

Estado da publicação: Não informado pelo autor submissor

USO DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA EM ANASTOMOSES INTESTINAIS: ESTUDO EM RATOS TRATADOS COM 5-FLUOROURACIL

Daniel Dantas Ferrarin, Nicolau Gregori Czezko , Luiz Fernando Kubrusly , Osvaldo Malafaia,
Eros Luiz de Sousa, João Carlos Domingues Repka, Pedro Henrique Lambach Caron, Carlos José
Franco de Souza

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4505>

Submetido em: 2022-07-27

Postado em: 2022-07-27 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

USO DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA DESCELULARIZADA EM ANASTOMOSES INTESTINAIS: ESTUDO EM RATOS TRATADOS COM 5-FLUOROURACIL

USE OF DECELLULARIZED HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE IN INTESTINAL ANASTOMOSES: A STUDY IN RATS TREATED WITH 5-FLUOROURACIL

Daniel Dantas **FERRARIN**^{1,2}, Nicolau Gregori **CZECZKO**¹, Luiz Fernando **KUBRUSLY**¹, Osvaldo **MALAFAIA**¹, Eros Luiz de **SOUSA**², João Carlos Domingues **REPKA**², Pedro Henrique Lambach **CARON**², Carlos José Franco de **SOUZA**²

Trabalho realizado na ¹Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; ²Hospital e Maternidade Angelina Caron, Campina Grande do Sul, PR, Brasil,

ORCID

Daniel Dantas Ferrarin - <https://orcid.org/0000-0002-1231-0044>

Nicolau Gregori Czecko - <https://orcid.org/0000-0002-5926-150X>

Luiz Fernando Kubrusly - <https://orcid.org/0000-0002-6546-9841>

Osvaldo Malafaia - <https://orcid.org/0000-0002-1829-7071>

Eros Luiz de Sousa - <https://orcid.org/0000-0003-2221-335X>

João Carlos Domingues Repka - <https://orcid.org/0000-0003-0794-4605>

Pedro Henrique Lambach Caron - <https://orcid.org/0000-0001-9769-2602>

Carlos José Franco de Souza - <https://orcid.org/0000-0003-3029-6300>

Correspondência:

Daniel Dantas Ferrarin

Email: danovix@uol.com.br

Conflito de interesse: Nenhum

Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

Este artigo como preprint possui endosso do Prof. Dr. Osvaldo Malafaia - <https://orcid.org/0000-0002-1829-7071>

Contribuição dos autores

Conceituação: Daniel Dantas Ferrarin, João Carlos Domingues Repka, Osvaldo Malafaia, Nicolau Gregori Czecko

Análise formal: Daniel Dantas Ferrarin, Eros Luiz de Sousa

Investigação: Daniel Dantas Ferrarin, Nicolau Gregori Czecko

Metodologia: Daniel Dantas Ferrarin, Pedro Henrique Lambach Caron, Eros Luiz de Sousa

Administração do projeto: Daniel Dantas Ferrarin, Nicolau Gregori Czecko

Supervisão: Osvaldo Malafaia, Luiz Fernando Kubrusly

Redação (esboço original): Daniel Dantas Ferrarin, João Carlos Domingues Repka

Redação (revisão e edição): Daniel Dantas Ferrarin, João Carlos Domingues Repka

RESUMO - Introdução: Atualmente emerge em nosso meio aplicações mais relevantes dos derivados perinatais, por exemplo, a membrana amniótica (MA), como fonte de biomateriais para emprego em diferentes processos cicatriciais. O comprometimento anastomótico por drogas antimetabólicas como o 5-fluorouracil (5-FU) é um potencial alvo da MA. **Objetivo:** Avaliar os efeitos cicatriciais do uso da MA em ratos tratados com 5-FU na dose de 20 mg/kg ao 7º. dia de evolução pós-operatória quanto aos parâmetros porcentagem de colágeno tipo I (maduro), viabilidade celular, densidade microvascular e formação do tecido de granulação. **Método:** Utilizaram-se 32 ratos da linhagem Wistar submetidos à colotomia e colorrafia separados em 4 grupos com 8 e receberam diferentes tratamentos diariamente por via intraperitoneal até o dia do sacrifício: Solução fisiológica (C), 20 mg/kg 5-FU, 20 mg/kg 5-FU e MA, MA. **Resultados:** O tratamento com 20 mg/kg de 5-FU, ao 7º. dia pós-operatório induziu efeitos adversos no processo cicatricial anastomótico evidenciados pela diminuição da porcentagem de colágeno tipo I (maduro), da viabilidade celular, da densidade microvascular, da formação de crosta fibrinoleucocitária e da proliferação angiofibroblástica; o uso da MA nestas condições induziu melhora da porcentagem de colágeno tipo I (maduro). **Conclusão:** O tratamento com 20 mg/kg de 5-FU, ao 7º. dia pós-operatório induziu efeitos adversos no processo cicatricial anastomótico e o uso da MA nestas condições induziu melhora da porcentagem de colágeno tipo I (maduro).

PALAVRAS-CHAVE - Membrana amniótica. Anastomose. Quimioterapia antitumoral.

ABSTRACT - Introduction: currently, the most relevant applications of perinatal derivatives are in wound healing, for example, the use of amniotic membrane (AM) as a biomaterials source for use in different healing processes. The anastomotic healing compromised by antimetabolic drugs, such as 5-fluorouracil (5-FU), is a potential target of AM. **Objective:** To evaluate the healing effects of the AM use in rats treated with 5-FU at a dose of 20 mg/kg on the 7th postoperative day, regarding the parameters percentage of type I collagen (mature), cell viability, microvascular density and granulation tissue formation. **Method:** Thirty-two Wistar rats were submitted to colotomy and colorrhaphy, separated in 4 groups with 8t rats each and received, by 7 days, different treatments intraperitoneally, once daily from the operation day until sacrifice: 1- saline solution (C), 2- 20 mg/kg 5-FU, 3- 20 mg/kg 5-FU and 4- MA, and MA. **Results:** Tthe treatment with 5-FU (20 mg/kg – 7 days) induced adverse effects in the anastomotic healing process evidenced by the decrease of type I collagen (mature), cell viability, percentage microvascular density, granulation tissue formation (leukocyte-fibrin crust and angio-fibroblastic proliferation). The use of AM, under these conditions, induced an improvement in type I collagen (mature) percentage. **Conclusion:** The treatment with 5-FU induced adverse effects on the healing anastomotic process, and the use of AM, under these conditions, induced improvement in type I (mature) collagen percentage.

KEY WORDS - Amniotic membrane. Anastomosis. Antitumoral chemotherapy.

INTRODUÇÃO

As operações gastrintestinais figuram entre os procedimentos cirúrgicos realizados com maior frequência. Passaram por excepcional desenvolvimento nos últimos 2 séculos e de atitudes heroicas e experimentais tornaram-se procedimentos tecnicamente refinados e de grande precisão. No transcurso deste processo evolutivo

destacaram-se as publicações sobre materiais de síntese, principalmente no que se refere às anastomoses intestinais¹.

Motivados pelas frequentes situações em que a intervenção cirúrgica intestinal, mesmo sob condições extremas e desafiantes, era a única decisão a ser tomada, muitos pesquisadores ampliaram os conhecimentos sobre agentes antimicrobianos e medidas de suporte vital amplamente utilizados, apesar de não serem ainda suficientes para diminuir a morbidade e mortalidade, que se mantêm crescentes a cada dia².

Entre as condições cirúrgicas adversas destaca-se o câncer do intestino que é considerada em geral como doença tratável e frequentemente curável quando sua detecção é precoce, sendo cirúrgico seu tratamento primário, seguido de tratamento adjuvante com quimioterapia a base de 5-Fluorouracil (5-FU). São descritos como causas isoladas ou associadas do insucesso do ato cirúrgico o fornecimento inadequado de oxigênio ao tecido manejado, a tensão mecânica elevada, as deficiências nutricionais, os distúrbios metabólicos, os processos inflamatórios e infecciosos, os agentes farmacológicos, entre outros^{3,4}.

Entre os medicamentos que podem afetar negativamente a evolução pós-operatória e o processo cicatricial são destacados os quimioterápicos antitumorais por suas ações citostáticas e antimetabólicas. Entre as complicações cirúrgicas gastrointestinais, as mais frequentemente são a ulceração péptica, a isquemia intestinal e a falha na cicatrização anastomótica representada por 3,4-12% de deiscências⁵.

A cicatrização de feridas é um processo intrincado e complexo, com a interação de inúmeros mecanismos fisiológicos ocorrendo de forma coordenada e sincronizada envolvendo inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelação da ferida. Em casos de falhas nestes mecanismos, sejam individualmente ou em combinação, o processo cicatricial será prejudicado. Diante das integrações que ocorrem, é improvável que a tentativa de corrigir um único mecanismo, progrida substancialmente na correção da cicatrização de feridas comprometidas. Como tal, possível produto terapêutico, candidato ideal, deveria atingir múltiplos processos e assim corrigir as deficiências no processo cicatricial⁶.

Neste contexto, os derivados de tecidos perinatais (DPs) humanos como a membrana âmnion/córion, têm sido pesquisados e apontados como produto multifacetado, com amplas possibilidades para resolver falhas na regeneração de tecidos e fechamento de feridas. Estes produtos de tecidos âmnion/córion humanos são derivados da placenta e contêm numerosos fatores de crescimento e citocinas que provaram promover a cicatrização de feridas. Apesar dos avanços na compreensão do papel desse tecido na cicatrização de feridas, a preservação da sua atividade biológica tem sido um grande obstáculo para amplo uso clínico⁷.

Os DPs são fontes abundantes de proteínas da matriz extracelular humana, fatores de crescimento e células-tronco, e seu uso é comprovado em ampla gama de aplicações terapêuticas. Esses tecidos possuem propriedades biológicas únicas, incluindo serem angiogênicos, anti-inflamatórios, antifibróticos, antimicrobianos e imunoindutores. Descartados como resíduos médicos, proporciona assim fácil acesso, custo-benefício "ilimitado" e ético. Embora alguns desses tecidos, como a membrana amniótica e o cordão umbilical têm sido utilizados na prática clínica, a maioria deles continua sendo altamente subexplorado. Atualmente emerge em nosso meio aplicações mais relevantes dos DPs como fonte de biomateriais e células na emergente área de engenharia de tecidos e medicina regenerativa, além de destacar como essas soluções podem ser usadas para superar a escassez de apoios

estruturais adequados e fontes de células que atualmente dificulta a transferência das estratégias definidas no ambiente experimental animal para os cenários clínicos⁸.

O conhecimento dos efeitos benéficos dos DPs na cicatrização de feridas teve início por volta de 1.900. Quanto à membrana amniótica (MA) fetal humana serviu ela como curativo para tratar queimaduras e ulcerações da pele. No século atual, com o conhecimento sobre os secretomas, que são proteínas secretadas para fora das células e desempenham funções importantes nas interações entre células vizinhas dentro de um mesmo organismo ou entre células de organismos de espécies diferentes que estejam em contato próximo, tem suscitado crescente interesse científico acerca das ações dos DPs pela possibilidade de serem obtidos de forma não invasiva, apresentarem propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas e antifibróticas características e serem imunologicamente toleradas *in vivo*. Muitos estudos que os aplicaram em modelos pré-clínicos de cicatrização de feridas cutâneas mostraram grandes variações na escolha das espécies animais, desde grandes animais até roedores, a escolha de animais diabéticos ou não e o tipo de lesão (feridas de espessura total, queimaduras, feridas induzidas por radiação ou retalhos de pele). A fonte e tipo de DPs (placenta, cordão umbilical, membranas fetais, células, secretomas, extratos de tecidos), o modo de administração (aplicação tópica, intradérmica, subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal) e a forma de aplicação (hidrogéis, sintéticos ou naturais, biomateriais como transportadores de células transplantadas, extratos ou secretomas) têm sido motivo de grandes investimentos por parte de centros investigadores⁹.

Desta forma, estudos sobre aplicabilidade clínica da membrana amniótica tem importância crescente por sua baixa antigenicidade, ação microbicida, capacidade de diminuir o exsudato e aderências, aceleração da epitelização, redução da dor local, ação como substrato para o crescimento de tecidos, entre várias outras ações, justificam o investimento em projetos que possam compor o elenco transdisciplinar de informações acerca desta opção terapêutica.

Os objetivos deste estudo no 7º. dia pós-operatório em anastomoses colônicas de ratos foram avaliar os efeitos cicatriciais da MA com 5-FU, quanto à formação do tecido de granulação, porcentagem de colágeno tipo I (maduro), viabilidade celular e densidade microvascular.

MÉTODO

Delineamento experimental

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEPA) do Hospital e Maternidade Angelina Caron conforme protocolo nº 016/16 CEPA/HAC⁴⁷. Foram obedecidas as normas contidas na Lei Federal n.º 11.794 e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-2000).

Utilizaram-se 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem Wistar, com idades entre 112-125 dias e pesos de 451,56±56,20 g e divididos em 4 grupos de 8 animais para os procedimentos (Tabela 1).

TABELA 1 - Demonstrativo da organização dos grupos do estudo e procedimentos realizados

Grupos	n	Procedimentos	
		D0	D7
Controle (C)	8	Tratamento com SF, colotomia e colorrafia	Término do protocolo e coleta de amostras
5-Fluorouracil (5-FU)	8	Tratamento com 5-FU (20mg/kg IP), colotomia e colorrafia	
5-Fluorouracil+Membrana amniótica (5FU/MA)	8	Tratamento com 5-FU (20mg/kg IP), e colocação da MA, colotomia e colorrafia	
Membrana amniótica (MA)	8	Colocação de MA, colotomia e colorrafia	

Os ratos foram submetidos à triagem através da observação da pelagem para investigação de ectoparasitas, presença de sinais de diarreia e lesões cutâneas. Foram mantidos em ambiente específico para animais de laboratório com exaustão forçada de ar (pressão negativa), temperatura controlada entre 19-23 °C e ciclos de iluminação automaticamente regulados a cada 12 h. Após a inspeção foram separados em grupos de 4 por caixa de polipropileno e recebiam ração específica para a espécie, água *ad libitum* e foram pesados em 2 momentos, no dia do início do experimento (D0) e ao término do protocolo (D7).

Experimento

Os procedimentos foram executados em um único ciclo de atividades, em ambiente específico para cirurgias experimentais, seguindo os protocolos para anestesia nos procedimentos abdominais.

Preparação da membrana amniótica^{48,49,50}

Ela foi preparada da seguinte forma (Figura 1): 1) seleção das pacientes parturientes do serviço de obstetrícia do hospital que aceitaram participar do estudo pela cessão das placentas, com indicação de partos por cesariana, e triagem para doenças infecciosas (HIV, hepatites B e C, sífilis e HTLV I e II); 2) após a dequitação, a placenta era transferida para recipiente inoxidável esterilizado e procedia-se a separação manual da MA em condições de assepsia; 3) desinfecção da MA com recobrimento de Dakin por 2 h; 4) enxágue de 3 vezes com solução de lavagem; 5) descclularização, imergindo a MA em solução hipotônica para descclularização e mantida por 16 h em temperatura entre 2-8 °C; 6) enxágue de 3 vezes da MA em solução de lavagem; 7) imersão da MA em solução para descclularização SDS/EDTA por 24 h na temperatura ambiente; 8) enxágue de 3 vezes a MA em solução de lavagem; 9) imersão da MA em solução para descclularização solução DNase / RNase por 3 h a 37 °C; 10) enxágue de 1 vez a MA em solução de lavagem; 11) esterilização, imersão da MA em solução de antibióticos por 2 h na temperatura ambiente; 12) enxágue de 1 vez em solução de lavagem; 13) montagem dos patches de MA; 14) em gabinete de fluxo laminar, sobre campos esterilizados, fixar a MA em papel nitrocelulose (Nitro Bind – Nitrocellulose 0,45 – Cat. EOYHY B0001) previamente esterilizado por óxido de etileno; 15) com tesouras esterilizadas recortar em fragmentos de 3,0 x1,5 cm; 16) acondicionar 4 patches em placas de Petri esterilizadas e manter na temperatura entre 2-8 °C por período não superior a 12 h³⁵.

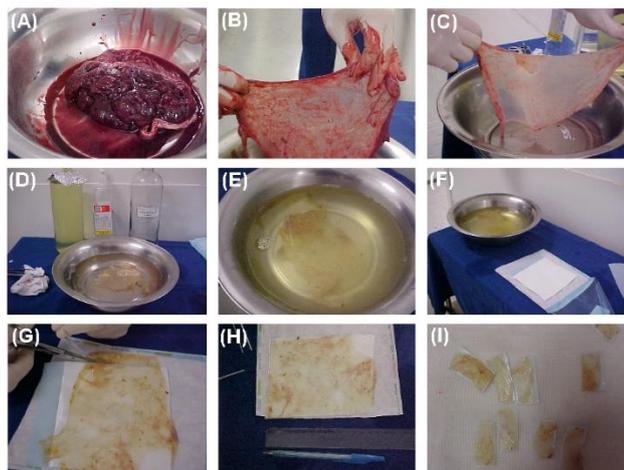


FIGURA 1 - Detalhes da preparação das membranas amnióticas: A) aspecto da placenta recém-dequitada; B) separação manual da membrana amniótica; C) desinfecção e enxágue; D e E) descelularização; F) esterilização; G, H e I) montagem dos patches

Procedimentos cirúrgicos

Foram executados em ambiente exclusivo para cirurgias experimentais e todos os ratos foram submetidos a jejum de 12 h com água *ad libitum*.

Anestesia

Para a indução anestésica os animais foram submetidos à sedação por inalação de isoflurano em circuito fechado e pesados em balança analítica para calcular as doses de cetamina, 80 mg/kg, e 10 mg/kg de xilasina por via IM. Após, procediam-se a tricotomia ampla do abdome, degermação da área tricotomizada e colocação de campos cirúrgicos fenestrados esterilizados.

Colotomia e colorrafia

Por meio de laparotomia mediana de 3 cm, procedia-se a colotomia por secção completa do cólon, a aproximadamente 5 cm distais da válvula ileocecal, atentando sempre para a preservação dos vasos cólicos e executava-se a reconstrução por anastomose terminoterminal em plano único total, com 8 pontos separados de fio monofilamentar de náilon 6.0. O fechamento da parede era feito por sutura contínua de náilon 3.0 em dois planos.

Nos ratos dos grupos 5FU/MA e MA era colocado um patch de MA no entorno da enteroanastomose e a seguir eram ajustadas e fixadas as extremidades com fio 6.0 na circunferência total da anastomose. O fechamento da parede era feito por sutura contínua de nylon 3.0 nos planos musculoaponeurótico e cutâneo. Administrava-se dipirona por via oral, na dose de 20 mg/kg e 10 ml de solução fisiológica por via subcutânea na região dorsal e os ratos eram mantidos sob aquecimento até a recuperação anestésica. A seguir, eram recolocados em caixas identificadas e durante as 24 h seguintes eram mantidos em jejum de ração e recebendo somente água suplementada com açúcar (comercial) a 100 mg/ml. Após este período passaram a receber ração e água *ad libitum*.

Tratamentos

Os ratos dos grupos 5FU e 5FU/MA (Tabela 1) foram tratados com 20 mg/kg de 5-fluorouracil por via IP, 1 vez ao dia, durante os 7 dias de pós-operatório. Os dos grupos C e MA foram tratados com solução fisiológica esterilizada em dose equivalente ao peso (20 mg/kg)

Interrupção do experimento e coleta de amostras

No 7º. dia, eram pesados e a seguir submetidos aos procedimentos para interrupção de experimentos e eutanásia que incluía sedação por inalação de isoflurano em circuito fechado, anestesiados por injeção intramuscular de cetamina na dose de 100 mg/kg e procedida punção cardíaca exanguinativa e indutora de parada cardiorrespiratória. Após a confirmação do óbito, realizava-se laparotomia mediana ampla e ressecção do segmento colônico com a cicatriz, os quais eram colocados em frascos identificados para fixação em solução de paraformaldeído 4%, em PBS pH 7,4, por 24 h e encaminhados para as avaliações histopatológicas.

Avaliações

Foram realizadas avaliações para formação de tecido de granulação, histométrica das porcentagens de colágenos tipo I (maduro) e III (imaturo), viabilidade celular pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e para densidade microvascular pelo CD34.

*Ponderal e histopatológica da formação de tecido de granulação*¹⁹

As pesagens dos ratos foram feitas no D0 (início do experimento) e no D7. As histológicas foram procedidas por 2 patologistas independentes em cortes corados por H&E e de Harris para considerar: 1) a intensidade da reação inflamatória e formação de crosta fibrinoleucocitária por depósitos de fibrina e células sanguíneas na superfície da ferida; 2) a proliferação angiofibroblástica, através da avaliação morfológica de neovascularização (angiogênese); e 3) proliferação de fibroblastos e da reepitelização das bordas, dedicando-se especial atenção ao avanço do epitélio em torno da ferida. Aos achados foram atribuídos grau 0 para a ausência de reação; grau 1, para reação em grau discreto; e grau 2, para moderado. As leituras foram tabuladas e os valores individuais das 2 leituras (L1 e L2) para cada critério e a média de cada amostra foram submetidas à avaliação estatística.

*Histometria da porcentagem de colágeno dos tipos I e III*¹⁸

Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de Picrosirius-Red-F3BA em aumento de 400 vezes, com luz polarizada. As imagens eram captadas por câmera fotográfica e transmitidas a um monitor colorido e digitalizadas. Realizou-se a análise histométrica das imagens mediante o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para Windows para a identificação do tipo de colágeno, baseado em cores. As cores vermelho, amarelo e laranja correspondiam a colágeno tipo I (maduro), enquanto os tons de verde tipo III (imaturo). O resultado foi expresso em área percentual de colágeno tipo I e tipo III em cada campo do corte histológico. Para a obtenção dos resultados foram calculadas as médias das 3 leituras dos 3 campos de cada lâmina, as quais foram tabuladas.

Viabilidade celular pelo PCNA ^{51,52}

Foi empregada técnica imunoistoquímica pela marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), marcador de atividade proliferativa. O anticorpo monoclonal reage com um gene nuclear de célula em proliferação também conhecido como PCNA ou DNA-polimerase. O PCNA é um anel trimérico de 36 kDa que atua como um grampo deslizante de DNA-polimerase expresso no núcleo de todas as células em proliferação. Função primordial do PCNA é estimular o aumento da capacidade de processamento da polimerase do DNA durante o alongamento da fita principal. O PCNA é marcador da síntese de DNA e altamente conservado na maioria das espécies, destacando a reatividade muito ampla desse anticorpo. Os resultados foram expressos em porcentagem de imunomarcação do antígeno PCNA.

Densidade microvascular pelo CD34^{53,54}.

Do material embocado em parafina foram obtidos cortes de 4 μ m de espessura estendidos em lâminas de vidro e submetidos aos anticorpos anti-CD34. A marcação dos cortes histológicos com anticorpo anti-CD34, permite a quantificação da densidade microvascular cicatricial. Ele é proteína transmembrana encontrada na superfície de células endoteliais, que atua na ligação com receptores específicos de adesão celular. É expresso difusamente nos microvasos cicatriciais e seus níveis de expressão podem se correlacionar à qualidade do processo cicatricial.

As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo com padrão de reação nuclear, sendo que qualquer célula endotelial ou grupo de células endoteliais de coloração marrom, independentemente do tamanho, claramente separadas de outros elementos imunocorados, eram considerados um microvaso. A análise foi realizada por histometria computadorizada. Os resultados foram expressos em densidade tecidual de microvasos em área de 7.578,94 μ m², como média de 3 leituras em diferentes campos microscópicos.

Avaliação estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Empregou-se o teste T-Student com $p \leq 0,05$ para as comparações entre os grupos através do software *GraphPad InStat*[®].

RESULTADO

Avaliação ponderal

No início do experimento (D0) não houve diferenças significantes entre as pesagens (Tabela 2). No D7 houve diferença significativa ($p=0,0387$) entre o grupo controle (452,6 \pm 43,5 g) e o grupo 5-FU (397,6 \pm 46,7 g). Da mesma forma entre os grupos 5-FU (397,6 \pm 46,7 g) e MA (473,9 \pm 46,9 g, $p=0,0086$) e entre 5FU/MA (395,1 \pm 58,7) e MA (473,9 \pm 46,9 g, $p=0,0149$, Tabela 2).

TABELA 2 - Comparações estatísticas entre as pesagens dos ratos em D0 e D7

D0		
Grupos comparados		p
C	x 5-FU	0,3441
	x 5-FU/MA	0,2370
	x MA	0,3740
5-FU	x 5-FU/MA	0,7299
	x MA	0,0895
5-FU/MA	x MA	0,0672
D7		
Grupos comparados		p
C	x 5-FU	0,0387*
	x 5-FU/MA	0,0562
	x MA	0,3928
5-FU	x 5-FU/MA	0,9320
	x MA	0,0086*
5-FU/MA	x MA	0,0149*

Avaliação histopatológica da formação de tecido de granulação

Foram analisadas a formação de crosta fibrinoleucocitária (CFL), proliferação angiofibroblástica (PAF) e reepitelização de bordas (RB) nas amostras de tecido colônico. No Figura 2 pode-se observar que quanto à formação de crosta fibrinoleucocitária (CFL), a média dos escores do grupo controle foi significativamente maior que nos grupos 5-FU (0,0073) e 5-FU/MA (0,04858, Tabela 3). Pode-se observar que quanto à proliferação angio-fibroblástica (PAF) a média dos escores do grupo controle foi significativamente maior que no grupo 5-FU (0,0233). O grupo MA apresentou média de escores significativamente maior (0,0095) que o 5-FU. Quanto aos critério reepitelização de bordas (RB), a média dos escores do grupo controle foi significativamente maior que os grupo 5-FU (0,01168) e 5FU/MA (0,0405). O grupo MA apresentou média de escores significativamente maior que grupo 5-FU ($p=0,0233$).

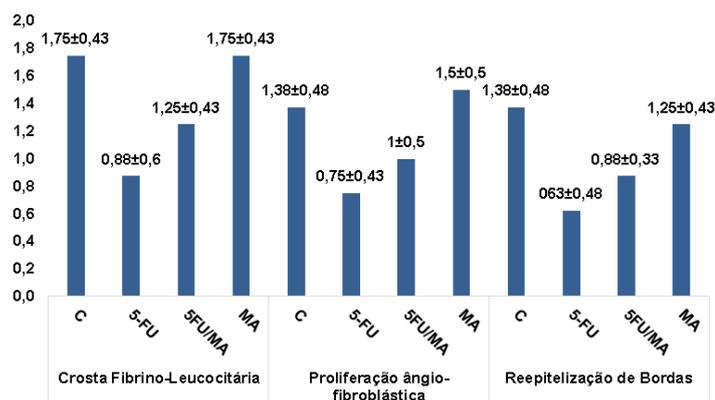


FIGURA 2 - demonstrativo dos resultados médios e desvios-padrão dos escores de avaliação da formação de tecido de granulação formação de crosta fibrinoleucocitária (CFL), proliferação angiofibroblástica (PAF) e reepitelização de bordas (RB)

TABELA 3 - Avaliações estatísticas entre resultados médios e desvios-padrão dos escores de avaliação da formação da crosta fibrinoleucocitária (CFL), proliferação angiofibroblástica (PAF), e reepitelização de bordas (RB) em amostras de tecido colônico dos ratos dos grupos controle, 5-fluoracil, 5-fluoracil/MA e MA

Grupos comparados CFL			p
Controle	x	5-Fluouracil	0,0073*
		5-Fluoracil/MA	0,0485*
		MA	1
5-Fluouracil	x	5-Fluoracil/MA	0,2010
		MA	0,0073*
5-Fluoracil/MA	x	MA	0,0485*
Grupos comparados PAF			p
Controle	x	5-Fluouracil	0,0233*
		5-Fluoracil/MA	0,1759
		MA	0,6419
5-Fluouracil	x	5-Fluoracil/MA	0,3342
		MA	0,0095*
5-Fluoracil/MA	x	MA	0,0824
Grupos comparados RB			p
Controle	x	5-Fluouracil	0,01168*
		5-Fluoracil/MA	0,04057*
		MA	0,61856
5-Fluouracil	x	5-Fluoracil/MA	0,27822
		MA	0,02330*
5-Fluoracil/MA	x	MA	0,09005

Avaliação histométrica das porcentagens de colágenos tipo I (maduro) e III (imaturo)

Na Figura 3 e Tabela 4 pode-se observar que houve diferença significativa na comparação entre o grupo controle e o grupo 5-FU ($p=0,0055$). A média de colágeno tipo I no grupo tratado pelo 5-FU foi significativamente menor que o grupo 5-FU/MA ($p=0,0154$) e o grupo MA ($p=0,0368$).

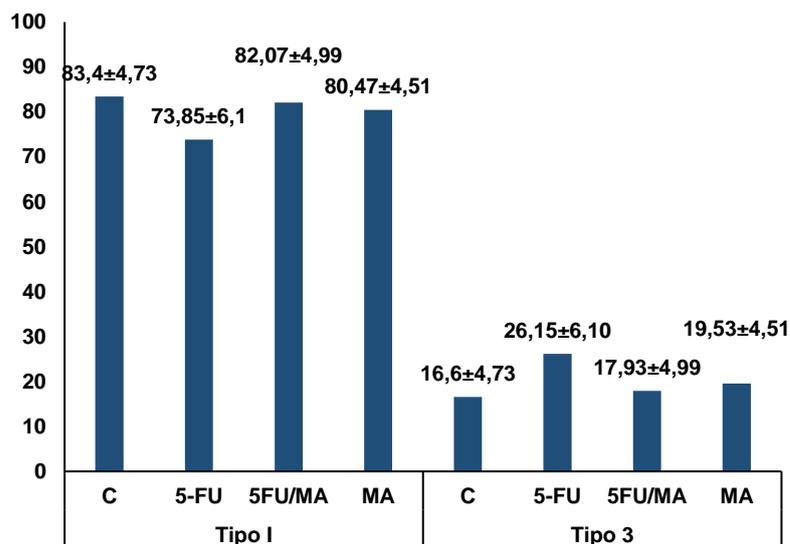


FIGURA 3 - Demonstrativo dos resultados médios e desvios-padrão das porcentagens de colágenos tipo I (maduro) e III (imaturo)

TABELA 4 - Avaliações estatísticas entre as porcentagens de colágeno maduro em amostras de tecido colônico dos ratos dos grupos controle, 5-fluoracil, 5-fluoracil/MA e MA

Grupos comparados		p
Controle	x 5-Fluouracil	0,0055*
	x 5-Fluoracil/MA	0,6155
	x MA	0,2551
5-Fluouracil	x 5-Fluoracil/MA	0,0154*
	x MA	0,0368*
5-Fluoracil/MA	x MA	0,5404

Avaliação da viabilidade celular pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

No Figura 4 e Tabela 5 pode-se observar que houve diferenças significantes na comparação entre o grupo controle e o grupo 5-FU ($p=0,0012$) e o grupo 5-FU/MA ($p=0,0028$). A média de PCNA positivo no grupo tratado pelo 5-FU foi significativamente menor que o grupo MA ($p=0,0008$), bem como no grupo 5 FU/MA foi também significativamente menor que o grupo MA ($0,0019$).

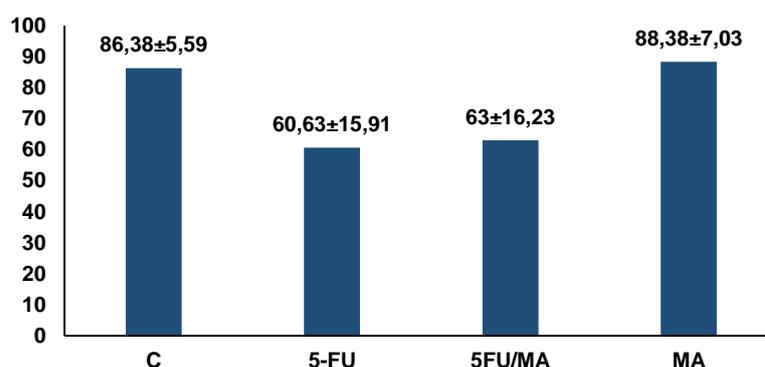


FIGURA 4 - Demonstrativo dos resultados médios e desvios-padrão das porcentagens de positividade para PCNA

TABELA 5 - Avaliações estatísticas entre as porcentagens de positividade da marcação do PCNA em amostras de tecido colônico dos ratos dos grupos controle, 5-fluoracil, 5-fluoracil/MA e MA

Grupos comparados		p
Controle	x 5-Fluouracil	0,0012*
	x 5-Fluoracil/MA	0,0028*
	x MA	0,5652
5-Fluouracil	x 5-Fluoracil/MA	0,7862
	x MA	0,0008*
5-Fluoracil/MA	x MA	0,0019*

Avaliação da densidade microvascular pelo CD34

Na Tabela 6 estão disponíveis as avaliações individuais e as médias das porcentagens de positividade para o marcador de atividade angiogênica CD34, e também na Figura 5 pode-se observar que houve diferenças significantes na comparação entre o grupo controle e o grupo 5-FU ($p=0,0001$) e o grupo 5-FU/MA ($p=0,0001$). A média de CD34 positivo no grupo tratado pelo 5-FU foi significativamente menor que o grupo MA ($p=0,0006$) bem como o grupo 5 FU/MA foi também significativamente menor que o grupo MA ($0,0005$).

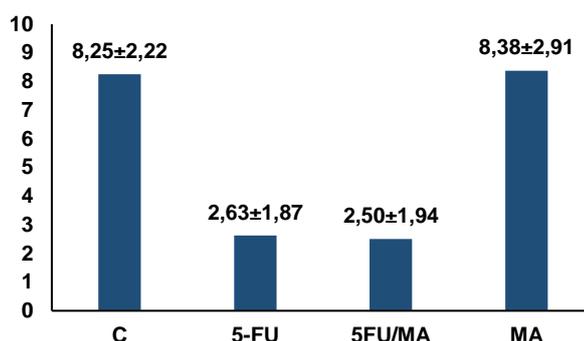


FIGURA 5 - Demonstrativo dos resultados médios e desvios-padrão das porcentagens de positivities para CD34

TABELA 6 - Avaliações estatísticas entre as porcentagens de positivities da marcação do CD34 em amostras de tecido colônico dos ratos dos grupos controle, 5-fluorascil, 5-fluorascil/MA e MA

Grupos comparados		p
Controle	x 5-Fluouracil	0,0001*
	x 5-Fluoracil/MA	0,0001*
	x MA	0,9293
5-Fluouracil	x 5-Fluoracil/MA	0,9038
	x MA	0,0006*
5-Fluoracil/MA	x MA	0,0005*

DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizado foi proposto por ULUDAG et al. em 2009⁴⁸, no qual investigaram se a cobertura das anastomoses colônicas com MA melhorava a cicatrização anastomótica em vigência dos efeitos tóxicos da administração imediata do 5-FU. Utilizaram 120 ratos Wistar. O presente estudo diferiu quanto à quantidade de ratos utilizados (n=32), a data de interrupção do estudo (D7), com a avaliação ponderal final dos animais, sacrifício e coleta das anastomoses colônicas e estudos histopatológicos da formação de tecido de granulação pela coloração de H&E, histométrica da porcentagem de colágeno dos tipos I e III pela coloração de Picro-Sirius, avaliação imunoistoquímica da viabilidade celular pela quantificação porcentual do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e avaliação imunoistoquímica da densidade microvascular, pela pesquisa do marcador de angiogênese o CD34.

A escolha do 5-FU para o presente estudo, como fator de possível interferência negativa no processo cicatricial colônico, foi inicialmente por ser droga descrita como não seletiva para as células tumorais, exercendo efeitos antimetabólicos em diversos tecidos e na celularidade envolvida no processo de cicatrização anastomótica em animais adultos e jovens^{55,56}. A dose de 20 mg/kg de 5-FU utilizada já foi confirmada como fator indutor da diminuição da capacidade de síntese de colágeno anastomótico possivelmente pela redução do número de fibroblastos e consequente inibição diretamente da síntese de colágeno. Verificou-se que este tratamento interferiu na reparação da ferida operatória colônica evidenciada pela redução significativa da pressão de ruptura anastomótica e a força de ruptura^{48,57}.

Em outro estudo experimental, com objetivo de avaliar os efeitos do fator estimulador de colônias granulócitos-macrófagos na evolução de anastomoses

colônicas em ratos, após quimioterapia intraperitoneal com 5-FU na dose de 20 mg/kg pós-operatório, comprovou-se a diminuição da atividade dos macrófagos e comprometimento da cicatrização de feridas e melhora da cicatrização com o uso do referido fator ⁵⁰.

Os efeitos tóxicos do 5-FU nos ratos deste estudo foram inicialmente evidenciados na perda de peso dos grupos 5-FU (397,6±46,7 g) ao D7 quando comparados ao grupo controle (452,6±43,5 g, p=0,0387), o que está em acordo a outros estudos similares ^{58,59,60,61,62,63}.

Avaliações do processo cicatricial

Para a análise do processo de cicatrização os estágios daquela intestinal são similares aos de outros tecidos, nos quais a resposta inflamatória inicial ocorre entre 1-3 dias, seguida da fase proliferativa 3-14 dias onde ocorrem a formação de tecido de granulação, maior estímulo angiogênico e síntese de colágeno (7^o. dia), seguindo-se da fase de remodelação cicatricial pela deposição e maturação de colágeno e por consequência a maturação da cicatriz ^{1,64,65}. A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células desta fase, sendo que os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência ⁶⁶.

No presente estudo, na comparação da formação de tecido de granulação entre o grupo controle com os ratos do grupo 5-FU, estes apresentaram piora significativa nas formações da crosta fibrino-leucocitária (p=0,00737), proliferação angiofibroblástica (p=0,02330); contudo, na reepitelização de bordas não houve diferença significativa (p=0,2782), o que confirma a ação comprometedora do 5-FU no processo cicatricial.

Estes resultados estão em acordo aos de outros autores que também verificaram a piora do processo cicatricial colônico e outros tecidos. Em ratos tratados com o 5-FU observou-se severa perda de força das anastomoses, medida pela pressão de ruptura em ratos submetidos à ressecções de íleo e cólon, com redução concomitante do colágeno da ferida. Concluiu-se que o reparo anastomótico em ratos prossegue normalmente sob condições ideais, mas é alterado na presença de 5-FU ⁹ que em estudo experimental em ratos também submetidos à ressecção colônica e colorrafia, aumentou a taxa de deiscência de anastomose e a formação de aderências, diminuição na pressão de ruptura, piora nas taxas de infiltração de células inflamatórias, neoangiogênese, atividade de fibroblastos, deposição de colágeno e níveis de hidroxiprolina e induziu aumento nos níveis de malondialdeído⁴⁸.

5-FU já foi utilizado para indução de mucosite em ratos. Foram descritas pioras na reparação da mucosa oral dos tratados com 5-FU em comparação ao grupo controle não tratados, evidenciando a ação do 5-FU também nos tecidos da mucosa oral através dos indicadores histopatológicos CD4, CD8, PCNA e de proliferação celular, o VEGF ⁵⁹.

A aplicação intraperitoneal de 5-FU na dose de 20 mg/kg induziu piora dos resultados das avaliações da pressão de ruptura anastomótica, das dosagens de hidroxiprolina tecidual, da formação de edema tecidual, necrose e formação de colágeno ⁶⁸.

Em relação à avaliação das porcentagens de colágenos tipo I e tipo III verificou-se piora no grupo 5-FU (73,85±6,1) quando comparado ao grupo controle (83,4±4,73, p= 0,0055) e em comparação ao grupo 5-FU/MA (82,07±4,99, p=0,0154) e também ao grupo MA (80,47±4,51, p=0,0368). Para a avaliação de colágeno experimental têm sido utilizados métodos espectrofotométricos pela dosagem de

hidroxiprolina ou histoquímicos pela avaliação histométrica com coloração de Picrosirius-red²².

A molécula de colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas em forma de uma tripla hélice contendo prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina. A prolina e a hidroxiprolina estabilizam essas cadeias, sendo que 14% do colágeno é por hidroxiprolina¹⁷. Até o presente já foram identificados 28 tipos diferentes de colágeno em mamíferos. Destes, 4 numerados de I a IV, são os mais conhecidos. Eles diferem entre si pela composição química, pelo modo de associação entre suas moléculas, pelas funções que desempenham e pelas doenças que a sua má-formação e a sua produção excessiva ou insuficiente, podem causar. Em tecidos intactos, o colágeno tipo I predomina e constitui 80-90% e os restantes 10-20% são do tipo III. No trato gastrointestinal a camada submucosa contém a maior quantidade de colágeno em relação às outras camadas¹. O comportamento e a dinâmica do colágeno podem ser ilustrados de uma maneira prática no exemplo da cicatrização de uma anastomose. Nas cicatrizes recentes observa-se aumento percentual no colágeno do tipo III em relação ao colágeno do tipo I, sendo este o tipo predominante nas fases mais tardias da cicatrização⁶⁷.

Junqueira, Cossermelli e Brentani em 1978 confirmaram em seus experimentos, que a coloração com picro-sirius é procedimento específico para o colágeno em diferentes tecidos. Na observação com luz polarizada, as fibras com maior entrelaçamento e maior espessura apresentaram coloração laranja-avermelhada e foram denominadas colágeno do tipo I (maduro). As fibras mais afiladas e menos entrelaçadas apresentaram coloração esverdeada e foram denominadas colágeno tipo III (imaturo)¹⁸.

Em estudos experimentais em ratos submetidos à colotomias e colorrafias, similares ao presente, observaram-se também melhores níveis de deposição de colágeno em anastomoses colônicas em que foram sobrepostas MA, sendo estas avaliações executadas pela dosagem de hidroxiprolina tecidual⁷⁰.

Quanto à quantificação de células viáveis pelo teste imunoistoquímico PCNA, o grupo 5-FU demonstrou diminuição significativa ($p=0,0012$) quando comparado ao grupo controle, estando em acordo com os resultados verificados na formação da crosta fibrinoleucocitária e reepitelização de bordas no teste de avaliação da formação do tecido de granulação. Este grupo também apresentou resultados significativamente menores ($p=0,0001$) na quantificação da densidade microvascular cicatricial, quantificado pela pesquisa imunoistoquímica do receptor CD34 quando comparado ao grupo controle, o que está em acordo ao resultado observado na proliferação angioblastica na formação de tecido de granulação.

Nos grupos em que foram inseridas as MA, quanto à viabilidade celular não foram observadas melhoras nos níveis de viabilidade celular, quando comparados os grupos 5-FU ($60,63\pm 5,59$) e 5-FU/MA ($63\pm 16,23$, $p=0,7862$). Da mesma forma ocorreu em relação às avaliações da densidade microvascular, quando comparados os grupos 5-FU ($2,63\pm 1,87$) e 5-FU/MA ($2,5\pm 1,94$, $p=0,9038$).

O emprego de MA descelularizada, com efeitos negativos mínimos em seus componentes da matriz extracelular, é muito importante para evitar a rejeição do enxerto e apresenta melhor desempenho. Até o momento, várias técnicas para descelularização de MA têm sido propostas e se baseiam principalmente em procedimentos enzimáticos associados à ação de detergentes com resultados distintos conforme a técnica utilizada⁷¹. Aqui foi utilizada a associação entre efeito detergente do dodecil-sulfato de sódio com ações enzimáticas da RNase e DNAase, uma vez que a procedência humana da MA certamente induziria resposta

imunologicamente ativa em ratos devido à distância filogenética entre estas espécies. O referido protocolo para descelularização mostrou evidências histológicas confiáveis na remoção de células ou fragmentos, minimizando a antigenicidade com danos mínimos aos componentes da matriz extracelular. Custo-benefício, simplicidade, rapidez e segurança são outras vantagens do atual protocolo de descelularização à base de detergente e ação enzimática⁷². A MA tem sido usada como um produto de base biológica muito promissor em humanos, especialmente para aplicações de cicatrização de feridas na pele e córnea. As excelentes propriedades desta membrana tornam-na potencial candidata no tratamento de várias lesões cutâneas como escaras, queimaduras, úlceras diabéticas, lesões ósseas, disfunções do assoalho pélvico e úlceras venosas^{72,73}. A principal propriedade dela é a citobiocompatibilidade, pois trata-se de estrutura muito semelhante à pele normal, composta por proteínas da matriz extracelular^{73, 74, 75, 76, 77, 78, 79}.

O processo de descelularização da MA à base de detergente, utilizado neste estudo é considerado um “protocolo confiável” para esta finalidade, por remover as células ou fragmentos delas, não havendo necessidade de comprovar histologicamente a descelularização por este método⁷².

CONCLUSÃO

O uso da MA no processo cicatricial anastomótico de ratos tratados com com 20 mg/kg de 5-FU no 7º. dia de evolução pós-operatória induziu melhora da porcentagem de colágeno tipo I (maduro).

REFERÊNCIAS

- 1 CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arq Bras Cir Dig**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.
- 2 MARQUES, R.M. Cirurgia - Arte e Ciência. In: **Técnica operatória e cirurgia experimental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, primeira edição, p. 3-18, 2005.
- 3 COSTA, M.A.R.; JENKIS, R.L. Complicações cirúrgicas. In: **COELHO, J.C.U. Manual de clínica cirúrgica - cirurgia geral e especialidades**, v 1. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, primeira edição, p. 101-121, 2009.
- 4 WAGNER, O.J.; EGGER, B. Influential Factors in Anastomosis Healing. **Swiss Surg, Bern**, v. 9, n. 3, p. 105-113, 2003.
- 5 GIAQUINTO, M.G.C.; MOTA, D.S.C. Cicatrização de feridas. In: **MARQUES, R.M. Técnica operatória e cirurgia experimental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, primeira edição, p. 55-70, 2005.
- 6 THORNTON, F.J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surg Clin North Am**. v.77, n.3, p.549-73, 1997.
- 7 DEUS, I.A.; MANO, J.F.; CUSTÓDIO, C.A. Perinatal tissues and cells in tissue engineering and regenerative medicine. **Acta Biomater**. v.1, n.110, p.1-14. 2020.
- 8 PICHLBERGER, M.; JERMAN, U.D.; OBRADOVIĆ, H.; RATNJEK, L.; MACEDO, A.S.; MENDES, F.; FONTE, P.; HOEGLER, A.; SUNDL, M.; FUCHS, J.; SCHOEBERLEIN, A.; KREFT, M.E.; MOJSILOVIĆ, S.; LANG-OLIP, I. Systematic Review of the Application of Perinatal Derivatives in Animal Models on Cutaneous Wound Healing. **Front Bioeng Biotechnol**. v.24, n.9, p.742858, 2021.
- 9 KOGAN, S.; SOOD, A.; GRANICK, M.S. Amniotic Membrane Adjuncts and Clinical Applications in Wound Healing: A Review of the Literature. **Wounds**. v.30, n.6, p.168-173, 2018.
- 10 IRVIN, T.T.; GOLINGHER, J.C. Aetiology of disruption of intestinal anastomosis. **Br J Surg**. v.60, p.461-4, 1973.
- 11 WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am Philadelphia**. v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.
- 12 ORGILL, D.; DEMLING, R.H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit Care Med**. v.9, p.899-908, 1988.
- 13 EHRLICH, H.P.; TARVER, H.; HUNT, T.K. Inhibitory effects of vitamin E on collagen synthesis and wound repair. **Ann Surg**. v.175, p.235-40, 1972.
- 14 BRENNAN, S.S.; FOSTER, M.E.; MORGAN, A.; LEAPER, D.J. Prostaglandins in colonic anastomotic healing. **Dis Colon Rectum** v.27, p.723-5, 1984.
- 15 GOODSON, W.H.; HUNT, T.K. Wound healing in experimental diabetes mellitus: importance of early insulin therapy. **Surg Forum**. v.29, p.95-8, 1978.

- 16 CLARK, R.A.F. Wound repair. In: Kumar, Robbins, **Cotran: Pathologic Basis of Disease**, 7th ed., Ed. Saunders, p.112, 2005.
- 17 DIETZ, U.A.; CZECZKO, N.G.; LEMOS, R.; ARAÚJO, A.C.F.; INÁCIO, C.M.; SALLES JÚNIOR, G.S.; CORREIA NETO, M.C.; REPKA, J.C.D.; ZANELATO, C.; MALAFAIA, O.; DEBUS, E.S.; THIEDE, A. Terminolateral esophagojejunostomy after gastrectomy with the biofragmentable anastomosis ring in the dog model. **Zentralbl Chir, Leipzig**, v. 130, n. 3, p. 274-279, 2005.
- 18 JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, Okayama, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978
- 19 STEVENS, A.; LOWE, J. Respostas teciduais ao dano. In: **Patologia**. São Paulo, Manole, segunda edição, p.35-50, 2000.
- 20 GRECA, F.H.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; IOSHI, S.; SANTOS, E.A.A.; CHIN, E.W.K.; EL TAWIL, I.I.; STALHSCHMIDT, F.L. Cicatrização de anastomoses do cólon esquerdo com doença inflamatória: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 15 n. supl 3, p. 41-46, 2000.
- 21 GUIMARÃES, M.V.T.N.; MOREIRA, G.H.G.; ROCHA, L.P.; NICOLUZZI, J.E.L.; FRANCO DE SOUZA, C.J.F.; REPKA, J.C.D. L-arginine action in cutaneous flap evolution under nicotine exposure in rats. **Rev Col Bras Cir**, v.40, n.1, p.49-54, 2013.
- 22 THÁ NASSIF, A.C.; HINTZ GRECA, F.; GRAF, H.; DOMINGUES REPKA, J.C.; NASSIF, L.S. Wound healing in colonic anastomosis in hypothyroidism. **Eur Surg Res**, Basel, v. 42, n. 4, p. 209-215, 2009.
- 23 KUZU, I.; BICKNELL, R.; HARRIS, A.; JONES, M.; GATTER, K.C.; MASON, D.Y. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. **J Clin Pathol**, v.45, n.2, p.143-148, 1992.
- 24 NAKANO, S.; KAWAMURA, J. Proliferating cell nuclear antigen expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with pathologic features and DNA content. **Ahinyokita Kiyo**, v.41, p.343, 1995.
- 25 CELIS, J.E.; CELIS, A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of nuclear cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. **Proc Natl Acad Sci**, v.82, p.3262-6, 1985.
- 26 LONGLEY, D.B.; HARKIN, D.P.; JOHNSTON, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer**, v.3, n.5, p.330-8, 2003.
- 27 HAJDU, S.I. 2000 years of chemotherapy of tumors. **Cancer**, v.103, n.6, p.1097-102, 2005.
- 28 DIASIO, R.B.; HARRIE, B.E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics**, v.16, p.215-237, 1989.
- 29 DAVIS, J.S. Skin transplantation with a review of 550 cases at the John's Hopkins Hospital. **JHH Report**, v.15, p.307-96, 1910.
- 30 BLANES, L. Tratamento de feridas. In: Baptista-Silva JCC. editor. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em URL: <http://www.baptista.com>
- 31 NIKNEJAD, H.; PEIROVI, H.; JORJANI, M.; AHMADIANI, A.; GHANAVI, J.; SEIFALIAN, A.M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur Cell Mater**, v.29, n.15, p.88-99, 2008.
- 32 MATTHEWS, R.N.; FAULK, W.P.; BENNETT, J.P. A review of the role of amniotic membranes in surgical practice. **Obstet Gynecol Ann**, v.11, p.31-58, 1982.
- 33 MENON, R.; ISMAIL, L.; ISMAIL, D. Human fetal membrane expression of IL-19 and IL-20 and its differential effect on inflammatory cytokine production. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v.19, p.209-214, 2006.
- 34 FERREIRA, L.A.P.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E.G.; GONZAGA, C.; SANTOS, J.R.; GOLGHER, R.R. A concentração de interferon humano de membranas amnióticas: II métodos químicos. **Rev. Microbial**, v.22, n.3, p.216-220, 1991
- 35 TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **J Pharmacol Sci**, v.105, p.215-228, 2007.
- 36 BARLAS, M.; GÖKÇORA, H.; EREKUL, S.; DINDAR, H.; YÜCESAN, S. Human amniotic membrane as an intestinal patch for neomucosal growth in the rabbit model. **J Pediatr Surg**, v.27, n.5, p.597-601, 1992.
- 37 CROMACK, D.T.; SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B. Transforming growth factor beta levels in rat wound chambers. **J Surg Res**, v.42, p.622-628, 1997.
- 38 BOSE B. Burn wound dressing with human amniotic membrane. **Ann R Coll Surg Engl**, v.61, n.6, p.444-447, 1979.
- 39 SCHRIMPF, W.J. Repair of tympanic membrane perforations with human amniotic membrane; report of fifty-three cases. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v.63, p.101-15, 1954;
- 40 DINO, B.R.; EUFEMIO, G.G.; DE VILLA, M.S. Human amnion: the establishment of an amnion bank and its practical applications in surgery. **J Philipp Med Assoc**, v.42, p.357-66, 1966.
- 41 ILIC, D.; VICOVAC, L.; NIKOLIC, M.; LAZIC, I.L.I.C.E. Human amniotic membrane grafts in therapy of chronic non-healing wounds. **Br Med Bull**, v.117, n.1, p.59-67, 2016.
- 42 HERMANS, M.H. Preservation methods os allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns. **Burns**, v.37, n.5, p.873-881, 2011
- 43 RIAU, A.K.; BEUERMAN, R.W.; LIM, L.S.; MEHTA, J.S. Preservation, sterilization and desespitelização of human amniotic membranes for use in ocular surface rescosntruction. **Biomaterials**, v.31, n.2, p.216-225, 2010.
- 44 MAMEDE, A.; CARVALHO, M.; ABRANTES, A.; LARANJO, M.; MAIA, C.; BOTELHO, M. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell and tissue Research**, v.349, n.2, p.447-458, 2012.
- 45 MILAN, P.B.; AMINI, N.; JOGHATAEI, M.T.; EBRAHIMI, L.; AMOUPOUR, M.; SARVEAZAD, A.; KARGOZAR, S.; MOZAFARI, M. Decellularized human amniotic membrane: From animal models to clinical trials. **Methods**, v.15, n.171, p.11-19, 2020.

- 46 GHOLIPOURMALEKABADI, M.; BANDEHPOUR, M.; MOZAFARI, A.; HASHEMI, H.; GHANBARIAN, M.; SAMENI, M.; SALIMI, M.; GHOLAMI, A.; SAMADIKUCHAKSARAEI, G.H. Decellularized human amniotic membrane: more is needed for an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant bacteria isolated from burn patients. **Burns**. v.41, n.7, p.1488-1497, 2015.
- 47 SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta cir. bras**. São Paulo. v.19, n.4, p.441-447, 2004.
- 48 ULUDAG, M.; OZDILLI, K.; CITGEZ, B.; YETKIN, G.; IPCIOGLU, OM.; OZCAN, O.; POLAT, N.; KARTAL, A.; ORUN, P.; ISGOR, A. Covering the colon anastomoses with amniotic membrane prevents the negative effects of early intraperitoneal 5-FU administration on anastomotic healing. **Int J Colorectal Dis**. v.25, n.2, p.223-232, 2010.
- 49 HERMANN, J.B.; WOODWARD, S.C.; PULASKI, E.J. Healing of colonic anastomosis in the rat. **Surg Gynecol Obstet**. v.119, p.269-275, 1964.
- 50 JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses. III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. **American Journal of Surgery**. v.139, n.3, p.398-405, 1980.
- 51 GAN, L.; VAN SETTEN, G.; SEREGARD, S.; FAGERHOLM, P. Proliferating cell nuclear antigen colocalization with corneal epithelial stem cells and involvement in physiological cell turnover. **Acta Ophthalmol Scand**. v.73, n.6, p.491-5, 1995
- 52 HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem**, Baltimore. v.29, n.4, p.577-580, 1981.
- 53 HASAN, J.; BYERS, R.; JAYSON, G.C. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumors. **Br J Cancer**. v.86, n.10, p.1566-1577, 2002.
- 54 VERMEULEN, P.B.; GASPARINI, G.; FOX, S.B.; COLPAERT, C.; MARSON, L.P.; GION, M.; BELIËN, J.A.; DE WAAL, R.M.; VAN MARCK, E.; MAGNANI, E.; WEIDNER, N.; HARRIS, A.L.; DIRIX, L.Y. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. **Eur J Cancer**. v.38, n.12, p.1564-1579, 2002.
- 55 CARRICO, C.K.; GLAZER, R.I. Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver. **Cancer Res**. v.39, n.9, p.3694-701, 1979.
- 56 ERDEM, E.; DINÇ, S.; ERDEM, D. Effects of intraperitoneal chemotherapy and GM-CSF on anastomotic healing: an experimental study in rats. **J Surg Res**. v.108, p.1-6, 2002.
- 57 FERGUSON, M.K. The effect of antineoplastic agents on wound healing. **Surg Gynecol Obstet**. v.154, p.421-9, 1972.
- 58 CINCIK, H.; GÜNGÖR, A.; CEKIN, E.; SAGLAM, O.; YILDIRIM, S.; POYRAZOGLU, E.; CANDAN, H. Effects of topical application of mitomycin-C and 5-fluorouracil on myringotomy in rats. **Otol Neurotol**. v. 26, n.3, p. 351-4, 2005.
- 59 LIMA, G.M.; SEVERO, M.C.; SANTANA-MELO GDE, F.; CARVALHO, M.A.; VILELA-GOULART, MD.; SALGADO, M.A.; GOMES, M.F. Amniotic membrane as a biological dressing for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v.44, n.7, p.845-51, 2015
- 60 SAYRE, R.S.; BARR, J.W.; BAILEY, E.M. Accidental and experimentally induced 5-fluorouracil toxicity in dogs. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**. v.22, n.5, p.545-9, 2012.
- 61 SCARTOZZI, M.; MACCARONI, E.; GIAMPIERI, R.; PISTELLI, M.; BITTONI, A.; DEL PRETE, M.; BERARDI, R.; CASCINU, S. 5-Fluorouracil pharmacogenomics: still rocking after all these years? **Pharmacogenomics**. v.12, n.2, p.251-65, 2011.
- 62 STOOP, M.J.; DIRKSEN, R.; WOBBS, T.; HENDRIKS, T. Effects of early postoperative 5-fluorouracil and ageing on the healing capacity of experimental intestinal anastomoses. **Br J Surg**. v.85, p.1535-1538, 1998.
- 63 THIRION, P.; MICHELIS, S.; PIGNON, J.P.; BUYSE, M.; BRAUD, A.C.; CARLSON, R.W.; O'CONNELL, M.; SARGENT, P.; PIEDBOIS, P. Meta-Analysis Group in Cancer. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. **J Clin Oncol**. v.22, n.18, p.3766-75, 2004.
- 64 HOUDART, R.; LAVERGNE, A.; VALLER, P.; VILLET, R.; RAUTEFEUILLE, P. Vascular evolution of single-layer end-colonic anastomosis. A micrographic study of 180 anastomoses in the rat from two to 180 days. **Dis Colon Rectum**. v.28, p.475-80, 1995
- 65 HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W.J. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. **Diseases of the Colon Rectum**. v.33, n.10, p.891-901, 1990.
- 66 LAW, N.W.; ELLIS, H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomosis in protein-malnourished rats. **Surgery**. v.107, n.4, p.449-454, 1990.
- 67 SILVA, C.A.; REPKA, J.C.; SOUZA, C.J.; MATIAS, J.E.F. Effects of renal dysfunction on healing of colonic anastomosis: experimental study in Wistar rats. **ABCD Arq Bras Cir Dig**. v.31, n.4, p.e1398, 2018
- 68 ULUDAG, M.; CITGEZ, B.; OZKAYA, O.; YETKIN, G.; OZCAN, O.; POLAT, N.; ISGOR, A. Effects of the amniotic membrane on healing of colonic anastomoses in experimental left-sided colonic obstruction. **Langenbecks Arch Surg**. v.395, n.5, p.535-43, 2010.
- 69 ULUDAG, M.; CITGEZ, B.; OZKAYA, O.; YETKIN, G.; OZCAN, O.; POLAT, N.; ISGOR, A. Effects of amniotic membrane on the healing of primary colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of secondary peritonitis in rats. **Int J Colorectal Dis**. v.24, n.5, p.559-67, 2009.
- 70 GORURL, A.S.; OKTY, I.; BURAR, K. The influence of platelet-rich plasma (PRP) on colonic anastomosis healing impaired by intraperitoneal 5-fluorouracil application. An experimental study. **Acta Cir Bras**. v.35, n.5 p.e202000504, 2020.

- 71 DIAS, T.; MACHADO, K.; KOCHLA, K. R. A.; CUNHA, R.; CARDOSO, M. A.; SIMEONI, R. B.; SANTOS, V. C. GOMES, P. V.; NASCIMENTO, C. S.; NASCIMENTO, M. E. B.; SOUZA, L. C. G.; BRAWERMAN, A.; FRANCISCO, J. C. Acellular Amniotic Membrane Patch Regeneration for Burn Injury: The Future for Wound Healing. **J. Biomedical Science and Engineering**. v.12, n.8, p.409-413, 2019.
- 72 KHOSRAVIMELAL, S.; MOMENI, M.; GHOLIPUR, M.; KUNDU, S.C.; GHOLIPOURMALEKABAD, M. Protocols for decellularization of human amniotic membrane. **Methods in Cell Biology**. v.157, p.37-47, 2020.
- 73 ELHENEIDY, H.; OMRAN, E.; HALWAGY, A.; AL-INANY, H.; AL-ANSARY, M.; GAD A. Amniotic membrane can be a valid source for wound healing. **Int J Womens Health**. v.27, n.8, p.225-31, 2016.
- 74 WU, Z.; LIU, X.; YUAN, D.; ZHAO, J. Human acellular amniotic membrane is adopted to treat venous ulcers. **Exp Ther Med**. v.16, n.2, p.1285-1289, 2018.
- 75 XUE, S.L.; LIU, K.; PAROLINI, O.; WANG, Y.; DENG, L.; HUANG, Y.C. Human acellular amniotic membrane implantation for lower third nasal reconstruction: a promising therapy to promote wound healing. **Burns Trauma**. v.18, n.6, p.34, 2018.
- 76 TANG, K.; WU, J.; XIONG, Z.; JI, Y.; SUN, T.; GUO, X. Human acellular amniotic membrane: A potential osteoinductive biomaterial for bone regeneration. **J Biomater Appl**. v.32, n.6, p.754-764, 2018.
- 77 ZHAO, B.; LIANG, L.; WANG, J.; REN, C.; HU, M.; WU, H.; CHEN, L.; LIU, X.; XU, F.; ZHENG, X.; CHENA, J.; CUI, S. The effect of a human acellular amniotic membrane loaded with mechanical stretch-stimulated bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of pelvic floor dysfunction. **RSC Advances**. v.12, n.17, p. 37086-37094, 2017.
- 78 NORDBACK, P.H.; MIETTINEN, S.; KÄÄRIÄINEN, M.; PELTO-HUIKKO, M.; KUOKKANEN, H.; SUURONEN, R. Amniotic membrane reduces wound size in early stages of the healing process. **J Wound Care**. v.21, n.4, p.190,192-4, 196-7, 2012.
- 79 DA, L.C.; HUANG, Y.Z.; XIE, H.Q.; ZHENG, B.H.; HUANG, Y.C.; DU, S.R. Membranous Extracellular Matrix-Based Scaffolds for Skin Wound Healing. **Pharmaceutics**. v.13, n.11, p.1796, 2021.

Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.