para a decelularização do material.

Ao decelularizar pericárdio humano, material diferente daquele utilizado no presente experimento, porém, com características semelhantes, MIRSADRAEE et al. (2007), utilizou o detergente SDS em seu protocolo. Porém, sua utilização foi feita em concentração superior àquela por nós utilizada. O autor menciona a concentração de 0,1% do detergente SDS, ainda em associação com mais três técnicas, utilizando ainda solução hipotônica, solução enzimática e solução ácida. Ainda que a concentração do detergente SDS esteja maior, quando comparada à concentração por nós utilizada, fez-se necessário a associação de diversas técnicas para a efetiva decelularização do material. Informação que entra em acordo com os dados obtidos pelo presente estudo, visto que, houve ineficácia no método utilizado, sugerindo aumento de concentração do detergente utilizado, assim como o tempo de tratamento e associação de outras técnicas.

A concentração do detergente SDS de 0,03% para decelularização de membrana amniótica foi descrita por Wilshaw et al. (2006), trazendo-nos a informação de concentração mais próxima daquela utilizada no presente trabalho. Contudo, a substância, assim como os outros autores acima mencionados, não atuou de forma isolada. Pois, o autor relata a associação com solução hipotônica, solução enzimática e solução ácida na associação de técnicas para tal decelularização. Assim como os demais autores, deixa mais consistente a sugestão de rever os protocolos para procedimentos de decelularização para futuros trabalhos que, por nós, poderão ser realizados. Dois anos após, Wilshaw et al. (2008) menciona protocolo semelhante para decelularização de membrana amniótica humana.

A concentração de 0,01% do detergente SDS foi relatada por GONZÁLEZ-ANDRADES et al. (2015), porém, para decelularização de córneas suínas. Nesta publicação, os autores comparam três substâncias diferentes (cloreto de benzalcônio, detergente SDS e Tritom X-100) nas concentrações de 0,01%, 0,05% e 0,1% durante os tempos de 12, 24 e 48 horas. As córneas suínas são estruturas oculares extremamente delicadas e devem ser manuseadas de forma mais cuidadosa em comparação com a membrana amniótica e, ainda assim, com material

consideravelmente mais fino e delicado do que a membrana amniótica, o melhor protocolo de decelularização foi de 0,1% durante o período de 48 horas. Informação que corrobora e fortalece com o que se sugere no presente trabalho; que necessita reavaliação e mais estudos no futuro com maiores concentrações do detergente SDS, assim como a sua associação com demais técnicas e substâncias.

Os autores mencionados neste item de discussão, entram em acordo, quando subintende-se que, a associação de técnicas e/ou a maior concentração da solução do detergente SDS são necessárias para a efetiva decelularização da membrana amniótica. Pois, o presente trabalho confirma que a baixa concentração, utilização de forma isolada e o tempo reduzido de manutenção do material em tratamento, é ineficaz para a total decelularização do material em questão.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com o presente trabalho que, a incorporação da membrana amniótica equina, tanto preservada em glicerina 98% quanto tratada com detergente SDS 0,01%, no aspecto macroscópico, é boa, mostrando boa cicatrização e alinhamento do tecido implantado com o tecido muscular hospedeiro, assim como a sua baixa reatividade ao não causar aderências viscerais e, conseqüentemente, comprometimento dos órgãos.

O grupo em que foram utilizadas as membranas tratadas com SDS 0,01%, apresentou menor intensidade de infiltrado celular de forma considerável, no terceiro momento de avaliação (40 dias após procedimento cirúrgico/M3), porém, sem o remodelamento construtivo da região operada. Este resultado levanta hipóteses e abre portas para futuras pesquisas em relação aos materiais decelularizados e sua biocompatibilidade.

O detergente Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate* – SDS) na concentração de 0,01%, utilizado de forma isolada, durante o período de 18 horas, não mostrou eficiência para decelularização da membrana amniótica equina, devido considerável presença de material nuclear ao avaliar histologicamente o material. Este resultado sugere a realização de protocolos mais agressivos, aumentando a concentração da substância e/ou associando com outras substâncias e técnicas para alcançar eficiência necessária para decelularização da membrana amniótica equina.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R.; BAPTISTA, L. C.; MUKAI, L. S. **Tópicos em Cirurgia de Cães e Gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1992. p. 33-42.

AMID, P. K.; SHULMAN, A. G.; LICHTENSTEIN, I. L.; SOSTRIN, S.; YOUNG, J.; HAKAKHA, M. Experimental evaluation of a new composite mesh with the selective property of incorporation to the abdominal wall without adhering to the intestines. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 28, 1994, p. 373-375.

ARAÚJO, U. R. M. F.; CZECHKO, N. G.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; BUDEL, V. M.; BALDERRAMA, C. M. S. R.; ZIMMERMANN, E.; ULRICH ANDREAS DIETZ, R. A. Reparo intraperitoneal de defeitos da parede ventral do abdome com telas de poliéster com colágeno e polipropileno com ácido poliglicólico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**. v. 36, n. 03, 2009, p. 241-249.

AZHIM, A.; SYAZWANI, N.; MORIMOTO, Y.; FURUKAWA, K. S.; USHIDA, T. The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds. **Journal of Biomaterials Applications**. v. 29, n. 01, 2014, p. 130-141.

BARBUTO, R. C.; ARAUJO, I. D.; BONOMI, D. O.; TAFURI, L. S. A.; NETO, A. C.; MALINOWSKI, R.; BARDIN, V. S. S.; LEITE, M. D.; DUARTE, I. G. L. Uso da membrana amniótica como cobertura da cavidade abdominal na reconstrução da parede com tela de polipropileno em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**. v. 42, n. 01, 2015, p. 049-055.

BARROS, P. S. M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; GOMES, T. L. S. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**. v. 01, Issue 2-3, 1998, p. 119-123.

BASTOS, E. L. S.; FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y.; SIMÕES, M. J.; SILVANO, R. A. B. The role of bovine preserved peritoneum in rats ventral hernia. A histological evaluation. **Acta Cirúrgica Brasileira**. Marília, v. 21, n. 5, p. 328 - 331, 2006.

BATISTA, L. C.; DALECK, C. R.; SHIMANO, A. C.; ALESSI, A. C.; ABRAHAO, M. S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, equino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.33, 1996, p. 305-312.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal reproduction Science**. v. 60/61, 2000, p. 691-702.

BROWN, B. N.; VALENTIN, J. E.; STEWART-AKERS, A. M.; MACCABE, G. P.; BADYLAK, S. F. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. **Biomaterials**. v. 30, n. 08, 2009, p. 1482-1491.

BRUN, M. V.; PIPPI, N. L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E. A.; BECK, C. A. C.; CUNHA, O.; FILHO, S. T. L. P.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos wistar. **Ciência Rural**. v. 32, n. 06, 2002, p. 1019-1025.

BRUN, M. V.; PIPPI, N. L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E. A.; BECK, C. A. C.; CUUNHA, O. FILHO, S. T. L. P.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R.; SILVA, T. F. Solução hipersaturada de sal ou glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos Wistar. **Ciência Rural**. v. 34, n. 01, 2004, p. 147-153.

CAIXETA, E. S.; FAGUNDES, N. S.; CAIXETA, M. S.; PYLES, E. S. S. Desenvolvimento embrionário inicial equino - **Revisão**. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 103, 2008, p. 25-34.

CAMARGO, A. D. **Propriedades morfológicas e tensiométricas do peritônio de Paca (*Agouti Paca*, LINNAEUS, 1766) a fresco, e conservados em glicerina**, 44 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, 2009.

CLARKE, K. M.; LANTZ, G. C; SALISBURY, K.; BADYLAK, S. F.; HILES, M. C.; VOYTIK, S. L. Intestine Submucosa and Polypropylene Mesh for Abdominal Wall Repair in Dogs. **Journal of Surgical Research**. v. 60, n. 18, 1996, p. 107-114.

COSTA NETO, J. M.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C.; BRACCIALLI, C. S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**. v. 29, n. 04, 1999, p. 697-703.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**. v. 32, n. 12, 2011, p. 3233-3243.

CUNHA, O.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; LEMOS, S. T.; FILHO, P.; MOYA, L. G.; GAIGA, L. H.; TAFFAREL, M. O.; RIOS, A.; FERNANDES, D. R. Esofagoplastia torácica com retalho de pericárdio em gatos. **Ciência Rural**. v. 33, n. 02, 2003, p. 325-330.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; FILHO, J. G. P.; NETO, J. C. M. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**. v. 22, n. 2, p. 179 - 183, 1992.

D'AMBRA, L.; BERTI, S.; FELEPPA, C.; MAGISTRELLI, P.; BONFANTE, P.; FALCO, E. Use of bovine pericardium graft for abdominal wall reconstruction in contaminated fields. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**. v. 04, n. 07, 2012, p. 171-176.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic Membrane Transplantation. Suporte hemodinâmico. **British Journal Ophthalmology**. v. 83, n. 6, 1999, p. 748-752.

FERNER, K.; MESS, A. Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v. 178, n. 1, 2011, p. 39-50.

FERREIRA, G. T. N. M.; SOUZA, T. F. B.; SAKAMOTO, S. S.; SILVA, T. C. C.; ANDRADE, A. L. Aspectos clínicos do enxerto conjuntival 360º e da membrana amniótica criopreservada no tratamento de úlceras de córnea em cães. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 34, n. 03, 2013, p. 1239-1252.

FRANCISCO, J. C.; CUNHA, R. C.; SIMEONI, R. B.; GUARITA-SOUZA, L. C.; FERREIRA, R. J.; IRIODA, A. C.; SOUZA, C. M. C. O.; SRIKANTH, G. V. N.; NITYANAND, S.; CHACHQUES, J. C.; CARVALHO, K. A. T. Amniotic membrane as a potent source of stem cells and a matrix for engineering heart tissue. **Journal of Biomedical Science and Engineering**. v. 06, 2013, p. 1178-1185.

FRANDSON, R.D. et al. **Anatomia e Fisiologia Dos Animais de Fazenda**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 454p.

FU, R. H.; WANG, Y. C.; LIU, S. P.; SHIH, T. R.; LIN, H. L.; CHEN, Y. M.; SUNG, J. H.; LU, C. H.; WEI, J. R.; WANG, Z. W.; HUANG, S. J.; TSAI, C. H.; SHYU, W. C.; LIN, S. Z. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. **Cell Transplantation**. v. 23, n. 4-5, 2014, p. 621-630.

GIOVANI, A. M. M.; CROCI, A. T.; OLIVEIRA, C. R.; FILIPPI, R. Z.; SANTOS, L. A. U.; MARAGNI, G. G.; ALBHY, T. M. Comparative study of cryopreserved boné tissue and tissue preserved in a 98% glycerol solution. **Clinics**. v. 61, n. 06, 2006, p. 565-570.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**. v. 27, n. 19, 2006, p. 3675-3683.

GOMES, J. A. P.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N.; CHAVES, A. P.; CUNHA, M. C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias reconstrutivas da superfície ocular nas ceratoconjuntivites cicatriciais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 62, n. 05, 1999, p. 562-576.

GONZÁLEZ-ANDRADES, M.; CARRIEL, V.; RIVERA-IZQUIERDO, M.; GARZÓN, I.; GONZÁLES-ANDRADES, E.; MEDIALDEA, S.; ALAMINOS, M.; CAMPOS, A. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. **Translational Vision Science & Technology**. v. 04, n. 02, 2015, 13 p.

GRECA, F. H.; FILHO, Z. A. S.; ROCHA, S. L.; BORSATO, K. S.; FERNANDES, H. A. D.; NIISIDE, M. A. Submucosa de intestino delgado no reparo de defeito em parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 19, n. 05, 2004, p. 471-477.

GRUBER-BLUM, S.; BRAND, J.; KEIBL, C.; FORTELNY, R. H.; REDL, H.; MAYER, F.; PETTER-PUCHNER, A. H. Abdominal wall reinforcement: biological vs. Degradable synthetic devices. **Hernia**. v. 21, n. 02, 2016, p. 305-315.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Fertilização e clivagem. In. HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7ed. Barueri: Manole, 2004, p. 111-126.

KEANE, T. J.; LONDONO R.; TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**. v. 33, n. 06, 2012, p. 1771-1781.

LEAL, L. M.; FERREIRA, A. R. S.; REIS, A. C. G.; MARTINS, L. L.; GARCIA FILHO, S. P.; MACHADO, R. F. O uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% ou glicerina a 98% implantados na parede abdominal de ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 05, 2014, p. 1383-1391.

LEE, A. J.; LEE, S. H.; CHUNG, W. H.; KIM, D. H.; CHUNG, D. J.; DO, S. H.; KIM, H. Y. Evaluation of a canine small intestinal submucosal xenograft and polypropylene mesh as bioscaffolds in na abdominal full-thickness resection model of growing rats. **Journal of Veterinary Science**. v. 14, n. 02, 2013, p. 175-184.

MAHMOUDI-RAD, M.; ABOLHASANI, E.; MORAVVEJ, H.; MAHMOUDI-RAD, N.; MIRDAMADI, Y. Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 38, n. 06, 2013, p. 646-651.

MAZZA, G.; ROMBOUTS, K.; HALL, A. R.; URBANI, L.; LOUNG, T. V.; AL-AKKAD, W.; LONGATO, L.; BROWN, D.; MAGHSOUDLOU, P.; DHILLON, A. P.; FULLER, B.; DAVIDSON, B.; MOORE, K.; DHAR, D.; COPPI, P. D.; MALAGO, M.; PINZANI, M. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. **Scientific Reports**. v. 05, n. 13079, 2015.

MAZZANTI, A.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; SILVEIRA, A. F.; FARIA, R. X.; ALVES, A. S.; GONÇALVES, G. F.; STEDILE, R.; BRAGA, F. A. Músculo Diafragma Homólogo Conservado em Solução Supersaturada de Açúcar para Reparação de Grande Defeito no Diafragma de Cão. **Ciência Rural**. v. 31, n. 02, 2001, p. 277-283.

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**. v. 66, 2006, p. 1699-1702.

MIRSADRAEE, S.; WILCOX, H. E.; WATTERSON, K. G.; KEARNEY, J. N.; HUNT, J.; FISHER, J.; INGHAM, E. Biocompatibility of acellular human pericardium. **Journal of Surgical Research**. v. 143, n. 02, 2007, p. 407-414.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia clínica. 8 ed. Rio de Janeiro. 2008.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; FREITAS, P. M. C.; BELETTI, M. E.; MASTRANTONIO, E. C.; SHIMIZU, B. J.; SILVA, L. A. F.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K. Análise morfológica e microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada muscular do intestino delgado de cães. **Ciência Animal Brasileira**. v. 04, n. 02, 2003, p. 117-123.

MUTTINI, A.; SALINI, V.; VALBONETTI, L.; ABATE, M. Stem cell therapy of tendinopathies: suggestions from veterinary medicine. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**. v. 02, n. 3, 2012, p. 187-192.

NIKNEJAD, H.; PEIROVI, H.; JORJANI, M.; AHMADIANI, A.; GHANAVI, J.; SEIFALIAN, A. M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells and Materials**. v. 15, 2008, p. 88-99.

NOWACKI, M.; JUNDZILL, A.; NAZAREWSKI, L.; KOTELA, A.; KLOSKOWSKI, T.; SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J.; BODNAR, M.; LUKASIEWICZ, A.; NAZAREWSKI, S.; KOTELA, I.; KUCHARZEWSKI, M.; POKRYWCZYNSKA, M.; MARSZALEK, A.; DREWA, T. Blood vessel matrix seeded with cells: A better alternative for abdominal wall reconstruction – A long-term study. **Biomed Research International**. v. 2015, 2015, 8 p.

OKAZAKI, T.; CASEY, M. L.; OKITA, J. R.; MACDONALD, P. C.; JOHNSTON, J. M. Initiation of human parturition. XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 139, n. 04, 1981, p. 373-381.

OLIVEIRA, V. A.; ALVARENGA, J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas em membros locomotores de equinos. **Ciência Rural**. v. 28, n. 04, 1998, p. 623-628.

OLIVEIRA, T. C.; SCAVONE, A. R. F.; MACHADO, M. R. F.; MAZZUCATTO, B. C. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 38, n. 8, 2008, p. 2218 - 2224.

OLIVEIRA, L. L.; SOUZA, D. B.; ABÍLIO, E. J.; CARVALHO, E. C. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**. v. 02, n. 03, 2009, p. 175-188.

PAULO, N. M. Tratamento de feridas experimentais do cão utilizando a membrana amniótica de equino. **Revista da Universidade de Alfenas**. v. 04, 1998, p. 07-10.

PIGEON, J. Treatment of Second-Degree Burns With Amniotic Membranes. **Canadian Medical Association Journal**. v. 83, n. 16, p. 844-845, 1960.

PLUMMER, C. E. The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002–2008). **Veterinary Ophthalmology**. v. 12, n. 1, 2009, p. 17-24.

PONTES, K. C. S.; BORGES, A. P. B.; ELEOTÉRIO, R. B.; FAVARATO, L. S. C.; DUARTE, T. S. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural**. v. 41, n. 12, 2011, p. 2120-2127.

QIAO, J.; JIANG, Z.; YANG, Y.; CHI, J.; QIAO, X.; HAN, B.; LIU, W. Study of a new biodegradable hernia patch to repair abdominal wall defect in rats. **Carbohydrate Polymers**. v. 15, n. 172, 2017, p. 255-264.

QUITZAN, J. G.; RAHAL, S. C.; ROCHA, N. R.; CROCCI, A. J. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n. 04, 2003, p. 297-301.

RABELO, R. E.; TAVARES, G. A.; PAULO, N. M.; SILVA, L. A. F.; DAMASCENO, A. D.; ANDRADE, M. A.; MARTINS, F. G.; ROMANI, A. F.; SILVA, O. C.; TRINDADE, B. R. Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98 % e no glutaraldeído a 4 %. **Ciência Animal Brasileira**. v. 05, n. 04, 2004, p. 229-238.

RENNEKAMPFF, H. O.; DOHRMANN, P.; FÖRY, R.; FÄNDRICH, F. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. **Journal of Investigative Surgery**. v. 07, n. 03, 1994, p. 187-193.

RIAU, A. K.; BEUERMAN, R. W.; LIM, L. S.; MEHTA, J. S. Preservation, sterilization and de-epithelization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**. v. 31, 2010, p. 216-225.

RICCIARDI, B. F.; CHEQUIM, L. H.; GAMA, R. R.; HASSEGAWA, L. Correção de hérnia abdominal com tela envolta por tecido fibroso – Estudo em ratos Wistar. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 39, n. 03, 2012, p. 195-200.

RIET, M. V.; BURGER, J. W. A.; BONTHUIS, F.; JEEKEL, J.; BONJER, H. J. Prevention of adhesion formation to polypropylene mesh by collagen coating. **Surgical Endoscopy**. v. 18, 2004, p. 681-685.

SANGWAN, V. S.; BURMAN, S.; TEJWANI, S.; MAHESH, S. P.; MURTHY, R. Amniotic membrane transplantation: A review of current indications in the management of ophthalmic disorders. **Indian Journal of Ophthalmology**. v. 55, n. 04, 2014, p. 251-260.

SCHIMIDT, L. R.; CARDOSO, E. J.; SCHIMIDT, R. R.; BACK, L. A.; SCHIAZAWA, M. B.; D'ACAMPORA, A. J.; SOUSA, M. V. The use of amniotic membrane in the repair of duodenal wounds in Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 25, n. 01, 2010, p. 18-23.

SCHMALTZ, E. G.; MARQUES, C.; JORGE, J. L. G.; ANDRADE, C. Z. N.; SILVA, M. F.; JUNIOR, J. A. F. Reparação de parede abdominal com tela dupla de polipropileno e poligrecaprone, pós retalho TRAM em reconstrução mamária. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 29, n. 04, 2014, 544-549.

SONG, M.; WANG, W.; YE, Q.; BU, S.; SHEN, Z.; ZHU, Y. The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. **Materials Science and Engineering: C. Materials for Biological Applications**. v. 77, 2017, p. 739-747.

STELMANN, U. J. P.; SILVA, A. A.; SOUZA, B. G.; HESS, T. M.; AGUIAR, G. C. Utilização de Pericárdio Bovino Como Reforço da Rafia do Peritônio no Tratamento Cirúrgico de Eventração em Equino: Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VIII, n. 14, 2010.

STOPIGLIA, A. J.; ALVARENGA, J.; BARROS, P. S. M.; GUERRA, J. L.; IWASAKI, M. Réparation chirurgicale de la paroi thoracique du chien. **Le Point Vétérinaire**. v. 18, n. 97, 1986, p. 239-243.

SZABO, A.; HAJ, M.; WAXSMAN, I.; EITAN, A. Evaluation of Seprafilm and Amniotic Membrane as Adhesion Prophylaxis in Mesh Repair of Abdominal Wall Hernia in Rats. **European Surgical Research**. v. 32, 2000, p. 125-128.

TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T.; NIKAIDO, T. The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 105, n. 3, 2007, p. 215-228.

TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. Biologic scaffolds for musculetendinous tissue repair. **European Cells and Materials**. v. 25, 2013, p. 130-143.

VIDOR, S. B.; MARQUES, J. M. V.; MOURA, L. F. L.; GOMES, C.; PAZ, A. H.; GOMES, H. M.; MEURER, L.; BARROS, R. R.; GUIMARÃES, K. M.; CIRNE-LIMA, E. O.; CONTESINI, E. A. Reparo de hérnia abdominal com pericárdio bovino associado a células-tronco mesenquimais em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, n.01, 2013, p. 01-10.

VULCANI, V. A. S.; MACORIS, D. G.; PLEPIS, A. M. G. Biomateriais para reparação cirúrgica da parede abdominal em animais domésticos Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**. v. 12, n. 02, 2009, p. 141-147.

WILSHAW, S. P.; KEARNEY, J. N.; FISHER, J.; INGHAM, E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. **Tissue Engineering**. v. 12, n. 08, 2006, p. 2117-2129.

WILSHAW, S. P.; KEARNEY, J. N.; FISHER, J.; INGHAM, E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogenic cells. **Tissue Engineering: Part A**. v. 14, n. 04, 2008, p. 463-472.

ZERWES, M. B. C.; STOPIGLIA, A. J.; MATERA, J. M.; FANTONI, D. T.; STERMAN, F. A.; LACERDA, P. M. O. Avaliação do tratamento cirúrgico da hérnia perineal em cães com reforço de membrana de pericárdio equino preservado em glicerina 98%. **Brazilian Jornal of Research Animal Science**. v. 48, n. 03, 2011, p. 220-227.

ZHENG, M. H.; CHEN, J.; KIRILAK, Y.; WILLERS, C.; XU, J.; WOOD, D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: Possible implications in human implantation. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**. v. 73. n. 01, 2005, p. 61-67.