

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

DISSERTAÇÃO

**MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA CRIOPRESERVADA APLICADA EM
FERIDAS CUTÂNEAS DE CAVALOS**

MARCOS VINICIUS DIAS ROSA

Seropédica/RJ

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

MEMBRANA AMNIÓTICA EQUINA CRIOPRESERVADA APLICADA EM
FERIDAS CUTÂNEAS DE CAVALOS

MARCOS VINICIUS DIAS ROSA

Sob orientação do Professor:

Dr. Paulo Landgraf Botteon

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica/RJ

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

D788m Dias Rosa, Marcos Vinicius, 1986-
Membrana Amniótica Equina Criopreservada Aplicada
em Feridas Cutâneas de Cavalos / Marcos Vinicius Dias
Rosa. - Niterói, 2019.
93 f.

Orientador: Paulo de Tarso Landgraf Botteon.
Coorientador: Maurilio Rosa.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária Patologia e Ciências Clínicas,
2019.

1. Membrana Amniótica Equina. 2. Biomateriais . 3.
Enxerto. 4. Ferida. I. Landgraf Botteon, Paulo de
Tarso, 1964-, orient. II. Rosa, Maurilio, 1957-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária Patologia e Ciências Clínicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA PATOLOGIA E
CIÊNCIAS CLÍNICAS

MARCOS VINICIUS DIAS ROSA

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Clínicas**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/_____.

Paulo Landgraf Botteon (Dr.) UFRRJ
(Orientador)

Marta Fernanda Albuquerque da Silva (Dr.) UFRRJ

Phillipe Bauer de Araújo Dória (Dr.) UFF

Be water, my friend.
(Bruce Lee)

Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores e exemplos na vida, meus pais Maurilio Rosa e Nilza Carlos Dias Rosa.

À minha esposa Michele Guimarães Jacintho Rosa e filha Marina Guimarães Rosa, cuja paciência infinita com as longas horas de trabalho e pesquisa talvez nunca possam ser compensadas, mas certamente renderão bons frutos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão Maximiano Dias Rosa, pelas incontáveis conversas, debates e discussões, principalmente ao longo desses últimos anos. Seu ponto de vista é, e sempre será imprescindível.

Ao Prof. Dr. Dennis Eugene Brooks, o professor e pesquisador mais incansável que já conheci, sem a sua influência há exatos quinze anos, eu provavelmente nunca teria escolhido a carreira que escolhi.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo de Tarso Landgraf Botteon, um poço infindável de paciência. Conhece-me desde que me entendo por gente e, primeiro através das histórias do meu pai e depois pessoalmente, tive a oportunidade e o privilégio de conviver. Seus questionamentos certamente me impulsionaram a fazer o melhor de mim neste projeto.

Aos meus maiores exemplos de profissionais na Medicina Veterinária, o Prof. Dr. Sérgio Aguiar de Barros Vianna e a MV. Karen Stenos Possidente, este espaço é pequeno para agradecer e registrar tudo que já fizeram por mim, mas acima de tudo muito obrigado por me fazer sentir como parte da família.

A Prof. Dr. Marilene de Farias Brito e a MV. Yasmim Daoualibi pela execução dos laudos histopatológicos, dados fundamentais para a execução deste projeto.

As colegas profissionais do Centro Universitário Serra dos Órgãos PhD. Júlia Siqueira Simões e DSc. Daniela Mello Vianna Ferrer que de muitas maneiras me incentivaram a prosseguir com este projeto e alcançar meus objetivos.

A grande amiga MV. Msc. Sabina Gaia Campos Lemos, uma guerreira, cuja força sempre serviu para me motivar.

Aos amigos MV. Leonardo Antoniol Brasiliense de Almeida, MV. Alisson Meshala de Aguiar Britto e MV. Ricardo dos Santos Aguiar, companheiros que a graduação me deu para o resto da vida.

RESUMO

ROSA, Marcos Vinicius Dias. **Membrana amniótica equina criopreservada aplicada em feridas cutâneas de cavalos**. 2019. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Os equinos são animais predispostos a sofrerem lesões cutâneas extensas, e mesmo sendo lesões comuns nesses animais, as feridas requerem conhecimento e cuidado especiais para alcançar um resultado bem-sucedido. Sendo assim, novos métodos de manejo de lesões se fazem necessários para auxiliar o profissional médico veterinário. Neste cenário, ressurgiu o uso da membrana amniótica, que é um dos biomateriais mais antigos utilizados na recuperação de tecidos. O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a utilização da membrana amniótica equina (MAE) congelada indiretamente por meio do nitrogênio líquido e conservada entre -10° e -24°C como método auxiliar no tratamento de lesões cutâneas na região distal dos membros anteriores de equinos. Para tanto, foi realizado um estudo experimental, utilizando seis equinos, fêmeas, híginas, com idades de 3 a 10 anos. A MAE foi coletada de éguas parturientes híginas, previamente avaliadas. As feridas nas éguas do estudo foram feitas cirurgicamente nas extremidades distais dos membros anteriores, especificamente na região metacarpiana, sob anestesia local. Um dos membros foi escolhido como tratado, permanecendo o contralateral como controle. Foram avaliados os seguintes parâmetros macroscópicos e sensoriais, como: sensibilidade dolorosa à palpação digital ao redor da ferida; presença de tecido de granulação; secreções; e hemorragia após debridamento durante a limpeza. Os parâmetros avaliados microscopicamente foram: a integridade do epitélio, a organização do tecido conjuntivo, a presença de hemorragia, fibroplasia, hiperplasia epitelial, hiperqueratose, neovasos e os tipos celulares presentes. As avaliações foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 14, 21, 28, e 63 a fim de padronizar os resultados estatísticos, visto que o fechamento completo da lesão em tempos diferentes para cada animal poderia afetá-los negativamente. O estudo concluiu que o tratamento com a MAE atingiu as expectativas esperadas, sendo um tratamento eficaz, simples e com custo relativamente baixo. Com isso, se comprova a hipótese defendida, de que o uso da MAE como método de auxílio e modulação do processo de cicatrização das feridas é vantajoso e eficaz para ser aplicado rotineiramente na clínica de equinos, pois promove uma rápida recuperação cicatricial, além de mais organizada histologicamente em comparação com o grupo controle, o que ficou comprovado pela maior neovascularização e melhor qualidade da fibroplasia, além de causar menor sensibilidade à dor e promover cicatrização mais rápida.

Palavras-chave: Biomateriais. Enxerto. Ferida. Membrana Amniótica Equina.

ABSTRACT

ROSA, Marcos Vinicius Dias. **Cryopreserved equine amniotic membrane and its use in cutaneous wounds of horses.** 2019. 92p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Horses are predisposed animals to suffer extensive skin lesions, and even being common lesions in these animals, wounds require special knowledge and care to achieve a successful result. Thus, new methods of injury management are needed to assist the veterinarian. In this scenario, the use of the amniotic membrane resurfaces, which is one of the oldest biomaterials used in tissue recovery. The aim of this research was to evaluate the use of the equine amniotic membrane (EAM) indirectly frozen by liquid nitrogen and stored at -10° to -24°C as an auxiliary method in the treatment of skin lesions in the distal region of the anterior limbs of horses. For this, an experimental study was carried out, using six healthy female horses, aged 3 to 10 years. The EAM was collected from healthy parturient mares, previously evaluated. Wounds in the mares of the study were surgically made at the distal extremities of the anterior limbs, specifically in the metacarpal region, under local anesthesia. One of the members was chosen as treaty, while the contralateral remained as control. The following macroscopic and sensory parameters were evaluated, such as: painful sensitivity to digital palpation around the wound; presence of granulation tissue; secretions; and bleeding after debridement during cleaning. The parameters evaluated microscopically were: the integrity of the epithelium, the organization of connective tissue, the presence of hemorrhage, fibroplasia, epithelial hyperplasia, hyperkeratosis, neovascular and the present cell types. Evaluations were performed on days 0, 3, 7, 14, 21, 28, and 63 in order to standardize statistical results, as the complete closure of the lesion at different times for each animal could negatively affect them. The study concluded that treatment with EAM achieved expected result and was effective, simple and relatively low cost. This proves the hypothesis that the use of EAM as a method of aid and modulation of the wound healing process is advantageous and effective to be routinely applied in the clinic of horses, since it promotes a fast healing recovery, besides more histologically organized compared to the control group, which was proven by the greater neovascularization and better quality of fibroplasia, besides causing lower pain sensitivity and promoting faster healing.

Keywords: Biomaterials. Equine Amniotic Membrane. Graft. Wound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática da pele com folículo piloso.	20
Figura 2:	Representação esquemática de diferentes estágios de reparo de feridas.	34
Figura 3:	Foto da MAE durante a separação das 2 camadas. A porção não vascularizada é a amniótica e a vascularizada é a coriônica. HDM Horse Service, Dezembro de 2016.....	51
Figura 4:	Corte histológico de MAE criopreservada íntegra e sem alterações após reidratação. HE, obj. 2,5.	52
Figura 5:	MAE acondicionada em papel grau cirúrgico, em contato com nitrogênio líquido para congelamento.	52
Figura 6:	MAE lacrada antes da aplicação, já cortada nas dimensões 4x4cm, ainda congelada, armazenada em papel grau cirúrgico.	53
Figura 7:	MAE já sem forma, após a primeira troca de curativo.	55
Figura 8:	Foto da MAE na lesão, antes de realizar o curativo. HDM Horse Service, Janeiro de 2019.....	56
Figura 9:	Coleta de amostra para realização de biópsia, obtida da borda da ferida.	57
Figura 10:	Gráfico apresentando os escores médios de granulação nas feridas.	60
Figura 11:	Gráfico apresentando os escores médios da secreção nas feridas.	61
Figura 12:	Gráfico apresentando os escores médios de hemorragia das feridas.	62
Figura 13:	Taxa média de cicatrização das feridas, comparando-se o grupo controle (CTL) e tratado com membrana amniótica (MBN), onde “0” corresponde a nenhuma cicatrização e “1” cicatrização total.	62
Figura 14:	Fotos da evolução cicatricial onde se observa o comparativo das lesões do membro-controle (CTL) e as lesões tratadas com a MAE em uma das éguas do estudo.....	64
Figura 15:	Fotos da evolução cicatricial onde se observa o comparativo das lesões do membro-controle (CTL) e as lesões tratadas com a MAE em uma das éguas do estudo.....	65

- Figura 16: Dia 7 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Observa-se área focal de infiltrado inflamatório misto, com detritos celulares e fibrina polimerizada (crosta) adjacente ao tecido de granulação, caracterizado por fibroplasia, neovascularização e infiltrado inflamatório. HE, obj. 20. B) Grupo MBN. Observa-se moderada hiperplasia da epiderme (acantose), e adjacente a esta há uma área de ulceração e acentuado infiltrado inflamatório misto, predominantemente polimorfonuclear com acentuada quantidade de tecido de granulação, caracterizado por fibroplasia e neovascularização. HE, obj. 10.66
- Figura 17: Dia 14 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Evidencia-se a epiderme acantótica, e derme com acentuada quantidade de tecido de granulação. HE, obj. 10. B) Grupo MBN. Observa-se acentuado tecido de granulação e áreas multifocais de fibrina na extremidade da lesão. HE, obj. 10.....66
- Figura 18: Dia 28 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Verifica-se epiderme acentuadamente acantótica, com leve hiperpigmentação e hiperqueratose ortoqueratótica moderada. HE, obj. 10. B) Grupo MBN. Observa-se epiderme acentuadamente acantótica, com hiperqueratose ortoqueratótica moderada e derme com acentuado tecido de granulação. HE, obj. 10.67
- Figura 19: Dia 63 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Verifica-se epiderme com pequena área normotrófica seguida por área moderadamente acantótica. HE, obj. 5. B) Grupo MBN. Observa-se epiderme com células epidérmicas de citoplasma amplo e eosinofílico. Na derme, acentuada quantidade de vasos sanguíneos de pequeno calibre (neovascularização), formados por células endoteliais robustas e preenchidas por moderada quantidade de hemácias. HE, obj. 5.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escores médios de granulação nas feridas	59
Tabela 2: Escores médios da secreção.....	60
Tabela 3: Escore médio de hemorragia.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs:	Anti-Inflamatórios Não Esteroides
bFGF:	Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos
CTGF:	Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
CTL:	Grupo Controle
EGF:	Fator de Crescimento Epidérmico
HA:	Ácido Hialurônico
HE:	Hematoxilina e Eosina
HGF:	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HVC:	Hospital de Clínicas Veterinária
KGF:	Fator de Crescimento de Queratinócito
MA:	Membrana Amniótica
MAE:	Membrana Amniótica Equina
MAH:	Membrana Amniótica Humana
MBN:	Grupo Membrana
MMPs:	Metaloproteinases da Matriz
MSC:	Células-Tronco Mesenquimais
PDGF:	Fator Derivado Plaquetário
PGE2:	Prostaglandina E2
PMNs:	Polimorfonucleares
PRP:	Plasma Rico em Plaquetas
SAM:	Membrana Ânion Solubilizada
TGF- β :	Fator de Crescimento Transformador- β
VEGF:	Fator Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO TEGUMENTO COMUM	17
2.2 FERIDAS	21
2.2.2 Feridas em extremidades distais de equinos	23
2.3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	25
2.3.1 Fase inflamatória	27
2.3.2 Fase proliferativa	31
2.3.3 Fase de remodelação	33
2.3.4 Características de cicatrização de feridas na região distal dos membros de equinos	36
2.4 A MEMBRANA AMNIÓTICA	37
2.5 USO DA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	40
2.6 USO DA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS NA REGIÃO DISTAL DOS MEMBROS DE EQUINOS	46
3 METODOLOGIA	50
3.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO	50
3.2 ANIMAIS	50
3.3 MEMBRANA AMNIÓTICA	50
3.4 FERIDAS	53
3.5 AVALIAÇÃO	56
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4 RESULTADOS	59
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO I – CEUA	78
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	79
ANEXO III – RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS	81
ANEXO IV - QUADROS COM OS ESCORES ANOTADOS EM CADA PARÂMETRO AVALIADO MICROSCOPICAMENTE	90

1 INTRODUÇÃO

Os equinos são animais que respondem ao perigo através de um instinto de luta e fuga, o que os predispõem a lesões cutâneas extensas. A grande maioria dos cavalos de criação está destinada à vida atlética e, sendo assim, uma reparação tecidual defeituosa representa um peso econômico significativo na indústria, sendo reportados 7% de animais aposentados devido a lesões resultantes de feridas (THEORET, 2008).

O manejo de feridas em cavalos pode causar medo em alguns e paixão em outros (DAHLGREN, 2018). O tratamento clássico de feridas consiste em debridamento cirúrgico, medicação tópica e bandagem, porém características como a genética, a resposta inflamatória, suprimento de sangue e oxigênio, síntese, crescimento e fenótipo de fibroblastos, entre outros, tornam o manejo de feridas um grande desafio, principalmente nas extremidades inferiores dos membros distais (THEORET, 2008).

Mesmo sendo lesões comuns em equinos, as feridas requerem conhecimento e cuidado excepcionais para alcançar um resultado satisfatório. Nem todas as decisões clínicas são difíceis, mas todas requerem atenção em série aos detalhes, desde o momento da apresentação inicial até o que pode se tornar uma série longa e complexa de decisões baseadas na progressão da ferida e no resultado cosmético desejado (DAHLGREN, 2018).

Sendo assim, novos métodos de manejo de lesões se fazem necessários para auxiliar o profissional médico veterinário. Theoret (2004) alerta que, embora seja improvável que os métodos conservadores e consagrados pelo tempo de tratamento de feridas desapareçam, o desenvolvimento de substâncias que estimulam o reparo é iminente e os clínicos de equinos devem permanecer cientes dessas inovações para melhor atender seus clientes e pacientes.

Entre as maiores dificuldades no manejo de feridas equinas estão as feridas não cicatrizadas, o tecido de granulação exuberante e conseguir uma cobertura funcional do tecido. Nesses casos, a conquista de um bom resultado cosmético é um bônus. Diante desse quadro surge a medicina regenerativa, que representa um amplo conjunto de ferramentas com grande promessa de manipular as deficiências reconhecidas na cicatrização de feridas equinas e melhorar seu

resultado. Em termos gerais, a medicina regenerativa se refere ao desenvolvimento de tecidos capazes de substituir ou restaurar tecidos nativos que estão ausentes, perdidos ou danificados devido a defeito congênito, envelhecimento, doença ou lesão, e essa definição abrange uma vasta gama de terapias (DAHLGREN, 2018).

Neste cenário, ressurgiu o uso da membrana amniótica, que é um dos biomateriais mais antigos utilizados na recuperação de tecidos. Seu uso foi primeiramente documentado por Davis em 1910, quando foi empregado em transplantes de pele. Desde então, esta ganhou importância devido à sua capacidade de reduzir cicatrizes e inflamação, melhorando a cicatrização de feridas e auxiliando a proliferação e diferenciação celular como resultado das suas propriedades antimicrobianas. Além disso, é um biomaterial que pode ser facilmente obtido, processado e transportado (NIKNEJAD, 2008).

O emprego deste material na medicina veterinária já vem apresentando bons resultados como comprovado na oftalmologia equina por Plummer (2009), em gatos por Barachetti, Giudice e Mortellaro (2010) e a membrana equina também já foi utilizada em cães com bons resultados conforme relatado por Fahie e Shettko (2007).

Mas, conforme explica Dahlgren (2018), esse é um campo que está se expandindo em um ritmo tão rápido que tem se tornado difícil acompanhar as novas descobertas científicas e, de fato, as aplicações de várias terapias já ultrapassaram até mesmo a taxa em que a medicina baseada em evidências pode fornecer dados para apoiar aplicações clínicas. Nesse caso, ultrapassar a capacidade de produzir evidências rigorosas de eficácia vem sendo constatado no caso terapias regenerativas usadas para o tratamento de feridas equinas, sendo cada vez mais necessárias pesquisas voltadas para essa área da medicina veterinária, o que justifica a relevância do presente estudo.

Dessa forma, este estudo traz a seguinte questão problema: O uso da membrana amniótica como método de auxílio e modulação das feridas é vantajoso e eficaz para ser aplicado rotineiramente na clínica de equinos? O estudo defendeu a hipótese de que sim, pois promove uma rápida recuperação cicatricial, além de mais organizada histologicamente.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a utilização da membrana amniótica equina (MAE) congelada por meio do nitrogênio líquido e conservada

entre -10° e -24°C como método auxiliar no tratamento de lesões cutâneas em feridas experimentais.

Como objetivos específicos, este estudo procurou realizar uma comparação entre o tempo de completo fechamento das lesões frente à utilização da membrana no membro que recebeu o tratamento, em relação ao sem nenhum tratamento, que funcionou como controle; avaliar a facilidade no manejo, manutenção e aplicação do material; realizar teste microbiológico para avaliar a confiabilidade do método após o tratamento da membrana e certo período de criopreservação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO TEGUMENTO COMUM

O tegumento comum, popularmente chamado apenas como pele, se constitui em uma barreira externa do organismo, ao mesmo tempo que é a forma de contato do corpo com o meio ambiente. Trata-se do maior órgão de todos os mamíferos e uma perda de 25% resulta em complicações fatais, o que comprova sua função vital para o organismo. Também possui importância diagnóstica, pois pode refletir o estado de saúde do animal ou indicar uma doença interna, manifestando-se como icterícia, cianose ou edema. O tegumento comum também possui um valor econômico considerável no que se refere às indústrias de couro, pele e lã. Durante o desenvolvimento evolucionário, o tegumento comum desenvolveu várias estruturas especializadas em adaptação à sua função complexa, podendo-se citar: tela subcutânea (subcutis); pele (cutis) com derme, epiderme e pelos; e suas modificações (glândulas da pele, incluindo as glândulas mamárias; coxins digitais; revestimento da falange distal como unha, garra e casco; cornos - chifres) (REESE et al, 2016).

O tegumento é de grande importância e tem uma ampla variedade de funções vitais para a manutenção da homeostase do organismo, promovendo uma barreira que controla a perda de água e eletrólitos; protegendo o meio interno contra as injúrias físicas, químicas e microbiológicas do meio externo; desempenhando papel ativo na indução e manutenção de respostas imunes; sendo um órgão sensorial que fornece sensações de calor, frio, dor, pressão e prurido; sendo responsável pela regulação da temperatura através do isolamento, variação do fluxo de sangue e sudorese; realizando controle hemodinâmico através de alterações vasculares periféricas; e também tendo função glandular de secreção e excreção de gases, líquidos e solutos, crescimento de pelos, além da síntese de vitamina D. As diferentes regiões do tegumento, tais como o ouvido, pálpebras, lábios, prepúcio, regiões palmares e plantares têm funções especializadas e apresentam diferenças estruturais do tegumento que cobre a superfície corporal geral (LLOYD; PATEL, 2003).

A pele (cutis) envolve o corpo e se funde a membranas mucosas em diversas aberturas dos sistemas digestório, respiratório, urinário e genital. Sua superfície é marcada por uma rede de sulcos finos e cristas, sendo esses contornos mais distintos em áreas onde não há pelos. A pele pode ser subdividida em: derme (dermis, corium), que é a camada profunda de tecido conectivo; e epiderme (epidermis), que é o epitélio superficial (REESE et al, 2016).

Alguns autores, como Lucas (2008), incluem uma terceira camada, que seria a mais profunda, denominada de hipoderme ou tecido celular subcutâneo. Os queratinócitos dessa camada sintetizam grânulos lamelares que possuem enorme importância na barreira de proteção oferecida pela epiderme.

A derme representa a estrutura de tecido conectivo do tegumento, sendo a parte que mais contribui para sua espessura. É amplamente composta por fascículos de fibras colágenas que se encontram dispostos paralelamente à superfície da pele. Estas fibras entrelaçadas formam uma rede densa que responde pelo aumento da força de tensão do tegumento. Uma rede adicional formada por fibras elásticas deixa o tegumento maleável. A derme pode ser subdividida em: camada reticular e camada papilar. A camada reticular é densa, sendo rica em fibras e pobre em células, situando-se diretamente na tela subcutânea. A camada papilar se localiza sob a epiderme e é rica em vasos sanguíneos e células. O contato entre a camada papilar e a epiderme aumenta com o desenvolvimento de cristas e papilas, estruturas que são tratadas de forma conjunta sendo denominadas de corpo papilar, o qual desempenha duas funções principais: aumentar a aderência mecânica entre a derme e a epiderme, e intensificar a difusão de substâncias nutritivas da derme (intensamente vascularizada) para a epiderme que é pouco irrigada (REESE et al, 2016).

A epiderme é formada por um epitélio escamoso estratificado e queratinizado, sendo contínua com as membranas mucosas nas junções mucocutâneas e pode ser diferenciada da mucosa pela presença de pelos e de glândulas sebáceas e sudoríparas. A epiderme pode ser dividida em cinco camadas: camada basal; camada espinhosa; camada granulosa; camada lúcida; e camada córnea. A camada mais profunda é a camada basal, que se localiza sobre uma membrana de base sob a qual se encontra a derme. Nessa camada, os queratinócitos sofrem divisão celular mitótica, seguida por migração em direção à superfície. No caminho da camada basal para a superfície, os queratinócitos

passam por vários processos de diferenciação (queratinização e cornificação), cujo produto final é a célula cornificada morta (REESE et al, 2016).

A camada granulosa recebe essa denominação devido às suas células se caracterizarem pela presença de grande quantidade de grânulos, de tamanho e forma irregulares, compostos por querato-hialina. Esta camada é fonte de aminoácidos livres que garantem a hidratação normal da camada córnea. A camada lúcida corresponde a uma camada fina de células anucleares, mortas e completamente queratinizada. Ocorre exclusivamente em coxins palmo-plantares e plano nasais, não sendo encontrada em outras regiões do corpo. A camada córnea é a camada mais externa da epiderme, sendo composta por queratinócitos em sua fase final de desenvolvimento. É composta basicamente por algumas camadas de células envoltas por uma matriz lipídica. Os queratinócitos encontram-se em seu último estágio de diferenciação, onde apresentam uma estrutura altamente especializada em sua periferia, chamada de envelope celular, que possui funções protetoras por conter polímeros insolúveis, que são desenvolvidos a partir de proteínas que são sintetizadas na camada espinhosa. Esse envelope queratinizado e impermeável oferece suporte estrutural às células e resiste à invasão de microrganismos e agentes ambientais deletérios (LUCAS, 2008).

Observa-se que o principal componente da epiderme são os queratinócitos, que correspondem a 85% de suas células. Vários tipos de células são responsáveis pelos 15% restantes da epiderme e, embora estejam em menor quantidade, essas células têm um papel importante na grande variedade de funções do tegumento. São as seguintes: melanócitos; células de Langerhans; células de Merkel (REESE et al, 2016).

Os melanócitos são responsáveis pela pigmentação da pele, pois produzem os melanossomos, que são grânulos amarelados ou pretos, assimilados por queratinócitos vizinhos. Esses melanossomos se agrupam ao redor dos núcleos dos queratinócitos e, com isso, os protege do efeito mutagênico da radiação ultravioleta. Os melanossomos são os responsáveis pela cor da pele e proporcionam camuflagem e coloração de regiões específicas da pele, que expressam sinais para outros animais. As células de Langerhans integram o sistema imune e pertencem ao sistema de fagocitose mononuclear. Possuem uma função importante na defesa do corpo contra infecções virais, tumores cutâneos e

alergias de contato. As células de Merkel são especialmente numerosas no entorno de elevações táteis e funcionam como receptores ao toque. São células epiteliais neuroendócrinas que reagem a estímulos mecânicos e conduzem as informações recebidas para as terminações nervosas livres no interior do epitélio (REESE et al, 2016).

A figura 1 a seguir traz uma representação esquemática da pele de mamíferos.

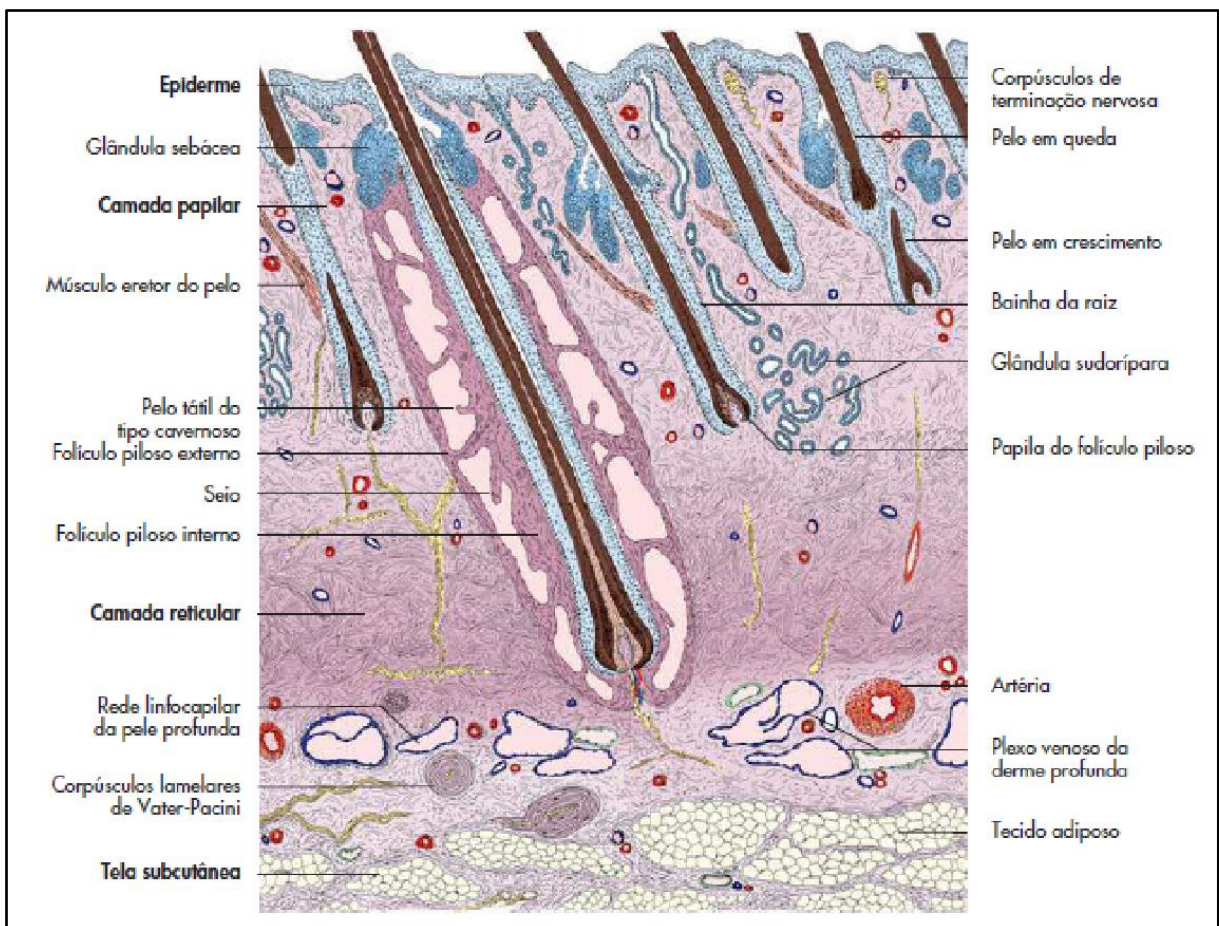


Figura 1: Representação esquemática da pele com folículo piloso.
Fonte: REESE et al, 2016.

Normalmente a espessura da pele decresce ventralmente, sendo mais espessa nas regiões cervical dorsal, torácica dorsal, cefálica e na base da cauda, e se apresentando mais delgada nas regiões das orelhas, axilar, inguinal e perianal. Nessas observações se excluem as superfícies palmo-plantares. Em equinos, geralmente a espessura da pele varia em torno de 3,8mm. A superfície

cutânea dos mamíferos é levemente ácida, com alguma variação de pH cutâneo entre as espécies, sendo que nos equinos é onde ocorre a maior variação, apresentando-se entre 4,8 e 6,8, chegando ao limite de 7,9 quando há sudorese exacerbada (LUCAS, 2008).

2.2 FERIDAS

As feridas podem ser definidas como a descontinuidade recente ou antiga de quaisquer tecidos moles corporais, com ou sem a perda da função básica (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014). As feridas são tradicionalmente classificadas como abertas ou fechadas e ainda como limpas ou contaminadas (PROVOST, 2012). As feridas infectadas têm um tempo de reparação tecidual muito mais longo e geralmente apresentam complicações associadas (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014).

De acordo com Paganela et al (2009), as classificações que se baseiam no grau de contaminação microbiana se dividem em lesões limpas, limpas-contaminadas, contaminadas e sujas ou infectadas. Esses autores citam a explicação dada por Daly (1985), que diz ser comum que as feridas abertas em cavalos estejam contaminadas ou sujas no momento inicial do exame, o que se justifica pela natureza do animal e seu meio ambiente. O autor define que feridas contaminadas são lesões traumáticas com menos de seis horas de evolução, na qual pelo e outros fragmentos teciduais estão presentes. Os mesmos autores citam a definição dada por Romatowski (1989), de que feridas sujas são caracterizadas pela presença de edema e supuração. Entretanto, esse pesquisador também explica que o tempo ocorrido entre a exposição, a aderência e a subsequente multiplicação e invasão bacteriana do tecido sofre variação, que depende do tipo e da quantidade de microrganismos presentes na ferida. Por isso, essas feridas podem passar para a categoria de limpas-contaminadas e fechadas após uma meticulosa limpeza e debridamento completo.

As feridas podem estar restritas à pele, mas geralmente envolvem tecidos subjacentes e adjacentes. Feridas fechadas incluem lesões por esmagamento ou contusão que, no momento do impacto, não apresentam perda de pele. No entanto, podem ocorrer perturbações substanciais no fornecimento de sangue

subjacente, o que pode levar a uma futura perda de pele e, frequentemente, a um período de recuperação prolongado. As feridas abertas podem ser classificadas pelo tipo de trauma, como escoriações, avulsões, incisões e lacerações; por sua espessura parcial ou total; ou podem ser classificadas com base em seu potencial para presença bacteriana (PROVOST, 2012).

Conforme Provost (2012), os esquemas de classificação tradicionais de feridas são úteis porque fornecem uma base para diretrizes terapêuticas gerais, e uma classificação comumente utilizada para feridas é a seguinte:

- Esmagamento: lesão que ocorre quando a parte do corpo é submetida a um alto grau de força entre dois objetos pesados.
- Contusão: um golpe na pele no qual os vasos sanguíneos são danificados ou rompidos.
- Abrasão: danos na epiderme da pele e porções da derme por traumatismos contusos ou forças de cisalhamento.
- Avulsão: perda de pele ou tecido caracterizada pelo rompimento do tecido de seus anexos.
- Incisão: uma ferida criada por um objeto pontiagudo que tem um mínimo de dano tecidual adjacente.
- Laceração: uma ferida irregular criada pela ruptura de tecido. A pele e o dano tecidual subjacente podem ser variáveis.
- Punção: uma lesão penetrante na pele, resultando em danos mínimos na pele e danos subjacentes nos tecidos. Contaminação com sujeira, bactérias e pelos é comum.

Em equinos, embora possam existir diferenças geográficas quanto ao tipo e incidência das feridas encontradas, de um modo geral, as feridas da região distal dos membros (até e incluindo o carpo e o tarso) são bastante comuns e representam mais de 60% de todas as feridas desses animais. As diferenças geográficas referem-se à forma como o cavalo é confinado (por exemplo, cercas de arame farpado versus cercas de tábua ou de tubo) ou como é utilizado (por exemplo, para caça, passeio, corridas, salto). Enquanto objetos pontiagudos são geralmente responsáveis por lacerações e lesões por avulsão, objetos protuberantes são frequentemente a causa de ferimentos penetrantes (STASHAK, 2012).

As lacerações são provavelmente os tipos mais comuns de ferimentos em equinos, sendo produzidas por objetos angulares, como cercas de arame farpado e mordidas de outros animais. Em geral, esse tipo de lesão apresenta bordos irregulares e seu dano se estende aos tecidos subjacentes. É comum que as feridas em equinos estejam relacionadas com seu ambiente e/ou tipo de instalação, como a presença de cercas, portas de cocheira e mata-burro. Em alguns casos, o animal pode colocar o membro em local estreito e, a partir de um movimento brusco, ocorre a laçada do membro, causando danos internos sem lesão externa aparente além da alopecia. Nestes casos ocorre lesão de tecido subcutâneo com edema, exsudação e posterior ruptura da pele (RIBAS et al, 2005; PAGANELA et al, 2009).

2.2.2 Feridas em extremidades distais de equinos

Devido ao seu comportamento ativo e por apresentar reações rápidas, os equinos estão predispostos a sofrer traumatismos, agressões traumáticas ou lesões, especialmente quando sua função se encontra associada com atividades esportivas ou de tração. Além desses fatores, as pastagens sujas e instalações inadequadas também são consideradas fatores de risco para a ocorrência de feridas traumáticas nesses animais. A associação desses fatores faz com que os ferimentos de pele representem uma das mais frequentes ocorrências na clínica de equinos, em especial os ferimentos localizados nos membros locomotores (PAGANELA et al, 2009).

As extremidades distais dos equinos constantemente são alvos de ferimentos. Estes animais podem sofrer lesões ao esbarrar, chutar ou pisar em um objeto, ou por se enredar em um arame farpado ou liso, ou em uma corda. Cavalos que pulam cercas podem sofrer um trauma contuso, resultando em uma abrasão ou uma ferida penetrante. Um trauma contuso na superfície dorsal do carpo ocasionalmente pode causar um hematoma ou higroma grave. As feridas penetrantes causadas por ferimentos de salto ocorrem, geralmente, proximal à coroa nos membros posteriores ou na extremidade distal do antebraço e, muitas vezes, uma lasca de madeira pode ficar embutida no tecido mole (STASHAK, 2012).

Cavalos que se emaranham em arame farpado podem apresentar feridas graves, sendo particularmente comuns nas regiões metacarpais ou metatarsais. Esse tipo de lesão pode vir em forma de uma laceração que se estende para o interior de uma cavidade sinovial. Os tendões extensores e flexores também podem ser lesados. Casos de traumatismo contuso podem levar a um hematoma organizado deformante com substituição do tecido cicatricial ou, se for grave o suficiente, pode resultar em uma lesão por esmagamento dos tecidos moles, que pode causar necrose isquêmica (STASHAK, 2012).

Em estudo retrospectivo realizado no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade Federal de Pelotas/RS, avaliando os atendimentos em equinos entre os anos de 2000 e 2008, foi constatada uma alta incidência (37%) de afecções cutâneas, sendo que, dessas, 63% eram referentes a lesões que variaram entre lacerações, perfurações, incisões e contusões. Em geral a cicatrização de feridas apresenta prognóstico favorável, porém as feridas cutâneas em equinos, frequentemente, não evoluem do modo desejado, principalmente as localizadas nas extremidades distais, que podem se complicar pela falta de tecido de revestimento, má circulação, movimento articular, maior predisposição para contaminação e consequente infecção (PAGANELA et al, 2009).

Se o osso subjacente for lesionado, um sequestro ósseo pode se desenvolver ou uma exostose óssea proliferativa pode surgir, com ou sem perda de pele. Isto é particularmente comum se o trauma contuso ocorrer ao longo de uma região com cobertura mínima de tecido mole (por exemplo, região do terceiro metacarpo – osso da canela). Ocasionalmente, uma pressão contínua pode levar não só à necrose isquêmica dos tecidos moles, mas também a resposta inflamatória que pode se estender até os ossos, resultando em exostose proliferativa. Além disso, feridas que são profundas o suficiente para remover o perióstio do osso são suscetíveis à formação de sequestros ósseos, bem como a osteíte séptica (STASHAK, 2012).

Feridas de extremidades distais em equinos apresentam alguns desafios clínicos, pois apresentam características de cicatrização ruins em comparação com feridas em outras áreas do corpo ou em diferentes espécies. Entre alguns desses desafios, enfrentados na cicatrização, estão o desenvolvimento de tecido de granulação exuberante, ausência de pele redundante, facilidade de contaminação, epitelização lenta e baixa vascularização. Portanto, o modelo de

cicatrização em equinos representa um cenário mais desafiador do que o encontrado em outras espécies. Assim, a identificação de produtos que melhoram a cicatrização de feridas nos membros dos equinos não apenas melhora o bem-estar, o conforto e a função do animal, mas também pode vir a ser aplicável ao tratamento de feridas desafiadoras em outros animais e no homem (MOYER, 2018).

2.3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A cicatrização de feridas é um evento complexo que envolve reações e interações entre células e mediadores bioquímicos que tentam reparar a área lesada e começa imediatamente após uma lesão (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014). Trata-se de um processo complexo pelo qual vários tipos de células, fatores de crescimento e proteínas extracelulares interagem para reparar uma ruptura nas camadas dérmicas e epidérmicas da pele (RIORDAN et al, 2015). O tratamento precoce e eficaz das feridas é vital para garantir seu fechamento e cicatrização, com resultados funcionais e cosméticos apropriados (MURPHY et al, 2017).

Portanto, além da classificação, uma compreensão mais precisa dos mecanismos de reparo e cicatrização de feridas em equinos é necessária antes que abordagens terapêuticas bem-sucedidas possam ser implementadas para seu tratamento (THEORET, 2004).

A cicatrização de feridas é algo inerente a todas as espécies e é o processo biológico pelo qual o corpo se auto repara após uma lesão, seja ela traumática ou cirúrgica. Entender os fundamentos da cicatrização de feridas pode melhorar o resultado do paciente, reduzindo a morbidade e, muitas vezes, a despesa. A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, semelhante em todas as espécies de mamíferos adultos, que se inicia sempre que há uma ruptura na integridade do tecido. O processo de reparo envolve interações complexas entre eventos celulares e bioquímicos que coordenam a cicatrização, sendo similares se a lesão está confinada à pele ou se estende a estruturas mais profundas (PROVOST, 2012).

A cicatrização bem-sucedida de feridas é um processo interativo que envolve a ativação de mediadores solúveis, remodelação da matriz extracelular, proliferação celular e infiltração de células sanguíneas. A epitelização e a contração da ferida são dois passos fundamentais da cicatrização. Acredita-se que, geralmente, a epitelização seja dependente de queratinócitos, enquanto a contração é dependente de fibroblastos. Ainda, o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), o fator de crescimento de queratinócito (KGF), o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) são fatores-chave que promovem a regeneração epidérmica, a atividade dos fibroblastos e a maturação adequada da matriz de colágeno (MOMENI et al, 2018).

Uma progressão adequada da cicatrização da ferida começa com a secreção de fatores de crescimento, como o TGF- β , bem como de fibroblastos, EGF, Fator Derivado Plaquetário (PDGF) e Fator Endotelial Vascular (VEGF). Os neutrófilos, que são atraídos pelos sinais de PDGF, eliminam as bactérias em excesso no local da ferida com a ajuda de monócitos, posteriormente transformados em macrófagos. Os macrófagos regulam a produção de TGF- β , que por sua vez estimula a migração e a proliferação de fibroblastos, bem como a epitelização. A matriz extracelular e o tecido de granulação começam a se formar à medida que os fibroblastos secretam fibronectina e precursores de colágeno, concomitantemente à angiogênese, que é estimulada por VEGF, que transporta oxigênio e nutrientes para o local lesado. Finalmente, a estrutura de colágeno na área da ferida amadurece e se reagrupa em uma estrutura mais ajustada, e com maior resistência à tração (RIORDAN et al, 2015).

Pode-se, de forma simples, se dividir o processo de cicatrização em três fases: (1) fase inflamatória, que envolve hemostasia e inflamação aguda; (2) fase proliferativa, durante a qual ocorre a formação de tecido; e (3) fase de remodelação, durante a qual o tecido de cicatrização recupera a força. Essas três fases se sobrepõem no tempo, com numerosas interações ocorrendo em todos os níveis. Quando as feridas passam por essas etapas em tempo hábil e obtêm integridade funcional e anatômica, são consideradas feridas agudas. Alternativamente, elas se tornam crônicas, o que não é um resultado incomum em cavalos (PROVOST, 2012).

Uma interrupção ou atraso em qualquer estágio desse processo complexo resulta em uma ferida que não cicatriza, ou seja, em alguns casos, o mecanismo por trás do referido reparo não consegue restaurar a integridade do tecido lesado em tempo hábil, retardando a progressão das fases inflamatória, proliferativa e de remodelação da cicatrização. A ferida crônica, ou seja, que não se cura, fica vulnerável à infecção, pode causar dor e reduzir a qualidade de vida (RIORDAN et al, 2015).

A cicatrização de grandes feridas de membros em equinos está sujeita a inúmeras complicações, tendo em vista que a perda maciça de tecido, a contaminação excessiva e a tensão da pele geralmente impede seu fechamento primário, fazendo com que muitas feridas em cavalos tenham que cicatrizar por segunda intenção. O reparo por segunda intenção envolve a formação de tecido de granulação sobre o qual o epitélio migra para cobrir a superfície da ferida e que, eventualmente, se contrai para reduzir seu tamanho e remodelar para melhorar a resistência do tecido (THEORET, 2004).

Este tipo de reparo resulta na formação de tecido cicatricial que pode afetar adversamente a função, bem como levar a uma aparência inaceitável, particularmente para cavalos de exposição. Embora a cicatrização frequentemente progrida sem intercorrências em feridas corporais, o reparo de feridas de extremidades distais de espessura total em equinos está sujeito a numerosas complicações, como inflamação crônica e fibroplasia excessiva, com retardamento subsequente da epitelização e contração da ferida (THEORET, 2004).

2.3.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória da cicatrização também é conhecida como a fase de retardamento da cicatrização de feridas. Trata-se de uma resposta precoce, que envolve hemostasia e inflamação, sendo um período altamente ativo metabolicamente, que dura vários dias, durante o qual a cicatrização da ferida é iniciada. Se caracteriza por uma resposta celular e vascular proporcional a gravidade da situação. Os principais objetivos nesta fase incluem: homeostase, fornecimento de substrato, proteção da ferida contra infecção e a sinalização celular necessária para as próximas fases do processo de cicatrização. Ou seja, a

resposta é direcionada para impedir a perda de sangue, proteger contra infecções e fornecer o substrato e os sinais celulares que facilitarão as etapas subsequentes no processo de cura. A hemostasia é iniciada imediatamente através das contribuições de vasoconstrição, agregação plaquetária e deposição de fibrina (PROVOST, 2012).

A vasoconstrição reflexa ocorre pela contração da musculatura lisa mediada pela liberação de endotelina e tromboxano A₂ dos vasos lesados e da serotonina derivada de plaquetas. A resposta é transitória, durando apenas 5 a 10 minutos, após os quais predominam os vasodilatadores, como prostaciclina, histamina e óxido nítrico, facilitando a diapedese de células, fluidos e proteínas para a ferida e para o espaço extracelular. A hemostasia é conquistada através da compressão dos vasos pelo inchaço dos tecidos moles e formação de um plugue de plaquetas de fibrina dentro da ferida. A trombina, o principal fator na formação de coágulos, é fundamental nesse processo, sendo liberada pela ativação de ambas as vias de coagulação intrínseca e extrínseca. A trombina cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que após a polimerização em fibras de fibrina interage com a fibronectina plasmática para estabilizar o tampão hemostático que preenche o local da ferida. Este coágulo inicial é conhecido como matriz provisória da ferida, e abaixo dessa matriz vai ocorrendo a substituição da mesma por tecido de granulação durante a fase proliferativa da cicatrização (PROVOST, 2012).

Esta fase inflamatória é essencial para proteger a ferida contra a infecção, bem como para iniciar o processo de reparo. Os macrófagos teciduais ativados parecem desempenhar um papel fundamental na transição entre inflamação e reparo, através da liberação de múltiplas citocinas e fatores de crescimento que iniciam a migração e a proliferação das células mesenquimais envolvidas na angiogênese, fibroplasia e epitelização. Paradoxalmente, a inflamação prolongada pode contribuir para a patogênese de diversas doenças caracterizadas por cicatrização desproporcional, como cirrose hepática, fibrose pulmonar, cicatrizes corneanas e queloides dérmicos. Especificamente, as feridas crônicas diferem das feridas agudas porque a reparação ocorre com a formação de tecido de granulação abundante e frequentemente com fibrose excessiva levando a contratura da cicatriz, que pode causar em perda de função do tecido lesionado (THEORET, 2004).

Os autores Wilmink et al (1999-a) identificaram que a cura por segunda intenção de feridas profundas ocorre mais rapidamente em pôneis do que em cavalos. Essa diferença pode ser atribuída, em grande parte, a uma contração da ferida mais pronunciada e mais rápida em pôneis do que em cavalos. Portanto, as tentativas de melhorar a cicatrização de feridas por segunda intenção na prática clínica devem ser direcionadas para a estimulação da contração da ferida.

Em um segundo estudo, Wilmink et al (1999-b) demonstraram, experimentalmente, que a resposta inflamatória inicial durante a cicatrização por segunda intenção é fraca, mas prolongada, em cavalos, em comparação com pôneis. Nos pôneis, o número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) foi alto durante as primeiras 3 semanas do estudo (que avaliou os aspectos histológicos da cicatrização por segunda intenção em cavalos e pôneis) e subsequentemente diminuiu rapidamente. Nos cavalos, o número inicial de PMNs foi menor, mas permaneceu persistentemente elevado durante o período de avaliação. Significativamente mais fibrina estava presente nas feridas dos cavalos. Não foram observadas diferenças significativas no número de fibroblastos, nas quantidades de actina do músculo liso e colágeno. No entanto, os miofibroblastos foram significativamente menos regularmente organizados nas feridas dos cavalos, em especial nas feridas dos metatarsos.

Os pesquisadores Wilmink et al (1999-b) também observaram que a atividade mitótica do epitélio foi temporariamente reduzida na semana 3, enquanto a atividade mitótica do tecido de granulação foi inicialmente alta, mas diminuiu rapidamente a partir da semana 1, com exceção das feridas metatarsais dos cavalos, em que a atividade mitótica permaneceu significativamente maior. Portanto, o exame histológico confirmou e explicou as diferenças macroscópicas na cicatrização de feridas entre equinos e pôneis pela organização estrita dos miofibroblastos e a inflamação aguda mais eficaz nos pôneis. Com isso, o estudo concluiu que a estimulação da organização dos miofibroblastos e a melhora da eficácia da resposta inflamatória em equinos podem resultar em melhor cicatrização de feridas de segunda intenção nestes animais na prática clínica.

Na sequência de seus estudos, Wilmink et al (2002) verificaram que a resposta inflamatória mais forte em pôneis parece ter maior efetividade em condições de campo na prevenção de infecção de feridas, resultando em menor incidência de deiscência de ferida e formação de sequestro ósseo. De acordo com

estes autores, em feridas acidentais, o trauma e a infecção podem resultar na deiscência de feridas fechadas e na formação de sequestro quando o osso cortical é exposto. Para comprovar sua hipótese, estes pesquisadores realizaram um estudo retrospectivo com 89 pôneis e 422 cavalos com feridas traumáticas. Os animais, feridas e tratamentos foram categorizados e relacionados à taxa de sucesso do fechamento primário e à incidência de formação de sequestro. As feridas tratadas foram comparáveis quanto à localização, duração, grau de contaminação e profundidade em ambos os grupos de animais, mas houve significativamente mais casos com tendões extensores rotos nos pôneis.

Ainda no estudo de Wilmink et al (2002), antibióticos e anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) foram administrados com menor frequência aos pôneis. A taxa de sucesso de fechamento primário foi significativamente maior em pôneis do que em cavalos, e sequestros foram formados com menor frequência em pôneis. Com isso, os pesquisadores concluíram que os resultados da cicatrização foram melhores nos pôneis, embora as condições externas fossem menos favoráveis, o que pode estar associado às diferenças na resposta inflamatória inicial após a lesão, como encontrado em trabalhos experimentais anteriores, resultando em uma melhor defesa local contra a infecção da ferida.

Em estudo posterior, Wilmink et al (2003) identificaram que os leucócitos do cavalo produzem espécies de oxigênio menos reativas essenciais para a morte bacteriana. Além disso, esse estudo demonstrou uma maior produção de vários mediadores inflamatórios por leucócitos em pôneis quando em comparação com cavalos. Apesar da menor quimiotaxia *in vitro* de PMNs de pônei, essa maior produção *in vivo* resultou em uma resposta inflamatória inicial mais forte em pôneis, como tem sido relatado em estudos sobre cicatrização de feridas, através da atração de leucócitos e desencadeamento da produção de outras citocinas. Portanto, uma inflamação inicial mais forte pode promover a cura por eliminação mais rápida de contaminantes e transição anterior para reparo. Os autores alertam que a modulação da resposta inflamatória inicial pode, portanto, ser uma opção válida para intervenção terapêutica em casos de cicatrização de feridas problemáticas. Além disso, as diferenças intraespecíficas na função dos leucócitos podem ter um impacto em muitos campos na medicina equina.

Em vista destes fatos, Theoret (2004) afirma ser importante que a resposta inflamatória imediata ao ferimento não seja inibida, ou seja, o uso de AINEs deve

ser limitado. Por exemplo, a autora cita o trabalho de Schneiter et al (1987), onde os pesquisadores demonstraram que altas doses de AINEs utilizadas no período inicial após a criação de incisões de linha alba em pôneis retardam o reparo.

2.3.2 Fase proliferativa

Essa fase tem início no terceiro dia após o surgimento da lesão, sendo caracterizada pela formação de tecido de granulação, angiogênese, deposição de colágeno, fibroplasia, epitelização e contração da ferida. Como na fase anterior de cicatrização de feridas, os passos na fase proliferativa não ocorrem em série, mas se sobrepõem no tempo. O processo de cicatrização requer um fornecimento contínuo de oxigênio e nutrientes, e a diminuição da tensão de oxigênio, os altos níveis de lactato e baixo pH na ferida iniciam o processo de angiogênese. As células endoteliais nas pontas dos capilares adjacentes à área ferida são atraídas pela fibronectina, encontrada dentro da matriz provisória, e crescem em resposta às citocinas liberadas pelas plaquetas e macrófagos a uma taxa de 0,4 a 1,0 mm por dia. O desenvolvimento de consequências vasculares requer a proliferação de células endoteliais que se organizam na arquitetura do vaso. Fatores de crescimento como o VEGF e o bFGF desempenham papéis reguladores centrais na neovascularização e subsequente reparo tecidual (PROVOST, 2012).

O exsudato inflamatório possui fibrinogênio, e esse se transforma em fibrina, formando uma rede onde os fibroblastos irão se depositar e onde passam a se multiplicar e a secretar os componentes proteicos do tecido cicatricial. Esses fibroblastos dão início a síntese e a secreção de componentes da matriz extracelular, entre eles os glicosaminoglicanos e as fibras colágenas tipo I e III, que estão associadas à angiogênese. Em consequência dessa angiogênese se forma o tecido conjuntivo, que recebe a denominação de tecido de granulação, devido a sua aparência granular, pela presença de inúmeros capilares (WERNER; GROSE, 2003; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

Quando os macrófagos e outras células produtoras de fator de crescimento não estão mais em um ambiente hipóxico, repleto de ácido láctico, a produção de fatores angiogênicos é interrompida. Assim, quando o tecido é perfundido adequadamente, a migração e a proliferação de células endoteliais são reduzidas

pela ação das metaloproteinases da matriz (MMPs). Eventualmente, vasos sanguíneos que não são mais necessários sofrem apoptose de células endoteliais. Os fibroblastos começam a chegar no segundo dia após a lesão e, no quarto dia, são o principal tipo de célula no leito da ferida. Da mesma forma, a produção de colágeno começa lentamente no segundo ou terceiro dia após o ferimento e atinge o pico de produção dentro de 1 a 3 semanas. Embora os fibroblastos da ferida produzam colágeno tipo I, que predomina na derme não curada, quase 30% a 40% do colágeno encontrado na ferida aguda será do tipo III. Isso é reflexo da população densa de vasos sanguíneos contendo colágeno tipo III, que então compreende o tecido de granulação (PROVOST, 2012).

O tecido de granulação é formado basicamente por vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos e seus produtos, como colágeno fibrilar, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas sulfatadas e não sulfatadas e proteases. Esse tecido é produzido de três a quatro dias após o surgimento da lesão, sendo um processo intermediário entre o desenvolvimento da malha formada por fibrina e fibronectina e a reestruturação de colágeno (BERRY; SULLINS, 2003).

O recrutamento de tecido adjacente, a proliferação local e a transformação de células-tronco mesenquimais locais e sistêmicas indiferenciadas em fibroblastos contribuem para o pico de número de fibroblastos 7 a 14 dias após a lesão. Nos primeiros dias após a lesão, os fibroblastos proliferam e migram, enquanto posteriormente sintetizam e reorganizam os componentes, o que eventualmente substituirá a matriz provisória no local da ferida. Os fibroblastos sintetizam e liberam colágeno; glicosaminoglicanos, incluindo hialuronano (o que facilita a migração celular); glicoproteínas (fibronectina e laminina); e proteoglicanos. Simultaneamente eles também secretam proteases, incluindo MMPs, que digerem o coágulo de fibrina para que a substituição com os novos componentes possa ocorrer. À medida que a ferida cicatriza e a vascularização é reduzida, há uma mudança no equilíbrio do conteúdo de colágeno para o tipo I (PROVOST, 2012).

A epitelização começa inicialmente com a migração dos queratinócitos existentes, mas em poucos dias a proliferação de queratinócitos nas margens da ferida contribui para o número de células disponíveis. A localização e, portanto, o número de queratinócitos disponíveis, depende do tipo de lesão. Pode ocorrer epitelização rápida em lesões superficiais, como as do tipo abrasão, pois a

membrana basal e as populações de queratinócitos do apêndice epidérmico permanecem disponíveis em toda a área ferida para participar do reparo. Em compensação, em feridas de espessura total não há epitélio residual, ou apêndices epidérmicos, dos quais os queratinócitos podem ser recrutados. Em feridas de área superficial similar, é este último tipo de lesão que requer a cura mais longa, porque a epitelização só pode ocorrer através do movimento centrípeto dos queratinócitos das margens da ferida (PROVOST, 2012).

2.3.3 Fase de remodelação

A remodelação e maturação da matriz celular consistem na última etapa do processo de cicatrização, tendo início na segunda semana após a ocorrência da ferida, finalizando após a formação de uma cicatriz, o que leva em média de 1 a 2 anos após o trauma, tornando essa região de 15 a 20% mais frágil que o tecido original, por não apresentar elasticidade suficiente (PROVOST, 2012)

A fase final do reparo está relacionada com a redução do tamanho da ferida por contração e a reorganização dos componentes da matriz extracelular sintetizados durante a fase anterior. A contração da ferida acelera o fechamento e, também, aumenta a aparência estética e a força da cicatriz, já que proporcionalmente menos área da ferida deve ser coberta por neoepitélio frágil. Na remodelação, embora a deposição dos feixes de colágeno do tipo I tenha um pico de 1-2 semanas após o ferimento, o colágeno continua a se acumular lentamente por mais uma semana a partir de então. Neste momento, a síntese é equilibrada pela degradação e o colágeno remanescente é remodelado indefinidamente (THEORET, 2004).

Nessa fase, portanto, ocorre uma transição do tecido de granulação para uma cicatriz madura, caracterizada pela contínua síntese de colágeno e seu catabolismo. Porém, esse tecido cicatricial é mecanicamente insuficiente e não possui anexos, incluindo folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. A cicatriz também pode ser excessiva, levando a cicatrizes hipertróficas e queloides. Resumindo, a lesão na pele inicia uma cascata de eventos, incluindo inflamação, nova formação de tecido e remodelação tecidual,

que finalmente levam à reconstrução parcial da área ferida, como pode ser observado no esquema da Figura 2 (WERNER; GROSE, 2003).

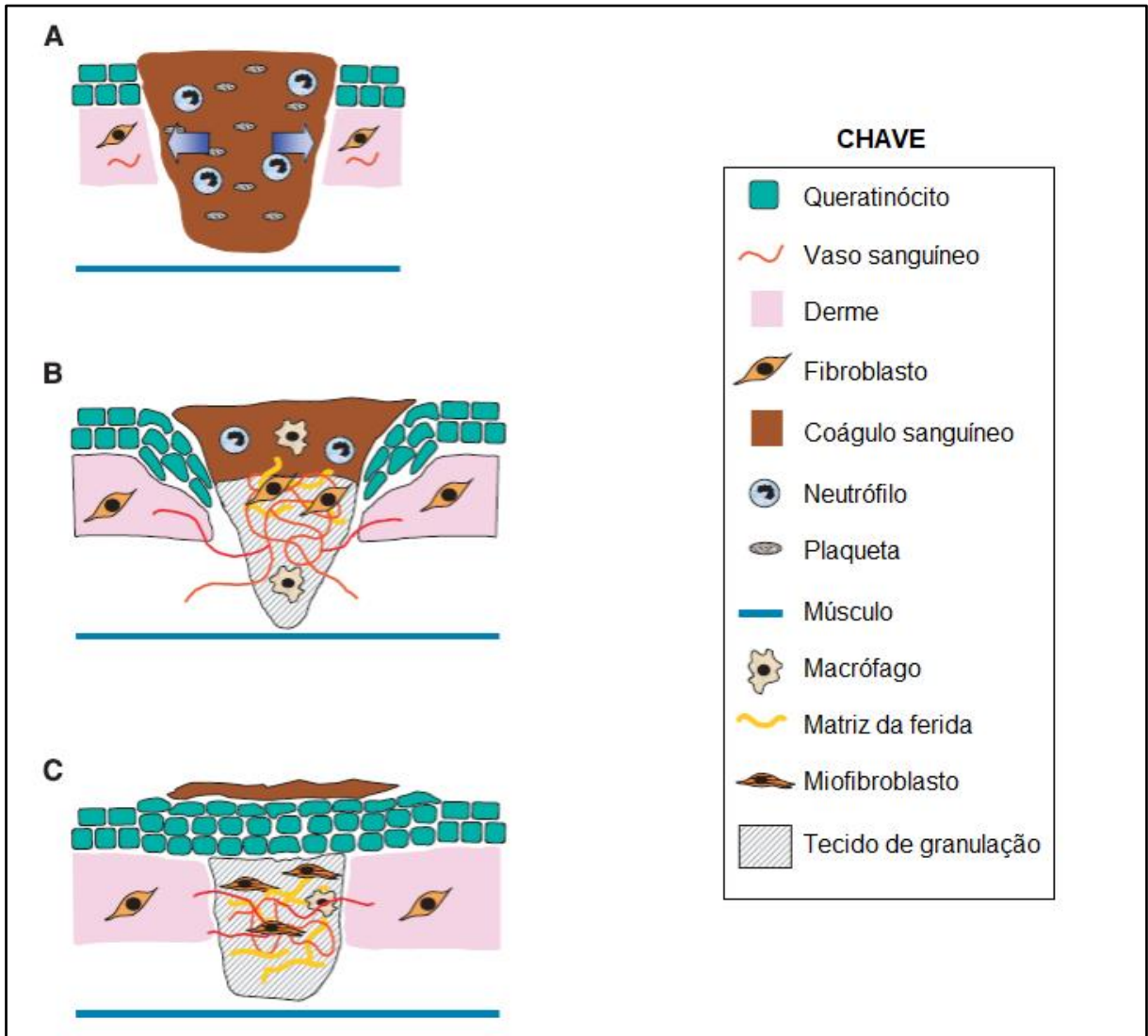


Figura 2: Representação esquemática de diferentes estágios de reparo de feridas.

Legenda: A: 12–24 h após a lesão, a área ferida é preenchida com um coágulo sanguíneo. Neutrófilos invadem o coágulo. B: nos dias 3-7 após a lesão, a maioria dos neutrófilos foi submetida à apoptose. Em compensação, os macrófagos são abundantes no tecido da ferida neste estágio do reparo. Células endoteliais migram para o coágulo; eles proliferam e formam novos vasos sanguíneos. Os fibroblastos migram para o tecido da ferida, onde proliferam e depositam a matriz extracelular. O novo tecido é chamado tecido de granulação. Os queratinócitos proliferam na borda da ferida e migram para baixo da derme lesada e acima da matriz provisória. C: 1-2 semanas após a lesão, a ferida é completamente preenchida com tecido de granulação. Os fibroblastos se transformaram em miofibroblastos, levando à contração da ferida e à deposição de colágeno. A ferida está completamente coberta de neopiderme.

Fonte: Adaptado de WERNER; GROSE, 2003.

Há algum tempo sabe-se que o equino ativa a formação de colágeno da ferida em maior extensão e mais cedo durante o reparo do que outras espécies. Isso predispõe à formação de um exuberante tecido de granulação, com retardo posterior de contração e migração epitelial. Além disso, as feridas dos membros demoram significativamente mais tempo para cicatrizar do que as feridas do corpo, como resultado de uma fase inflamatória prolongada, bem como uma deficiência na contração da ferida (THEORET, 2004).

Procurando identificar se essa variação na capacidade contrátil de uma ferida ocorre devido a diferenças na capacidade de contração inerente dos fibroblastos ou diferenças nos fatores ambientais teciduais, como a resposta inflamatória, Wilmink et al (2001) conduziram um estudo *in vitro*, avaliando a capacidade de contração de fibroblastos de membros e da garupa de equinos e de pôneis. Os autores identificaram que os miofibroblastos do corpo e da origem dos membros não possuem diferenças em sua capacidade de contração inata, portanto, as diferenças *in vivo* na contração da ferida entre cavalos e pôneis e entre diferentes locais do corpo não são causadas por diferenças na capacidade de contração inerente dos fibroblastos.

Assim, acredita-se que as diferenças entre os fibroblastos de membros e da garupa sejam devidas à menor taxa de proliferação e ao maior tempo de cultura dos fibroblastos provenientes dos membros, pois os fibroblastos maduros podem desenvolver forças de contração mais altas do que os fibroblastos imaturos. Isso significa que fatores ambientais do tecido, como os perfis de citocinas durante a resposta inflamatória, determinam a extensão da contração durante a cicatrização da ferida (WILMINK et al, 2001).

Especificamente, maior retração da ferida, epitelização deficiente e formação excessiva de tecido de granulação insalubre comumente afetam as feridas dos membros. Na maioria das espécies, a fibroplasia e a epitelização são favorecidas por um ambiente de ferida úmida como o fornecido sob certas ataduras, enquanto no cavalo os curativos oclusivos resultam em tempos de cicatrização significativamente prolongados e produção de excesso de exsudato de ferida e tecido de granulação (THEORET, 2004).

Segundo Theoret (2004), uma notável exceção é obtida com o uso de membrana amniótica, um material para curativos biológico, espécie-específico, tanto para cicatrização por segunda intenção de feridas localizadas na parte distal

dos membros, onde aumenta a epitelização e acelera o fechamento, como também em feridas enxertadas.

2.3.4 Características de cicatrização de feridas na região distal dos membros de equinos

As feridas no aspecto distal do membro em equinos são, frequentemente, mais difíceis de suturar do que feridas de tamanho semelhante no corpo ou no aspecto proximal dos membros. Isso se explica pelo fato de que a pele que envolve as feridas no aspecto distal do membro é mais difícil de mobilizar. Além disso, feridas suturadas no aspecto distal do membro também são mais propensas a se desprender. Portanto, geralmente feridas nas extremidades distais são cicatrizadas por segunda intenção (STASHAK, 2012).

Enquanto o processo de cicatrização por primeira intenção ocorre quando é possível promover a união ou restauração da continuidade do tecido diretamente, sem que haja produção de tecido de granulação, a cicatrização por segunda intenção é feita quando a ferida não pode ser suturada, geralmente porque seus bordos se encontram distantes e não permitem uma boa aposição devido à grande perda de tecido e feridas infectadas/contaminadas (THEORET, 2008).

Outra característica é que a cicatrização por segunda intenção de feridas no aspecto distal do membro ocorre mais lentamente do que nas feridas acima do carpo e do tarso, isso porque elas expandem mais após a lesão durante os primeiros 11 a 15 dias após o trauma (provavelmente devido às forças de tensão da pele), tem uma fase preparatória mais longa de cura, uma taxa mais lenta e cessação antecipada da contração da ferida e uma taxa mais lenta de epitelização. Por exemplo, feridas no flanco se epitelizam a uma taxa de 0,2 mm/dia, em comparação com 0,09 mm/dia para feridas na parte distal dos membros. A maior diferença na taxa de cura entre feridas no corpo e feridas no aspecto distal do membro é a maior contribuição da contração para a cura de feridas no corpo. Além disso, feridas que cicatrizam por contração são mais cosméticas do que aquelas que curam por epitelização, e assim, a aparência de feridas cicatrizadas do corpo e do aspecto proximal dos membros é muito mais

cosmética do que a aparência de feridas cicatrizadas de tamanho similar no aspecto distal dos membros (STASHAK, 2012).

Cavalos têm propensão a desenvolver um tecido de granulação exuberante em comparação com outras espécies, e feridas no aspecto distal dos membros que estão cicatrizando por segunda intenção têm a mesma tendência de desenvolver um tecido de granulação ainda mais exuberante, em comparação com feridas semelhantes proximais ao carpo e tarso. Especialmente as feridas na região distal dos membros com grandes déficits teciduais apresentam esse problema, onde esse tecido de granulação acaba se projetando acima da superfície da pele e pode impedir a contração e a epitelização da ferida. Outros fatores, além da localização, que promovem a produção exuberante de tecido de granulação em feridas de equinos, incluem inflamação crônica, má perfusão vascular, baixa oxigenação tecidual, infecção da ferida, movimento, tipo de tratamento, uso de bandagens, ligaduras e talas que são estimulantes da angiogênese e a fibroplasia, e o tamanho e o peso do animal (animais com mais de 1,40 m de altura e 365 kg são mais predispostos). Outra característica é que o tecido de granulação exuberante tem uma tendência maior a se desenvolver em feridas com aparência altamente móvel, úmida e irritada (STASHAK, 2012; THEORET; STASHAK, 2014).

2.4 A MEMBRANA AMNIÓTICA

Considerando o aumento das doenças crônicas e degenerativas em todo o mundo, a terapia celular parece ser a melhor alternativa de tratamento para muitas dessas condições. Entretanto, uma das principais preocupações dos pesquisadores é identificar fontes confiáveis que não representem risco para o doador ou para o indivíduo que receberá as células, e que facilitem a amostragem e o isolamento de células com alto potencial de expansão e proliferação. Atualmente, a identificação de novas fontes de células-tronco com potencial regenerativo está sob investigação, mas, devido à diversidade celular e às diferentes características biológicas das células amnióticas, a membrana amniótica é considerada uma fonte promissora de células estaminais que podem ser utilizadas em terapia celular e engenharia de tecidos (FAVARON et al, 2015).

As membranas fetais são tecidos essenciais para o desenvolvimento embrionário, desempenhando papéis importantes relacionados à proteção, respiração, nutrição e excreção. O âmnio é a membrana extraembrionária mais interna (camada mais interna da placenta), que envolve o feto, formando um saco amniótico que contém o líquido amniótico. Vários aspectos relacionados ao perfil de expressão dos fatores de crescimento, citocinas e marcadores de pluripotência, bem como as propriedades imunossupressoras e os efeitos antitumorais têm sido investigados nas células-tronco amnióticas. Uma atenção especial tem sido dada ao ácido hialurônico, que possui importantes propriedades biológicas, principalmente no controle de moléculas de adesão intercelular (FAVARON et al, 2015).

Os pesquisadores Seo et al (2013) isolaram e caracterizaram com sucesso as células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica equina (MAE- MSC). A proliferação de MAE- MSC foi medida com base no nível cumulativo de duplicação da população. A imunofenotipagem de MAE- MSC por citometria de fluxo mostrou que a maior população era de origem mesenquimal. Para confirmar o potencial de diferenciação, foi realizado um ensaio de diferenciação de linhagem múltipla, e os pesquisadores identificaram que, sob condições apropriadas, as MAE- MSC são capazes de diferenciação em múltiplas linhagens. Os resultados indicaram que as MAE- MSC podem ser uma boa fonte de células-tronco, tornando-as potencialmente úteis para a medicina regenerativa veterinária e terapia baseada em células.

A membrana amniótica é composta de três camadas: uma fina camada epitelial, uma membrana basal espessa e um tecido mesenquimal avascular. Essencialmente, o âmnio é uma matriz rica em colágeno que inclui proteoglicanos, ácido hialurônico (HA), laminina (glicoproteínas de importância fundamental para o desenvolvimento embrionário, além de possuírem um papel importante nos processos de diferenciação, migração e adesão celular, dirigirem o crescimento celular e são um fator de sobrevivência para diferentes tipos celulares), fatores de crescimento e sulfato de heparina. Se as células-tronco mesenquimais (MSC) e células epiteliais irão permanecer presentes e se os fatores de crescimento permanecerão ativos quando aplicados a uma ferida, dependerá do método de preparação e da duração e método de armazenamento da membrana (DAHLGREN, 2018).

As dificuldades inerentes ao fornecimento de uma membrana amniótica segura e eficaz são particularmente aquelas relacionadas a patógenos transmitidos pelo sangue, estabilidade durante o armazenamento e disponibilidade disponível, o que gera esforços para preservar o tecido amniótico enquanto se mantêm suas atividades biológicas e eficácia clínica (KOOB et al, 2013).

Outra questão relacionada com seu uso é a dificuldade em manusear e colocar folhas finas de membrana em feridas, e os altos custos associados com o uso de tecido celularizado, o que acabou por limitar a aplicação clínica de produtos de cicatrização de feridas com membrana amniótica (MURPHY et al, 2017).

Ainda assim, a membrana amniótica tem sido usada há décadas, tanto no homem como nos animais, para promover a cura em diversas condições diferentes, demonstrando ser segura e eficaz. A administração de fatores de crescimento proporciona efeitos desejáveis na proliferação de fibroblastos, queratinócitos e vasos sanguíneos, despertando o interesse científico em seu uso para a cura de tecidos córneos, pele e outros tecidos. O âmnio já se mostrou promissor devido a seus fatores antimicrobianos, promoção da epitelização e fornecimento de uma ampla variedade de fatores de crescimento (MURPHY et al, 2017; MOYER, 2018).

Em teoria, os benefícios do âmnio incluem propriedades anti-inflamatórias, bacteriostáticas, epitelizantes e preventivas de cicatrizes. A matriz estrutural da membrana, preservada independentemente do processamento e armazenamento, retém potenciais propriedades benéficas dos arcações de tecido quando usada como curativo biológico. Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais o âmnio promove a cicatrização de feridas continuam a ser o foco de investigações ativas (DAHLGREN, 2018).

Nos últimos anos, a membrana amniótica ressurgiu como uma ferramenta potencial para aplicações clínicas e tem sido usada principalmente para estimular a cicatrização de doenças da pele e da córnea. Na medicina humana também tem sido usada em cirurgia de reconstrução vaginal, reparo de hérnia abdominal, prevenção de aderências cirúrgicas, fechamento de pericárdio (FAVARON et al, 2015), úlceras varicosas, queimaduras, reconstrução da bexiga urinária, lesão nervosa e feridas orais, traumatismo cutâneo, lesões oculares, controle de aderência e cicatrizes de estrutura peritoneal (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014).

Ainda mais recentemente, tem sido usado na medicina regenerativa, já que as células-tronco derivadas da membrana amniótica e células derivadas do líquido amniótico exibem plasticidade celular, propriedades angiogênicas, citoprotetoras, imunossupressoras, potencial antitumoral e capacidade de gerar células-tronco pluripotentes induzidas. Estas características tornam a membrana amniótica uma fonte promissora de células estaminais para terapia celular e engenharia de tecidos (FAVARON et al, 2015).

2.5 USO DA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A aplicabilidade clínica da membrana amniótica tem se tornado cada vez mais importante devido à sua baixa antigenicidade e ação antimicrobiana, bem como sua capacidade de diminuir o exsudato e aderências, acelerar a epitelização, reduzir a dor local, atuar como substrato para o crescimento dos tecidos, ser rica em MSC, entre outras vantagens. Essas propriedades sugerem que a membrana amniótica poderia ser usada como um curativo biológico, fornecendo uma alternativa para o tratamento de feridas crônicas e beneficiando certas fases do processo de cicatrização, incluindo inflamação, granulação, epitelização e fibroplasia (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014).

A familiaridade e a disponibilidade cada vez maiores de construções biológicas e biossintéticas comercializadas e modificadas estão alterando significativamente a maneira como conceituar, compreender, cobrir e tratar as feridas. A capacidade de cobrir uma ferida é, ao mesmo tempo, calmante e protetora. As terminações nervosas expostas são acalmadas, as perdas de fluido e calor são retardadas, o que otimiza o equilíbrio da umidade, tecidos subjacentes são protegidos do cisalhamento e de outros traumas, respostas inflamatórias e autolíticas são moduladas e interações celulares são promovidas para melhorar o processo geral de cicatrização (TENENHAUS, 2017).

Tratamentos para feridas maiores, ou crônicas, que não cicatrizam sozinhas, incluem terapia de compressão, terapia por pressão negativa, enxertos de pele e bioengenharia de tecidos, bem como terapia celular particularmente utilizando células-tronco mesenquimais. Estas células, conhecidas por melhorar a cicatrização de feridas, já foram amplamente estudadas em ensaios clínicos. Ao

contrário do paradigma inicial de substituição e diferenciação celular como um mecanismo terapêutico de ação, há evidências de que as secreções das MSC são responsáveis por seus efeitos terapêuticos (RIORDAN et al, 2015).

Essas secreções incluem moléculas e vesículas extracelulares que produzem tanto efeitos locais e como distantes. Os fatores mais importantes presentes em um meio condicionado de MSC também podem ser considerados protagonistas dos efeitos fisiológicos das MSC incluindo HGF, TGF- β , VEGF, prostaglandina E2 (PGE2) e galectinas 1 e 9. Outro fato é que as membranas amnióticas frescas contêm MSC vivas enquanto membranas amnióticas desidratadas não. Em vez disso, as membranas amnióticas desidratadas funcionam como um suporte biológico para facilitar e melhorar a regeneração e a reabilitação de tecidos através das referidas moléculas (RIORDAN et al, 2015).

Seu uso tem se comprovado tão benéfico que Zelen et al (2013) citam que, em humanos, a membrana amniótica tem sido utilizada, inclusive, no tratamento de feridas derivadas do diabetes, especialmente as em membros pélvicos, que são comuns nesses pacientes. Aproximadamente 25% dos pacientes diabéticos desenvolvem uma úlcera crônica não cicatrizante ao longo da vida, e elas são notoriamente lentas para serem curadas, levando vários meses para cicatrizar.

Em seu estudo esses autores revelaram que as feridas tratadas com membrana amniótica desidratada reduziram em tamanho mais rapidamente, e foram mais propensas a cicatrizar completamente, em comparação com as feridas tratadas apenas com tratamento padrão. Os autores concluíram que os aloenxertos com membrana amniótica desidratada melhoram a cicatrização das úlceras de pé de diabéticos (ZELEN et al, 2013).

Da mesma forma, Zelen, Serena e Snyder (2014) realizaram um estudo para determinar se a aplicação semanal de aloenxerto de membrana amniótica (MA) humana desidratada reduz o tempo para cura de úlceras de pé em diabéticos mais eficazmente do que a aplicação quinzenal. Os resultados encontrados validaram estudos anteriores mostrando que o aloenxerto de MA é um tratamento eficaz para úlceras diabéticas, e mostram que as feridas tratadas com aplicação semanal curam mais rapidamente do que com a aplicação quinzenal.

Em um estudo realizado por Duarte e Duval-Araújo (2014), os pesquisadores investigaram o uso da membrana amniótica como um curativo

biológico na cicatrização de feridas infectadas em 15 coelhos, com infecções de ferida induzidas experimentalmente em suas costas. A cicatrização foi avaliada histologicamente durante as diferentes fases, verificando a inflamação, granulação, epitelização e fibroplasia. Os animais foram distribuídos em três grupos para estudo histológico após a indução da ferida, onde o grupo A não recebeu tratamento: a ferida ficou exposta e seca; o grupo B recebeu um tratamento de exposição diária com colagenase; e o Grupo C recebeu uma MA, que também permaneceu exposta.

Os resultados demonstraram uma redução acentuada da fase inflamatória no grupo C aos 21 dias, e a fase de granulação dessa cicatrização aumentou aos 14 dias. A epitelização foi semelhante entre os três grupos e a fibroplasia foi mais pronunciada no Grupo C aos 14 dias. Os pesquisadores concluíram que a membrana amniótica não alterou significativamente as fases de inflamação, epitelização ou fibroplasia, mas aumentou a angiogênese até o dia 14 em comparação com os tratamentos com curativo seco e colagenase (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014).

Outro uso importante da MA é em feridas e doenças oculares. Echeverry, Toro e Giraldo (2018) relatam que muitos dos defeitos do epitélio da córnea, como a ceratite ulcerativa, não respondem ao tratamento convencional e progridem para ulceração do estroma e perfuração iminente. Esses pesquisadores utilizaram a membrana amniótica para promover uma reepitelização da córnea e cicatrização adequada em cães e gatos, quando o tratamento médico não foi bem-sucedido. Com base nos resultados do estudo, os autores concluíram que o uso da MA promoveu o crescimento epitelial e facilitou a migração de células epiteliais, proporcionou uma barreira para a infecção, promoveu a revitalização e melhora a dor. Ainda de acordo com os autores, graças às suas características únicas, a MA oferece uma opção importante no tratamento de úlceras de córnea, visto que nos últimos anos, sua eficácia tem sido demonstrada no tratamento de doenças da superfície ocular e vem sendo amplamente utilizada neste tipo de patologias.

Plummer (2008) avaliou uma série de 58 casos clínicos equinos (entre 2002-2008) onde foram realizados transplantes de membrana amniótica para reconstrução da superfície ocular, e relata que essa técnica deve ser considerada como uma opção de tratamento nos casos que requerem reconstrução da superfície ocular para o tratamento de defeitos da córnea e da conjuntiva.

Ainda em relação a problemas oculares, Goktas et al (2017) avaliaram 14 olhos de 14 pacientes submetidos a transplante de membrana amniótica após excisão total de tumor e crioterapia perilesional. Segundo os pesquisadores, os tumores que foram excisados eram classificados como neoplasia intraepitelial conjuntival em 7, nevus conjuntival em 5, melanose adquirida primária e carcinoma espinocelular em 1 caso cada. O limbo foi envolvido em 10 casos e a córnea em 6 casos.

Os animais seguiram sendo avaliados durante 17,5 meses em média (6-60, DP 20), verificando-se que a cicatrização completa ocorreu em 8 olhos e deficiência de células limbares ocorreu em 2 olhos. Foi detectada uma recorrência em 4 casos, que receberam novamente o mesmo procedimento cirúrgico e médico, e a vascularização periférica superficial e a cicatriz corneana desenvolveram-se nos 4 casos durante o seguimento. Foi concluído que o transplante de MA é um método eficaz para a reconstrução do defeito tecidual após a excisão de tumores limbares e conjuntivais, com a combinação de crioterapia. Na maioria dos casos, a cicatrização completa pode ser conseguida com uma superfície lisa, estável e transparente (GOKTAS et al, 2017).

Em casos de queimaduras, a MA também vem sendo usada com sucesso, como relatado por Herndon e Branski (2017), que dizem que as membranas amnióticas têm um grande potencial para melhorar o cuidado com feridas de queimaduras, visto que as que apresentam espessura parcial envolvem danos na camada superior da pele, o que deixa as terminações nervosas expostas e, portanto, representam a mais dolorosa de várias categorias de lesões térmicas.

O estudo de Momeni et al (2018) investigou a possibilidade de desenvolvimento de um novo curativo de gel de quitosana com base em MA, como um potencial substrato de reparo de feridas com eficácia marcante. Neste experimento, o gel amniótico foi preparado com base em gel de quitosana / polivinilpirrolidona contendo extrato de membrana amniótica humana (AME-Gel), e foi avaliado em termos de eficácia de cicatrização de feridas e efeitos preventivos de cicatriz em modelo de queimaduras de ratos. Os níveis de reepitelização e regeneração dérmica foram examinados por avaliação histológica usando H & E tricrômico de Masson. Os resultados revelaram que o AME-Gel induz a regeneração epidérmica e dérmica em um tempo mais curto através da formação de tecido de granulação, aumento da proliferação de fibroblastos e melhora da

formação capilar sanguínea concomitante ao desenvolvimento de feixes de colágeno. Portanto, o AME-Gel pode ser considerado simples e fácil de ser usado como curativo biológico para qualquer tipo de queimadura superficial.

A cicatrização de tendões também é um desafio na medicina equina, e a MA tem apresentado resultados animadores como tratamento. Nos estudos de Lange-Consiglio (2013 e 2016), os pesquisadores comprovaram que a administração de células mesenquimais amnióticas de cavalo e seu meio condicionado promove melhora na recuperação *in vivo* de lesões espontâneas de tendão equino e inibe a proliferação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico.

Da mesma forma, Nicodemo et al (2017) avaliaram o efeito do fragmento da membrana amniótica humana (MAH) na resposta inflamatória, proliferação de fibroblastos e organização das fibras de colágeno em tendão lesionado em 60 ratos. Esses foram divididos em 3 grupos: C - procedimentos cirúrgicos sem lesão tendínea e com simulação de aplicação de MAH; I - procedimentos cirúrgicos, lesão tendínea e simulação de aplicação de MAH; T - procedimentos cirúrgicos, lesão no tendão e aplicação de MAH. Esses grupos foram subdivididos em quatro tempos experimentais (3, 7, 14 e 28 dias).

De acordo com os resultados, a análise histológica aos 14 dias demonstrou que o grupo T apresentou fibras colágenas com melhor alinhamento. Aos 28 dias, o grupo I apresentou as características descritas para o grupo T aos 14 dias, enquanto este grupo apresentava aspectos de um tecido conjuntivo maduro. Os pesquisadores concluíram que uma lesão aguda de tendão tratada com fragmento de membrana amniótica humana mostrou um processo de cicatrização mais rápido, redução da resposta inflamatória, intensa proliferação de fibroblastos e organização das fibras de colágeno (NICODEMO et al, 2017).

Segundo Muttini et al (2012), na medicina veterinária, as células-tronco da membrana amniótica têm sido usadas com resultados encorajadores no tratamento da tendinopatia Flexora Digital Superficial nos equinos. Esses autores também explicam que apesar de uma estratégia ideal para a cicatrização de tendões ainda não ter sido definida, o uso de terapia baseada em células-tronco é uma proposta interessante, devido à sua capacidade de proliferar e diferenciar-se em direção a linhagens específicas de tecidos conjuntivos. Como o uso de células-tronco embrionárias têm seu uso limitado por fatores éticos, as células-tronco

mesenquimais são uma ótima opção e estão mais facilmente disponíveis, podendo ser obtidas por diferentes fontes. Nesse caso, as células-tronco derivadas do âmnio podem se diferenciar em relação a todas as três camadas germinativas, e podem ser usadas para transplante alogênico e armazenadas graças à criopreservação.

Em publicação do mesmo grupo de pesquisadores, foi relatado o uso de células epiteliais amnióticas ovinas expandidas e congeladas *in vitro* (oAECs) para tratamento de 15 equinos com lesões tendíneas agudas, e feita sua avaliação para se diferenciar em tenócitos. Os animais foram tratados com uma injeção intralesional de oAECs e a recuperação do tendão foi monitorada. Foi constatado o preenchimento do defeito nos tendões, o bom alinhamento inicial das fibras e 12 dos 15 cavalos (80%) retomaram sua atividade anterior. Exames histológicos e imunohistoquímicos em um tendão explantado demonstraram a baixa imunogenicidade dos oAECs que conseguiram sobreviver no local de cicatrização. Além disso, as oAECs apoiaram o processo regenerativo produzindo colágeno tipo I de ovinos entre as fibras de colágeno equino. Considerando esses resultados, os autores indicam o uso de oAECs como uma nova abordagem para o tratamento de lesões espontâneas em tendões equinos (MUTTINI et al, 2013).

Em estudo ainda mais recente, Muttini et al (2015) trataram 6 equinos adultos, portadores de lesões espontâneas unilaterais de tendão flexor digital superficial, agudas (4 casos) e crônicas (2 casos), com células epiteliais amnióticas ovinas xenotransplantadas. Foram realizados controles ultrassonográficos aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o implante das células. Nos 180 dias os animais foram eutanasiados, e amostras de tendão foram coletadas e submetidas ao exame histológico para verificar celularidade, organização das fibras da matriz extracelular e vasos sanguíneos.

Os resultados iniciais ao exame ultrassonográfico mostravam, nos casos agudos, uma área focal, não homogênea e hipoeicoica no tendão flexor digital superficial, com perda do padrão fibrilar normal. Nos casos crônicos, a área lesionada do tendão aparecia completamente hipereicoica, e mais engrossada. No final do acompanhamento, a ecotextura do tendão se mostrou mais regular, a área da secção transversal foi semelhante à do ramo contralateral e as fibras colágenas estavam orientadas paralelamente ao eixo longitudinal do tendão, tanto nos casos agudos como crônicos, sugerindo resposta de cura positiva. Esses achados foram

apoiados pelas análises histológicas que mostraram uma restauração quase completa da arquitetura tendínea normal com um ótimo alinhamento das fibras do tendão. Com esses resultados, o estudo sustenta a hipótese defendida pelos autores de que as células epiteliais amnióticas são dotadas de um excelente potencial de cura e mostra uma correlação muito boa entre os achados ultrassonográficos e as características histológicas encontradas (MUTTINI et al, 2015).

2.6 USO DA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS NA REGIÃO DISTAL DOS MEMBROS DE EQUINOS

Segundo informa Dahlgren, (2018), relatos sobre o uso de membrana amniótica equina (MAE) em feridas equinas ainda são limitados, mas promissores. Por exemplo, o estudo de Bigbie et al (1991) relata que a aplicação de MAE em feridas experimentais no metacarpo e metatarsos de 9 equinos resultou em aumento do percentual de epitelização e diminuição do número de dias para completar a cicatrização em comparação com o controle de feridas tratadas com um curativo não aderente sozinho. Além disso, as feridas tratadas com MAE também apresentaram tecido de granulação exuberante significativamente menor em comparação com os controles.

Para realizar o estudo, os pesquisadores criaram feridas medindo 2,5 x 2,5 cm no aspecto dorso-medial da região metacarpiana e metatársica de todos os 4 membros dos 9 equinos. Cada ferida foi atribuída aleatoriamente a 1 de 3 grupos de tratamento: grupo C, tratado com um curativo não-aderente como controle; grupo A, tratado com âmnio sob bandagem não-aderente; e grupo L, tratado com derivado celular de levedura vivo sob uma bandagem não aderente (BIGBIE et al, 1991).

Em um estudo semelhante, realizado por Goodrich et al (2000), utilizando a MAE como um curativo biológico após enxerto cutâneo de feridas distais experimentais em 6 pôneis, as feridas tratadas com MAE tiveram diminuição da formação de tecido de granulação exuberante e diminuição do tempo médio de cicatrização comparado com o curativo não aderente isolado. Da mesma forma que o estudo anterior, uma secção de 2,5 x 2,5 cm de espessura total da pele foi

removida do aspecto dorsal de cada membro no ponto médio do metacarpo ou metatarso.

Em 1998, Oliveira e Alvarenga avaliaram o uso da MAE preservada em glicerina a 98% à temperatura ambiente, em feridas nos membros locomotores de 5 equinos adultos. As feridas foram provocadas cirurgicamente, tendo 9,6 cm², na face lateral da articulação metacarpo-falangeana, face medial do terço proximal do metacarpo e face lateral do terço médio do metatarso de ambos os membros locomotores dos animais, totalizando 30 feridas. Os pesquisadores dividiram os animais em dois grupos experimentais, com 15 feridas cada. Um grupo foi tratado com a MAE e o outro grupo serviu como controle, recebendo apenas gaze umedecida em solução fisiológica. Os curativos eram trocados a cada 48 h.

Ainda sobre o estudo citado, foi feita a mensuração da área das feridas, grau de secreção, formação de tecido de granulação exuberante e tempo de epitelização completa. Também foi realizado exame bacteriológico e histopatológico. Os resultados demonstraram que em todas as feridas tratadas com MAE houve menor tempo de cicatrização, menor formação de tecido de granulação exuberante, menor incidência de bactérias patológicas e aumento de área total reduzido. Em conclusão, os autores declararam que a MAE possui importante poder oclusivo sobre feridas cutâneas, promovendo a diminuição de contaminação secundária, menor intensidade de exsudato e tempo de cicatrização, além de que feridas tratadas com MAE desenvolvem menor quantidade de tecido de granulação (OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998).

Por se tratar de um tecido biológico, com boa resistência e elasticidade, a MAE, quando em contato com a ferida cutânea, desenvolve uma boa oclusividade, sem provocar perdas teciduais ou sangramentos durante sua remoção para renovar os curativos. Os pesquisadores também afirmam que a glicerina a 98% é um bom agente de conservação para a MAE, e que a MAE é de fácil obtenção e estocagem, além de ter um custo irrisório quando utilizada essa técnica de preservação (OLIVEIRA; ALVARENGA, 1998).

A análise proteômica da MAE foi realizada recentemente por Galera et al (2015), e forneceu uma confirmação inicial da presença de muitas das proteínas estruturais e funcionais que se acredita terem um papel na cicatrização de feridas. O estudo elaborou um mapa de identificação de referência das proteínas da MAE, identificando 149 proteínas diferentes.

Evidências disponíveis sugerem que, se houver acesso a placentas equinas para a coleta e armazenamento do âmnio, o âmnio halogênico tem baixa imunogenicidade e potencial para melhorar a cicatrização de feridas. Recentemente, uma linha de novos produtos derivados do âmnio equino tornou-se comercialmente disponível. Esses produtos halogênicos incluem folhas liofilizadas prontas para uso, descelularizadas e pó pulverizado para aplicações tópicas e injetáveis. Pesquisas sugerem que esses produtos resultam na rápida formação de tecido de granulação e promovem a contração da ferida, e dados preliminares apoiam a cicatrização acelerada de feridas de extremidades distais equinos (DAHLGREN, 2018).

Entretanto, Moyer (2018), em seu estudo, se propôs a avaliar a segurança e a eficácia do âmnio humano moído liofilizado como curativo de feridas criadas experimentalmente em extremidades distais de 4 equinos adultos clinicamente normais (3 Thoroughbred e 1 Paint Horse, com idade de 11 anos em média). Um membro anterior de cada cavalo foi aleatoriamente designado para o grupo de tratamento, e o membro contralateral foi designado como controle. As feridas dos membros do tratamento foram revestidas com material âmnio humano, liofilizado, moído, distribuído sob uma pomada antibiótica tripla. As feridas-controle foram revestidas apenas com pomada antibiótica tripla. Todas as feridas foram cobertas com curativos não aderentes e bandagens foram aplicadas.

Os resultados demonstraram que um dos equinos desenvolveu celulite unilateral, que se resolveu com tratamento adicional. Todos os membros do tratamento exibiram uma resposta inflamatória caracterizada por edema focal e descarga das feridas. As feridas foram completamente epitelizadas nos membros controle mais cedo do que nos membros do tratamento em todos os equinos, embora não tenha havido diferença estatística entre as feridas de controle (média de 46,8 dias) e de tratamento (média de 51,8 dias) (MOYER, 2018).

Os escores histológicos foram melhores nas feridas controle do que nas feridas tratadas com âmnio em todos os momentos. Com isso, o estudo concluiu que as feridas tratadas com material amniótico exibiram uma resposta inflamatória inapropriada, que resultou em tempo tardio para o fechamento da ferida. Portanto, o âmnio triturado liofilizado humano não é recomendado para uso no tratamento de feridas equinas (MOYER, 2018).

Procurando facilitar a aplicação, Murphy et al (2017) descrevem um novo produto derivado de membrana amniótica, processado para resultar em uma solução livre de células, mantendo altas concentrações de citocinas derivadas de células e fatores de crescimento. A membrana âmnio solubilizada (SAM) combinada com o hidrogel de veículo hialurônico (HA-SAM) se mostrou fácil de produzir, armazenar e aplicar em feridas.

Os pesquisadores demonstraram a eficácia do HA-SAM como tratamento de feridas, onde HA-SAM acelerou significativamente o fechamento das mesmas através da reepitelização e preveniu a contração das feridas. As feridas tratadas com HA-SAM tiveram uma pele regenerada mais espessa, maior número total de vasos sanguíneos e um maior número de queratinócitos em proliferação dentro da epiderme. No geral, o estudo confirma a eficácia da membrana amniótica como tratamento/curativo de feridas e supera muitas das limitações associadas ao uso de tecido fresco, criopreservado ou desidratado, fornecendo um sistema de fornecimento de hidrogel para SAM (MURPHY et al, 2017).

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO

O experimento foi aprovado pela CEUA/UFRRJ (Anexo I), em 8 de agosto de 2017 sob inscrição nº3133070817, e foi realizado nos seguintes locais:

1. HDM Horse Service Clínica Veterinária – Cachoeiras de Macacu-RJ;
2. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – UFRRJ.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados seis equinos sem raça definida, fêmeas, híginas, com idades de 3 a 10 anos, utilizadas pelo autor como doadoras de plasma hiperimune. Nenhuma égua foi coletada durante o tempo de experimento.

Os animais, mantidos em piquetes rotacionados e alimentados exclusivamente a pasto, foram submetidos a exame clínico (inspeção de mucosas, aferição de frequência cardíaca e respiratória, tempo de perfusão capilar, ausculta intestinal, respiratória e cardíaca e anamnese) e hematológico (hemograma completo), previamente ao estudo, para, então, serem qualificados para inclusão no experimento. Nenhum animal apresentou alteração significativa nos exames realizados, estando todos dentro dos padrões de normalidade indicados para a espécie equina.

3.3 MEMBRANA AMNIÓTICA

O material foi coletado de éguas parturientes híginas, previamente avaliadas contra enfermidades infecciosas e vacinadas. A coleta ocorreu até 4 horas após o parto. Os anexos fetais, que incluíam a membrana amniótica foram recolhidos após a eliminação espontânea da égua. Em seguida, a placenta era separada dos demais anexos e lavada com água corrente para remoção de

sujidades grosseiras, escolha do segmento que seria separado, para então seguir com os outros procedimentos.

A técnica utilizada para a conservação do material foi proposta por Kim e Tseng (1995), na qual a lavagem para limpeza é realizada após a separação dos outros anexos fetais é efetuada primeiramente com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e, então, é feita a separação da porção coriônica da placenta manualmente, sendo a porção amniótica imersa numa solução tampão fosfato-salino (PBS) contendo 1000UI/ml de penicilina G, 20mcg/ml de estreptomicina e 2,5mcg/ml de anfotericina B, sendo realizados três ciclos de trinta minutos de imersão total do material.

A foto da figura 3 traz a MAE durante a separação das duas camadas córion x âmnio, para separar e congelar o material. O âmnio é a parte sem vasos sanguíneos, e o córion é a parte que apresenta vasos sanguíneos. A foto da figura 4, em seguida, traz uma imagem histológica da MAE.



Figura 3: Foto da MAE durante a separação das 2 camadas. A porção não vascularizada é a amniótica e a vascularizada é a coriônica. HDM Horse Service, Dezembro de 2016.

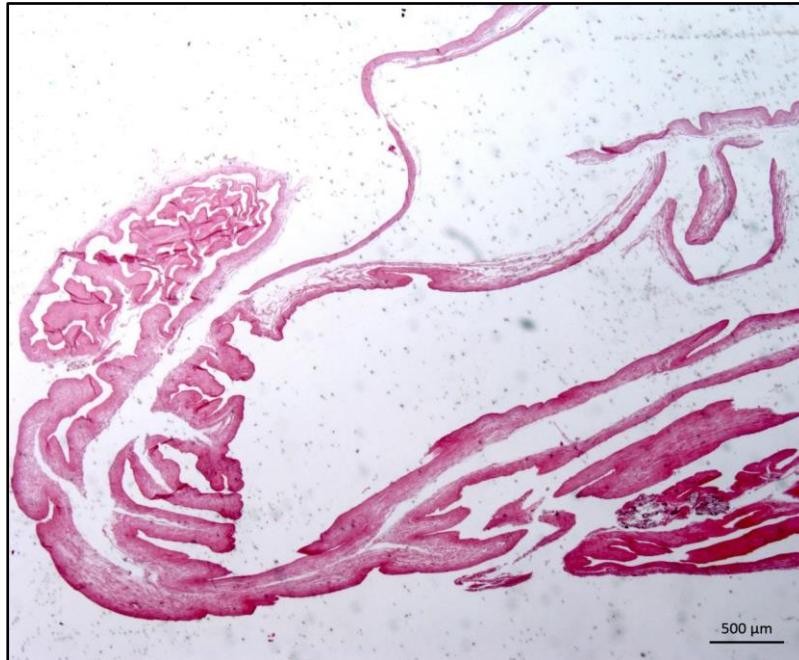


Figura 4: Corte histológico de MAE criopreservada íntegra e sem alterações após reidratação. HE, obj. 2,5.

A membrana amniótica é colocada em contato com nitrogênio líquido para congelamento (Figura 5) tendo como base papel grau cirúrgico previamente esterilizado. Seguido este contato com o nitrogênio, ela é envazada em outro papel grau, vedada e armazenada em congelador com temperatura entre -10°C e -24°C .



Figura 5: MAE acondicionada em papel grau cirúrgico, em contato com nitrogênio líquido para congelamento.

A membrana amniótica é, então, retirada do tampão e colocada em um pano de campo estéril, onde é cortada em pedaços de dimensões correspondentes ao tamanho das lesões, sendo armazenada em papel grau cirúrgico (4x4cm), conforme Figura 6.

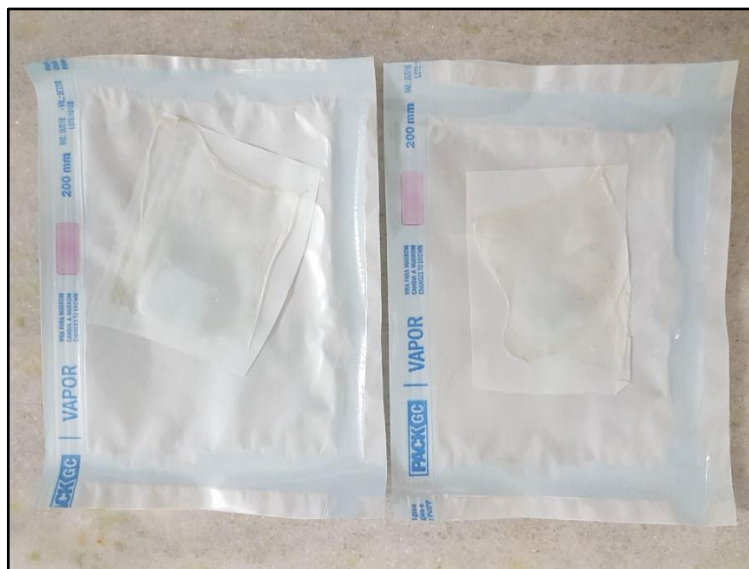


Figura 6: MAE lacrada antes da aplicação, já cortada nas dimensões 4x4cm, ainda congelada, armazenada em papel grau cirúrgico.

A MAE utilizada no presente trabalho foi preparada em dezembro de 2016 e reidratada para uso em dezembro de 2018. A criopreservação é realizada somente para fins de conservação, podendo o material ser utilizado imediatamente após os ciclos de imersão previamente citados.

3.4 FERIDAS

As feridas foram feitas cirurgicamente nas extremidades distais dos membros anteriores, especificamente na região metacarpiana. Os animais foram mantidos em tronco de contenção e pré-medicados com Cloridrato de Xilazina 10%, na dose de 1,0 mg/kg, por via endovenosa. Após tricotomia e antissepsia com Clorexidina degermante 2% de ambos os lados dos membros anteriores, foi realizado bloqueio regional infiltrativo dos nervos palmares superiores e

metacárpicos palmares, conhecido como quatro pontos altos, com solução de Lidocaína a 2% sem vasoconstritor, sendo infiltrados 3 a 5 ml de fármaco em cada ponto com agulha 30x08.

Porém, verificou-se que esse bloqueio não foi eficaz, sendo necessária a realização de um bloqueio infiltrativo local no formato da lesão, também com lidocaína 2% (3 a 5 mL no local da incisão), sendo efetivo.

Uma lesão cutânea em forma de quadrado foi, então, produzida em cada membro na região média do metacarpo, utilizando-se um molde para a obtenção de lesões uniformes, com quatro centímetros de lado. Após a incisão com bisturi, a pele e o tecido subcutâneo foram removidos por dissecação utilizando-se tesoura de Mayo e pinça anatômica com dente de rato. Nenhum anti-inflamatório foi utilizado durante ou após a realização do procedimento para que, devido às características desta classe de fármaco, seu uso não afetasse os resultados obtidos no estudo.

Aleatoriamente, um dos membros de cada animal foi escolhido como tratado, permanecendo o contralateral como controle, sendo possível avaliar a resposta deste frente à terapia proposta quando comparada apenas à antissepsia. Sendo assim, quando referidos, o grupo controle corresponde ao membro não tratado e o grupo tratado corresponde ao membro em que a membrana foi utilizada por três dias. O tratamento realizado nas feridas de lado controle foi apenas a lavagem com água, detergente neutro da marca Ypê® e secagem com gaze esterilizada e colocação de atadura com algodão. As feridas tratadas receberam a aplicação da MAE, de forma a recobrir o ferimento, sendo fixo apenas devido à pressão e colocação de atadura com algodão.

Para isso, a MAE foi retirada do congelador e banhada em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% em temperatura ambiente para hidratação por cinco minutos, sendo posteriormente colocada nos locais de incisão dos animais nos membros testes, para futura comparação com os membros controles.

A MAE ficava retida na lesão por três dias até a primeira troca de curativo. Durante esse período ela ressecava e perdia sua forma inicial (Figura 7), não apresentando mais utilidade para o tratamento.



Figura 7: MAE já sem forma, após a primeira troca de curativo.

A ferida tratada era então avaliada, limpa e o manejo seguiu semelhante ao membro não tratado, com avaliação quando se aplicasse ao dia, limpeza e troca de curativo. A troca foi realizada até o 17º dia e era efetuada nos dias das avaliações. Após a remoção do curativo, a limpeza era realizada apenas nos dias de avaliação, que consistiu, a partir do 21º dia, de avaliações semanais até o fechamento completo do local da incisão.



Figura 8: Foto da MAE na lesão, antes de realizar o curativo.
HDM Horse Service, Janeiro de 2019.

3.5 AVALIAÇÃO

As lesões foram avaliadas e classificadas sempre pelo mesmo avaliador quanto a parâmetros macroscópicos e sensoriais, como: sensibilidade dolorosa à palpação digital ao redor da ferida; presença de tecido de granulação; secreções; e hemorragia após debridamento durante a limpeza.

A sensibilidade dolorosa à palpação foi classificada em: não sensível “0”; pouco sensível “1”; sensível “2”; e muito sensível “3”. Os demais parâmetros foram estimados em escala de 0 a 3, sendo: “0” indicativo de ausência dos parâmetros avaliados; “1” ocorrência em até 30% da lesão; “2” ocorrência em 30% a 60%; “3” ocorrência em 60% a 100% da lesão.

As avaliações foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 14, 21, 28, e 63 a fim de padronizar os resultados estatísticos, visto que o fechamento completo da lesão em tempos diferentes para cada animal poderia afetá-los negativamente.

A colheita de fragmentos por biópsia foi obtida das bordas das lesões (Figura 8) e, posteriormente, estes foram fixados em formaldeído tamponado em solução aquosa a 10%. Em seguida, foram reduzidos a pequenos fragmentos, que foram submetidos às técnicas rotineiras de inclusão em parafina, cortados em

micrótomo manual e corados com hematoxilina e eosina (HE). Os parâmetros avaliados microscopicamente também realizados pelo mesmo avaliador foram: a integridade do epitélio, a organização do tecido conjuntivo, a presença de hemorragia, fibroplasia, hiperplasia epitelial, hiperqueratose, neovasos e os tipos celulares presentes.



Figura 9: Coleta de amostra para realização de biópsia, obtida da borda da ferida.

A colheita do material destinado à análise histológica foi realizada imediatamente após a cirurgia e no 3º, 7º, 14º, 21º, 28º e 63º dias de pós-operatório. Foram colhidas amostras com punch descartável de quatro milímetros nas bordas das lesões, abrangendo áreas cicatrizadas, não cicatrizadas e a região de transição entre estas, dos lados controle e tratado de diferentes animais em tempos diferentes, por exemplo, a égua 1 coletada, no terceiro dia, não foi mais coletada, visto que os 6 dias de avaliação permitiram que cada égua fosse

avaliada uma vez, buscando-se evitar que traumatismos consecutivos reagudizassem o processo inflamatório e, com isso, interferissem no desenvolvimento do processo cicatricial.

Nas mesmas ocasiões em que as lesões eram avaliadas, seus contornos foram delineados com o uso de plástico filme de PVC transparente e caneta marcadora para retroprojeter, sendo esses esquemas, posteriormente, submetidos à análise por para calculo a área utilizando o programa ImageJ, conforme descrito por Sfair (2016). Este dado foi utilizado para análise até o 63º dia, porém, foi coletado semanalmente até o fechamento completo.

O tempo de cicatrização foi definido entre o momento da incisão e início do tratamento para o membro tratado e momento da incisão no membro controle, ambos realizados no mesmo dia, até o fechamento completo da pele.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores das áreas das feridas, bem como as taxas de contração e tempo de cicatrização, foram submetidos à análise pelo teste T de Student para dados pareados, com nível de significância de 5%. Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Wilcoxon Signed Rank Test, que verifica diferenças entre pares ordenados (VIEIRA, 2004).

Os dados apresentados em escala ordinal não paramétrica foram analisados pelo método de Friedman, com 95% de confiabilidade. A taxa de cicatrização foi analisada pelo Teste Anova para medidas repetidas, também com 95% de confiabilidade (VIEIRA, 2004).

4 RESULTADOS

Em princípio, é importante ressaltar que a criopreservação não alterou propriedades físicas da membrana, portanto é uma metodologia eficaz para armazenamento e utilização. Posterior ao tempo de hidratação proposto de cinco minutos, a membrana retornava à maleabilidade observada no momento da sua coleta. O tamanho da membrana não se mostrou afetado pelo tempo, sendo todas as feridas cobertas pelo material.

Em relação à dor, essa foi observada apenas no momento D3, nos animais do grupo controle, com escores variando de 0 a 2, com mediana 1,09. Nesse caso, este parâmetro diferiu significativamente pelo teste de Wilcoxon para amostras independentes, com P-valor = 0,0269.

Em seguida, os demais resultados estão expostos nas tabelas 1 a 3, nos gráficos das Figuras 10 a 13, onde CTL é o grupo controle, e MBN é o grupo membrana. Na tabela 1 e na figura 10, são vistos os resultados em relação à granulação.

Tabela 1: Escores médios de granulação nas feridas

	D3	D7	D14	D21	D28	D63
CTL	0.17	1.00	2.17	2.33	1.67	0.17
MBN	0.17	1.50	2.50	2.50	1.17	0.00

Em escala de 0 a 3, sendo: "0" indicativo de ausência dos parâmetros avaliados; "1" ocorrência em até 30% da lesão; "2" ocorrência em 30% a 60%; "3" ocorrência em 60% a 100% da lesão.

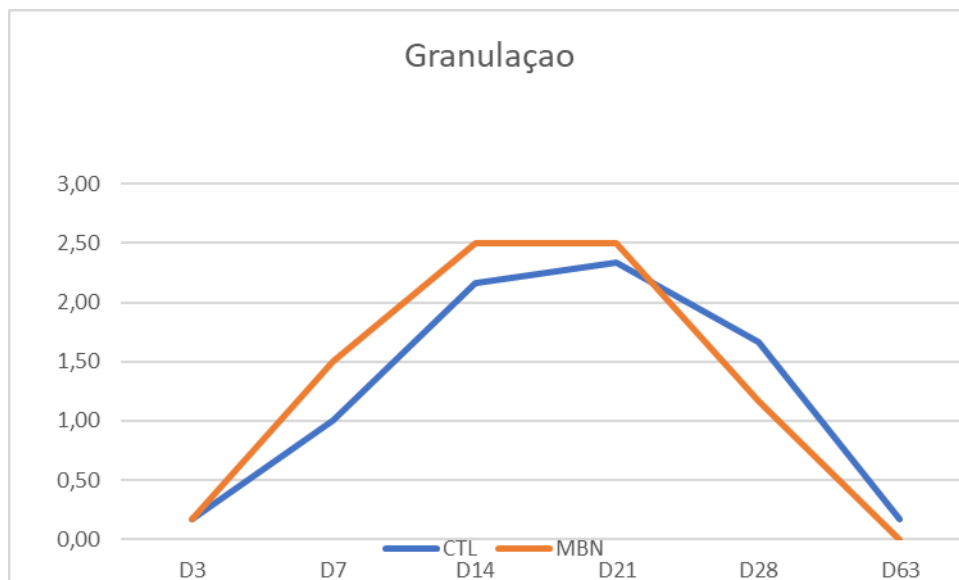


Figura 10: Gráfico apresentando os escores médios de granulação nas feridas.

Em relação aos escores médios de granulação nas feridas não houve diferença significativa entre os tratamentos: P-valor = 0.654720846. Todavia, pode-se verificar que a MAE estimulou a formação de tecido de granulação.

A tabela 2 e Figura 11 trazem os resultados dos escores médios da secreção.

Tabela 2: Escores médios da secreção

	D3	D7	D14	D21	D28	D63
CTL	1.50	1.50	1.50	0.67	0.00	0.00
MBN	2.00	2.17	1.83	1.83	0.00	0.00

Em escala de 0 a 3, sendo: "0" indicativo de ausência dos parâmetros avaliados; "1" ocorrência em até 30% da lesão; "2" ocorrência em 30% a 60%; "3" ocorrência em 60% a 100% da lesão.

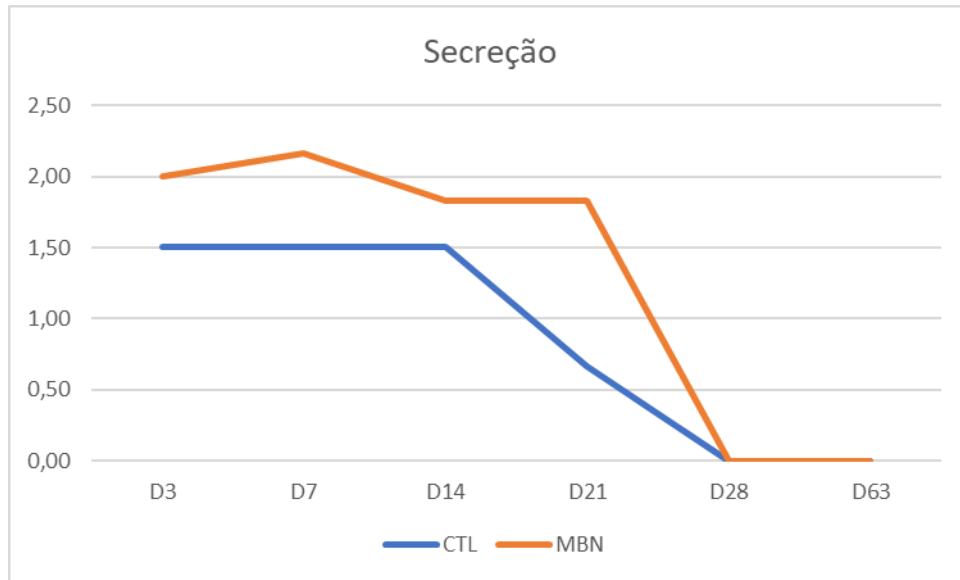


Figura 11: Gráfico apresentando os escores médios da secreção nas feridas.

Em relação à secreção também não houve diferença significativa entre os tratamentos: P-valor = 0.317310508. Porém, verifica-se que a MAE causou reação tecidual tipo “corpo estranho”, gerando o aumento da secreção.

Os resultados em relação ao escore médio de hemorragia se encontram na tabela 3 e figura 12.

Tabela 3: Escore médio de hemorragia

	D3	D7	D14	D21	D28	D63
CTL	1.67	1.33	1.33	0.67	0.33	0.83
MBN	2.33	1.67	1.50	1.50	0.33	0.17

Em escala de 0 a 3, sendo: “0” indicativo de ausência dos parâmetros avaliados; “1” ocorrência em até 30% da lesão; “2” ocorrência em 30% a 60%; “3” ocorrência em 60% a 100% da lesão.

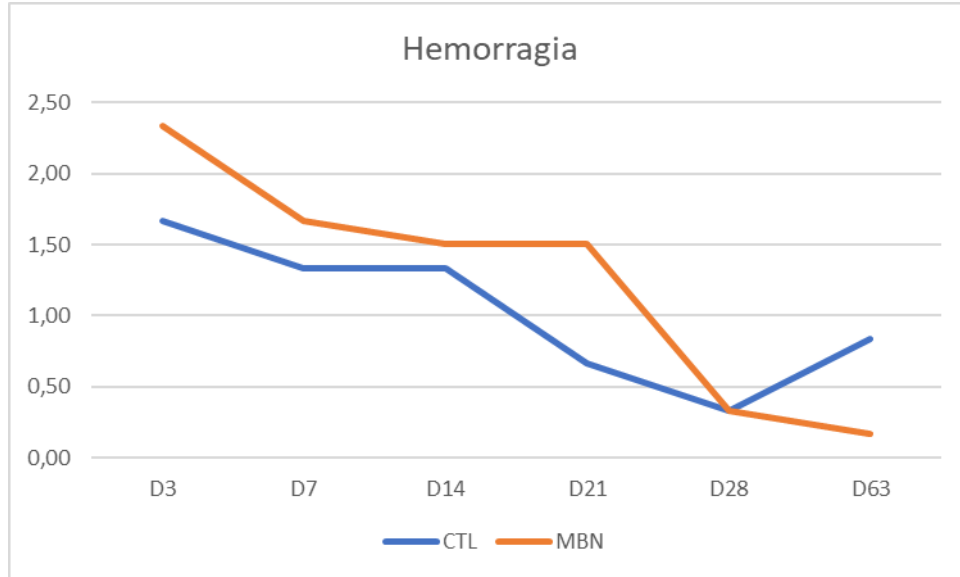


Figura 12: Gráfico apresentando os escores médios de hemorragia das feridas.

Da mesma forma que os resultados anteriores, também não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à hemorragia: P-valor = 0.179712495.

Em relação à taxa de cicatrização, esta não diferiu significativamente entre os grupos, com P-Valor = 0.3772, como pode ser observado na figura 13.

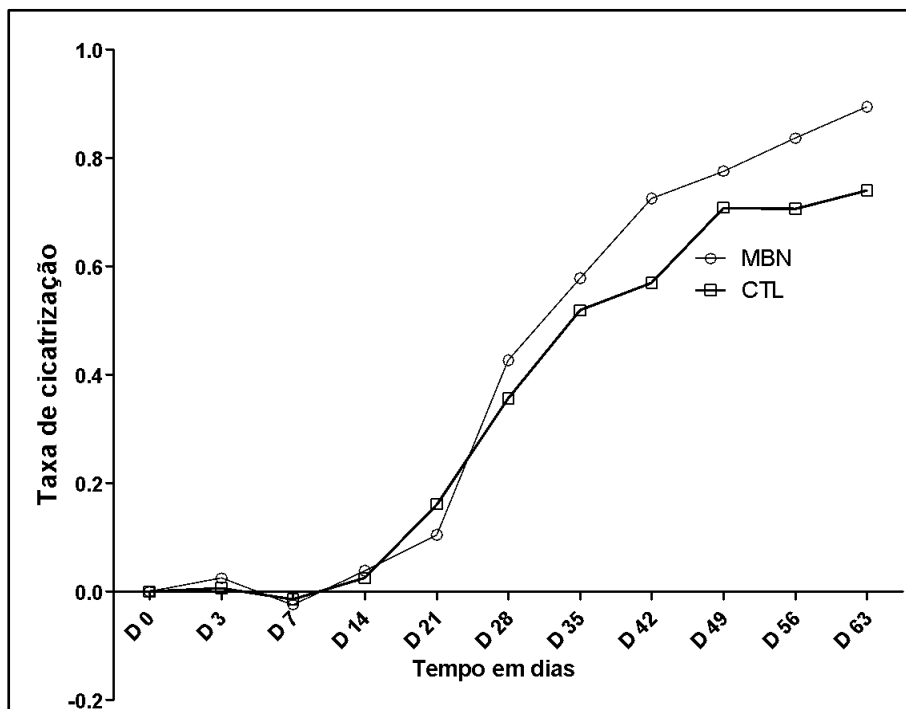


Figura 13: Taxa média de cicatrização das feridas, comparando-se o grupo controle (CTL) e tratado com membrana amniótica (MBN), onde "0" corresponde a nenhuma cicatrização e "1" cicatrização total.

O tempo de cicatrização foi de $72,83 \pm 7,3$ no grupo MBN e $84 \pm 9,4$ no grupo CTL, com diferença significativa entre os grupos: P-valor = 0.04446035.

As fotos das Figuras 14 e 15 a seguir trazem um comparativo lado a lado da evolução da cicatrização das feridas de duas das éguas do estudo, mostrando o lado não tratado (grupo CTL) e o tratado com a MAE (grupo MBN).

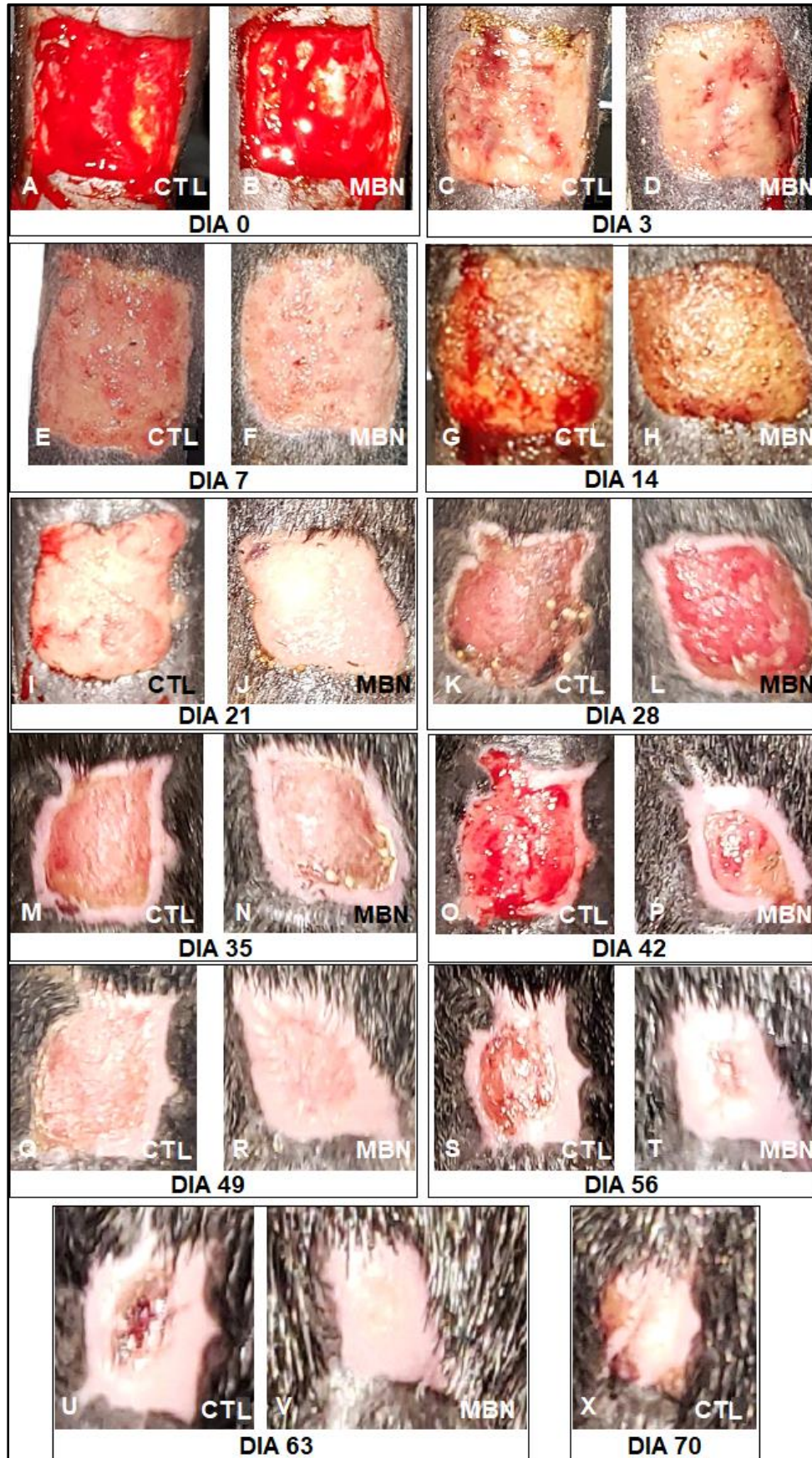


Figura 14: Fotos da evolução cicatricial onde se observa o comparativo das lesões do membro-controle (CTL) e as lesões tratadas com a MAE em uma das éguas do estudo.

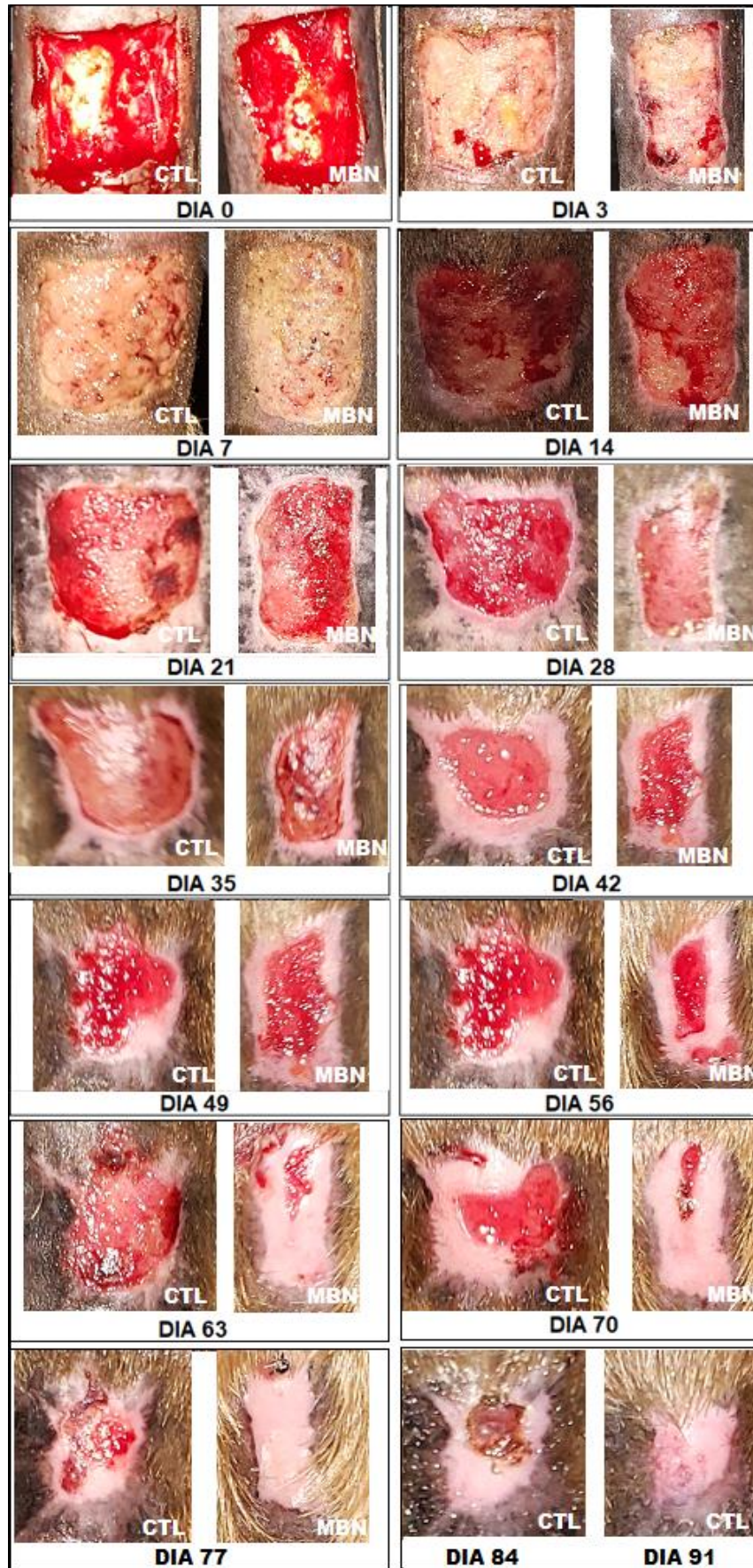


Figura 15: Fotos da evolução cicatricial onde se observa o comparativo das lesões do membro-controle (CTL) e as lesões tratadas com a MAE em uma das éguas do estudo.

As fotos das figuras 16 a 19 a seguir trazem imagens histológicas da evolução do processo de cicatrização das feridas, nos tratamentos dos grupos CTL e MBN, cujos laudos se encontram no Anexo III.

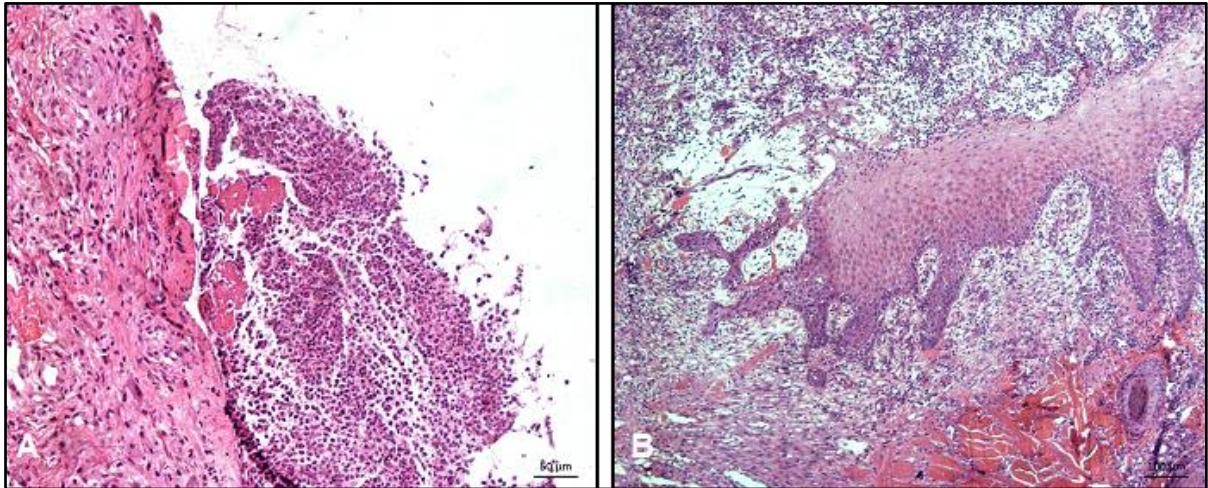


Figura 16: Dia 7 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Observa-se área focal de infiltrado inflamatório misto, com detritos celulares e fibrina polimerizada (crosta) adjacente ao tecido de granulação, caracterizado por fibroplasia, neovascularização e infiltrado inflamatório. HE, obj. 20. B) Grupo MBN. Observa-se moderada hiperplasia da epiderme (acantose), e adjacente a esta há uma área de ulceração e acentuado infiltrado inflamatório misto, predominantemente polimorfonuclear com acentuada quantidade de tecido de granulação, caracterizado por fibroplasia e neovascularização. HE, obj. 10.

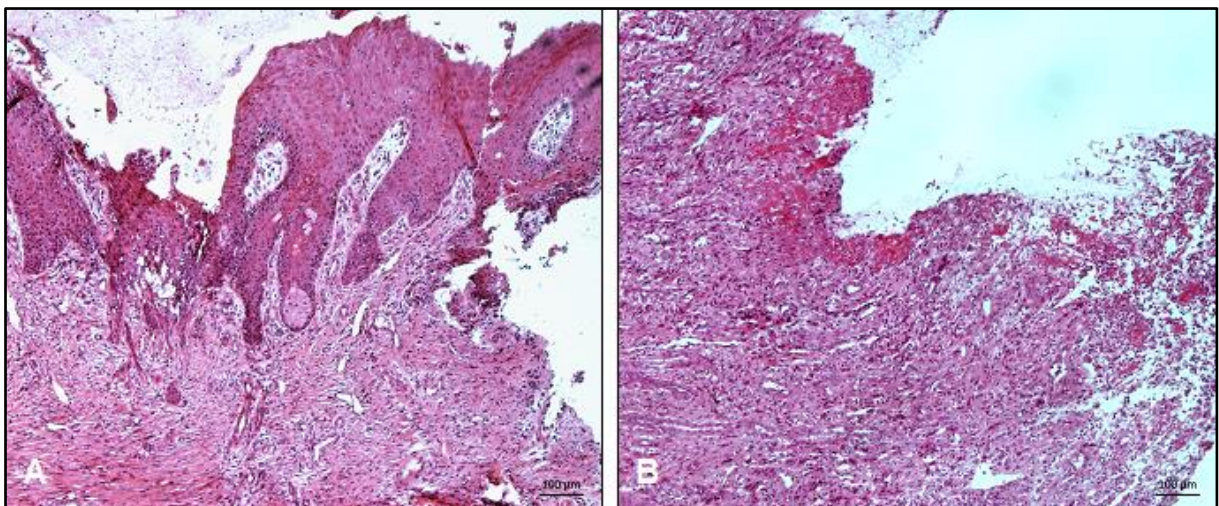


Figura 17: Dia 14 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Evidencia-se a epiderme acantótica, e derme com acentuada quantidade de tecido de granulação. HE, obj. 10. B) Grupo MBN. Observa-se acentuado tecido de granulação e áreas multifocais de fibrina na extremidade da lesão. HE, obj. 10.

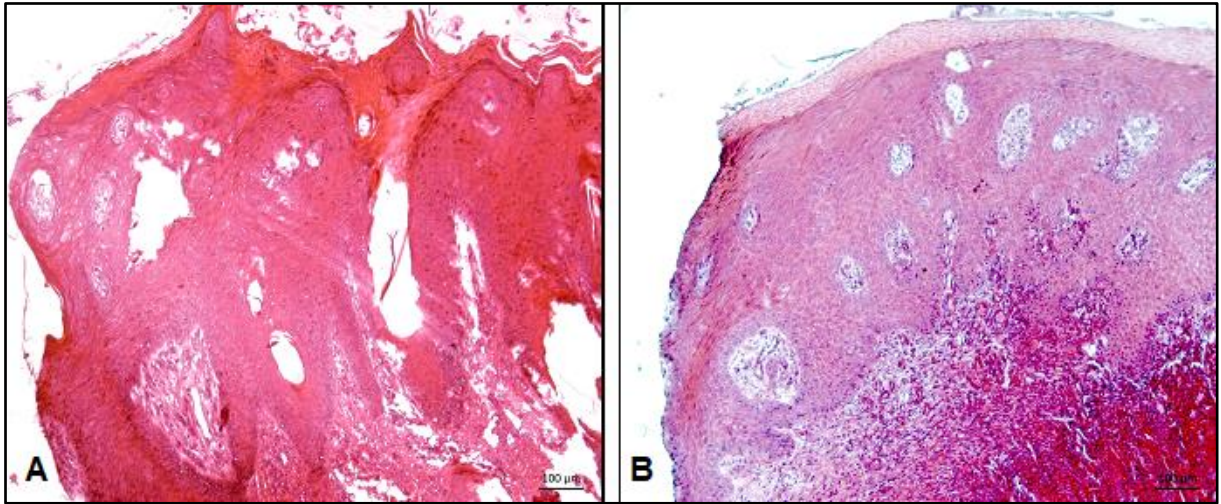


Figura 18: Dia 28 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Verifica-se epiderme acentuadamente acantótica, com leve hiperpigmentação e hiperqueratose ortoqueratótica moderada. HE, obj. 10. B) Grupo MBN. Observa-se epiderme acentuadamente acantótica, com hiperqueratose ortoqueratótica moderada e derme com acentuado tecido de granulação. HE, obj. 10.

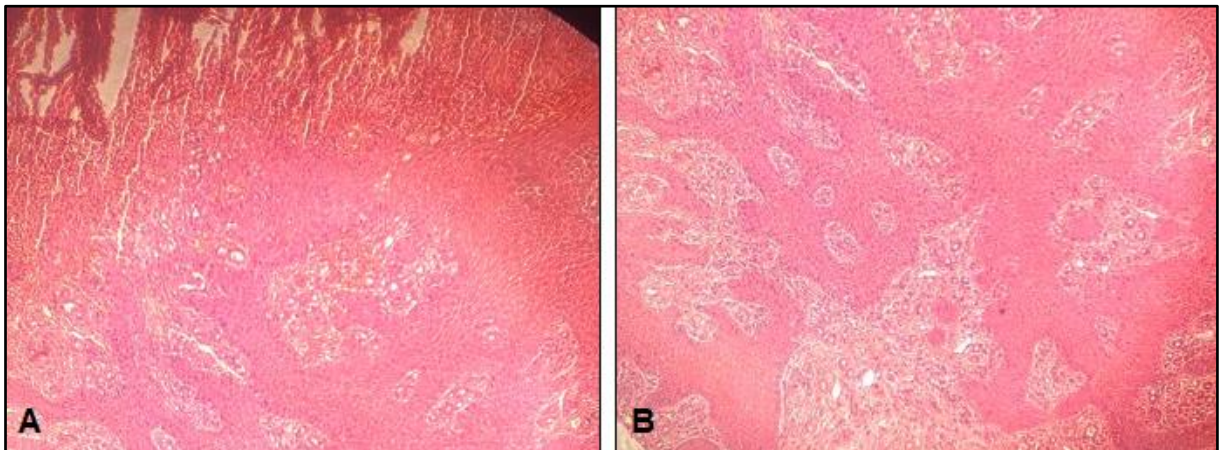


Figura 19: Dia 63 – Imagem histológica. A) Grupo CTL. Verifica-se epiderme com pequena área normotrófica seguida por área moderadamente acantótica. HE, obj. 5. B) Grupo MBN. Observa-se epiderme com células epidérmicas de citoplasma amplo e eosinofílico. Na derme, acentuada quantidade de vasos sanguíneos de pequeno calibre (neovascularização), formados por células endoteliais robustas e preenchidas por moderada quantidade de hemácias. HE, obj. 5.

5 DISCUSSÃO

Mesmo não havendo diferença significativa entre os grupos em relação à secreção e à hemorragia macroscópica, observou-se que a presença de ambas foi maior no tratamento com membrana amniótica do que no membro controle, o que pode ser explicado pela maior neovascularização promovida pela membrana, conforme descrito por Murphy et al (2017) e Moyer (2018), e como constataram Duarte e Duval-Araújo (2014) em seu estudo utilizando a membrana amniótica como curativo biológico na cicatrização de feridas infectadas em coelhos.

Nesse sentido, os aspectos microscópicos da cicatrização das feridas verificados no presente estudo através dos exames histológicos comprovam essa neovascularização maior no tratamento com a MAE, e essa neovascularização justifica o tempo de cicatrização ter sido menor no grupo MBN, visto que proporciona a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas e, conforme afirma Provost (2012), o processo de cicatrização necessita de um fornecimento contínuo de oxigênio e nutrientes.

Apesar dessa constatação, não foi feita uma análise estatística dos parâmetros microscópicos, porque as coletas de amostras para histologia foram restritas, no intuito de evitar que os traumatismos consecutivos provocados pelas coletas reagudizassem o processo inflamatório das feridas, o que iria interferir no desenvolvimento da cicatrização.

Após o término do experimento, também foi possível observar que o uso da MAE possibilitou uma melhor organização da cicatrização em relação ao membro controle, observada visualmente tanto na avaliação macroscópica quanto na microscópica. Essa melhor organização da cicatrização promovida pela MAE, em relação aos outros tratamentos, também foi observada por Nicodemo et al (2017), que em seu estudo em humanos com lesão aguda de tendão tratados com MA verificaram uma melhor organização das fibras de colágeno do que no grupo controle. Em estudo semelhante, porém em equinos com lesões espontâneas unilaterais de tendão flexor digital superficial, tanto agudas como crônicas, Muttini et al (2015) chegaram à mesma conclusão, ao avaliar análises histológicas que mostraram uma restauração quase completa da arquitetura tendínea normal com um ótimo alinhamento das fibras do tendão.

Esse fato talvez possa ser explicado por uma melhor qualidade da fibroplasia proporcionada pela MAE, visto que o presente estudo encontrou uma classificação mais favorável para esse parâmetro no o grupo MBN em comparação com o grupo CTL.

Sobre a granulação macroscópica, não foi observada diferença significativa entre o grupo MBN e CTL, como foi observado em outros estudos, como no de Bigbie et al (1991), no qual as feridas de equinos tratadas com MAE apresentaram tecido de granulação exuberante significativamente menor em comparação com os controles; o de Oliveira e Alvarenga (1998), onde as feridas tratadas com MAE desenvolvem menor quantidade de tecido de granulação; e o de Goodrich et al (2000), realizado com pôneis, que também observou o mesmo.

Essa diferença talvez possa ser explicada pelo fato de que, no presente estudo, a bandagem foi mantida durante 17 dias e esse tempo, apesar de estar dentro dos limites estabelecidos pela literatura, pode contribuir para que o tecido de granulação se desenvolva mais facilmente. Esse fato se justificaria pelo atrito que ocorre entre a ferida e a bandagem, durante a movimentação do animal, o que promoveria a granulação. O resultado observado é que isto pode ter contribuído com o tempo total de cicatrização.

Nesse sentido, Theoret (2004) explica que, no equino, curativos oclusivos resultam em tempos de cicatrização significativamente prolongados e produção de excesso de exsudato de ferida e tecido de granulação. Essa observação também encontra respaldo em Jacobsen (2017), que diz que para evitar o desenvolvimento do tecido de granulação os curativos oclusivos devem ser usados apenas durante a fase inflamatória da cicatrização e que seu uso deve ser interrompido no primeiro sinal de formação de tecido de granulação ou quando o leito da ferida é coberto com tecido de granulação.

Em relação ao alívio da dor, verificado no grupo MBN, pode ser explicado pelo que diz Tenenhaus (2017), de que o fato de cobrir a ferida com a MAE, além de proteger a área, tem ação calmante, pois as terminações nervosas expostas são acalmadas. Esse alívio da dor também foi observado no estudo de Duval-Araújo (2014).

Esse fato também pode indicar uma melhor modulação da inflamação local no tratamento com a membrana amniótica. Essa redução do processo inflamatório

e melhor modulação também foi verificada nos estudos de Bigbie et al (1991), Oliveira e Alvarenga (1998) e no de Nicodemo et al (2017).

Por fim, sobre o tempo mais curto de cicatrização, observado no presente estudo para o tratamento com a MAE, também está de acordo com os resultados de outros estudos, já descritos em maiores detalhes na revisão de literatura desse trabalho, como: o de Bigbie et al (1991), que relatam que a aplicação de MAE em feridas experimentais no metacarpo e metatarsos de 9 equinos promoveu uma diminuição do número de dias para completar a cicatrização em comparação com o grupo controle; o de Oliveira e Alvarenga (1998), que também utilizaram a MAE em feridas nos membros locomotores de 5 equinos adultos e os resultados demonstraram que em todas as feridas tratadas com MAE houve menor tempo de cicatrização em comparação com o grupo controle; e o de Goodrich et al (2000), que utilizaram a MAE em feridas distais experimentais em 6 pôneis, apresentando diminuição do tempo médio de cicatrização comparado com o grupo controle.

6 CONCLUSÃO

Através desse estudo foi possível concluir que o tratamento com a MAE atingiu as expectativas esperadas, de ser um tratamento eficaz, de execução simples e com custo relativamente baixo.

O tratamento e preservação da MAE realizado dentro dos parâmetros utilizados por esse estudo se provou eficiente, e poder ser mantida em um congelador, o que facilita o acesso a esse tipo de tratamento.

Com isso, o estudo confirma a hipótese defendida de que o uso da MAE como método de auxílio e modulação das feridas é válido, visto que a mesma promove uma recuperação cicatricial de melhor qualidade, sugerida pela maior neovascularização e melhor qualidade da fibroplasia, além de causar menor sensibilidade à dor e promover a cicatrização em tempo significativamente menor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARACHETTI, L.; GIUDICE, C.; MORTELLARO, C.M. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.5, p.326-330, 2010.

BERRY, D.B.; SULLINS, K.E. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.1, p.88-92, 2003.

BIGBIE, R.B.; SCHUMACHER, J.; SWAIM, S.F.; PUROHIT, R.C.; WRIGHT, J.C. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.8, p.1376-1382, 1991.

DAHLGREN, L.A. Regenerative medicine therapies for equine wound management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.34, n.3, p.605-620, 2018.

DALY, W. Wound infection. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1985. p.37-49.

DAVIS, J. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. **Johns Hopkins Medical Journal**, v.15, p.307-396, 1910.

DUARTE, I.G.L.; DUVAL-ARAUJO, I. Amniotic membrane as a biological dressing in infected wound healing in rabbits. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.29, n.5, p.334-339, 2014.

ECHEVERRY, LF.G.; TORO, S.P.A.; GIRALDO, J.L.V. Implante de membrana amniótica en la corrección de úlceras corneales profundas de caninos y felinos. **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá (Colombia), n.36, p.109-120, 2018.

FAHIE, M.A.; SHETTKO, D. Evidence-based wound management: a systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelialization. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.37, p.559-577, 2007.

FAVARON P.O., CARVALHO R.C., BORGHESI J., et al. The amniotic membrane: development and potential applications – a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.881–892, 2015.

GALERA, P.D.; RIBEIRO, C.R.; SAPP, H.L.; COLEMAN, J.; FONTES, W.; BROOKS, D.E. Proteomic analysis of equine amniotic membrane: characterization of proteins. **Veterinary Ophthalmology**, v.18, n.3, p.198-209, 2015.

GOKTAS, S.E.; KATIRCIOGLU, Y.; CELIK, T.; ORNEK, F. Surgical amniotic membrane transplantation after conjunctival and limbal tumor excision. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.80, n.4, p.242-246, 2017.

GOODRICH, L.R.; MOLL, H.D.; CRISMAN, M.V.; LESSARD, P.; BIGBIE, R.B. Comparison of equine amnion and a nonadherent wound dressing material for bandaging pinch-grafted wounds in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.3, p.326-329, 2000.

HERNDON, D.N.; BRANSKI, L.K. Contemporary methods allowing for safe and convenient use of amniotic membrane as a biologic wound dressing for burns. **Annals of Plastic Surgery**, v.78, suppl.1, p.9-10, 2017.

JACOBSEN, S. Update on wound dressings: indications and best use. In: THEORET, C.L. SCHUMACHER, J. **Equine wound management**. 3.ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2017. Cap.6, p.104-131.

KIM, J.C.; TSENG, S.C.G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. **Cornea**, v.14, p.473-484, 1995.

KOOB, T.J.; RENNERT, R.; ZABEK, N.; MASSEE, M.; LIM, J.J.; TEMENOFF, J.S.; LI, W.W.; GURTNER, G. Biological properties of dehydrated human amnion/chorion composite graft: implications for chronic wound healing. **International Wound Journal**, n.10, p.493-500, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Inflamação e reparo. In: _____. **Robbins & Cotran - Patologia: bases patológicas das doenças**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Cap.3, p.71-114.

LANGE-CONSIGLIO, A.; TASSAN, S.; CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; PEREGO, R.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries. **Cytotherapy**, n.15, p.1011-1020, 2013.

LANGE-CONSIGLIO, A.; PERRINI, C.; TASQUIER, R.; DEREGIBUS, M.C.; CAMUSSI, G.; PASCUCCI, L.; MARINI, M.G.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; DE VITA, B.; ROMELE, P.; PAROLINI, O.; CREMONESI, F. Equine amniotic microvesicles and their anti-inflammatory potential in a tenocyte model *in vitro*. **Stem Cells and Development**, v.25, n.8, p.610-621, 2016.

LLOYD, D.H.; PATEL, A.P. Structure and function of the skin. In: FOSTER, A.P.; FOIL, C.S. **BSAVA Manual of small animal dermatology**. 2.ed. Gloucester – Inglaterra: British Small Animal Veterinary Association, 2003. Cap.1, p.1-10.

LUCAS, R. Semiologia da pele. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap.12, p.641-676.

MATERA, J. Ensaio de avaliação de eficácia e de exequibilidade de uso do creme ou gaze impregnada com *Triticum vulgare* em feridas cutâneas. **Artigos técnicos em série da Schering-Plough Coopers**, n.8, p.1-7, 2002.

MOMENI, M.; ZAREHAGHIGHI, M.; HAJIMIRI, M.; KHORASANI, G.; DINARVAND, R.; NEKOOKAR, A.; SODEIFI, N.; KHOSRAVANI, P.; SHAYANASL, N.; EBRAHIMI, M. In vitro and in vivo investigation of a novel amniotic-based chitosan dressing for wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.26, n.1, p.87-101, 2018.

MOYER, C.T. **Evaluation of lyophilized human amnion for equine wound management**. 48p. Thesis (Master of Science in Biomedical and Veterinary Sciences), Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Leesburg, Virginia, 2018.

MURPHY, S.V.; SKARDAL, A.; SONG, L.; SUTTON, K.; HAUG, R.; MACK, D.L.; JACKSON, J.; SOKER, S.; ATALA, A. Solubilized amnion membrane hyaluronic acid hydrogel accelerates full-thickness wound healing. **Stem Cells Translational Medicine**, v.6, n.11, p.2020-2032, 2017.

MUTTINI, A.; SALINI, V.; VALBONETTI, L.; ABATE, M. Stem cell therapy of tendinopathies: suggestions from veterinary medicine. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v.2, n.3, p.187-192, 2012.

MUTTINI, A.; VALBONETTI, L.; ABATE, M.; COLOSIMO, A.; CURINI, V.; MAURO, A.; BERARDINELLI, P.; RUSSO, V.; COCCIOLONE, D.; MARCHISIO, M.; MATTIOLI, M.; TOSI, U.; VULPIANI, M.P.; BARBONI, B. Ovine amniotic epithelial cells: In vitro characterization and transplantation into equine superficial digital flexor tendon spontaneous defects. **Research in Veterinary Science**, v.94, p.158-169, 2013.

MUTTINI, A.; RUSSO, V.; ROSSI, V.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TOAL, U.; MAFFULLI, N.; VALBONETTI, L.; ABATE, M. Pilot experimental study on amniotic epithelial mesenchymal cell transplantation in natural occurring tendinopathy in horses. Ultrasonographic and histological comparison. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v.5, n.1, p.5-11, 2015.

NICODEMO, M.C.; NEVES, L.R.; AGUIAR, J.C.; BRITO, F.S.; FERREIRA, I.; SANT'ANNA, L.B.; RANIERO, L.J.; MARTINS, R.A.L.; BARJA, P.R.; ARISAWA, E.A.L.S. Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.32, n.2, p.125-139, 2017.

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 & Materials**, v.15, p.88-99, 2008.

OLIVEIRA, V.A.; ALVARENGA, J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores e equinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.4, p.623-628, 1998.

PAGANELA, J.C.; RIBAS, L.M.; SANTOS, C.A.; FEIJÓ, L.S.; NOGUEIRA, C.E.W.; FERNANDES, C.G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, ano 108, v.CIV, n.569-572, p.13-18, 2009.

PLUMMER CE. 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, Suppl 1, p.17-24, 2009.

PROVOST, P.J. Wound healing. AUER, J.A.; STICK, J.A. **Equine surgery**. 4.ed. Missouri: Elsevier, 2012. Cap.5, p.47-61.

REESE, S.; BUDRAS, K.D.; MÜLLING, C.; BRAGULLA, H.; KÖNIG, H.E. Tegumento comum (Integumentum commune). In: KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. Cap.18, p.615-666.

RIBAS, L.M.; NOGUEIRA, C.E.W.; BEIRA, F.T.A.; ALBUQUERQUE, L.P.A.N.; KICKHÖFEL, I.A. Efeito cicatrizante do extrato aquoso de *Triticum vulgare* em feridas do tecido cutâneo de equinos. **A Hora Veterinária**, v.25, n.147, p.58-60, 2005.

RIORDAN, N.H.; GEORGE, B.A.; CHANDLER, T.B.; MCKENNA, R.W. Case report of non-healing surgical wound treated with dehydrated human amniotic membrane. **Journal of Translational Medicine**, v.13, n.242, p.1-5, 2015.

ROMATOWSKI, J. Prevention and control of surgical wound infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.194, n.1, p.107-112, 1989.

SCHNEITER, H.L.; MCCLURE, J.R.; CHO, D.Y.; CRAWFORD, M.P. The effects of flunixin meglumine on early wound healing of abdominal incisions in ponies. **Veterinary Surgery**, v.16, p.101, 1987.

SFAIR, J.C. **Usando o ImageJ para calcular a área foliar**. Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Ecologia Vegetal, 2016. Disponível em: <<https://bit.ly/334U6n7>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

SEO, M.S.; PARK, H.S.; KANG, J.G.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v.14, n.2, p.151-159, 2013.

STASHAK, T.S. **Management of wounds associated with the distal limbs 2/9/09**. Abreveq, 2012. Disponível em: <<https://bit.ly/2PswNgm>>. Acesso em: 11 mar. 2019.

TENENHAUS, M. The use of dehydrated human amnion/chorion membranes in the treatment of burns and complex wounds: current and future applications. **Annals of Plastic Surgery**, v.78, suppl.1, p.11-13, 2017.

THEORET, C.L. Wound repair in the horse: problems and proposed innovative solutions. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.3, n.2, p.134-140, 2004.

THEORET, C.L. Wound repair: problems in the horse and innovative solutions. In: STACHAK, T.S.; THEORET, C.L. **Equine wound management**. Wiley-Blackwell, 2008. Cap 1.3, p 47-68.

THEORET, C.L.; STACHAK, T.S. Integumentary system: wound healing, management and reconstruction. In: ORSINI, J.A.; DIVERS, T.J. **Equine emergencies-treatment and procedures**. 4.ed. Saint Louis: Elsevier, 2014. p.238-267.

VIEIRA, S. **Bioestatística – tópicos avançados**. 2.ed. São Paulo: Campus, 2004. 232p.

WERNER, S.; GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, n.83, p. 835-870, 2003.

WILMINK, J.M.; VAN WEEREN, P.R.; STOLK, P.W.; BARNEVELD, A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. **Equine Veterinary Journal**, v.31, n.1, p.53-60, 1999a.

WILMINK, J.M.; VAN WEEREN, P.R.; STOLK, P.W.; VAN MIL, F.N.; BARNEVELD, A. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. **Equine Veterinary Journal**, v.31, n.1, p.61-67, 1999b.

WILMINK, J.M.; NEDERBRAGT, H.; VAN WEEREN, P.R.; STOLK, P.W.; BARNEVELD, A. Differences in wound contraction between horses and ponies: The in vitro contraction capacity of fibroblasts. **Equine Veterinary Journal**, v.33, n.5, p.499-505, 2001.

WILMINK, J.M.; VAN HERTEN, J.; VAN WEEREN, P.R.; BARNEVELD, A. Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. **Equine Veterinary Journal**, v.34, n.3, p.270-273, 2002.

WILMINK, J.M.; VEENMAN, J.N.; VAN DEN BOOM, R.; RUTTEN, V.P.M.G.; NIEWOLD, T.A.; BROEKHUISEN-DAVIES, J.M.; LEES, P.; ARMSTRONG, S.; VAN WEEREN, P.R.; BARNEVELD, A. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.6, p.561-569, 2003.

ZELEN, C.M.; SERENA, T.E.; DENOZIERE, G.; FETTEROLF, D.E. A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. **International Wound Journal**, n.10, p.502-507, 2013.

ZELEN, C.M.; SERENA, T.E.; SNYDER, R.J. A prospective, randomised comparative study of weekly versus biweekly application of dehydrated human amnion/chorion membrane allograft in the management of diabetic foot ulcers. **International Wound Journal**, n.11, p.122-128, 2014.

ANEXO I – CEUA



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



Seropédica, 08 de agosto de 2017
CEUA N 3133070817

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 924.895.677-72

Título do projeto: Membrana amniótica congelada e desidratada seu uso em feridas cutâneas de equinos

Responsável: Paulo de Tarso Landgraf Botteon

Equipe: Marcos Vinícius Dias Rosa

Telefone: 24 988234252 e-mail: pbotteon@ufrj.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://r1.ufrj.br/ceua/>) por meio da sua senha de acesso.

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Membrana amniótica congelada e desidratada seu uso em feridas cutâneas de equinos.

Nome do Pesquisador Principal: Marcos Vinicius Dias Rosa

Nome do Assistente: Maurilio Rosa

Natureza da pesquisa: o Sr. está sendo convidado a participar desta pesquisa que tem como finalidade descobrir os efeitos do uso da membrana amniótica congelada e desidratada em feridas cutâneas de equinos

Participantes da pesquisa: Seis equinos serão utilizados na pesquisa, tendo como alvo esta população para utilização do tratamento proposto anteriormente. Os animais estão localizados no Haras dos Meninos, localizado na RJ 116, KM 28, Japuiba, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro.

Envolvimento na pesquisa: ao participar deste estudo o(a) Sr.(Sra.) permitirá que o pesquisador Marcos Vinicius Dias Rosa utilize seus animais para a experimentação através da realização de feridas cirúrgicas que serão tratadas com a membrana amniótica. O(A) Sr.(Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o(a) Sr.(Sra.). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do pesquisador do projeto e, se necessário, através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os animais passarão por um procedimento cirúrgico minimamente invasivo com baixa possibilidade de causar algum desconforto permanente ao mesmo. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética elaborados pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794-2008. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

Confidencialidade: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o pesquisador e o orientador terão conhecimento dos dados.

Benefícios: ao participar desta pesquisa o(a) Sr.(Sra.) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre como esta membrana biológica e como ela auxilia a recuperação de feridas cutâneas em equinos de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa fornecer aos profissionais médico veterinários mais um método de tratamento desta enfermidade, onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.

Pagamento: o(a) Sr.(Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

Consentimento Livre e Esclarecido:

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa. Declaro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a realização da pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Nome do Proprietário do animal

Assinatura do Pesquisador


Assinatura do Orientador

Pesquisador Principal: Marcos Vinicius Dias Rosa – (21) 999663627

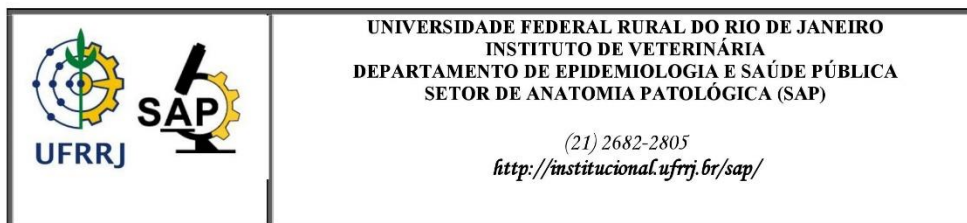
Demais pesquisadores: Maurilio Rosa – (21) 997780188

Comitê de Ética em Pesquisa: BR 465, Km 7 / Campus da UFRRJ - Seropédica - Rio de Janeiro - CEP: 23.890-000 - tel: 55 (21) 2682-3051 Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 17h e-mail: ceuaiv@ufrj.br

ANEXO III – RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE VETERINÁRIA DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA SETOR DE ANATOMIA PATOLÓGICA (SAP)</p> <p>(21) 2682-2805 http://institucional.ufrrj.br/sap/</p>
Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019	Resultado de Histopatologia 35505
Espécie: origem equina Nome: material de membrana amniótica	Veterinário: Maurilio Rosa/Marcos Vinicius Dias Rosa
<p>HISTÓRICO CLÍNICO: O histórico clínico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foram enviadas duas amostras de membrana amniótica, sendo a primeira com âmnion (em gelo) e a segunda membrana total (em formol). O material foi utilizado na tese de doutorado do aluno Marcos Vinicius Dias Rosa, sob a orientação do professor Paulo Botteon. Experimento com utilização de membrana amniótica equina em feridas realizadas no membro de equinos.</p> <p>DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA: Amostra 1: um fragmento de 3x3,5cm. O tecido era firme e transparente. Amostra 2: dois fragmentos de 13x10cm. O tecido era translúcido e de consistência gelatinosa.</p> <p>DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA: Membrana amniótica e âmnion com características microscópicas típicas e inalteradas.</p>	
<p><i>Marilene de Farias Brito</i> CRMV/RJ Prof. Patologia Veterinária</p>	<p><i>Yasmin Daoualibi</i> CRMV/RJ 14010 Residente em Patologia Veterinária</p>

Laudo 1: Laudo histopatológico de duas amostras da Membrana Amniótica Equina, sendo a primeira com âmnion (em gelo) e a segunda membrana total (em formol).



Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019 Resultado de Histopatologia 35506

Espécie: equina Nome: Equino 9 Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: adulta	Médico Veterinário: Marcus Vinicius CRMV-RJ: Fone: E-mail:
--	---

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foram coletadas três amostras de pele. A primeira (amostra 1) foi coletada no dia 3, com tratamento prévio com membrana amniótica; as outras duas amostras foram coletadas no dia 1, sem tratamento prévio, com membrana amniótica no membro torácico esquerdo (amostra 2) e no membro torácico direito (amostra 3). As amostras foram coletadas e enviadas ao SAP para exame histopatológico.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Amostra 1: pele de 0,5x0,4x0,2cm, marrom clara com áreas esbranquiçadas.

Amostra 2: pele de 4x2,5x0,5cm, hirsuta e tricotomizada, com pelos acastanhados. A superfície profunda era avermelhada. Ao corte era firme-elástica, compacta e brancacenta.

Amostra 3: pele de 3,6x2,5x0,7cm, hirsuta e tricotomizada, com pelos acastanhados. A superfície profunda era avermelhada. Ao corte era firme-elástica, compacta e brancacenta.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

1) Pele: epiderme moderadamente acantótica, com leve espongirose e evidenciação das pontes intercelulares na camada espinhosa, com discreta quantidade de detritos celulares e exocitose neutrofílica. Há uma área localmente extensiva de descontinuidade da epiderme com substituição por crosta, composta por tecido conjuntivo colagenoso, fibrina e infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, com acentuada quantidade de detritos celulares (úlceras). Na derme superficial e profunda há acentuado infiltrado inflamatório misto, predominantemente neutrofílico, com presença de fibrina e extensa área de moderada hemorragia. Adjacentes a três folículos pilosos há descontinuidade do epitélio e moderada quantidade de neutrófilos ao redor (perianexite). As glândulas sebáceas apresentam raras células com picnose nuclear, e raras glândulas sudoríparas estão ectásicas. Parte dos folículos pilosos têm discreta hiperqueratose. Na interface dermoepidermal há tecido conjuntivo colagenoso frouxo com leve infiltrado inflamatório composto por linfócitos e plasmócitos; subjacente a este, o tecido conjuntivo encontra-se denso e com moderada fibroplasia.

2) Pele: epiderme com discreta espongirose, necrose celular, leve a moderada hiperqueratose paraqueratótica e leve neovascularização. Na interface dermoepidermal há discreta leucocitoestase neutrofílica, leve fibroplasia e neovascularização, assim como na derme profunda e leve ectasia de glândulas sudoríparas. Há duas pequenas áreas abaixo da derme com fibrina, raros eosinófilos e corpúsculos de Husel.

3) Pele: epiderme levemente acantótica com leve espongirose e hiperqueratose paraqueratótica. Derme com leve neovascularização e fibroplasia. Derme profunda com tecido conjuntivo colagenoso denso desorganizado, com extensa área composta por acentuada hemorragia, feixes de fibrina e raras células inflamatórias compostas por neutrófilos, eosinófilos e linfócitos.

Marilene de Farias Brito

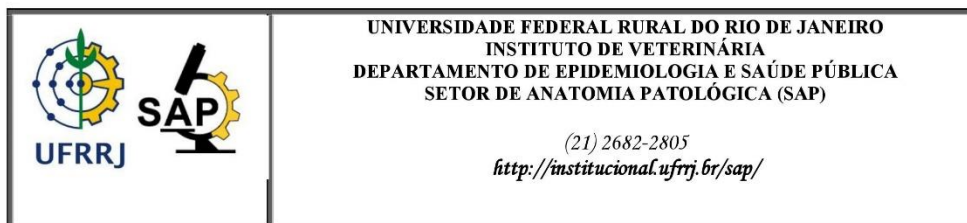
Prof Anatomia Patológica

Yasmin Daualibi

CRMV-RJ 14010

Residente em Patologia Animal

Laudos 2: Laudo histopatológico de amostras de tecido das feridas de éguas do grupo CTL nos dias 0 e dia 3.



Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019 Resultado de Histopatologia 35507

Espécie: equina Nome: Alazã Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: adulta	Médico Veterinário: Marcos Vinicius CRMV-RJ: Fone: E-mail:
---	---

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foram realizadas três biópsias de pele: duas no dia 1 (amostras 1 e 2), as quais encontravam-se sem tratamento prévio com membrana amniótica, sendo uma do membro torácico esquerdo e a outra no membro torácico direito; e outra amostra no dia 3 também sem tratamento prévio com membrana amniótica. As amostras foram coletadas e enviadas ao SAP para exame histopatológico.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Amostra 1: fragmento de pele ulcerada de 06x0,4x0,5cm, com pelos marrons e derme brancacenta. Ao corte era firme elástico, compacto, branco e com o centro pardo.

Amostra 2: fragmento de pele tricotomizada de 4x3x0,5cm, acastanhada, com áreas brancas, superfície profunda com tecido fibroso e avermelhada. Ao corte era firme-elástica, compacta e branca, com áreas avermelhadas.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

1) Pele: epiderme com moderada acantose, leve espongirose e necrose celular. Acima da epiderme há área localmente extensiva de fibrina, detritos celulares e raras células inflamatórias mistas. Na interface dermoepidermal observam-se leve neovascularização e fibroplasia.

2) Pele: epiderme levemente acantótica com leve espongirose. A derme apresenta leve neovascularização e fibroplasia. Há na derme profunda área localmente extensiva de acentuada hemorragia, leve quantidade de fibrina, moderada neovascularização, raros detritos celulares e células inflamatórias mistas.

3) Pele: epiderme levemente acantótica com leve espongirose. Derme com leve neovascularização e fibroplasia. Há uma área localmente extensiva com moderada fibroplasia na derme profunda e raros eosinófilos, uma área extensa de acentuada hemorragia, leve quantidade de fibrina, moderada neovascularização, raros detritos celulares e células inflamatórias mistas.

Marilene de Farias Brito

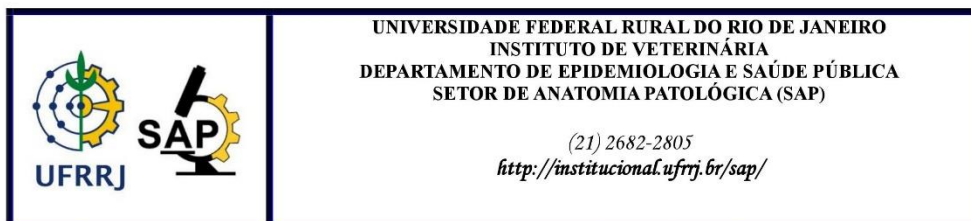
Prof Anatomia Patológica

Yasmin Daoualibi

CRMV-RJ 14010

Residente em Patologia Animal

Laudos 3: Laudo histopatológico de amostras de tecido das feridas de éguas do grupo MBN nos dias 0 e dia 3.



Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019 **Resultado de Histopatologia 35508**

Espécie: equina Nome: Potra Tordilha Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: potra	Veterinário: Marcos Vinicius Clínica: Proprietário: Telefone:
---	--

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico clínico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foram coletadas duas amostras, sendo a primeira coletada no dia 7, sem tratamento prévio com membrana amniótica no membro torácico esquerdo, e a segunda coletada no dia 7, com tratamento prévio com membrana amniótica no membro torácico direito.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Amostra 1: fragmento de pele com 1x0,5x0,3cm. Apresentava superfície externa com ponto de fibrose e pele íntegra.
Amostra 2: fragmento de pele de formato cilíndrico de 0,5cm de diâmetro em profundidade. A superfície externa era revestida por pele hirsuta acinzentada e profundo amarelada clara. Ao corte era, macio, compacto e amarelo claro.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

Amostra 1

Pele: epiderme com moderada a acentuada acantose, moderada espongiocose, com pontes intercelulares marcadas, leve exocitose neutrofílica, detritos celulares e leve hiperqueratose paraqueratótica. A derme apresenta acentuada fibroplasia e neovascularização substituindo o tecido conjuntivo colagenoso normal. Ainda há acentuado infiltrado inflamatório misto predominantemente composto por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (tecido de granulação). Acima da epiderme há uma área localmente extensiva de acentuada inflamação mista, detritos celulares e feixes de fibrina (crosta).

Amostra 2

Pele: epiderme com moderada a acentuada acantose, moderada espongiocose, com pontes intercelulares marcadas, leve exocitose neutrofílica, detritos celulares e leve hiperqueratose ortoqueratótica. Há uma área de descontinuidade da epiderme substituída por crosta composta por tecido conjuntivo, detritos celulares e infiltrado inflamatório misto (úlceras). Derme com acentuada fibroplasia e neovascularização substituindo o tecido conjuntivo colagenoso normal; além disso, ainda há acentuado infiltrado inflamatório misto, composto predominantemente por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (tecido de granulação).

Marilene de Farias Brito

Prof. Patologia Veterinária

Yasmin Daoualibi

CRMV/RJ 14010

Residente em Patologia Veterinária

Laudos 4: Laudo histopatológico de duas amostras de tecido das feridas, sendo uma de égua do grupo CTL e outra de égua do grupo MBN, ambas no dia 7.

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE VETERINÁRIA DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA SETOR DE ANATOMIA PATOLÓGICA (SAP)</p> <p style="text-align: center;">(21) 2682-2805 http://institucional.ufrj.br/sap/</p>
---	---

Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019 **Resultado de Histopatologia 35580**

Espécie: equina Nome: potra tordilha Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: não informado	Veterinário: Marcus Vinícius Proprietário: UFRRJ
---	---

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico clínico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foi coletado um fragmento, sem membrana, do membro torácico esquerdo, do 14º dia, e enviada ao SAP para exame histopatológico.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Biópsia de pele de 0,9x0,6cm, por *Punch* de 0,8cm, bege e com superfície parcialmente pilosa. Ao corte era firme elástico e esbranquiçado.

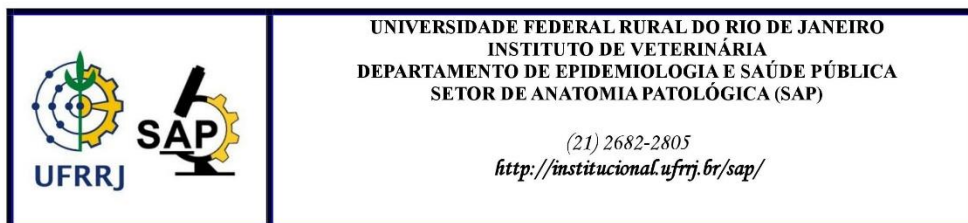
DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

Pele: epiderme com acentuada acantose com leve espongirose e necrose celular. Há raras células na camada espinhosa com queratinização incipiente e leve hiperqueratose paraqueratótica. Na derme há moderada fibroplasia, leve neovascularização e leve infiltrado inflamatório misto, distribuído aleatoriamente. Acima da epiderme há uma área localmente extensiva de crosta, composta por fibrina, detritos celulares e leve quantidade de células inflamatórias mistas, além de pelos soltos.

Marilene de Farias Brito
Prof. Patologia Veterinária

Yasmin Daoualibi
 CRMV/RJ 14010
Residente em Patologia Veterinária

Laudo 5: Laudo histopatológico de amostra de tecido da ferida de égua do grupo CTL no dia 14.



Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019

Resultado de Histopatologia 35581

Espécie: equina Nome: potra tordilha Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: não informado	Veterinário: Maurilio Rosa Clínica: Proprietário: Telefone:
---	--

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico clínico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foi coletado um fragmento de pele, com membrana, do membro torácico direito, do 14º dia, e enviadas ao SAP para exame histopatológico.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Pele de biópsia por punch de 0,8cm, com superfície parcialmente pilosa, 0,9x0,6cm bege. Ao corte é firme elástico e esbranquiçado.

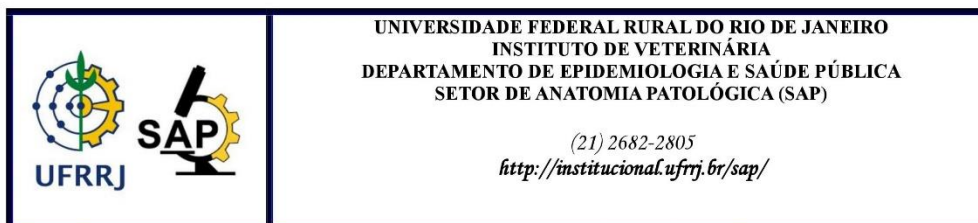
DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

Pele com úlcera, caracterizada por descontinuidade da epiderme, com substituição por fibrina, tecido conjuntivo colagenoso denso, detritos celulares e células inflamatórias mistas, predominantemente compostas por neutrófilos, com formação de crosta na superfície da epiderme. A derme superficial apresenta-se com acentuada fibroplasia e neovascularização, além de moderado infiltrado composto por eosinófilos, linfócitos, e em menor quantidade macrófagos e plasmócitos. Na derme profunda há leves fibroplasia e neovascularização.

Marilene de Farias Brito
Prof. Patologia Veterinária

Yasmin Daoualibi
 CRMV/RJ 14010
Residente em Patologia Veterinária

Laudo 6: Laudo histopatológico de amostra de tecido da ferida de égua do grupo MBN no dia 14.



Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019 **Resultado de Histopatologia 35580**

Espécie: equina Nome: potra tordilha Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: não informado	Veterinário: Marcus Vinícius Proprietário: UFRRJ
---	---

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico clínico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foi coletado um fragmento, sem membrana, do membro torácico esquerdo, do 14º dia, e enviada ao SAP para exame histopatológico.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Biópsia de pele de 0,9x0,6cm, por *Punch* de 0,8cm, bege e com superfície parcialmente pilosa. Ao corte era firme elástico e esbranquiçado.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

Pele: epiderme com acentuada acantose com leve espongirose e necrose celular. Há raras células na camada espinhosa com queratinização incipiente e leve hiperqueratose paraqueratótica. Na derme há moderada fibroplasia, leve neovascularização e leve infiltrado inflamatório misto, distribuído aleatoriamente. Acima da epiderme há uma área localmente extensiva de crosta, composta por fibrina, detritos celulares e leve quantidade de células inflamatórias mistas, além de pelos soltos.

Marilene de Farias Brito

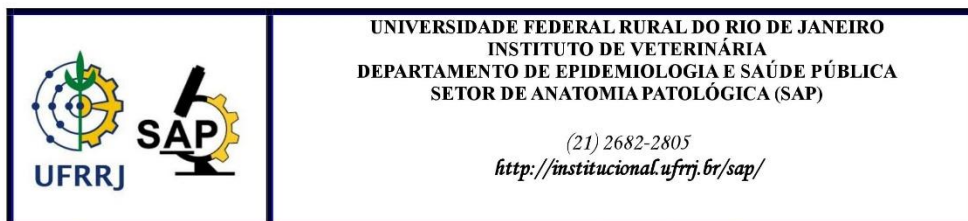
Prof. Patologia Veterinária

Yasmin Daoualibi

CRMV/RJ 14010

Residente em Patologia Veterinária

Laudo 7: Laudo histopatológico de duas amostras de tecido das feridas, sendo uma de égua do grupo CTL e outra de égua do grupo MBN, ambas no dia 21.



Seropédica/RJ, 25 de fevereiro de 2019

Resultado de Histopatologia 35581

Espécie: equina Nome: potra tordilha Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: não informado	Veterinário: Maurilio Rosa Clínica: Proprietário: Telefone:
---	--

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico clínico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foi coletado um fragmento de pele, com membrana, do membro torácico direito, do 14º dia, e enviadas ao SAP para exame histopatológico.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Pele de biópsia por punch de 0,8cm, com superfície parcialmente pilosa, 0,9x0,6cm bege. Ao corte é firme elástico e esbranquiçado.

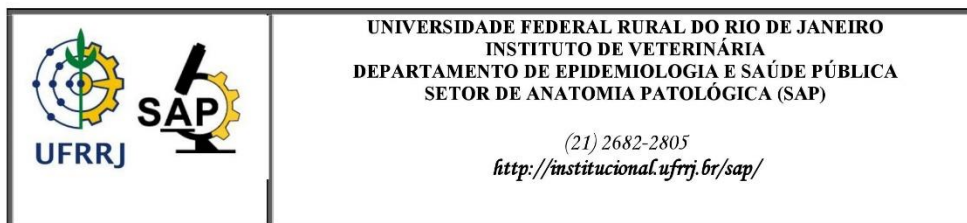
DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

Pele com úlcera, caracterizada por descontinuidade da epiderme, com substituição por fibrina, tecido conjuntivo colagenoso denso, detritos celulares e células inflamatórias mistas, predominantemente compostas por neutrófilos, com formação de crosta na superfície da epiderme. A derme superficial apresenta-se com acentuada fibroplasia e neovascularização, além de moderado infiltrado composto por eosinófilos, linfócitos, e em menor quantidade macrófagos e plasmócitos. Na derme profunda há leves fibroplasia e neovascularização.

Marilene de Farias Brito
Prof. Patologia Veterinária

Yasmin Daoualibi
 CRMV/RJ 14010
Residente em Patologia Veterinária

Laudo 8: Laudo histopatológico de duas amostras de tecido das feridas, sendo uma de égua do grupo CTL e outra de égua do grupo MBN, ambas no dia 28.



Seropédica/RJ, 27 de fevereiro de 2019 Resultado de Histopatologia 35600

Espécie: equina Nome: Esphirra Raça: SRD Sexo: fêmea Idade: não informado	Médico Veterinário: Maurilio Rosa Fonc: 997780188 Clínica: HDM vet
---	--

HISTÓRICO CLÍNICO:

O histórico foi fornecido pelo Médico Veterinário. Foram coletadas duas amostras de pele ferida do dia 21, do experimento, sendo um sem tratamento prévio com membrana amniótica do membro torácico direito (Amostra 1) e outra do membro torácico esquerdo com tratamento com membrana amniótica (Amostra 2). As amostras foram coletadas e enviadas ao SAP para exame histopatológico.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Amostras 1 e 2: foram recebidas duas amostras de biópsia por *punch* de pele sem pelos, com 0,5x0,8cm cada e branca nas superfícies externa e de corte. Ao corte eram firmes-elásticas e compactas.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

1) Pele: epiderme acentuadamente acantótica e com leve espongirose. Há uma área localmente extensiva de descontinuidade da epiderme com substituição uma grande camada de acentuada quantidade de fibrina com discreto infiltrado de linfócitos, neutrófilos e plasmócitos. A derme superficial e profunda apresenta acentuada fibroplasia, na qual o tecido conjuntivo encontra-se denso e modelado, com feixes organizados na horizontal e na vertical, formando uma malha na área mais superficial e mais organizado em apenas uma direção na área mais profunda, e acentuada neovascularização. Na derme superficial há ainda moderado inflamatório predominantemente neutrofílico e detritos celulares. Não foram observados anexos.

2) Pele: epiderme acentuadamente acantótica e com leve espongirose. Há uma área localmente extensiva de descontinuidade da epiderme com substituição por camadas de tecido conjuntivo colagenoso, infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico e detritos celulares. A derme superficial e profunda apresenta acentuada fibroplasia, na qual o tecido conjuntivo encontra-se denso e modelado, com feixes organizados na horizontal e na vertical, formando uma malha na área mais superficial e mais organizado em apenas uma direção na área mais profunda, e acentuada neovascularização. Não foram observados anexos.

	Integridade do epitélio	Hemorragia	Fibroplasia	Hiperplasia Epitelial	Hiperkeratose	Neovascularização	Tipos celulares (inflamação)
A	1	0	3	3	0	3	2
B	1	0	3	3	0	3	1

Legenda:

- 0 – ausência
- 1 – até 30%
- 2 – até 60%
- 3 – até 90%

Marilene de Farias Brito

Prof Anatomia Patológica

Yasmin Daoualibi

CRMV-RJ 14010

Residente em Patologia Animal

Laudo 9: Laudo histopatológico de duas amostras de tecido das feridas, sendo uma de égua do grupo CTL e outra de égua do grupo MBN, ambas no dia 63.

ANEXO IV - QUADROS COM OS ESCORES ANOTADOS EM CADA PARÂMETRO AVALIADO MICROSCOPICAMENTE

Durante o estudo, foram feitas avaliações sobre os seguintes aspectos: integridade do epitélio, hemorragia, fibroplasia, hiperplasia, hiperqueratose, neovascularização, tipos celulares. Lembrando que foi utilizada uma escala de 0 a 3, sendo: “0” indicativo de ausência dos parâmetros avaliados; “1” ocorrência em até 30% da lesão; “2” ocorrência em 30% a 60%; “3” ocorrência em 60% a 100% da lesão. Os resultados dessas observações seguem nos Quadros 1 a 7.

Quadro 1: Classificação da integridade do epitélio.

Dias	Grupo CTL				Grupo MBN			
	0	1	2	3	0	1	2	3
3		X				X		
7			X			X		
14		X				X		
21		X				X		
28				X			X	
63				X		X		

Quadro 2: Classificação da hemorragia.

Dias	Grupo CTL				Grupo MBN			
	0	1	2	3	0	1	2	3
3				X			X	
7	X				X			
14	X				X			
21	X				X			
28	X					X		
63	X				X			

Quadro 3 Classificação da fibroplasia.

Dias	Grupo CTL				Grupo MBN			
	0	1	2	3	0	1	2	3
3		X					X	
7				X				X
14			X					X
21				X				X
28			X					X
63			X				X	

Quadro 4: Classificação da hiperplasia epitelial.

Dias	Grupo CTL				Grupo MBN			
	0	1	2	3	0	1	2	3
3	X					X		
7		X				X		
14		X					X	
21				X				X
28				X				X
63			X					X

Quadro 5: Classificação da hiperqueratose.

Dias	Grupo CTL				Grupo MBN			
	0	1	2	3	0	1	2	3
3	X				X			
7		X				X		
14		X			X			
21	X						X	
28	X							X
63		X					X	

Quadro 6: Classificação da neovascularização.

Dias	Grupo CTL				Grupo MBN			
	0	1	2	3	0	1	2	3
3		X			X			
7				X				X
14		X						X
21				X				X
28			X					X
63			X					X

Quadro 7: Classificação dos tipos celulares.

Dias	Grupo CTL				Grupo MBN			
	0	1	2	3	0	1	2	3
3		X						X
7				X				X
14		X					X	
21		X				X		
28		X				X		
63		X			X			