

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Melissa Guimarães

**ANÁLISE DO POTENCIAL PROTETOR DA MEMBRANA AMNIÓTICA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DESMIELINIZAÇÃO *IN VITRO* DE FATIAS
ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS**

**ANALYSIS OF THE PROTECTIVE POTENTIAL OF THE AMNIOTIC MEMBRANE
IN AN *IN VITRO* EXPERIMENTAL MODEL OF DEMYELINATION USING
ORGANOTYPIC BRAIN SLICES FROM MICE**

São José dos Campos, SP
2025

Melissa Guimarães

**ANÁLISE DO POTENCIAL PROTETOR DA MEMBRANA AMNIÓTICA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DESMIELINIZAÇÃO *IN VITRO* DE FATIAS
ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna

São José dos Campos, SP

2025

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Guimarães, Melissa

Análise do potencial protetor da membrana amniótica em modelo experimental de desmielinização *in vitro* de fatias organotípicas de cérebro de camundongos / Melissa Guimarães; orientadora, Luciana Barros Sant'Anna. - São José dos Campos, SP, 2025.

81 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. membrana amniótica. 3. imunomodulação. 4. esclerose múltipla. 5. culturas organotípicas. I. Sant'Anna, Luciana Barros, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Melissa Guimarães, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 30 de Abril de 2025.



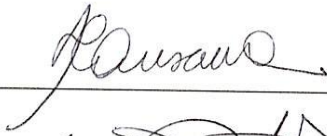
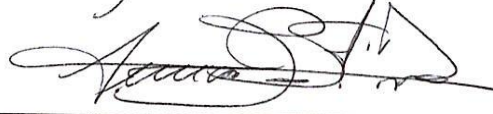
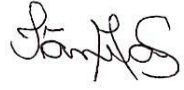
Autor(a) da Obra

Data da defesa: 28 / 02 / 2025

MELISSA GUIMARÃES DE OLIVEIRA

**“ANÁLISE DO POTENCIAL PROTETOR DA MEMBRANA AMNIÓTICA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DESMIELINIZAÇÃO *in vitro* DE FATIAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO DE
CAMUNDONGOS.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof. ^a Dr. ^a Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	
Prof. ^a Dr. ^a Luciana Barros Sant'Anna	
Prof. ^a Dr. ^a Tânia Mara da Silva – Unitau	

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 28 de fevereiro de 2025.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Andréia Luciane Guimarães, por seu amor incondicional, força e incentivo em cada etapa da minha vida. Seu suporte e segurança me permitiram executar minhas atividades com tranquilidade e leveza. O apoio nas noites mal dormidas, nos imprevistos e nas adversidades ao longo desta pesquisa foi fundamental para que eu chegasse até aqui com êxito. Além disso, ela sempre acreditou no meu potencial, investindo em mim e nos meus estudos, proporcionando o melhor mesmo diante das dificuldades.

Aos meus avós, Mathilde Guimarães e Jumeicy Guimarães, que foram fundamentais na minha trajetória. Ambos não tiveram muitas oportunidades de estudos, mas apoiaram minha mãe, permitindo que, desde a infância, eu tivesse essa oportunidade. Embora não estejam mais fisicamente presentes, sei que continuam me olhando lá de cima, guiando meus passos com amor e proteção.

Ao meu tio, Evandro Cesar Guimarães, que me auxiliou a buscar os animais em Campinas, além do seu apoio ao longo de toda a minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Luciana Barros Sant'Anna, por sua dedicação, paciência, orientação ao longo deste trabalho e por ter me acolhido em seu laboratório.

À Prof^a Dr^a Heloísa Orsini, por sua generosidade ao compartilhar seu conhecimento e por ter me ensinado a execução da parte experimental com os animais de pesquisa, tornando possível a realização deste estudo.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Gabriela Antônia Tiê Calheiro e Elisa Polifke Trindade, pelo apoio e companheirismo. A convivência e as trocas de experiências tornaram esse processo mais enriquecedor e leve.

À banca examinadora, composta pelas Prof^a Dr^a Emília Angela Lo Schiavo Arisawa e Prof^a Dr^a Tania Mara Silva, pelo aceite do convite e pelas contribuições valiosas para este trabalho.

Ao IPD, por fornecer a estrutura necessária para a realização do projeto, e à CAPES pela bolsa integral que me foi oferecida, possibilitando minha dedicação a esta pesquisa.

“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários”. C. S. Lewis.

RESUMO

A membrana amniótica (MA) é amplamente reconhecida por suas propriedades regenerativas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, sendo uma alternativa promissora no tratamento de doenças associadas à desmielinização, como a Esclerose Múltipla (EM). A desmielinização é caracterizada pela perda da mielina, estrutura responsável pela condução de impulsos nervosos, comprometendo a funcionalidade neuronal. Neste contexto, este estudo objetivou avaliar a eficácia da MA em proteger o tecido nervoso contra os efeitos desmielinizantes da lisolecitina, utilizando fatias organotípicas de cérebro de camundongos C57BL/6 como modelo experimental *in vitro*. Para isso, quatro grupos experimentais foram estabelecidos: Controle Sadio/C-S (fatias sadias); Desmielinização/C-DESM (fatias desmielinizadas pela aplicação de lisolecitina); Controle Membrana/C-MA (fatias sadias que receberam apenas MA); e Membrana Desafio Lisolecitina/MA-LISO (fatias que foram recobertas pela MA e submetidas à ação da lisolecitina). As análises incluíram colorações histológicas (Hematoxilina e Eosina, Luxol Fast Blue) para avaliação da integridade estrutural, teste metabólico com TTC para mensurar viabilidade celular, e MEV para avaliação da topografia de superfície tecidual. Os resultados demonstraram que a MA preservou a integridade da mielina e a arquitetura tecidual nas fatias desafiadas pela lisolecitina, enquanto as fatias do grupo C-DESM apresentaram microcavitações, desorganização da arquitetura histológica e perda da distinção entre substância branca e cinzenta. O ensaio TTC mostrou que as fatias protegidas pela MA mantiveram alta atividade metabólica, em contraste com a baixa atividade observada no grupo C-DESM. A análise por MEV reforçou a eficácia da MA, evidenciando a preservação da estrutura tecidual do parênquima cerebral, além de evidências de interação com o tecido que podem estar associados ao seu potencial bioativo. Essas propriedades incluem a modulação do microambiente neural e a liberação de fatores solúveis, que podem contribuir para a manutenção da viabilidade celular e integridade estrutural, mesmo em condições desafiadoras como a exposição à lisolecitina. Conclui-se que a MA atuou como barreira física eficaz contra a desmielinização induzida por lisolecitina, protegendo o tecido cerebral. Além disso, sugere-se que houve possível regeneração tecidual devido às suas propriedades bioativas, que devem ser mais investigadas para potencial aplicação no tratamento de doenças desmielinizantes, como a EM.

Palavras-chave: membrana amniótica; imunomodulação; agentes anti-inflamatórios; esclerose múltipla; culturas organotípicas.

Analysis of the Protective Potential of the Amniotic Membrane in an *In Vitro* Experimental Model of Demyelination Using Organotypic Brain Slices from Mice

ABSTRACT

The amniotic membrane (AM) is widely recognized for its regenerative, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties, making it a promising alternative for treating demyelination-associated diseases, such as Multiple Sclerosis (MS). Demyelination is characterized by the loss of myelin, a structure responsible for the conduction of nerve impulses, leading to impaired neuronal functionality. In this context, this study aimed to evaluate the efficacy of MA in protecting nervous tissue against the demyelinating effects of lysolecithin, using organotypic brain slices from C57BL/6 mice as an *in vitro* experimental model. Four experimental groups were established: Healthy Control/C-H (intact slices); Demyelination (demyelinated slices by application of lysolecithin); Membrane Control/C-AM (healthy slices treated only with AM); and AM Challenge Lysolecithin/AM-LPC (AM-protected slices before lysolecithin application). The analyses included histological staining (Hematoxylin and Eosin, Luxol Fast Blue) to assess structural integrity, a metabolic assay with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) to measure cell viability, and scanning electron microscopy (SEM) to evaluate tissue surface topography. The results demonstrated that the amniotic membrane (AM) preserved myelin integrity and tissue architecture in slices challenged with lysolecithin. In contrast, slices in the Demyelination group exhibited microcavities, disorganization of histological architecture, and loss of distinction between white and gray matter. The TTC assay revealed that slices protected by the AM maintained high metabolic activity, in contrast to the reduced activity observed in the Demyelination group. SEM analysis further reinforced the efficacy of the AM, showing preserved cerebral parenchyma organization, along with evidence of interaction with the tissue, potentially linked to its bioactive properties. These features include modulation of the neural microenvironment and the release of soluble factors, which may contribute to maintaining cellular viability and structural integrity, even under challenging conditions such as exposure to lysolecithin. It is concluded that AM acted as an effective physical barrier against lysolecithin-induced demyelination, protecting brain tissue. Furthermore, it is suggested that there was possible tissue regeneration due to its bioactive properties, which should be further investigated for potential application in the treatment of demyelinating diseases, such as MS.

Keywords: amniotic membrane; immunomodulation; anti-inflammatory agents; multiple sclerosis; organotypic cultures.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Evolução da pirâmide populacional no Brasil ao longo dos anos.....	20
Figura 2:	Esquema da condução de impulso nervoso em neurônio mielinizado e desmielinizado.....	22
Figura 3:	Membranas Fetais.....	27
Figura 4:	Características das regiões anatômicas da MA.....	28
Figura 5:	Representação bidimensional da histologia das regiões anatômicas da MA.....	29
Figura 6:	Representação tridimensional da histologia das regiões anatômicas da MA.....	29
Figura 7:	Representação das camadas histológicas da MA.....	30
Figura 8:	Esquema ilustrando as propriedades imunomoduladoras das células da MA por meio de diferentes mecanismos.....	32

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1:	Camundongo da Linhagem C57BL/6.....	36
Fotografia 2:	Microisolador alocado em rack ventilado.....	37
Fotografia 3:	Limpeza dos Microisoladores.....	37
Fotografia 4:	Fatiador de Tecidos Organotípicos.....	40
Fotografia 5:	Equipamento em funcionamento para a obtenção de fatias organotípicas cerebrais.....	40
Fotografia 6:	Dissecação dos hemisférios cerebrais.....	43
Fotografia 7:	Fatia do Grupo C-DESM (A); Fatia do Grupo MA-LISO (B).....	46
Fotografia 8:	Folheto de membrana amniótica, cortado no tamanho aproximado de 1x1 cm.....	46
Fotografia 10:	Fatia do Grupo C-S (A); Fatia do Grupo C-MA, com a MA colocada por cima da fatia (B).....	47
Fotografia 11:	Bloco histológico no micrótomo semi-automático Leica RM2245.....	48
Fotografia 12:	Destaque da amostra emblocada em parafina.....	49
Fotografia 13:	Lâmina de calibração. Aumento: 4x, ampliado digitalmente com ImageJ.....	50
Fotografia 14:	Fotos sobrepostas para formar a fatia completa, permitindo cálculo da área total e das áreas desmielinizadas.....	51
Fotografia 15:	Fotomicrografias de fatias organotípicas de cérebro nos grupos experimentais. Grupo C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DESM (D). Distinção preservada entre substância branca (asterisco) e cinzenta (cabeça de seta), observada em todos os grupos, com exceção do grupo C-DESM (D), onde essa diferenciação está comprometida. Coloração HE. Aumento: 4x.....	54
Fotografia 16:	Fotomicrografias de fatias organotípicas de cérebro nos grupos experimentais. Grupo C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DESM (D). Distinção preservada entre substância branca (asterisco) e cinzenta (cabeça de seta), observada em todos os grupos, com exceção do grupo C-DESM (D), onde essa diferenciação está comprometida. Coloração LFB. Aumento: 4x.....	54
Fotografia 17:	Fotomicrografias de fatias organotípicas do cérebro destacando a distinção preservada entre a substância branca (asterisco) e a cinzenta (ponta de seta) observada nos Grupos C-S, C-MA e MA-LISO. Colorações: HE (A) e LFB (B). Aumento: 10x.....	55
Fotografia 18:	Fotomicrografias de fatia organotípica do cérebro nos grupos C-H, C-MA e MA-LISO, destacando a substância branca: axônios longitudinais (asterisco) e transversais (setas). Colorações: HE (A) e LFB (B). Aumento: 10x.....	55
Fotografia 19:	Destaque para axônios transversais (setas), na substância	

	branca em uma fatia do grupo MA-LISO. Coloração: HE. Aumento: 40x.....	56
Fotografia 20:	Destaque para axônios longitudinais fortemente corados pelo LFB, na substância branca em uma fatia do grupo MA-LISO. Coloração: LFB. Aumento: 40x.....	56
Fotografia 21:	Fotomicrografias de fatias organotípicas do cérebro destacando as microcavitações observadas no grupo C-DEM (asterisco). Colorações: HE (A) e LFB (B). Aumento: 40x.....	57
Fotografia 22:	Eletrmicrografias das fatias organotípicas de cérebro nos grupos experimentais: C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DSEM (D). Cavitações observadas no grupo C-DESM (setas). Ampliação: 500 K X. Escala: 20 µm.....	60
Fotografia 23:	Aspecto macroscópico de fatias organotípicas do cérebro dos grupos experimentais C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DESM (D), coradas com TTC.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos Experimentais.....	38
Tabela 2: Dados histomorfométricos dos grupos experimentais.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentagem da Área Preservada nos Grupos Experimentais (**p<0,001, ANOVA e Teste Tukey).....	58
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BNDF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
CNTF	Fator Neurotrófico Ciliar
EM	Esclerose Múltipla
hAMSCs	Células-tronco mesenquimais amnióticas humanas
HE	Hematoxilina e Eosina
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
IL-10	Interleucina-10
IL-8	Interleucina 8
IL-1 α	Interleucina 1-alfa
IL-1 β	Interleucina 1-beta
LFB	Luxol Fast Blue
MA	Membrana Amniótica
MEC	Matriz extracelular
MEM	Meio Essencial Mínimo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MSCs	Células-tronco mesenquimais
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
PTFE	Politetrafluoretileno
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAIS.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	DOENÇAS NEUROLÓGICAS E SEU IMPACTO SOCIAL.....	19
3.2	FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS DESMIELINIZANTES DO SNC.....	20
3.3	MEMBRANA AMNIÓTICA.....	26
3.3.1	Estrutura Anatômica e Histologia	26
3.3.2	Propriedades da Membrana Amniótica nas Alterações Desmielinizantes	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	OBTENÇÃO DA PLACENTA E PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	35
4.2	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.3	CONFECÇÃO DO FATIADOR DE TECIDOS ORGANOTÍPICOS.....	39
4.4	PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DAS FATIAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO	41
4.4.1	Preparação dos Meios de Cultura e Suprimentos para Dissecção	41
4.4.2	Preparação da Área de Dissecção	41
4.4.3	Dissecção e Cultura da Fatia Cerebral	42
4.5	EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	44
4.5.1	Desmielinização Induzida por Lisolectina e Aplicação da Membrana Amniótica	44
4.5.2	Manutenção dos Grupos Controle Sem Desmielinização	46
4.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	47
4.6.1	Análise Histológica e Quantitativa de Imagem	47
4.6.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
4.6.3	Avaliação Atividade Metabólica das Fatias	52
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS	53
5.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA	53
5.2	ANÁLISE POR MEV	58
5.3	ATIVIDADE METABÓLICA COM CLORETO DE 2,3,5-TRIFENILTETRAZÓLIO (TTC).....	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	80

ANEXO B: PARECER CEUA 06/CEUA/2020	81
ANEXO C: SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA A REVISTA	82

1 INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) é o principal centro de controle e integração das funções corporais, sendo responsável por regular atividades motoras, sensoriais (Asan; Mcintosh; Carmel, 2022) e cognitivas essenciais para a sobrevivência e interação dos organismos com o ambiente (Moini; Avgeropoulos; Samsam, 2021). Ele é composto pelo encéfalo e pela medula espinhal, estruturas que atuam em conjunto para processar informações, regular funções corporais e coordenar atividades motoras e sensoriais. O encéfalo é composto pelo cérebro, cerebelo e tronco encefálico. O cérebro é dividido em duas principais estruturas, a substância cinzenta e a substância branca, que desempenham papéis distintos, mas complementares. A substância cinzenta está presente principalmente na região externa do cérebro, formando o córtex cerebral, e também nas regiões centrais da medula espinhal. Em contrapartida, a substância branca é composta principalmente por fibras nervosas mielinizadas (Barha; Nagamatsu; Liu-Ambrose, 2016), ou seja, axônios revestidos por uma bainha de mielina, uma camada lipoproteica que envolve e isola os axônios. Essa bainha é responsável por aumentar a velocidade de condução dos impulsos nervosos e garantir a eficiência das transmissões sinápticas entre as diferentes regiões do SNC. Alterações na integridade da mielina podem comprometer a funcionalidade neuronal, resultando em déficits neurológicos que impactam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados (Aggarwal; Yurlova; Simons, 2011; Shenfeld; Galkin, 2022).

A desmielinização é um processo patológico caracterizado pela perda ou deterioração da mielina, a camada lipoproteica que envolve os axônios, sem a destruição inicial dos próprios neurônios (Nave, 2010; Bernardo; Visentin, 2023). Esse fenômeno difere de outras condições do SNC, como a degeneração neuronal, que envolve danos diretos às células nervosas (Sasaki, 2018), ou inflamações difusas, como a encefalite, que afetam o tecido neural de forma mais abrangente (Shives; Tyler; Beckham, 2017). A desmielinização compromete a condução dos impulsos elétricos, levando a alterações funcionais severas nas vias neurais (Nave, 2010; Bernardo; Visentin, 2023).

Entre as condições clínicas mais associadas à desmielinização está a Esclerose Múltipla (EM), que corresponde a uma doença inflamatória do SNC, caracterizada patologicamente por desmielinização e subsequente degeneração neuronal. Trata-se de uma doença autoimune, crônica e progressiva, considerada

como o principal distúrbio desmielinizante em humanos (Mendes; Sá, 2011; Kornberg; Calabresi, 2024), resultando em sintomas neurológicos, como fadiga, fraqueza muscular, problemas de visão e déficits cognitivos. Além da EM, outras doenças desmielinizantes incluem a neuromielite óptica e as leucodistrofias hereditárias, que, embora distintas em suas etiologias, também geram prejuízos à funcionalidade do SNC. Essas condições frequentemente limitam a qualidade de vida dos indivíduos afetados e representam um grande desafio para a neurociência clínica, reforçando a necessidade de explorar novas abordagens terapêuticas (Barañano, 2016; Patterson; Goglin, 2017; Medina *et al.*, 2024).

Modelos experimentais de desmielinização são ferramentas importantes para elucidar os mecanismos subjacentes às alterações estruturais e funcionais da mielina no SNC. Entre esses modelos, as fatias organotípicas de cérebro destacam-se por preservarem a organização tecidual tridimensional e as interações celulares, proporcionando um ambiente controlado que representa, de forma realista, os processos fisiopatológicos. Esses modelos *in vitro* permitem estudar, de maneira detalhada, eventos celulares e moleculares associados à desmielinização e avaliar intervenções terapêuticas de forma precisa e reproduzível (Humpel, 2018; Gorter *et al.*, 2022). Um dos métodos mais utilizados para induzir desmielinização *in vitro* é o uso da lisolecitina, um agente desmielinizante que mimetiza o processo de desmielinização que ocorre em condições patológicas que afetam a bainha de mielina (Plemel *et al.*, 2017), possibilitando o estudo de estratégias terapêuticas em um contexto que reflete parcialmente os eventos ocorridos no tecido neural vivo (Miron *et al.*, 2010).

Nesse sentido, uma abordagem promissora na medicina regenerativa é a utilização da membrana amniótica (MA), que tem se mostrado eficaz em diversas aplicações terapêuticas, como na oftalmologia e dermatologia, especialmente no tratamento de úlceras de córnea (Casalita *et al.*, 2020), incluindo casos infecciosos e perfurantes, além de feridas crônicas (Ruiz-Cañada, 2021). A MA é a camada mais interna das duas membranas fetais humanas e está em contato com o líquido amniótico e o feto, envolvendo o embrião em desenvolvimento. Ela é uma estrutura importante para o desenvolvimento fetal, pois protege o feto e o líquido amniótico de danos externos e infecções (Favaron *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2023). A MA é uma fonte rica de células-tronco, incluindo células-tronco mesenquimais e células-tronco do líquido amniótico, que têm sido estudadas para uso em terapias regenerativas

(Parolini *et al.*, 2009; Leal-Marín *et al.*, 2020). Além disso, sua matriz extracelular (MEC) é composta por vários colágenos, laminina, proteoglicanos, glicoproteínas, elastina e fibronectina, além de vários fatores de crescimento significativos e citocinas, que são importantes para a manutenção da integridade estrutural da membrana (Alitalo *et al.*, 1980; Gholipourmalekabedi *et al.*, 2016; Farhadhosseinabadi *et al.*, 2018; Ragni *et al.*, 2021).

Devido a composição da MA por células especializadas e por uma MEC complexa, ela exibe características notáveis que a tornam um material biológico de interesse científico na medicina regenerativa (Parolini *et al.*, 2009; Ballesteros *et al.*, 2020), sugerindo que ela seja capaz de proteger as fatias organotípicas de cérebro da desmielinização induzida pela lisolecitina. A MEC rica em colágeno, elastina e glicoproteínas, confere à estrutura da MA uma resistência mecânica, flexibilidade e integridade (Fitriani *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2023), que permitem que a MA funcione como uma potencial barreira impermeável à penetração de agentes exógenos, como a lisolecitina, e, conseqüentemente, limitando o impacto dessa substância sobre a mielina. Além disso, a MA possui propriedades bioativas, incluindo a capacidade de modular respostas inflamatórias e fornecer fatores de crescimento, o que pode contribuir para a preservação do tecido neural e promover a regeneração celular (Hu *et al.*, 2023). Por isso, investigar o potencial protetor da MA é necessário a fim de avaliar os impactos nas doenças desmielinizantes. Esse estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre a interação entre a MA e o tecido nervoso, destacando sua relevância no campo da neurociência e medicina regenerativa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar *in vitro* o potencial protetor da MA na preservação da mielina e da arquitetura tecidual em modelo experimental de desmielinização utilizando lisolecitina em fatias organotípicas de cérebro de camundongos adultos *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar os resultados por meio de análise histológica (Hematoxilina e Eosina, e Luxol Fast Blue), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e atividade metabólica (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio - TTC), além da análise histomorfométrica para quantificação da relação entre a área desmielinizada e a área preservada em fatias organotípicas submetidas à desmielinização por lisolecitina e ao desafio com membrana amniótica (MA).

2) Avaliar a eficácia da MA na proteção das fatias organotípicas contra a desmielinização induzida pela lisolecitina por meio de análise estatística, além de verificar qualitativamente, por meio das imagens de MEV se os resultados corroboram com os observados na análise histológica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇAS NEUROLÓGICAS E SEU IMPACTO SOCIAL

Com o envelhecimento, numerosas alterações fisiológicas subjacentes ocorrem, e o risco de doenças crônicas aumenta. Aos 60 anos, os primeiros sintomas relacionados à idade começam a surgir, incluindo perdas cognitivas, auditivas, visuais e de mobilidade. Doenças osteomusculares acometem cerca de 63% da população idosa, com prevalência das mulheres (70,6%), com idade entre 70 a 79 anos (47%). Outras doenças não-transmissíveis, incluindo doenças cardiovasculares, acidente vascular encefálico, distúrbios respiratórios crônicos, câncer e demências também têm sua incidência aumentada, assim como a EM. Estes não são apenas problemas para países de baixa renda, mas sim uma realidade global. Claramente, o fardo associado a essas condições em pessoas senis é, geralmente, muito maior em países de renda média (Mattson, 2007; Xerente; Rodrigues; Daronch, 2020).

A longevidade tem sido acompanhada por aumento nos casos de doenças neurológicas associadas ao envelhecimento. De fato, são notadas diversas alterações macroscópicas e microscópicas no SNC envelhecido, que incluem, por exemplo, variação do peso e do volume encefálico com alargamento e aprofundamento dos sulcos e redução do volume cortical (Mattson, 2007; Vaughn *et al.*, 2019). A memória é um dos primeiros processos cognitivos a piorar com o avançar da idade (Moffat; Resnick, 2002; Duyckaerts; Delatour; Potier, 2009; Borelli; Grennan; Muth, 2020). Tal déficit, em seres humanos com idade avançada, pode variar entre 30 e 80% nos testes de memória espacial e pode estar relacionado à desmielinização neuronal (Magnusson *et al.*, 2003; Vaughn *et al.*, 2019).

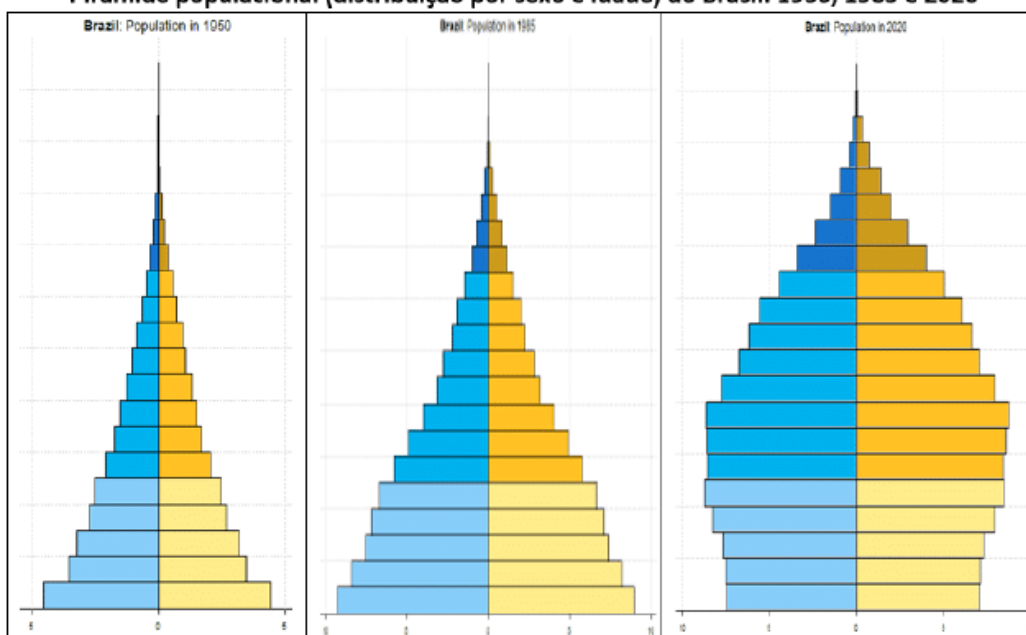
Embora seja reconhecido que o envelhecimento esteja associado a alterações fisiológicas e ao aumento do risco de doenças crônicas e degenerativas, como a EM (Mattson, 2007), sabe-se, hoje, que a maior prevalência da EM ocorre em indivíduos jovens, principalmente mulheres, entre 20 a 40 anos, ou seja, no auge de sua vida produtiva (Baliero *et al.*, 2024). Esse período coincide com momentos importantes, como o planejamento familiar e a construção de carreiras, o que torna o impacto da doença ainda mais significativo, afetando não apenas os indivíduos acometidos, mas também suas famílias e a sociedade como um todo (Walton *et al.*, 2020).

Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que sejam

capazes de tratar essas alterações é de grande valia, especialmente no contexto brasileiro de mudanças na pirâmide etária (Figura 1), visto que a EM que afeta predominantemente indivíduos mais jovens, no auge de sua vida produtiva. Esta realidade exige soluções terapêuticas eficazes que não apenas aliviem os sintomas de forma paliativa, mas também restaurem a função e a estrutura dos tecidos danificados, como propõe a medicina regenerativa. Essa abordagem, ao retardar a progressão de doenças degenerativas e potencialmente restabelecer a qualidade de vida dos pacientes (Debojyoti; Karmakar; Bhattacharya, 2021), não só beneficia diretamente os indivíduos acometidos, mas também contribui para a sustentabilidade social e econômica, aliviando a pressão sobre uma população ativa em declínio.

Figura 1 – Evolução da pirâmide populacional no Brasil ao longo dos anos.

Pirâmide populacional (distribuição por sexo e idade) do Brasil: 1950, 1985 e 2020



Fonte: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, World Population Prospects.

Neste contexto, a MA e seus derivados, tais como diferentes tipos de células-tronco, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, têm despontado como potenciais alternativas para a terapia celular em diversas doenças degenerativas (Wassmer; Berishvili, 2020).

3.2 FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS DESMIELINIZANTES DO SNC

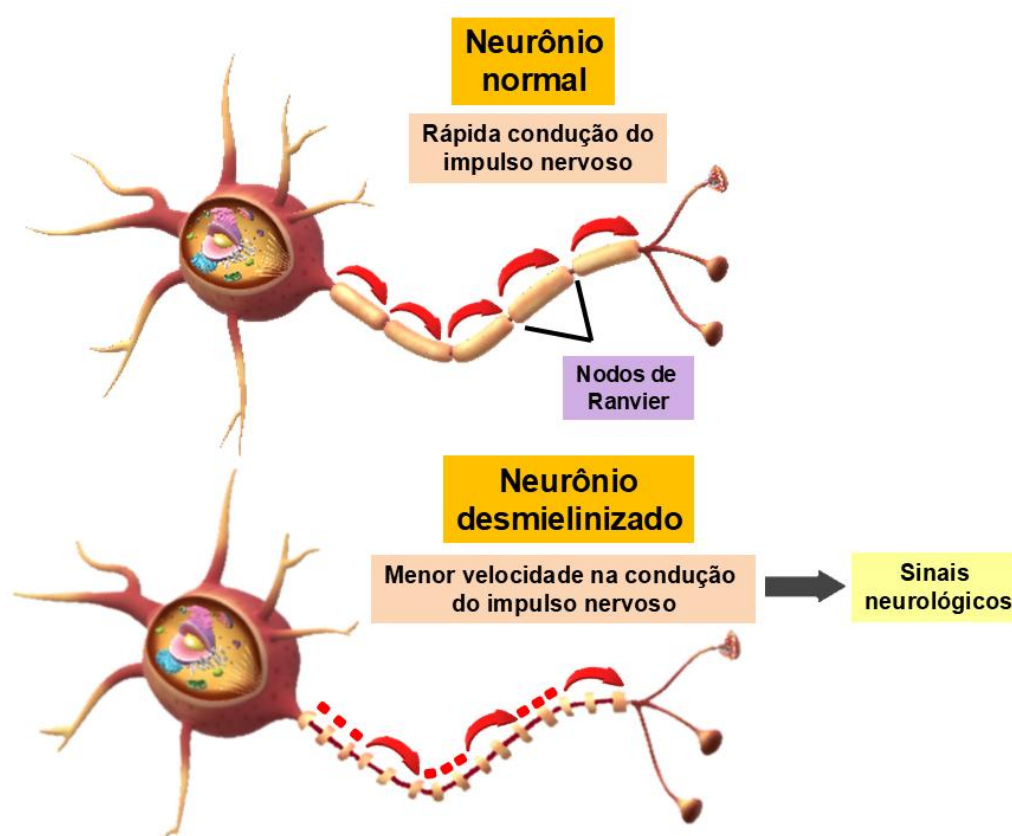
A mielina, material isolante composto principalmente por lipídios e proteínas, forma uma bainha ao redor dos axônios neuronais, desempenhando funções essenciais como estabilização, proteção e isolamento elétrico, o que aumenta a velocidade de transmissão dos impulsos nervosos (Sosa; Forsthuber, 2011). Esse processo ocorre por meio da deposição em espiral de membranas de células mielinogênicas, como os oligodendrócitos no sistema nervoso central e as células de Schwann no sistema nervoso periférico, formando segmentos denominados internodos. Os oligodendrócitos maduros envolvem os axônios com sua própria membrana celular, gerando uma bainha multicamadas que cobre longos segmentos do axônio, intercalando-se com os nodos de Ranvier, regiões desprovidas de mielina onde ocorre a atividade eletrogênica (Raine, 1989a).

Diversos eventos patológicos, tais como intoxicações, desordens metabólicas e funcionais, infecções, lesões mecânicas e inflamação, têm como resultado a perda mielínica, conhecida como desmielinização. Independentemente da causa, a desmielinização se deve a dois processos principais: ao dano direto da mielina ou das células mielinogênicas (desmielinização primária) e à lesão axonal, que promove a degeneração mielínica como efeito secundário (desmielinização secundária). A desmielinização pode ser encontrada tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP); entretanto, a reposição da mielina perdida difere entre os dois sistemas, sendo, na maioria das vezes, ineficiente no SNC (Raine, 1989b).

Embora a etiologia da desmielinização presente na EM seja ainda desconhecida, evidências sugerem que o processo ocorre de forma secundária à inflamação gerada no interior do parênquima nervoso (Batoulis *et al.*, 2011), por intermédio da resposta de linfócitos T autorreativos, ativados inapropriadamente contra os componentes da bainha de mielina. Estudos *in vivo* sugerem que os linfócitos Th1, e principalmente os linfócitos Th17 CD4+ são os subtipos de linfócitos mais importantes que levam à inflamação do SNC e desmielinização (Orsini *et al.*, 2014; Angelini *et al.*, 2023). A ativação de tais linfócitos promove o recrutamento e a ativação de monócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos B, microglíocitos e outras células efetoras da resposta imune no sítio de lesão. A ação conjunta de tais células e dos mediadores químicos e moléculas por elas liberados causa apoptose de oligodendrócitos e destruição das bainhas de mielina, levando ao processo de

desmielinização observado na doença (Figura 2) e aos seus sinais clínicos (Barthelmes *et al.*, 2016), que incluem disfunções sensoriais (entorpecimento, formigamentos e dor), sintomas motores (fraqueza, espasticidade muscular e alterações locomotoras) e outros sintomas, tais como déficits visuais, disfunções sexuais, urinárias e intestinais, alterações cognitivas e depressão (Fox *et al.*, 2006).

Figura 2 – Esquema da condução de impulso nervoso em neurônio mielinizado e desmielinizado.



Fonte: Autora (2024).

Relata-se que a mielina e os oligodendrócitos são bastante sensíveis aos produtos tóxicos derivados das células inflamatórias. Desta forma, proteases, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, óxido nítrico e outros produtos liberados por leucócitos ativados no SNC podem promover diretamente a desmielinização. Da mesma forma, citocinas como o TNF e o IFN- γ exercem efeitos pró-inflamatórios diversos, promovendo danos diretos, tais como apoptose de oligodendrócitos, ou indiretos, via aumento na expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas por células endoteliais e recrutamento e ativação de leucócitos (Lassman, 2004; Batoulis *et al.*, 2011; Petermann; Korn, 2011).

Diferentes modelos experimentais podem ser utilizados para o estudo da EM, visto que são elementos essenciais para avançar no conhecimento das doenças e na busca de terapias específicas e eficazes. Embora a EM seja uma doença inflamatória, com mecanismos imunológicos envolvidos, a falta de reparo das lesões, a remielinização incompleta e a neurodegeneração, são os fatores que conduzem à progressão e à incapacidade. Os tratamentos atuais são eficazes no controle imunológico, e conseqüentemente, nas fases iniciais da doença, mas não tem ação na remielinização e no surgimento de sequelas. Por isso, a remielinização é o objetivo de novas opções terapêuticas na EM, sendo necessária a adoção de modelos experimentais que visem o estudo desse processo (Torre-Fuentes *et al.*, 2020).

O brometo de etídio é um composto que tem sido amplamente utilizado como agente desmielinizante em estudos experimentais, contribuindo para o entendimento dos processos de desmielinização e remielinização no SNC. Blakemore (1982) constatou que o brometo de etídio é capaz de induzir desmielinização na medula espinhal de um gato. Abdallah, Shamaa e El-Tookhy (2020) demonstraram que a desmielinização induzida por brometo de etídio na medula espinhal de cães resulta em uma incapacidade clínica progressiva, caracterizada por lesões degenerativas, morte celular e vacuolização. Cisneros-Mejorado *et al.* (2020) investigaram a desmielinização induzida por brometo de etídio no pedúnculo cerebelar caudal de ratos, avaliando a remielinização por meio de ressonância magnética e coloração histológica. Bondan *et al.* (2004) investigou o processo de remielinização após a injeção de brometo de etídio no tronco encefálico de ratos imunossuprimidos com dexametasona. Ademais, Bondan *et al.* (2006) visou avaliar a atividade locomotora após a indução local de desmielinização tóxica no tronco encefálico de ratos Wistar, demonstrando os efeitos funcionais da desmielinização nessa região específica.

O brometo de etídio também foi utilizado para induzir desmielinização a fim de permitir o estudo do uso promissor de células de Schwann autólogas cultivadas para remielinizar áreas de desmielinização persistente no SNC (Blakemore; Crang, 1985). Ghezzi *et al.* (2023) identificaram a presença dessas células mielinizantes em lesões desmielinizadas do cérebro, tronco encefálico e medula espinhal em casos de EM necropsiados, evidenciando sua capacidade de remielinização em áreas adjacentes às vênulas e em regiões com menor densidade de astrócitos reativos. Garcia-Diaz e Evercooren (2020) revisaram os fatores que restringem ou permitem a migração e a sobrevivência das células de Schwann no SNC, destacando que sua invasão ocorre

frequentemente através dos vasos sanguíneos, os quais servem como suporte estrutural para sua migração até áreas lesadas. Já Chen *et al.* (2021) demonstraram que, além da migração de células de Schwann do SNP para o SNC, há evidências de que células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) podem se diferenciar em células de Schwann residentes no SNC, sugerindo um mecanismo adicional para a remielinização central.

Outro agente desmielinizante que tem sido amplamente utilizado em estudos experimentais para induzir desmielinização é a lisolecitina, particularmente devido à sua capacidade de afetar a estrutura da mielina em modelos *in vivo* e *in vitro*. A lisolecitina é um lipídio capaz de gerar desmielinização em modelos experimentais para estudo de doenças desmielinizantes do SNC. Estudos sugerem que a lisolecitina atua de maneira não específica, perturbando os lipídios da mielina ao se integrar nas membranas celulares, o que leva a um aumento na permeabilidade das células. Em modelos de camundongos, após a aplicação de lisolecitina, foi observado que ela causou danos imediatos às membranas celulares, mas foi rapidamente eliminada da substância branca, sem danos associados à elevação dos níveis endógenos de lisolecitina que ocorreu após cinco dias. Isso sugere que o cérebro pode possuir mecanismos para amortecer os efeitos da lisolecitina (Plemel *et al.*, 2018).

Outro estudo, desenvolvido por Wang *et al.* (2023), destacou o papel das células T reguladoras (Tregs) em modelos *in vivo* de desmielinização induzida por lisolecitina. A depleção das Tregs exacerbou a microgliose e as respostas inflamatórias, resultando em maior dano à mielina e déficits cognitivos nos animais. A análise molecular revelou que as Tregs desempenham um papel crucial na regulação da piroptose (tipo de morte celular programada inflamatória que ocorre em resposta a infecções ou danos celulares) nas microglias. Inibir a piroptose com o uso de VX765 (um inibidor da caspase-1) foi capaz de reverter os danos à mielina e melhorar a função cognitiva dos animais, mostrando o impacto das Tregs na proteção contra a desmielinização induzida por lisolecitina.

Além disso, a lisolecitina também tem sido utilizada em modelos *in vitro* de cultura de fatias organotípicas de cerebelo para estudar os processos de desmielinização e remielinização. Nesse modelo, a administração de lisolecitina induziu desmielinização em fatias cerebelares de ratos, o que foi observado pela perda de marcadores de mielina como proteína básica da mielina (MBP) e glicoproteína oligodendrocítica da mielina (MOG). No entanto, após o insulto transitório causado

pela lisolecitina, as culturas apresentaram uma fase de recuperação, com diferenciação de oligodendrócitos e reexpressão de CNPase, MBP e MOG, sugerindo um processo de remielinização limitado (Birgbauer; Rao; Webb, 2014).

Nas doenças desmielinizantes crônicas, os axônios passam por vários ciclos de desmielinização e remielinização, envolvendo muitos componentes celulares nestes processos. Devido à complexidade das interações, o estudo destas doenças é desafiador, sendo necessários modelos experimentais que se assemelhem à condição *in vivo* (Shen; Yuen, 2020). Fatias que possuem tempo de vida limitado, de 6 a 12 horas, também chamadas de fatias agudas (Wickham *et al.*, 2018), e culturas primárias de neurônios auxiliaram nas pesquisas acerca da compreensão do processamento de informações em redes neurais, mas possuem limitações e desvantagens. Nas fatias agudas, muitas fibras aferentes são cortadas e o tempo de vida limitado da fatia (6-12 h) não permite experimentos farmacológicos de longo prazo. As culturas de células primárias ou dissociadas, por sua vez, não refletem as complexas interações celulares e moleculares do tecido nervoso (Bekkers, 1998). Em contrapartida, embora os modelos animais *in vivo* sejam os que mais se aproximam do cérebro humano, eles apresentam desvantagens como alto custo e demora na indução da doença (Tan *et al.*, 2018). Para contornar estas limitações sem usar modelos *in vivo*, culturas de fatias organotípicas foram desenvolvidas como uma alternativa adequada (Sekizar; Williams, 2019). Este modelo tenta replicar as condições naturais do cérebro, mantendo a citoarquitetura tridimensional do tecido, a conectividade neural regional e a maioria dos principais tipos de células presentes no sistema, tornando estas culturas um modelo conveniente para investigar o comportamento e fisiologia de uma célula considerando as interações celulares e ambientais do tecido original (Hill *et al.*, 2014).

As fatias organotípicas apresentam uma maior sobrevivência a longo prazo devido ao seu método de processamento e manutenção. O tecido é inicialmente cortado em fatias, de 200 a 500 μm usando um fatiador de tecidos, que são, posteriormente, mantidas em cultivo em inserções de membrana porosa de 0,4 μm feita de politetrafluoretileno (PTFE), que permitem interface ar-líquido, onde podem ser mantidas por até 4 semanas. As inserções de membranas de PTFE são permeáveis e inertes, permitindo que moléculas ou agentes terapêuticos adicionados ao meio permeiem a fatia. As culturas podem ser acompanhadas por observação em microscópio invertido, visualizado pela parte inferior da placa e da inserção da

membrana (Sekizar; Williams, 2019).

Fatias cerebrais organotípicas são frequentemente preparadas a partir de cérebros de roedores pós-nascimento, devido à maior viabilidade das fatias em comparação com o tecido adulto. Entretanto, as diferenças entre cérebros de roedores jovens e adultos em termos de estrutura, função e propriedades fisiológicas é uma preocupação ao estudar doenças neurodegenerativas em que o envelhecimento é um fator, como a EM. Por isso, culturas organotípicas de tecido adulto do SNC de camundongos têm sido mais comumente usadas a fim de testar potenciais compostos para neuroproteção (Tan *et al.*, 2018).

Após o estabelecimento das fatias em cultura, drogas ou moléculas (Sekizar; Williams, 2019), ou ainda, agentes desmielinizantes como a lisolecitina (Birgbauer; Rao; Webb, 2004), podem ser adicionadas ao meio para promover desmielinização experimental ou alterar a taxa de mielinização ou remielinização, permitindo a triagem de potenciais compostos pró-remielinizantes (Sekizar; Williams, 2019) e que sejam impermeáveis a estes compostos.

Terapêuticas que afetam a modulação inflamatória e imunomoduladora no SNC podem ser determinantes críticos do resultado funcional a longo prazo na EM, visando não somente o alívio dos sintomas, mas também o retardo na progressão da doença (Cunniffe; Coles, 2021). Por isso, mais estudos acerca de novos agentes com ação anti-inflamatória e protetora precisam ser desenvolvidos.

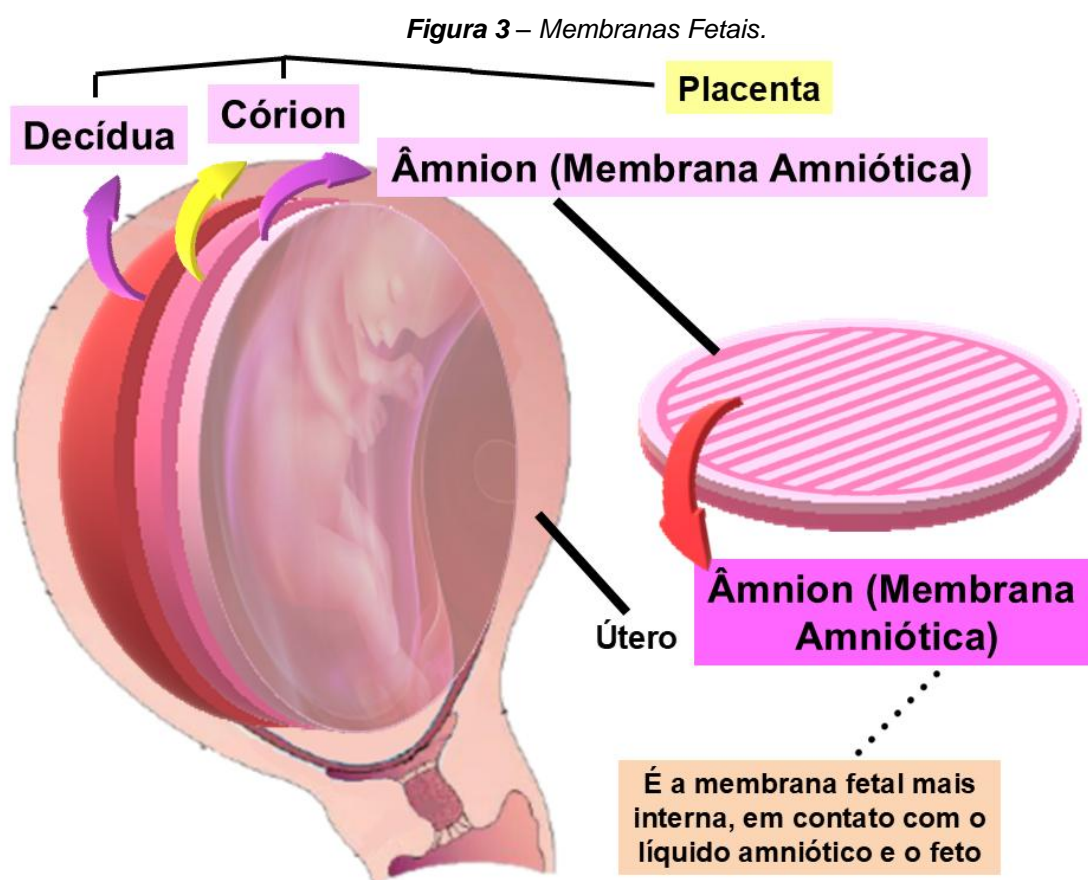
Neste contexto, devido às suas diversas propriedades terapêuticas, a MA se configura como potencial alternativa, modulando a inflamação e favorecendo a regeneração do tecido, além de exercer um efeito protetor por sua ação impermeável, impedindo a passagem dos agentes desmielinizantes aplicados sobre o tecido nervoso.

3.3 MEMBRANA AMNIÓTICA

3.3.1 Estrutura Anatômica e Histologia

A MA, também chamada de Âmnion, é a camada mais interna das duas membranas fetais humanas (Placenta e Âmnion) e está em contato com o líquido amniótico e o feto, envolvendo o embrião em desenvolvimento. A placenta, camada mais externa, é dividida em duas partes: a porção fetal, derivada do córion, e a porção

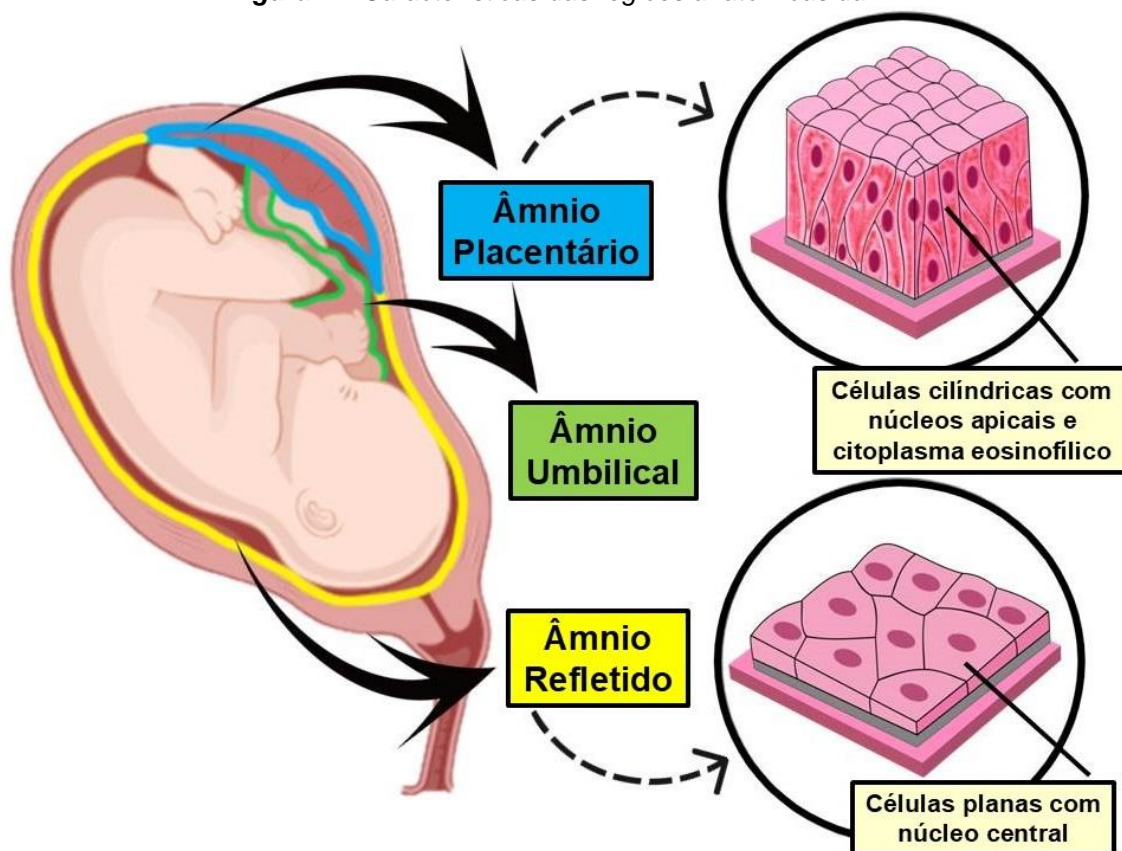
materna, derivada da decídua basal (Figura 3) (Farhadhosseinabadi *et al.*, 2018).



A MA possui uma estrutura complexa, dividida em diferentes regiões anatômicas (Figura 4). A primeira subdivisão anatômica da MA é o âmnio placentário, que é formado por células cilíndricas, apresentando núcleos apicais e citoplasma eosinofílico. Dentro do âmnio placentário, pode-se distinguir três áreas principais: a área periférica, a área intermediária e a área central (Figuras 5 e 6). A região central do âmnio placentário é composta principalmente por células epiteliais cuboidais, com algumas delas separadas por microvilosidades laterais e espaços intercelulares. A região intermediária apresenta células com formato de cúpula, ligeiramente menores do que as células da região central. Já as células da região periférica são mais altas e colunares, com microvilosidades longas tanto na porção apical quanto lateral, além de várias mitocôndrias no citoplasma. Por fim, a região refletida apresenta células cuboidais, mais unidas entre si, com microvilosidades curtas na porção apical (Basile *et al.*, 2023). Além do âmnio placentário, a MA inclui o âmnio umbilical, uma região que reveste o cordão umbilical. Por fim, a última região da MA é o âmnio refletido, que

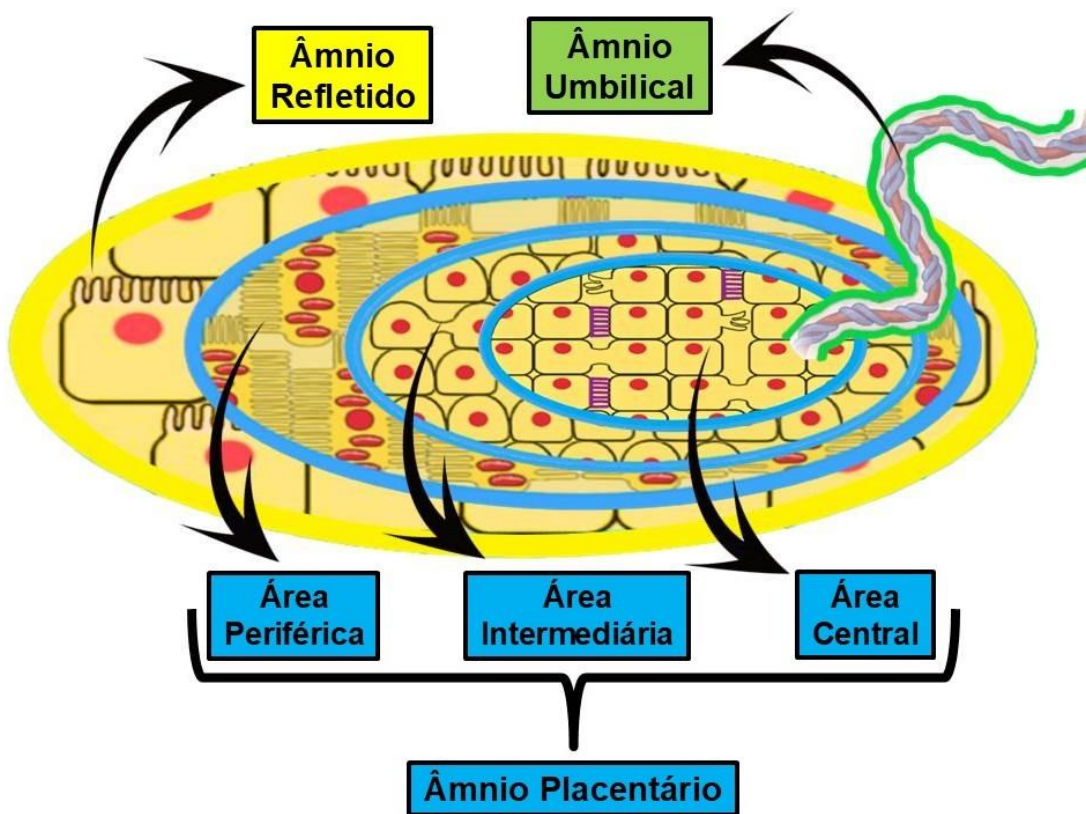
é caracterizado por células planas com núcleos centrais (Weidinger *et al.*, 2021).

Figura 4 – Características das regiões anatômicas da MA.



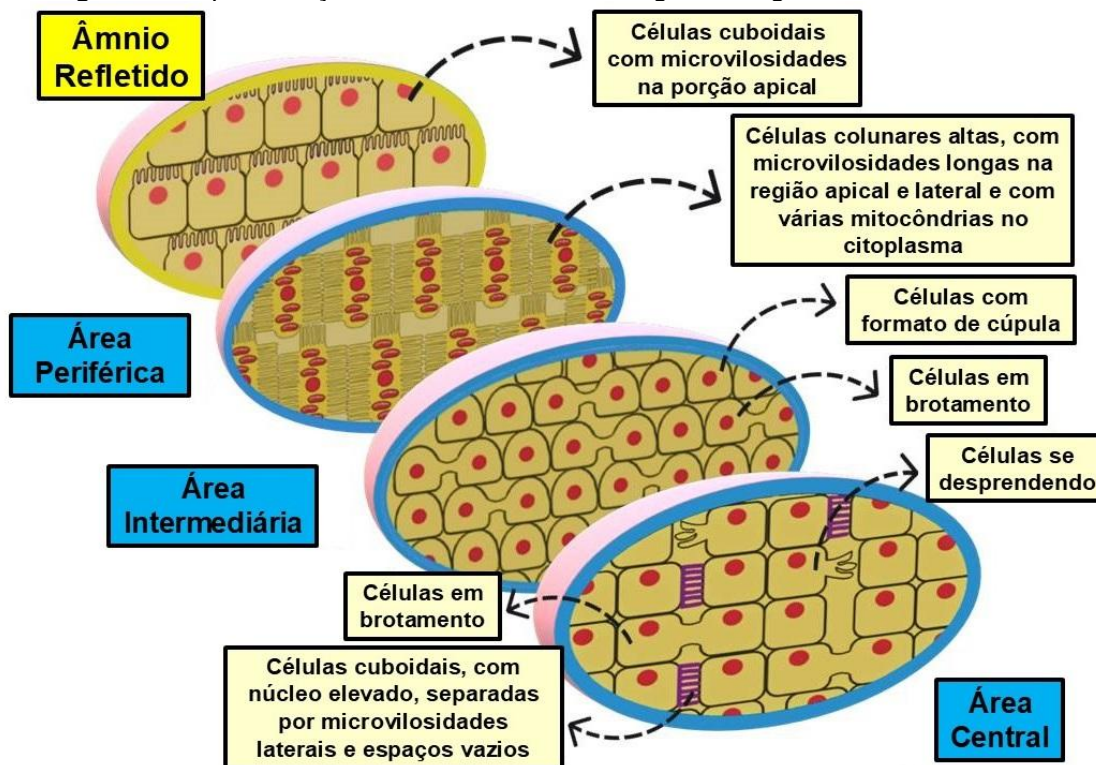
Fonte: Autora (2024).

Figura 5 – Representação bidimensional da histologia das regiões anatômicas da MA.



Fonte: Autora (2024).

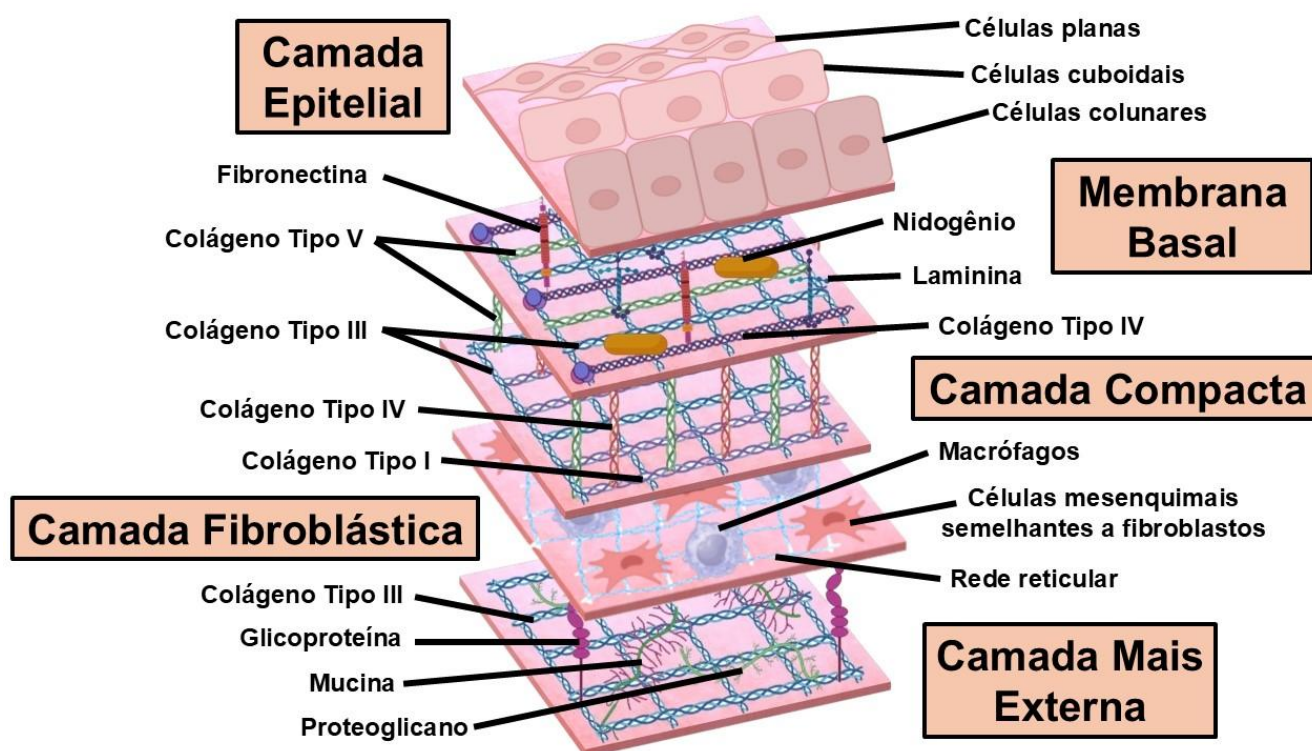
Figura 6 - Representação tridimensional da histologia das regiões anatômicas da MA.



Fonte: Autora (2024).

A MA é composta por cinco camadas histologicamente distintas, organizadas de dentro para fora (Figura 7) (Farhadhosseinabadi *et al.*, 2018). A camada epitelial consiste em uma única camada de células epiteliais cuboidais, planas e colunares, com propriedades semelhantes às células-tronco (Kellar; Diller, 2017). Esta camada repousa sobre uma membrana basal, que contém vários componentes, incluindo colágenos tipo III, IV e V, lamininas, fibronectina e nidogênio (Dietrich-Ntoukas *et al.*, 2012). Abaixo da membrana basal, encontra-se uma camada acelular compacta rica em colágeno, composta principalmente pelos colágenos tipo I e III (Niknejad *et al.*, 2008). O colágeno tipo VI interage com o colágeno tipo IV nas membranas basais, potencialmente ancorando-as à matriz circundante (Kuo *et al.*, 1997). A camada fibroblástica, por sua vez, é composta por células mesenquimais semelhantes a fibroblastos e macrófagos escassos, formando uma rede (Ockleford *et al.*, 1993). Por fim, a camada mais externa é uma estrutura esponjosa rica em mucina e proteoglicanos hidratados que permite a absorção de choque e o deslizamento entre o âmnio e o córion (Méhats *et al.*, 2011).

Figura 7 – Representação das camadas histológicas da MA.



Fonte: Autora (2024).

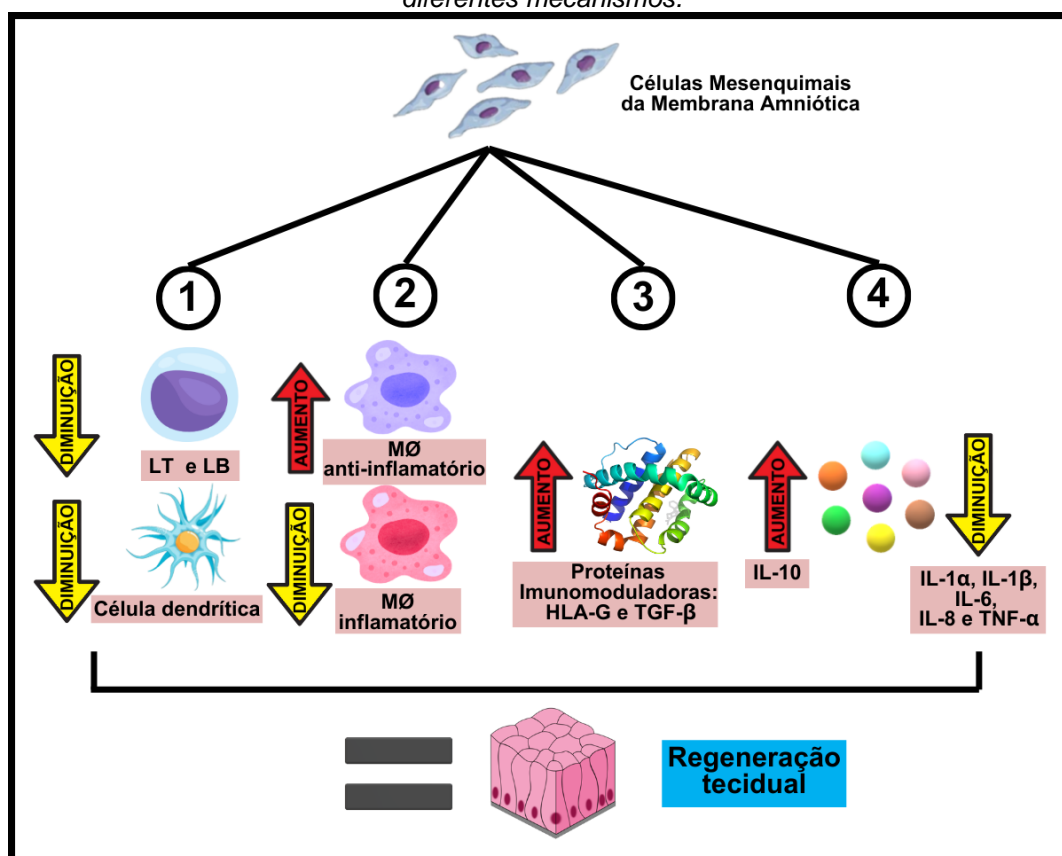
3.3.2 Propriedades da Membrana Amniótica nas Alterações Desmielinizantes

A MA é reconhecida como uma fonte de células com propriedades imunomodulatórias que podem ser utilizadas em aplicações de regeneração tecidual. Estudos têm demonstrado que as células amnióticas expressam proteínas imunomodulatórias, como Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) e Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), que podem suprimir a resposta imune, promovendo tolerância imunológica (Hoseini *et al.*, 2020; Xu; Zhou; Wei, *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021a), a fim de favorecer a regeneração tecidual e modular a inflamação. A expressão dessas proteínas varia de acordo com a localização das células na MA, com níveis mais elevados observados na área placentária da membrana (em contato com a placenta), em relação à área refletida (que está em contato com o líquido amniótico). Em contrapartida, a expressão de moléculas imunológicas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe I e II, pelas células amnióticas ainda é controversa na literatura, bem como sua capacidade de induzir uma reação imune. Estudos relatam tanto baixa expressão quanto expressão constitutiva dessas moléculas pela MA, ou seja, o MHC pode fazer parte de sua constituição, não necessitando de estímulo para expressá-lo. Isso pode indicar uma alta heterogeneidade celular entre placentas e regiões da placenta, resultando em possíveis problemas de compatibilidade imunológica em aplicações clínicas (Wassmer; Berishvili, 2020).

A MA é uma fonte rica em fatores solúveis que são capazes de suprimir a proliferação de células T, modulando a polarização de células T para o fenótipo regulatório Treg e de suprimir a ativação de células T efectoras (Th1 e Th17) (Pianta *et al.*, 2015), cujas últimas estão relacionadas com a progressão da EM (Orsini *et al.*, 2014). Essas propriedades imunomoduladoras tornam a MA uma fonte promissora para o desenvolvimento de terapias celulares e baseadas em fatores solúveis para doenças imunomediadas (Pianta *et al.*, 2015), como a EM. Magatti *et al.* (2015) verificaram, ainda, que há uma diferença entre as propriedades e potencialidades dos tipos de células que compõem a MA, sendo elas as células mesenquimais e epiteliais. Os resultados mostram que as células mesenquimais da MA inibem a diferenciação e maturação das células dendríticas, enquanto as células epiteliais não têm efeito

significativo (Figura 8). Em outro estudo, Magatti *et al.* (2017) corroboraram as potencialidades terapêuticas das células mesenquimais da MA, desta vez, avaliando seu efeito na polarização de macrófagos. Os resultados mostraram que as células mesenquimais aumentam a expressão de marcadores M2 e diminuem a expressão de marcadores M1, induzindo a polarização de macrófagos do subtipo M1 (pró-inflamatórios) que se diferenciam no subtipo M2 (anti-inflamatórios), indicando, assim, uma mudança no fenótipo dos macrófagos que fazem uma transição funcional de um estado pró-inflamatório para um estado anti-inflamatório. Além disso, as células mesenquimais aumentaram a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, e reduziram a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-8 e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α).

Figura 8 – Esquema ilustrando as propriedades imunomoduladoras das células da MA por meio de diferentes mecanismos.



Fonte: Autora (2024).

Correlacionando com suas propriedades imunomoduladoras, a MA também tem sido estudada como uma potencial ferramenta terapêutica para combater a inflamação tecidual. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que a MA pode reduzir a inflamação em diversos tecidos, incluindo a córnea, o fígado e os pulmões.

Acredita-se que a capacidade anti-inflamatória da MA esteja relacionada à presença de células-tronco e fatores de crescimento que podem modular a resposta imune, inibindo a proliferação de células T e B, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias e suprimindo a atividade das células dendríticas, que são importantes na ativação das células T (Manuelpillai *et al.*, 2011).

Devido às propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da MA, o processo de regeneração tecidual também é favorecido, podendo ser utilizada como um suporte para o crescimento de células-tronco e como um curativo para cobrir e reparar defeitos teciduais (Manuelpillai *et al.*, 2011). Em um estudo, a aplicação da MA demonstrou reduzir a fibrose hepática em um modelo de rato com ligadura de ducto biliar, sugerindo o potencial da MA como uma abordagem na atenuação das complicações associadas a doenças hepáticas (Sant'Anna *et al.*, 2011). Os efeitos regenerativos da MA estendem-se também aos tecidos cutâneos, visto que em experimentos com ratos, a aplicação da MA acelerou o processo de cicatrização de feridas na pele. Esses resultados demonstram a eficácia da MA ao agir como um facilitador natural na regeneração de tecidos, com potencial aplicação em tratamentos de feridas complexas e queimaduras (Campelo *et al.*, 2018). O campo da neurologia também tem se beneficiado da aplicação da MA. Estudos investigaram o uso da MA no tratamento de lesões da medula espinhal e regeneração de nervos periféricos. A aplicação da MA mostrou-se capaz de promover a regeneração de nervos periféricos, além de apresentar propriedades favoráveis para o tratamento de lesões na medula espinhal, indicando que a MA pode ter um impacto significativo na melhoria da função neurológica e recuperação após lesões na medula espinhal (Arisawa *et al.*, 2017). Além disso, a utilização da MA também tem sido explorada em modelos animais que visam avaliar a regeneração de nervos periféricos. Ao envolver os nervos com a MA, estudos têm demonstrado um aumento na regeneração e recuperação funcional dos nervos periféricos, sugerindo seu potencial para promover melhora clínica em casos de lesões nervosas periféricas (Wolfe *et al.*, 2022; Iwao *et al.*, 2023).

Além do seu potencial regenerativo, os efeitos imunomodulatórios da MA podem ajudar na prevenção da rejeição de transplantes, além de serem benéficos no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes (Manuelpillai *et al.*, 2011), como a EM. A MA oferece uma fonte potencial de células-tronco mesenquimais (MSCs), que é uma abordagem promissora para tratar a EM. As MSCs, conhecidas como células-

tronco mesenquimais amnióticas humanas (hAMSCs), possuem características anti-inflamatórias, anti-fibrose, anti-cicatrização e baixa imunogenicidade. Assim, as hAMSCs demonstram propriedades como imunomodulação, angiogênese, neuroproteção, expressão de fatores neurotróficos, como Fator de Crescimento Nervoso (NGF), Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF) e Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF), que são importantes para a saúde neuronal, além de favorecer e estimular o processo de remielinização (Abbasi-Kangevari *et al.*, 2019).

Dessa forma, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, neuroprotetoras e imunomodulatórias, e à sua estrutura composta por múltiplas camadas com colágenos e células especializadas, a MA é uma abordagem terapêutica promissora em doenças desmielinizantes. Espera-se que ela seja não somente capaz de atenuar respostas imunes exacerbadas e proteger tecidos nervosos contra danos, mas também criar um microambiente favorável para a regeneração do SNC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA PLACENTA E PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sob o número de parecer 6.389.780 (ANEXO A) e do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo A3CEUA/2023 (ANEXO B).

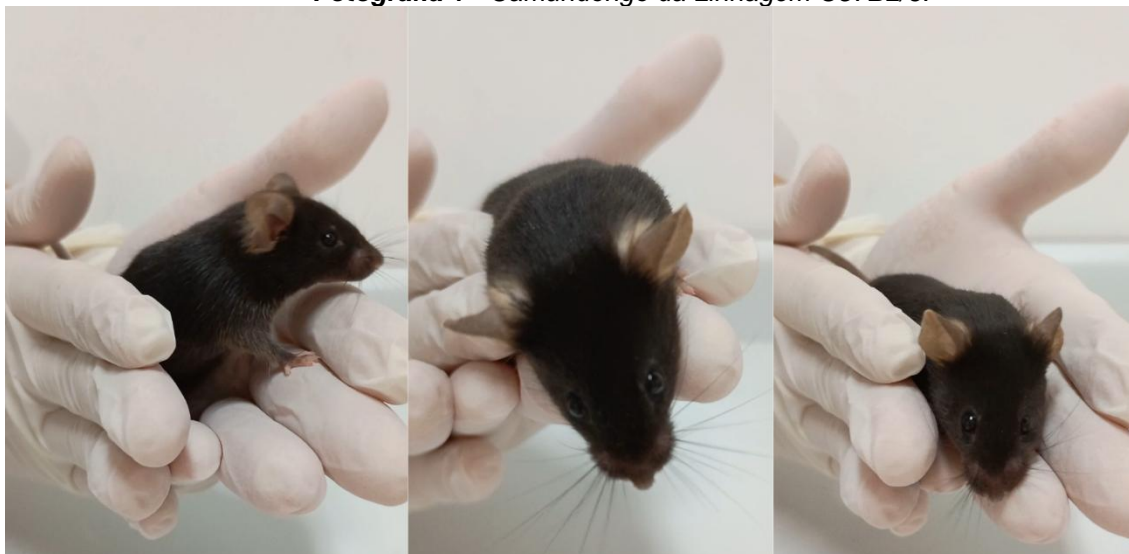
Após a aprovação do CEP, 10 placentas humanas a termo (gestação que atingiu a fase final do desenvolvimento fetal), com idade gestacional igual ou superior a 39 semanas, foram obtidas de cesáreas eletivas de mulheres com gestação normal, na maternidade do Hospital Santa Casa de São José dos Campos, após o consentimento materno mediante à assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e após certificação dos resultados negativos para Hepatite B e C, sífilis e HIV-1 e 2.

A MA foi transportada ao laboratório no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento sob refrigeração em torno de 10 a 15°C, onde, em condições estéreis, foi separada manualmente da membrana coriônica e lavada extensivamente em solução salina fisiológica contendo 100 U/ml de penicilina, 100 µ/ml de estreptomicina e anfotericina B. A MA foi cortada em fragmentos de dimensão adequada (2 × 2 cm) e marcada de forma a possibilitar a identificação da face mesenquimal para serem colocadas em placa de 6 poços a fim de cobrir as fatias de cérebro que estavam cultivadas nos poços. Os pedaços foram armazenados separadamente em temperatura ambiente em frascos de 50 ml contendo meio de cultura DMEM sem soro e sem fenol vermelho em condições estéreis, até a aplicação (Sant'Anna *et al.*, 2011, 2017).

4.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos, utilizou-se camundongos da linhagem C57BL/6 (Fotografia 1). Os camundongos foram adquiridos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram transportados para São José dos Campos em caixas apropriadas, equipadas com maçãs para prevenir a desidratação durante o trajeto.

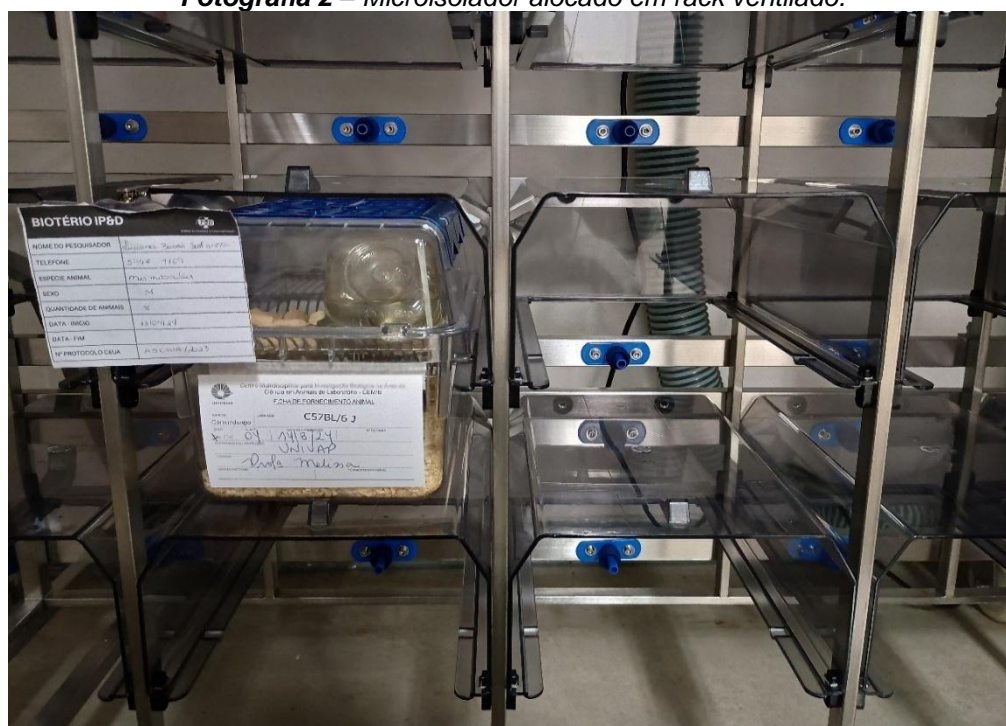
Fotografia 1 - Camundongo da Linhagem C57BL/6.



Fonte: Autora (2024).

Ao chegarem em São José dos Campos, os camundongos foram alojados no Biotério do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), que dispõe de infraestrutura adequada para a manutenção e cuidado dos animais. Eles foram mantidos em microisoladores alocados em racks ventilados (Fotografia 2), com três animais por unidade. Durante o período de alojamento, receberam água e ração *ad libitum*, além de rolos de papel higiênico como enriquecimento ambiental. A temperatura ambiente foi mantida em aproximadamente 22 °C, com um ciclo claro/escuro de 12 horas. A limpeza dos microisoladores foi realizada três vezes por semana, incluindo a troca da maravalha e a reposição de água e ração (Fotografia 3).

Fotografia 2 – Microisolador alocado em rack ventilado.



Fonte: Autora (2024).

Fotografia 3 – Limpeza dos Microisoladores.



Fonte: Autora (2024).

Abaixo encontra-se a Tabela 1, esquematizando o delineamento experimental da pesquisa, organizando os Grupos Experimentais adotados neste trabalho. O Grupo Controle Sadio (C-S) refere-se ao grupo cujas fatias organotípicas não passaram pelo processo de desmielinização e não receberam aplicação da MA sobre as fatias. No Grupo Controle Desmielinização (C-DESM), as fatias organotípicas foram desmielinizadas com liolecitina, mas não receberam aplicação de MA. No Grupo

Controle Membrana (C-MA), as fatias organotípicas não foram desmielinizadas, mas receberam a MA, que foi posicionada por cima das fatias. Por fim, no Grupo Membrana Desafio Lisoletina (MA-LISO), três folhetos de MA foram posicionados sobre a fatia cerebral, seguidos pela aplicação de lisoletina diretamente sobre a fatia protegida pela MA. O objetivo foi avaliar a eficácia da MA em proteger o tecido contra a desmielinização induzida pelo agente desmielinizante. Dessa forma, a MA foi desafiada pela lisoletina para determinar sua capacidade de atuar como uma barreira protetora, preservando a integridade da bainha de mielina nas condições experimentais propostas.

Cada uma das três análises foi realizada em triplicata. Cada análise em triplicata será feita em placa de 6 poços, nos quais será colocada 1 fatia organotípica por poço.

Antes do início dos experimentos, foi realizado um Projeto Piloto, no qual cada uma das análises de todos os grupos foi feita uma vez. Assim, o número de análises do Projeto Piloto (1x) foi somado às triplicatas dos Grupos Experimentais (3x), a fim de quantificar, ao final, quantas fatias organotípicas e, conseqüentemente, quantos animais seriam necessários.

Após calcular o número de fatias organotípicas necessárias (48 fatias) e considerando que cada animal fornecia seis fatias de cérebro, foi possível calcular o número de animais necessários para o desenvolvimento da pesquisa, totalizando oito animais, conforme demonstrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Grupos Experimentais.

GRUPOS	ANÁLISES	FATIAS	ANIMAIS
Grupo Controle Sadio (C-S)	Análise Histológica (4x)	4	0,25
	MEV (4x)	4	0,25
	TTC (4x)	4	0,25
Grupo Controle Desmielinização (C-DESM)	Análise Histológica (4x)	4	0,25
	MEV (4x)	4	0,25
	TTC (4x)	4	0,25
Grupo Controle Membrana (C-MA)	Análise Histológica (4x)	4	0,25
	MEV (4x)	4	0,25
	TTC (4x)	4	0,25
Grupo Membrana Desafio Lisoletina (MA-LISO)	Análise Histológica (4x)	4	0,25
	MEV (4x)	4	0,25
	TTC (4x)	4	0,25
TOTAL =		48	8

Fonte: Autora (2024).

4.3 CONFECÇÃO DO FATIADOR DE TECIDOS ORGANOTÍPICOS

Durante o planejamento dos experimentos, identificou-se a necessidade de um equipamento específico, comercialmente denominado Fatiador de Tecido McIlwain, para a obtenção das fatias organotípicas. Este aparelho é projetado para realizar cortes micrométricos em órgãos, incluindo o tecido cerebral com alta precisão. Contudo, devido ao seu elevado custo e à sua origem importada, a aquisição do equipamento não era viável no momento.

Dessa forma, para viabilizar a realização dos experimentos, antes de iniciá-los, procedeu-se com a confecção de um equipamento similar, que executasse a mesma função. O equipamento foi projetado para ser automatizado, todo eletrônico, controlado por um Arduino e equipado com motores que garantissem movimentos precisos e repetitivos, e com a estrutura externa feita de material de impressão 3D (PLA). Para isso, foi necessário o estudo da linguagem de programação utilizada no Arduino, além de conceitos básicos de eletrônica e técnicas de modelagem e impressão 3D.

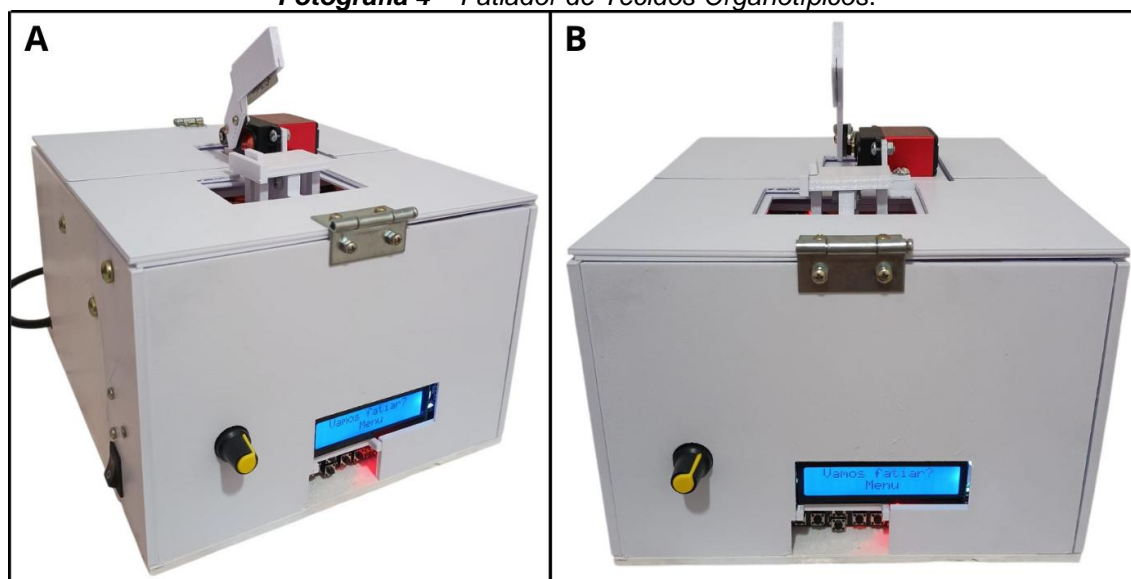
O equipamento desenvolvido (Fotografias 4 e 5) apresenta alguns diferenciais em relação aos modelos comercializados atualmente, destacando-se pelo design digital, que inclui um display com menu de opções e controle eletrônico, e por sua confecção original, com estrutura mecânica e elétrica projetada de forma autoral. O equipamento conta com as seguintes opções de tamanho de fatiamento, selecionáveis no menu digital: 250 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm , 450 μm e 500 μm . Os tamanhos de fatiamento foram caracterizados para validação utilizando massa de modelar sobre a mesa. Após selecionar o tamanho de corte desejado, o fatiador iniciava seu funcionamento, e a lâmina abaixava, deixando uma marca na massa ao repousar sobre a mesa no tamanho de corte selecionado. O intervalo entre as marcações da lâmina foi medido com um paquímetro digital para confirmar a precisão do tamanho estabelecido.

Além disso, seu custo reduzido, associado à produção nacional e à comercialização em moeda local (Real), torna o equipamento mais acessível para pesquisadores brasileiros, eliminando a necessidade de importação e os custos associados à variação cambial.

Devido a esses diferenciais, o equipamento foi depositado no Instituto Nacional

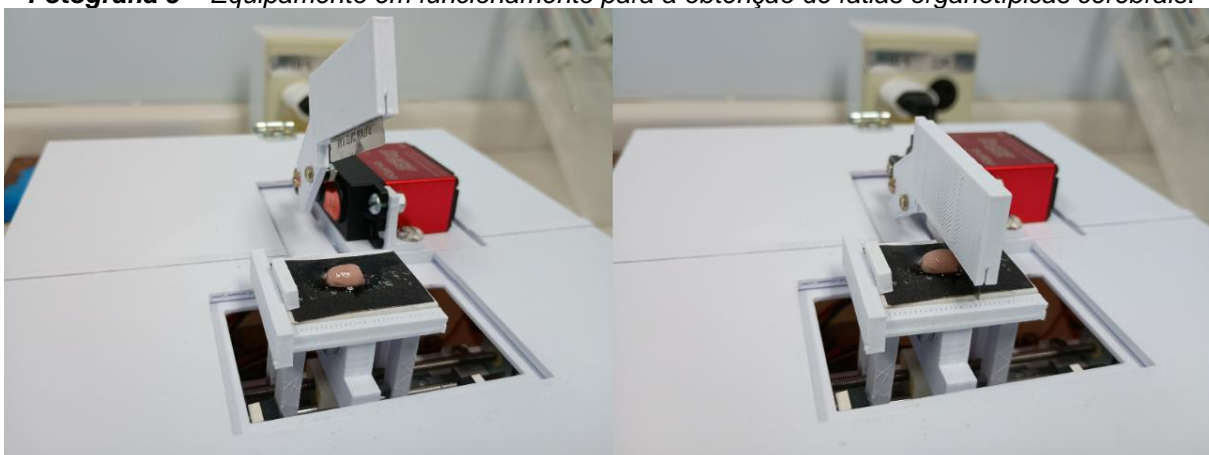
da Propriedade Industrial (INPI) como patente de Modelo de Utilidade, considerando seu potencial inovador e a possibilidade de contribuir significativamente para a pesquisa científica no país. A patente permitirá a disseminação do equipamento no mercado nacional como uma solução econômica e eficiente para a obtenção de fatias organotípicas.

Fotografia 4 – Fatiador de Tecidos Organotípicos.



Fonte: Autora (2024).

Fotografia 5 – Equipamento em funcionamento para a obtenção de fatias organotípicas cerebrais.



Fonte: Autora (2024).

4.4 PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DAS FATIAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO

A seguir será apresentada a metodologia que foi utilizada para a cultura das fatias organotípicas, cujo protocolo foi descrito por Shen e Yuen (2020) e Hill *et al.* (2014).

4.4.1 Preparação dos Meios de Cultura e Suprimentos para Dissecação

Foi preparado o meio de cultura Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 25% de soro fetal bovino, 25% de sais de Earle, 2,6 mg/mL de glicose 45%, 1% de glutamina, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). O meio de dissecação também foi preparado, com meio MEM e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). Ele foi utilizado para a preparação e manipulação das fatias de tecido antes de serem colocadas em uma placa de cultivo.

Com uma pinça estéril, foram colocadas inserções de membrana em cada poço de uma placa de 6 poços, garantindo que não houvesse bolhas presas sob a membrana. Foi pipetado em cada poço da placa, 1 ml de MEM suplementado.

A placa foi levada a uma estufa a 37° C e 7,5% de CO₂ para ser aquecida, pelo menos 2 horas antes da dissecação.

4.4.2 Preparação da Área de Dissecação

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar. Todas as áreas foram limpas com etanol 70%.

Inicialmente, uma nova lâmina e o estágio de corte de silicone foram colocados no fatiador de tecidos. Foram pipetados 300 µL de etanol 70% sob o estágio de corte para garantir que permanecesse no lugar, a lâmina do fatiador foi suavemente limpa com cotonete e posteriormente seca antes de utilizar o fatiador. Todas as ferramentas de dissecação foram pulverizadas com etanol a 70% e secas antes da dissecação.

Duas placas de Petri de 10 cm foram reservadas: uma com 15 mL de MEM suplementado; e outra com 10 mL de meio de dissecação. As placas foram armazenadas no gelo enquanto não estavam sendo usadas na dissecação. O tampão de dissecação foi oxigenado com 95% oxigênio e colocado no gelo por pelo menos 15

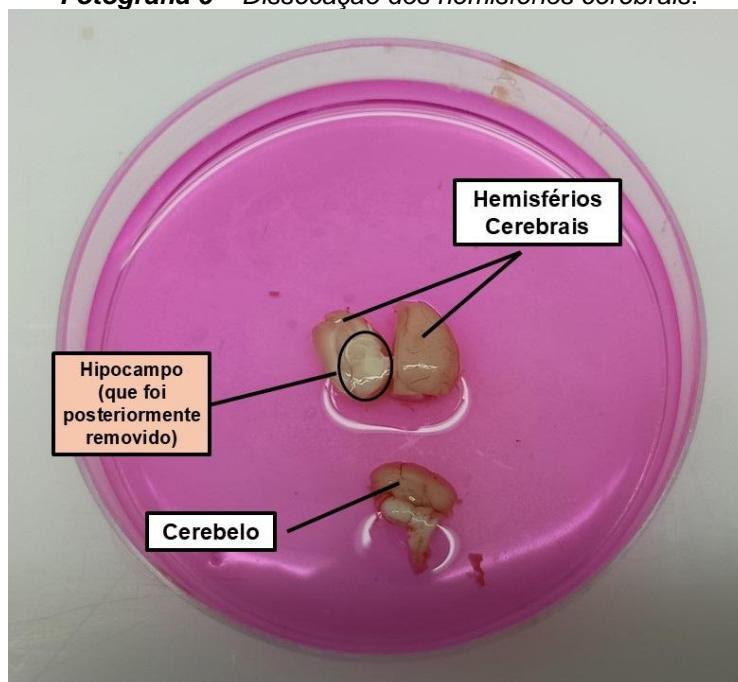
minutos antes do início da dissecação.

4.4.3 Dissecação e Cultura da Fatia Cerebral

Inicialmente, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção do cérebro, sendo importante ressaltar que nenhuma intervenção invasiva foi realizada enquanto os camundongos estavam vivos, pois todas as etapas experimentais foram conduzidas *in vitro*. O protocolo de eutanásia adotado assegurou o bem-estar animal e a ausência de sofrimento. Inicialmente, os camundongos foram sedados com uma combinação de xilazina, cetamina e fentanil, seguida de anestesia geral com tiopental. Após a confirmação de que os animais atingiram o plano anestésico adequado, foi administrada uma dose reforçada de tiopental para garantir o plano anestésico profundo e o início de depressão cardiorespiratória significativa. Após certificar-se de que os animais estavam profundamente anestesiados, assegurando que estivessem em um estado de hipnose completo e ausência de consciência, realizou-se a perfusão intracardíaca com cloreto de potássio para induzir a parada cardíaca.

Após a eutanásia, os animais foram decapitados, e o crânio sobre o prosencéfalo e cerebelo foi rapidamente removido, primeiramente com um corte sagital seguido de uma incisão lateral, utilizando ferramentas esterilizadas. Os nervos cranianos foram cortados da superfície ventral do cérebro e do cerebelo, rolando cuidadosamente o tecido para o lado. O tecido foi colocado em uma placa estéril de 35 mm contendo meio de dissecação. Utilizando uma lâmina de bisturi, o cerebelo foi separado do cérebro anterior. Em seguida, os hemisférios foram separados por meio de um corte médio-sagital no cérebro anterior e no cerebelo (Fotografia 6). Para permitir melhor visualização da substância branca na análise histológica, o hipocampo foi removido, deixando apenas o córtex cerebral com a substância branca mais internamente.

Fotografia 6 – Dissecação dos hemisférios cerebrais.



Fonte: Autora (2024).

Com uma espátula, o cérebro foi transferido para a fase de corte do fatiador de tecido, com o tecido repousando sobre a face rostral do rombencéfalo e a face caudal do rombencéfalo voltada para o pesquisador. Com uma pipeta P200, o excesso de meio ao redor do tecido foi removido, certificando-se de que o tecido permanecesse úmido, mas não flutuando em líquido. Em seguida, o tecido foi cortado em fatias de 400 μ M utilizando o fatiador de tecidos organotípicos.

Após o corte, foram pipetados 100 μ L de meio MEM suplementado sob o tecido para que as fatias ficassem flutuando. O tecido cortado foi transferido com uma espátula para a placa de Petri previamente separada contendo meio MEM suplementado. Com uma espátula e um pincel fino, as fatias organotípicas foram separadas cuidadosamente e posteriormente transferidas para os insertos de membrana posicionados nos poços da placa, contendo MEM suplementado, cuja placa foi previamente incubada na estufa para ser aquecida. Uma fatia de cérebro foi colocada em cada inserto presente no poço da placa. As fatias na placa de 6 poços foram incubadas com MEM suplementado, a 37 °C, em 7,5% de CO₂.

4.5 EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

4.5.1 Desmielinização Induzida por Lisolectina e Aplicação da Membrana Amniótica

O agente desmielinizante utilizado foi a lisolectina (L- α -Lysophosphatidylcholine from egg yolk, Sigma). Inicialmente, a lisolectina foi diluída na concentração de 100 mg para 0,8 mL de tampão fosfato-salino (PBS) estéril. A solução foi alíquotada em microtubos de centrifugação contendo 80 μ L cada, e armazenada a -20 °C. Para os experimentos, a lisolectina armazenada foi diluída em MEM suplementado até atingir a concentração final de 5 mg/mL (Shen; Yuen, 2020)

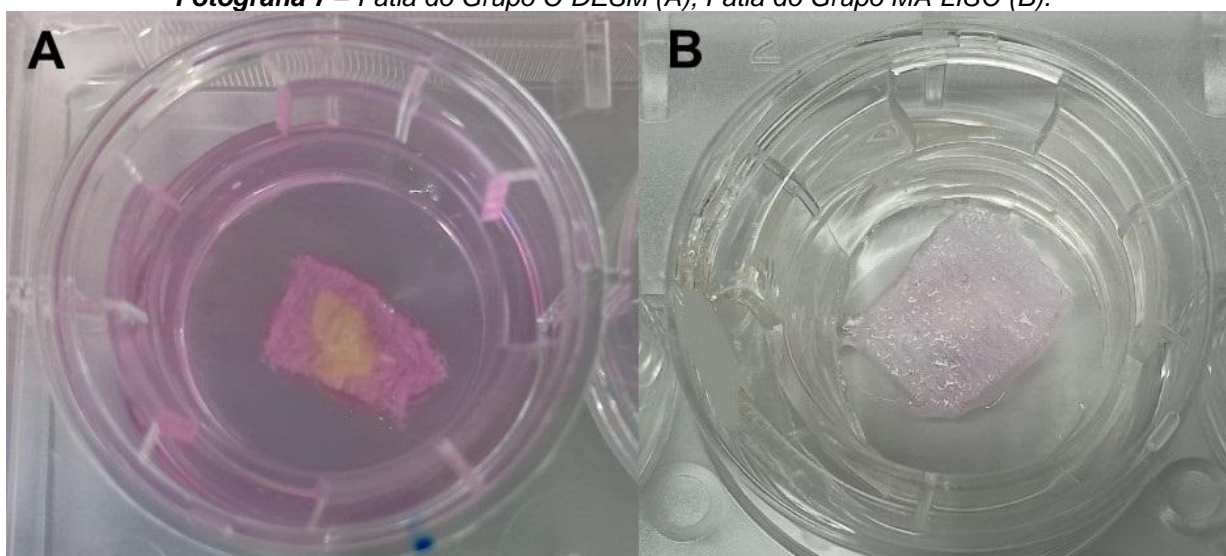
No grupo C-DESM (Fotografia 7A), o processo de desmielinização foi realizado utilizando duas estratégias: (1) aplicação direta de 100 μ L de lisolectina sobre as fatias organotípicas; e (2) posicionamento de um pequeno pedaço de papel de alta absorção (1x1 cm), embebido em lisolectina, sobre as fatias. A adoção de ambas as estratégias visou garantir uma desmielinização bem-sucedida, considerando o tempo limitado de ação da lisolectina sobre a fatia. Assim, além da aplicação direta, o uso do papel embebido permitiu aumentar a superfície de contato da lisolectina com o tecido, potencializando seu efeito.

Após a aplicação da lisolectina e a colocação do papel embebido, as fatias foram incubadas em MEM suplementado a 37 °C, com 7,5% de CO₂, por 30 minutos, para assegurar tempo suficiente para que a lisolectina promovesse a desmielinização, sem haver perda de viabilidade do tecido nervoso. O tempo de 30 minutos foi definido com base em testes preliminares realizados antes dos experimentos, com o objetivo de determinar o período em que a fatia permanecia viável enquanto a lisolectina promovia a desmielinização. Os resultados indicaram que esse tempo foi suficiente para induzir a desmielinização sem comprometer a viabilidade do tecido.

No grupo MA-LISO (Fotografia 7B), antes da aplicação da lisolectina, foram posicionados sobre as fatias organotípicas três folhetos de MA, cada um cortado com o auxílio de uma lâmina de bisturi em aproximadamente 1x1 cm (Fotografia 8). Após o posicionamento dos folhetos de MA, as mesmas estratégias de desmielinização empregadas no grupo C-DESM foram repetidas, incluindo a aplicação do papel de alta absorção embebido com lisolectina sobre os folhetos de MA que cobriam as fatias organotípicas. As fatias foram então incubadas em MEM suplementado a 37 °C, com

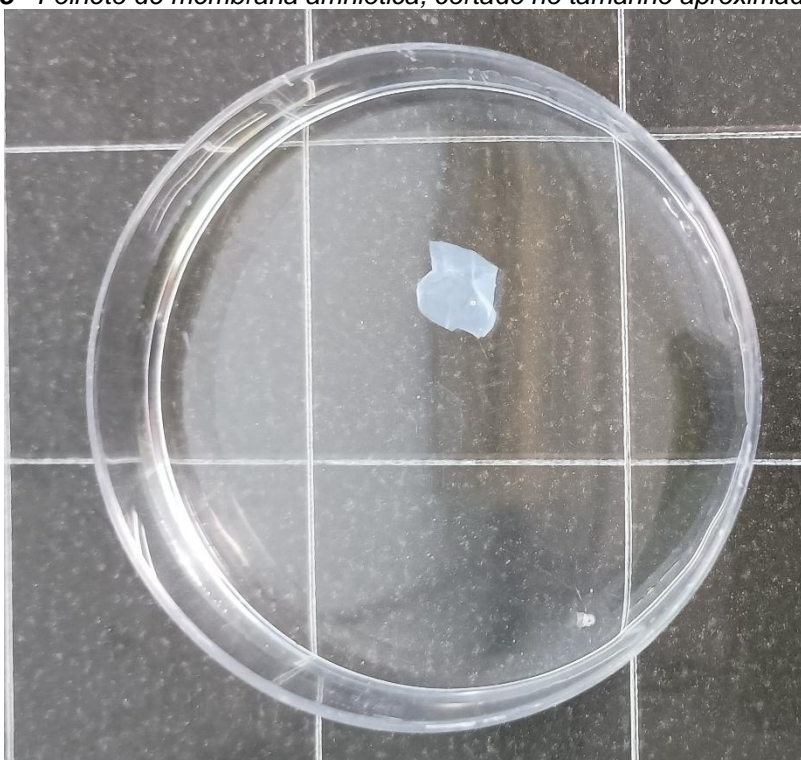
7,5% de CO₂, por 30 minutos, para garantir a uniformidade no procedimento experimental.

Fotografia 7 – Fatia do Grupo C-DESM (A); Fatia do Grupo MA-LISO (B).



Fonte: Autora (2024).

Fotografia 8 - Folheto de membrana amniótica, cortado no tamanho aproximado de 1x1 cm.



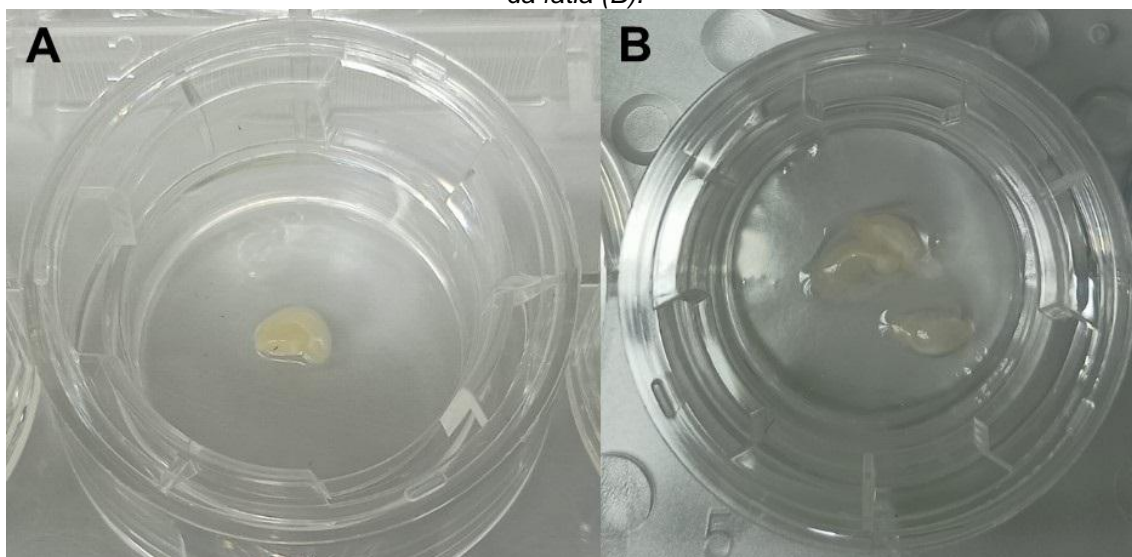
Fonte: Autora (2024).

4.5.2 Manutenção dos Grupos Controle Sem Desmielinização

No grupo C-S (Fotografia 10A), as fatias foram cortadas na etapa anterior e diretamente posicionadas nos insertos de membrana colocados nos poços da placa, sendo incubadas com MEM suplementado a 37 °C em 7,5% de CO₂, por 30 minutos, para seguir o procedimento experimental realizado com os outros grupos.

No grupo C-MA (Fotografia 10B), as fatias também foram cortadas na etapa anterior, posicionadas nos insertos de membrana, e 3 folhetos de MA, recortados em dimensões de aproximadamente 1x1 cm, foram posicionados em cima das fatias. Entretanto, elas não foram desafiadas com lisolecitina para promover desmielinização, visto que o objetivo deste grupo experimental era verificar se a MA sozinha promovia alguma ação nociva ou não para as fatias organotípicas. Da mesma forma como realizado com os outros grupos experimentais, as fatias também foram incubadas com MEM suplementado a 37 °C em 7,5% de CO₂, por 30 minutos.

Fotografia 10 – Fatia do Grupo C-S (A); Fatia do Grupo C-MA, com a MA colocada por cima da fatia (B).



Fonte: Autora (2024).

Após os 30 minutos de incubação, as fatias de todos os grupos experimentais foram removidas dos insertos cuidadosamente com o auxílio de um pincel fino e uma espátula, e foram destinadas para as análises propostas neste estudo: Análise Histológica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e avaliação da atividade metabólica utilizando o Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC).

4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DA MEMBRANA AMNIÓTICA

4.6.1 Análise Histológica e Quantitativa de Imagem

Após o tempo de incubação, as fatias de cérebro foram fixadas em formol tamponado a 10% a 4º por 24h, processadas por processamento histológico de rotina e embebidas em parafina. Cortes histológicos, semi-seriados, de 5 µm de espessura foram obtidos usando um micrótomo semi-automático (Leica RM2245) (Fotografias 11 e 12), e corados por meio de duas técnicas de coloração: Hematoxilina e Eosina (HE) e Luxol Fast Blue (LFB), coloração especial que cora de azul as bainhas de mielina.

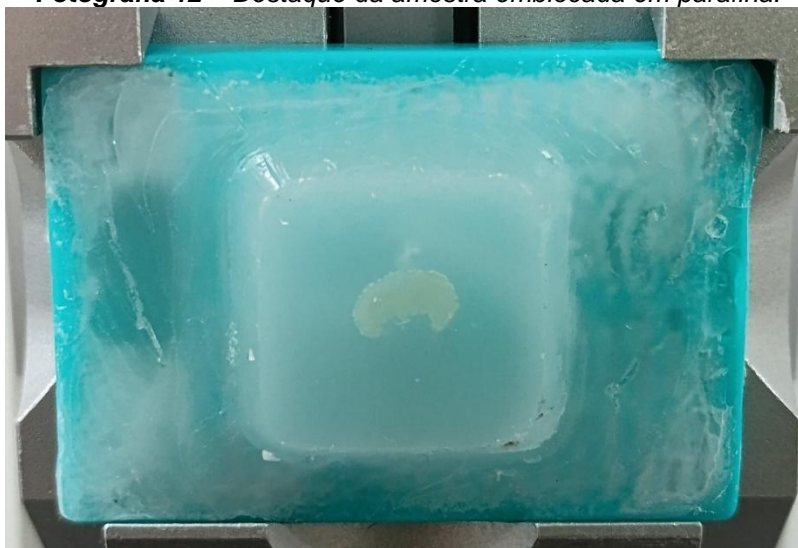
Para a coloração em HE, as lâminas foram desparafinizadas, reidratadas em série alcoólica decrescente, coradas com hematoxilina e eosina, desidratadas e montadas. Já a coloração com LFB envolveu reidratação, incubação na solução corante, diferenciação com carbonato de lítio e desidratação. Após os protocolos, as lâminas foram montadas com lamínula e meio de montagem para análise.

Fotografia 11 - Bloco histológico no micrótomo semi-automático Leica RM2245.



Fonte: Autora (2024).

Fotografia 12 – Destaque da amostra emblocada em parafina.

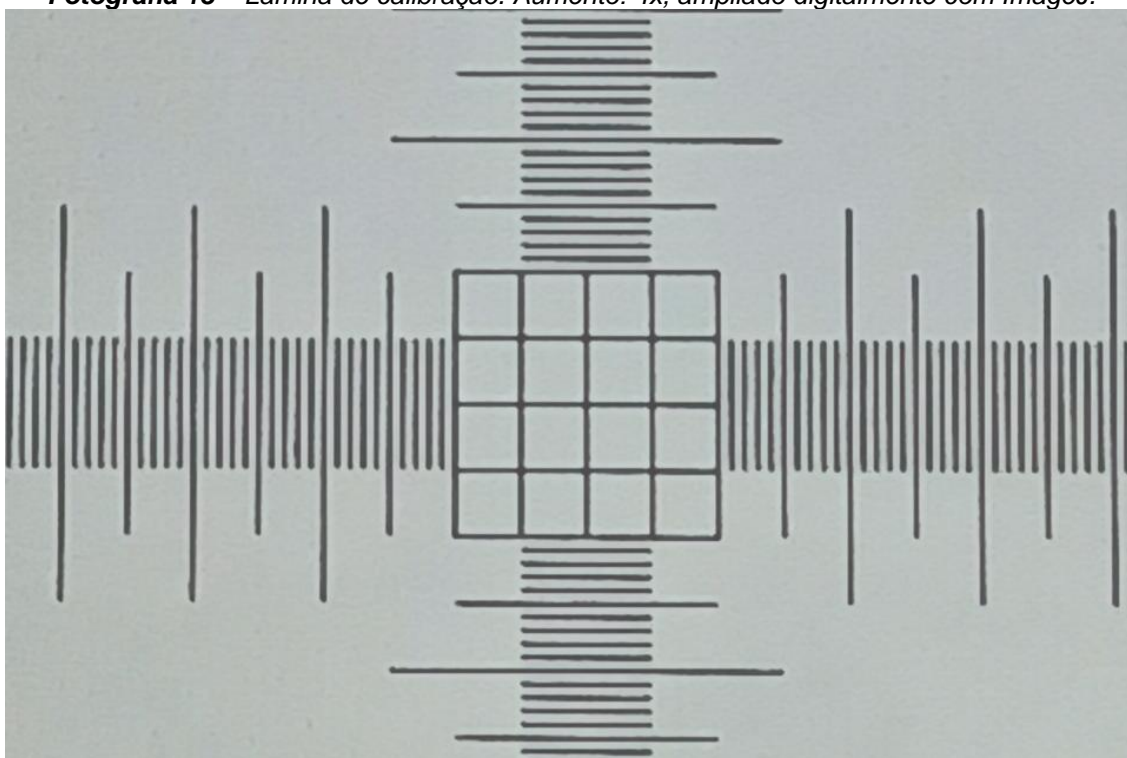


Fonte: Autora (2024).

As colorações foram avaliadas quantitativamente por análise histomorfométrica de imagem para a obtenção de uma relação entre as áreas desmielinizadas e áreas preservadas (ocupadas pela mielina), utilizando para isto, o programa de análise de imagem automática ImageJ. As imagens microscópicas da coloração foram capturadas por uma câmera de vídeo digital a 6120x8160 pixels, 8 bits, posicionada a um microscópio óptico binocular Olympus. Todas as imagens foram cortadas para focar na região de interesse, em tamanho padrão de 4841x3095 pixels e em seguida, foram avaliadas no ImageJ, quantificando as áreas com formação de microcavitações em relação à área total da imagem.

Antes de iniciar a quantificação das áreas desmielinizadas utilizando o software ImageJ, o programa foi calibrado com base em uma medida de referência conhecida, permitindo a conversão precisa dos pixels das imagens em unidades de medida reais. Para realizar essa calibração, foi utilizada uma lâmina de calibração (Fotografia 13) com intervalos regulares, em que cada divisão corresponde a 1 μm . Após a calibração, as áreas desmielinizadas nas imagens foram quantificadas em pixels, que foram posteriormente convertidos em unidades métricas para garantir a precisão dos dados analisados e minimizar possíveis variações decorrentes de diferenças na escala das imagens adquiridas.

Fotografia 13 – Lâmina de calibração. Aumento: 4x, ampliado digitalmente com ImageJ.

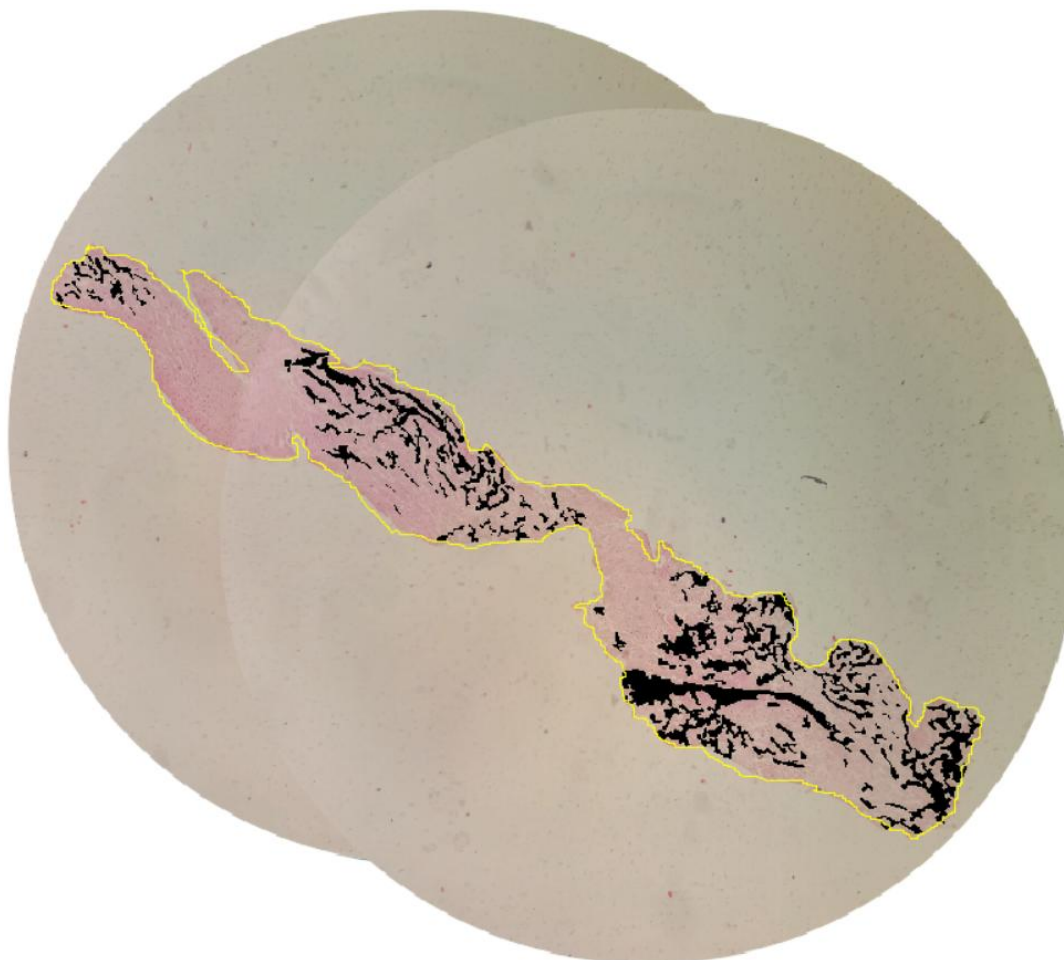


Fonte: Autora (2024).

Devido ao fato de algumas amostras não caberem em uma única imagem, mesmo utilizando a menor objetiva disponível (4x), foi necessário sobrepor duas fotografias para compor uma imagem completa da amostra (Fotografia 14). Essa imagem unificada permitiu o cálculo da área total da fatia e das áreas desmielinizadas. Posteriormente, a imagem da fatia completa foi carregada no software ImageJ, onde a ferramenta “Freehand Selections” foi utilizada para realizar seleções manuais das áreas de interesse.

Inicialmente foi feita a seleção de todo o perímetro de cada fatia, a fim de quantificar a área total de cada uma. Em seguida, cada microcavitação das fatias foram também selecionadas para quantificar a área correspondente à desmielinização. Após cada seleção, os comandos Ctrl + M foram utilizados para registrar o valor da área mensurada. Em seguida, a tecla “Delete” foi pressionada para apagar a área selecionada, marcando-a em preto e evitando que fosse incluída novamente nas medições subsequentes. As medidas das áreas desmielinizadas registradas foram somadas e o total subtraído da área total respectiva, a fim de calcular a área desmielinizada, a área preservada e o percentual de área preservada de cada fatia.

Fotografia 14 – Fotos sobrepostas para formar a fatia completa, permitindo cálculo da área total e das áreas desmielinizadas.



Fonte: Autora (2024).

4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após o cultivo em placa, as fatias foram imediatamente destinadas à análise por MEV. Cada fatia destinada ao MEV foi retirada dos insertos de membrana e diretamente posicionada em uma placa de 24 poços, onde foram imergidas em diferentes soluções presentes em cada poço da placa, que compunham o protocolo para a análise com o MEV.

Em cada solução, as fatias ficaram imersas por 10 minutos. Inicialmente, foram imergidas em Fixador (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5% + tampão cacodilato 0,05 mol), seguidas de álcool 50%, álcool 75%, álcool 100%, e, por fim, em uma mistura de Hexametildisiloxano (HDMS) com álcool 100% (na proporção de 1:1).

Após a secagem em temperatura ambiente por 12 horas, as amostras foram revestidas com ouro (10 nm) pelo metalizador Emitech k550x e montadas em um stub

com a ajuda de fita de carbono. Finalmente, as amostras foram revestidas por pulverização catódica com ouro e analisadas usando o microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO MA 10. As imagens foram capturadas a 500 K X de ampliação, com escala de 20 μm .

4.6.3 Avaliação Atividade Metabólica das Fatias

Para avaliar a atividade metabólica das fatias, foi utilizado um corante metabólico denominado TTC (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio), que tinha a função de indicar a viabilidade celular. O TTC reagiu com enzimas ativas nas mitocôndrias, marcando intensamente de vermelho as áreas de tecidos metabolicamente ativos (viáveis) e apresentando coloração mais fraca ou ausente em áreas de tecidos inviáveis, onde o metabolismo celular estava comprometido.

Inicialmente, o pó de TTC foi diluído em PBS até alcançar uma concentração de 2% e utilizado imediatamente após o preparo. As fatias de cérebro foram submersas na solução de TTC por 10 minutos a 37 °C, sendo mantidas protegidas da luz para evitar a degradação do corante. Em seguida, as fatias foram fixadas em PFA a 4% por um período mínimo de 24 horas. Após a fixação e análise inicial, as fatias foram congeladas, caso fossem necessárias análises adicionais posteriormente.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos das áreas de mielinização por meio das análises histológicas foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilks, e posteriormente ao teste paramétrico ANOVA, seguido de Tukey. Adotou-se um nível de significância de $p < 0,05$ para determinar se as diferenças observadas eram estatisticamente significativas (*). A análise dos dados e a elaboração dos gráficos foram realizadas utilizando o software **GraphPad Prism**, versão 5.00 (GraphPad Software, CA, EUA).

5 RESULTADOS

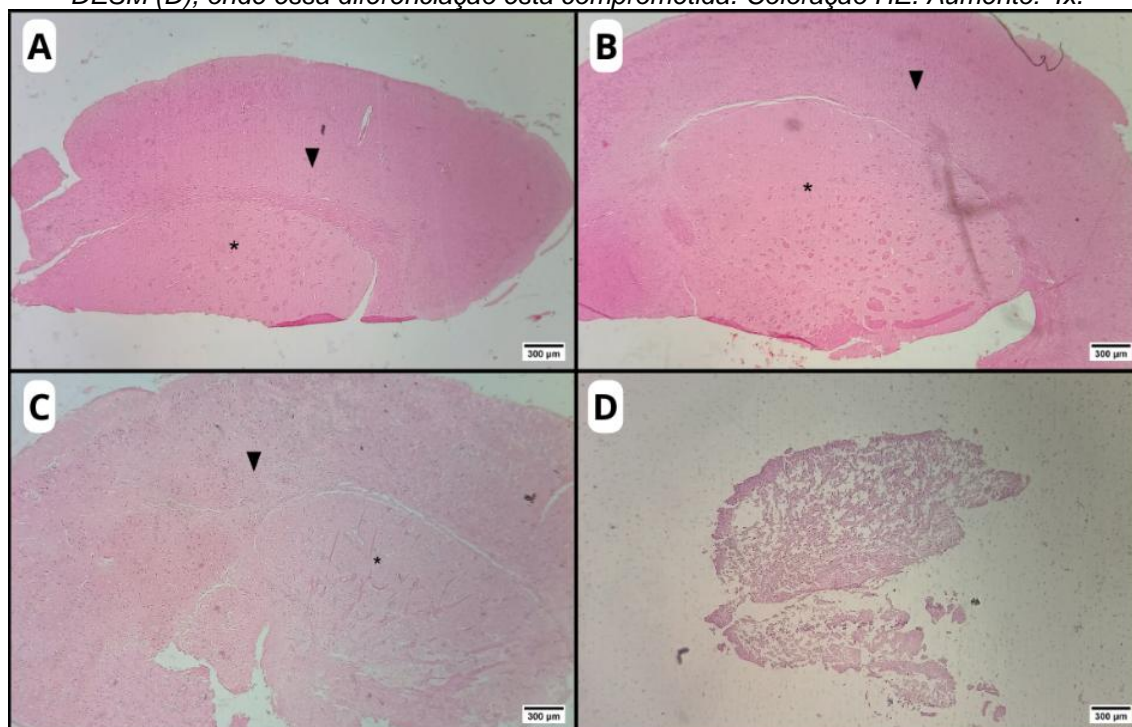
Nesta seção serão apresentados os resultados dos experimentos, incluindo a análise histomorfométrica das imagens histológicas, os aspectos qualitativos caracterizados pela análise do MEV e a atividade metabólica utilizando o Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC).

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O procedimento de quantificação da área total e das áreas desmielinizadas foi realizado nas triplicatas de fatias de cérebro correspondentes ao grupo C-DESM. As triplicatas dos grupos C-S, C-MA e MA-LISO foram analisadas apenas quanto à área total, uma vez que não apresentaram áreas de microcavitações, permanecendo íntegras e sem sinais de desmielinização.

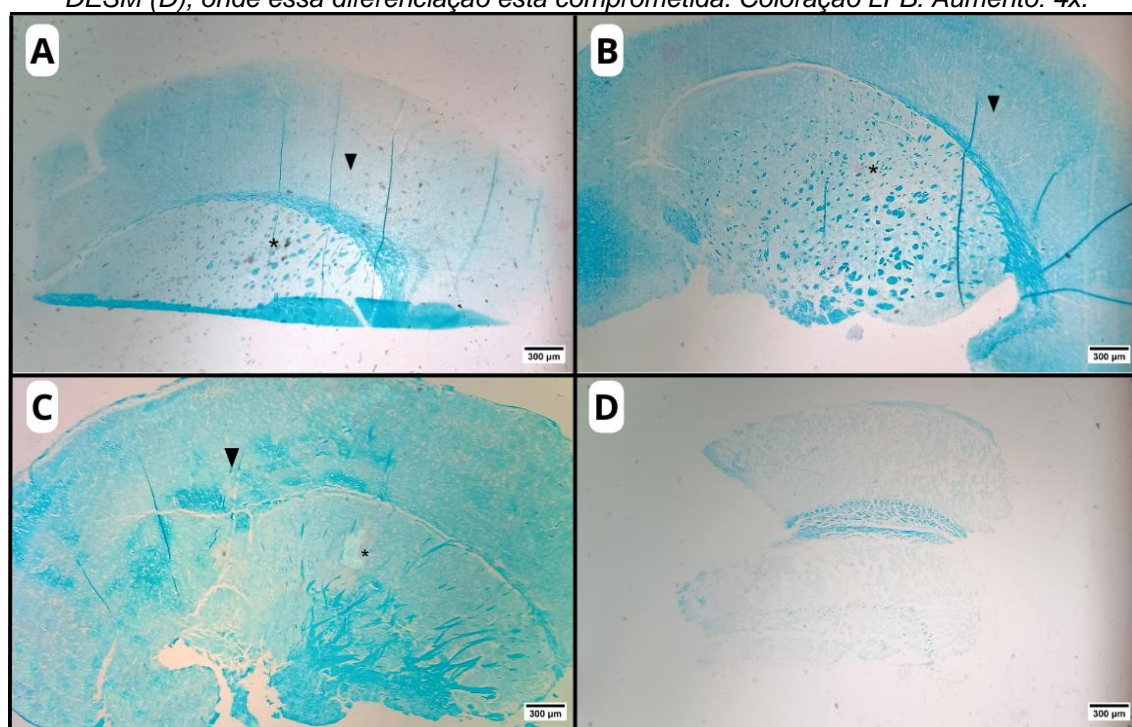
A análise histológica das fatias organotípicas dos grupos C-S (Fotografia 15A e 16A), C-MA (Fotografia 15B e 16B) e MA-LISO (Fotografia 15C e 16C), por meio das colorações HE e LFB, evidenciou parênquima cerebral organizado, com preservação das camadas corticais e distinção clara entre as substâncias branca e cinzenta, indicando a integridade estrutural e funcional das fatias, além de garantir sua viabilidade para o estudo. A preservação do parênquima cerebral no grupo C-MA indica que a MA não promoveu alterações estruturais adversas, sugerindo sua biocompatibilidade e segurança quando aplicada em condições normais. Além disso, a integridade preservada do tecido nervoso no grupo MA-LISO, sem a presença de áreas de desmielinização ou microcavitações, indica que a MA foi efetiva em proteger o tecido neural contra os efeitos lesivos da lisolecitina, preservando a integridade estrutural e funcional das fatias organotípicas.

Fotografia 15 – Fotomicrografias de fatias organotípicas de cérebro nos grupos experimentais. Grupo C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DESM (D). Distinção preservada entre substância branca (asterisco) e cinzenta (cabeça de seta), observada em todos os grupos, com exceção do grupo C-DESM (D), onde essa diferenciação está comprometida. Coloração HE. Aumento: 4x.



Fonte: Autora (2024).

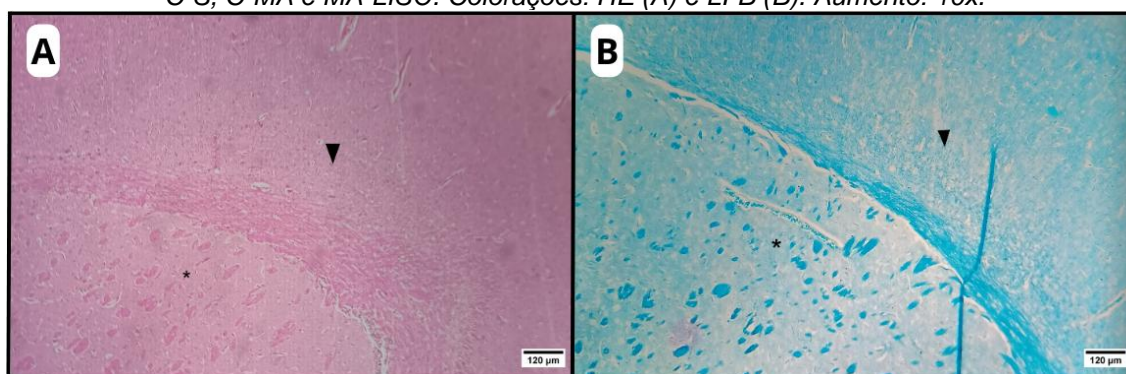
Fotografia 16 – Fotomicrografias de fatias organotípicas de cérebro nos grupos experimentais. Grupo C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DESM (D). Distinção preservada entre substância branca (asterisco) e cinzenta (cabeça de seta), observada em todos os grupos, com exceção do grupo C-DESM (D), onde essa diferenciação está comprometida. Coloração LFB. Aumento: 4x.



Fonte: Autora (2024).

Nos grupos C-S, C-MA e MA-LISO, é possível observar claramente a distinção preservada entre substância branca e substância cinzenta (Figura 17), evidenciando a preservação da integridade tecidual.

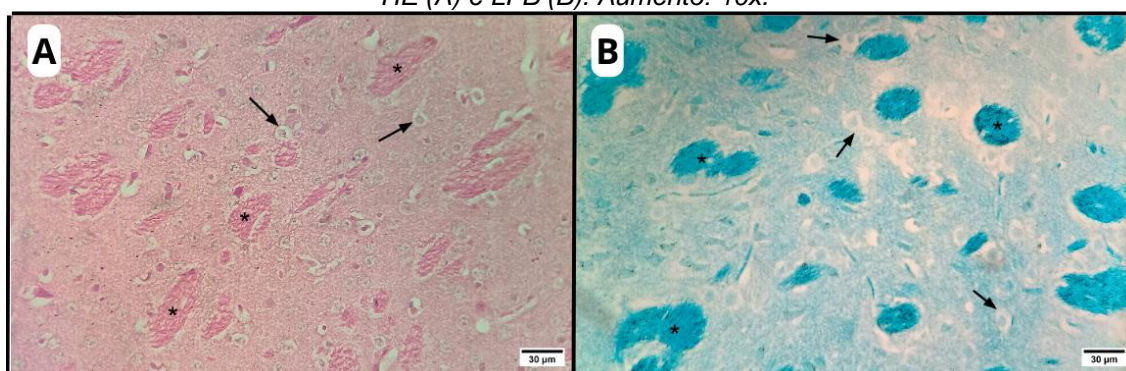
Fotografia 17 – Fotomicrografias de fatias organotípicas do cérebro destacando a distinção preservada entre a substância branca (asterisco) e a cinzenta (ponta de seta) observada nos Grupos C-S, C-MA e MA-LISO. Colorações: HE (A) e LFB (B). Aumento: 10x.



Fonte: Autora (2024).

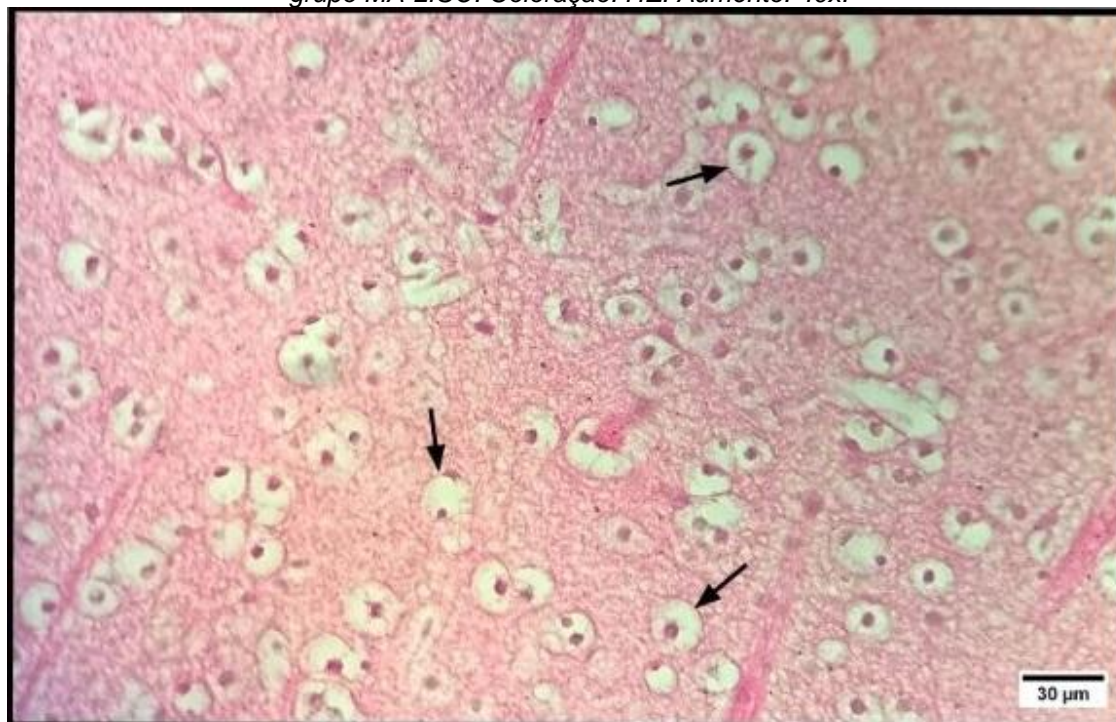
Ademais, na região correspondente à substância branca, foram observados axônios em cortes transversais (Fotografia 18 e 19) e longitudinais (Fotografia 18 e 20), confirmando a identificação dessa área como substância branca.

Fotografia 18 – Fotomicrografias de fatia organotípica do cérebro nos grupos C-H, C-MA e MA-LISO, destacando a substância branca: axônios longitudinais (asterisco) e transversais (setas). Colorações: HE (A) e LFB (B). Aumento: 10x.



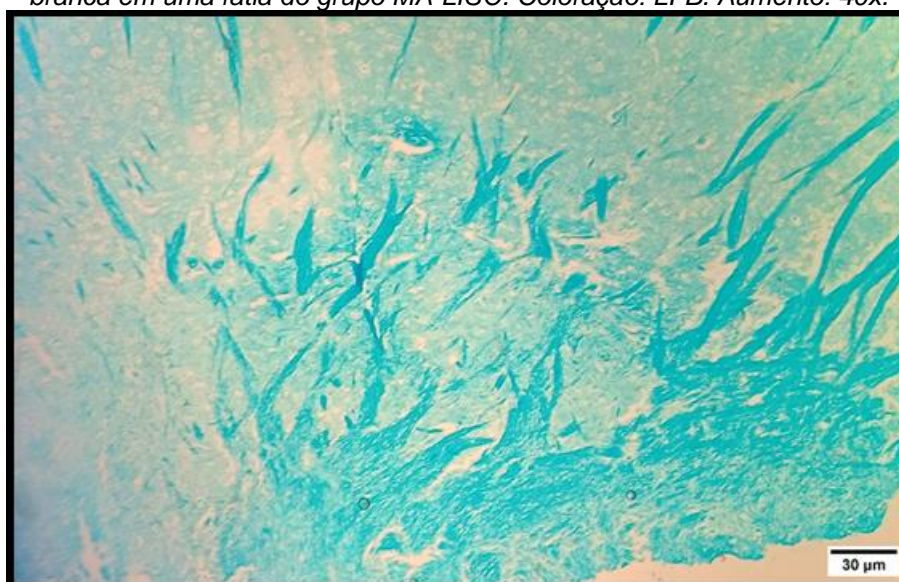
Fonte: Autora (2024).

Fotografia 19 – Destaque para axônios transversais (setas), na substância branca em uma fatia do grupo MA-LISO. Coloração: HE. Aumento: 40x.



Fonte: Autora (2024).

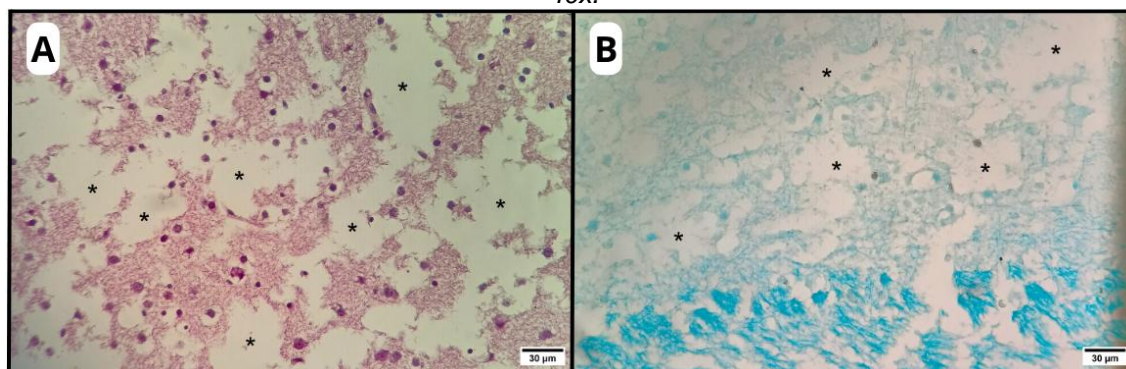
Fotografia 20 – Destaque para axônios longitudinais fortemente corados pelo LFB, na substância branca em uma fatia do grupo MA-LISO. Coloração: LFB. Aumento: 40x.



Fonte: Autora (2024).

Em contrapartida, nas fatias pertencentes ao grupo C-DESM (Fotografia 15D), foi observada perda significativa da organização estrutural, com a presença de áreas de microcavitações (Fotografia 21), indicando danos causados pelo processo de desmielinização induzido pela lisolecitina.

Fotografia 21 – Fotomicrografias de fatias organotípicas do cérebro destacando as microcavitações observadas no grupo C-DEM (asterisco). Colorações: HE (A) e LFB (B). Aumento: 40x.



Fonte: Autora (2024).

Após a quantificação das áreas desmielinizadas de cada fatia do grupo C-DESM, foi calculado o percentual de área desmielinizada em relação à área preservada das fatias (Tabela 2), e os resultados foram apresentados em forma de gráfico (Gráfico 1), conforme mostrado abaixo. A análise estatística dos dados foi conduzida por meio do teste ANOVA, que avalia a existência de diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais. Esse teste foi complementado por uma análise pós-hoc utilizando Teste Tukey para identificar quais grupos apresentaram diferenças significativas, garantindo uma interpretação robusta dos resultados.

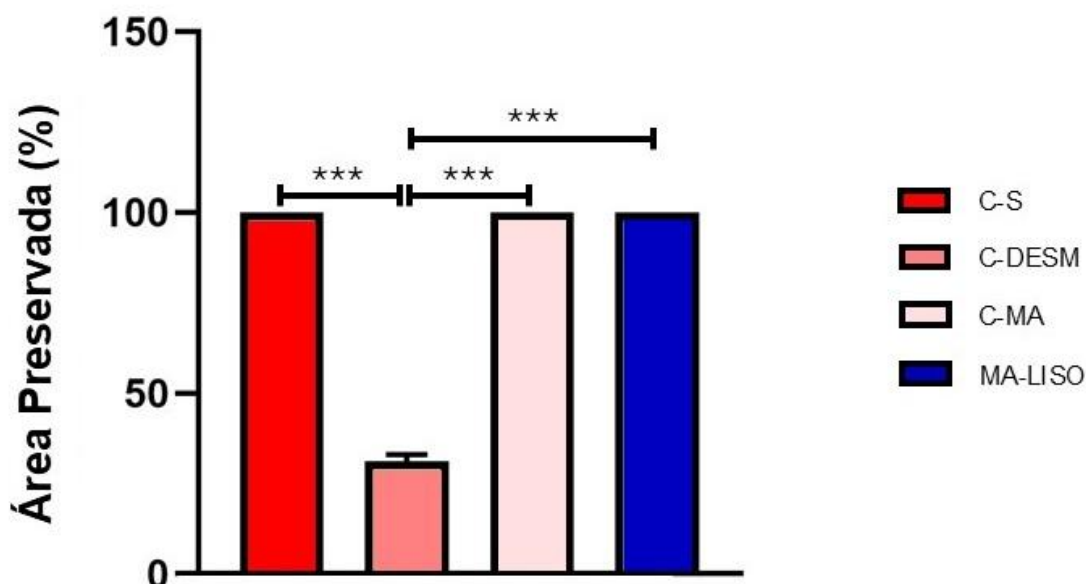
A partir dos resultados, enquanto os grupos C-S, C-MA e MA-LISO apresentaram 100% da área preservada, o grupo C-DESM apresentou uma área preservada de 31,2%. Pela análise estatística, verificou-se diferença estatística significativa entre o grupo C-DESM e os outros grupos, indicando a eficácia da MA ao preservar as fatias organotípicas da desmielinização induzida por lisolecitina.

Tabela 2 – Dados histomorfométricos dos grupos experimentais.

Grupo Experimental	Área (μm^2)	Área Desmielinizada (μm^2)	Área Preservada (μm^2)	% de Área Preservada
SADIO (C-S)				
Fatia 1	7.064.319,455	0	7.064.319,455	100
Fatia 2	4.548.168,980	0	4.548.168,980	100
DESMIELINIZAÇÃO (C-DESM)				
Fatia 1	3.074.421,719	2.059.862,552	1.014.559,167	33
Fatia 2	3.920.436,653	2.767.828,277	1.152.608,376	29,4
Fatia 3	3.024.299,976	2.080.718,383	943.581,592	31,2
CONTROLE MEMBRANA (C-MA)				
Fatia 1	11.113.321,159	0	11.113.321,159	100
MEMBRANA DESAFIO LISOLECITINA (MA-LISO)				
Fatia 1	12.113.304,927	0	12.113.304,927	100

Fonte: Autora (2024).

Gráfico 1 – Porcentagem da Área Preservada nos Grupos Experimentais ($p < 0,001$, ANOVA e Teste Tukey).**



Fonte: Autora (2024).

5.2 ANÁLISE POR MEV

A análise do MEV fornece informações sobre a topografia e textura superficial do tecido analisado. Dessa forma, é possível inferir que a preservação do aspecto

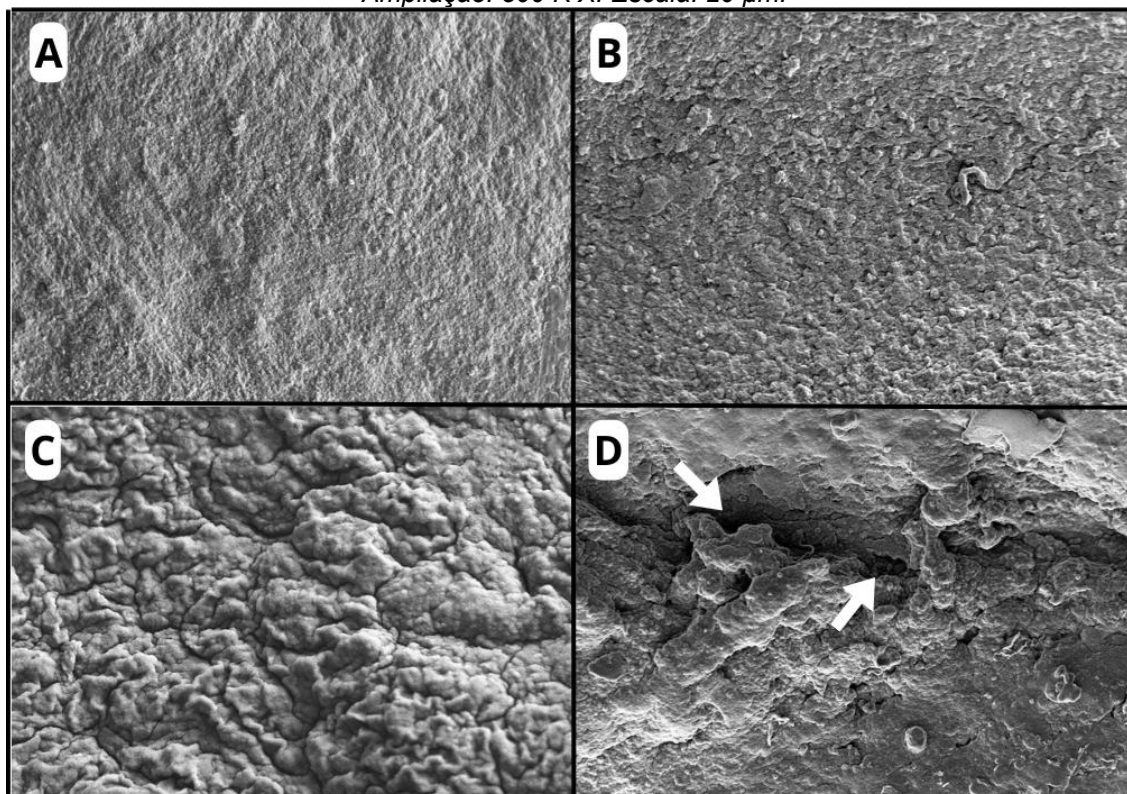
uniforme da superfície está associada a uma boa integridade da bainha de mielina nos axônios, o que se observa em fatias organotípicas do grupo C-S.

A característica do parênquima cerebral de fatias do grupo C-S (Fotografia 21A) apresenta superfície rugosa com características homogêneas, e granulações finas, sem a presença de fissuras ou áreas de descontinuidade significativas. Essas características são indicativas de um tecido cerebral saudável, sem sinais de degradação estrutural evidente. Além disso, não há indícios de microcavitações, o que sugere que as camadas do tecido estão preservadas.

As fatias dos grupos C-MA (Fotografia 21B) e MA-LISO (Fotografia 21C) apresentaram aumento na rugosidade superficial, com granulações mais grosseiras. Devido à ausência de descontinuidades e rupturas na morfologia geral, sugere-se que o aumento da rugosidade resulte do espessamento geral das fibras nervosas no parênquima cerebral, considerando as propriedades regenerativas e bioestimulantes da MA.

Em contrapartida, as fatias do grupo C-DESM (Fotografia 21D) evidenciaram regiões de cavitações (formação de espaços no tecido), indicando danos celulares e destruição estrutural. Além disso, também se observou áreas com fibras que parecem desordenadas e dispersas, que normalmente seriam homogêneas e com fibras bem-organizadas, conforme observada nas fatias do grupo C-S.

Fotografia 22 – Eletromicrografias das fatias organotípicas de cérebro nos grupos experimentais: C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DESM (D). Cavitações observadas no grupo C-DESM (setas).
Ampliação: 500 K X. Escala: 20 µm.



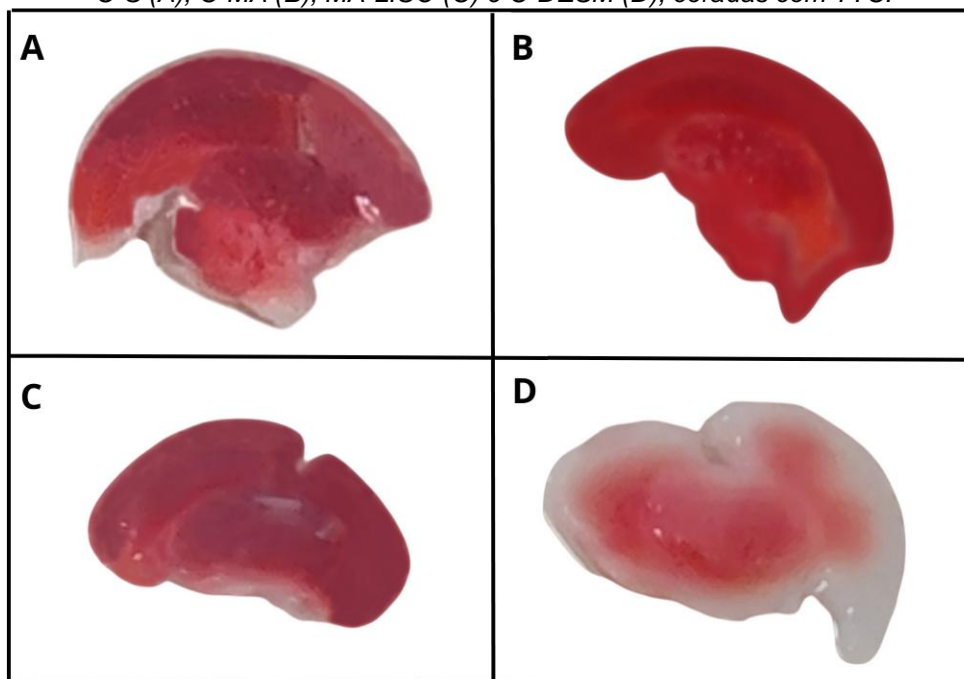
Fonte: Autora (2024).

5.3 ATIVIDADE METABÓLICA COM CLORETO DE 2,3,5-TRIFENILTETRAZÓLIO (TTC)

A partir da análise com o Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), que visa detectar a viabilidade celular, verificou-se que as fatias do grupo C-S (Fotografia 22A) e grupo C-MA (Fotografia 22B) ficaram fortemente coradas de vermelho, indicando preservação da integridade celular e alta atividade metabólica. Da mesma forma, as fatias do grupo MA-LISO (Fotografia 22C) também ficaram fortemente coradas por vermelho, sugerindo que a MA protegeu o tecido da agressão induzida pelo agente desmielinizante, pois não permitiu que a lisolecitina comprometesse a viabilidade celular das fatias.

Em contrapartida, as fatias do grupo C-DESM (Fotografia 22D) apresentaram coloração mais fraca e irregular e aspecto friável, indicando comprometimento da viabilidade celular nas regiões afetadas pela lisolecitina, com perda de integridade estrutural e funcional dos tecidos.

Fotografia 23 - Aspecto macroscópico de fatias organotípicas do cérebro dos grupos experimentais C-S (A), C-MA (B), MA-LISO (C) e C-DESM (D), coradas com TTC.



Fonte: Autora (2024).

6 DISCUSSÃO

O sistema nervoso central (SNC) apresenta organização histológica complexa e altamente especializada, essencial para suas funções. Na substância cinzenta, observam-se as camadas moleculares, granular e piramidal, com a camada molecular apresentando axônios horizontalizados e poucos neurônios, a camada granular rica em pequenas células granulosas, e a camada piramidal contendo grandes neurônios piramidais (Machado, 2013). Esta organização estratificada reflete a integridade funcional do tecido cerebral normal. A substância branca caracteriza-se, histologicamente, pela presença predominante de axônios envolvidos por bainha de mielina. As fibras nervosas podem apresentar-se de maneira longitudinal, nas quais é possível observar o axônio cortado ao longo de seu eixo, ou transversalmente. Nos cortes transversais dos axônios, é possível visualizar a ausência da mielina, que foi dissolvida durante a preparação histológica, e no interior do espaço claro, onde havia mielina, observam-se estruturas escuras que correspondem aos axônios seccionados transversalmente (Sullivan *et al.*, 2021).

A preservação dessas características histológicas no grupo C-MA indica que a MA não compromete a integridade tecidual, sugerindo sua biocompatibilidade e segurança. Esse achado está alinhado com seu crescente reconhecimento como um andaime biocompatível promissor para aplicações em engenharia de tecidos, devido à sua baixa imunogenicidade, propriedades anti-inflamatórias e capacidade de suportar o crescimento celular (Fénelon *et al.*, 2021). Para potencializar essas características, pesquisadores têm explorado métodos para melhorar suas propriedades mecânicas e reduzir a biodegradação por meio de processos de reticulação e desintoxicação (Bhawna *et al.*, 2023). Estudos demonstram que, em comparação à submucosa do intestino delgado suíno, a MA apresenta biocompatibilidade superior e maior potencial angiogênico no reparo de malha intraperitoneal (Liu *et al.*, 2020). Além disso, a incorporação de suas macromoléculas bioativas em córneas artificiais reforça sua biocompatibilidade e propriedades antiangiogênicas (Bakhshandeh *et al.*, 2020).

Em condições de desmielinização, como as induzidas no presente estudo, observa-se uma significativa desorganização dessa arquitetura histológica. Estes achados corroboram com os estudos de Hall (1972), que verificou que a injeção de lisolecitina nos tratamentos da substância branca causa rápida degradação da mielina,

caracterizada pela divisão das bainhas de mielina e formação de redes desorganizadas ao redor dos axônios. A perda de mielina compromete a integridade estrutural e funcional do parênquima cerebral, resultando em alterações morfológicas visíveis, como a redução da densidade axonal, alterações na disposição das células gliais e desorganização das camadas neuronais (Suminaite; Lyons; Livesey, 2019).

No presente estudo, a coloração por HE revelou que, nas fatias organotípicas submetidas à desmielinização, a desorganização tecidual tornou-se evidente, com redução da área preservada para 31,2%, diferindo significativamente dos demais grupos que obtiveram 100% da integridade. O parênquima, que normalmente apresenta camadas histológicas bem definidas e reconhecíveis, mostrou-se alterado, com interrupções na continuidade dessas camadas, evidenciadas pela análise histomorfométrica, que também revelou a presença de microcavitações nas fatias desmielinizadas. A perda de mielina resultou em uma substância branca com irregularidades e microcavitações, conforme descrito por Orsini *et al.* (2007), que observaram degeneração tecidual nervosa em cães com cinomose, caracterizada por microcavitações no tecido cerebral. Em contrapartida, as fatias protegidas pela MA não apresentaram microcavitações e mantiveram a organização histológica do parênquima cerebral preservada. Esses resultados sugerem que a MA atuou como uma barreira física eficaz, sendo impermeável à penetração da lisolecitina, e evitou que o agente desmielinizante comprometesse a integridade estrutural do tecido cerebral.

A MA serve como uma barreira eficaz devido à sua composição única de MEC, que consiste em uma rede densa de colágeno, proteínas estruturais e proteoglicanos, contribuindo para sua impermeabilidade (Niknejad *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2023). A MEC densa e organizada impede a difusão de moléculas, incluindo agentes desmielinizantes, que poderiam comprometer a integridade de tecidos adjacentes. Devido à sua composição por hialuronato e outros glicosaminoglicanos, a MEC permite que a MA atue como uma barreira seletiva, regulando a difusão de moléculas com base em sua carga. Este mecanismo de filtragem eletrostática permite que partículas sem carga se difundam facilmente enquanto prendem as carregadas, contribuindo para suas propriedades hidrofóbicas, limitando a penetração de substâncias hidrofílicas (Lieg *et al.*, 2009; Tomasetti; Breunig, 2018), potencializando sua ação como uma barreira seletiva.

A interação da lisolecitina com as membranas lipídicas está diretamente

relacionada à sua capacidade de difundir-se e interagir com as bainhas de mielina, comprometendo sua integridade estrutural. Em contrapartida, a MA demonstrou ser uma barreira física eficaz, graças à sua elasticidade e resistência mecânica. Suas propriedades viscoelásticas, como fluência, relaxamento de estresse e recuperação elástica, conferem-lhe a capacidade de suportar tensões mecânicas significativas, garantindo sua função protetora em diferentes contextos (Lavery; Miller, 1977; Faturechi; Hashemi; Fatourae, 2015; Kikuchi *et al.*, 2016). Além disso, essas características variam entre as diferentes regiões da MA, sendo a área placentária a mais resistente e elástica quando comparada às áreas periféricas, como relatado por Grémare *et al.* (2019).

Essa combinação de características biomecânicas faz da MA um elemento fundamental na proteção fetal ao atuar como uma barreira física e fisiológica contra agentes externos. Durante a gestação, a MEC da MA passa por remodelação fisiológica, processo que envolve a secreção de fatores de crescimento, citocinas e proteínas da matriz, a fim de manter a integridade estrutural enquanto permite a expansão durante o crescimento do feto (Lei *et al.*, 2019). Suas camadas estruturadas de colágeno e células fetais garantem não apenas suporte mecânico, mas também funções imunológicas e endócrinas fundamentais para o desenvolvimento embrionário, protegendo contra infecções microbianas e outras agressões ambientais (Yong *et al.*, 2021; Šket *et al.*, 2021; Richardson; Menon, 2022).

Além de sua função na gestação, essas mesmas propriedades biomecânicas e protetoras da MA têm sido exploradas para fins terapêuticos em diferentes tecidos adultos. Sua resistência e capacidade de modulação da resposta inflamatória demonstram efeitos benéficos na oftalmologia e dermatologia, especialmente no tratamento de úlceras de córnea, incluindo casos infecciosos e perfurantes, além de feridas crônicas. O transplante de MA fornece suporte bioquímico e mecânico para a cicatrização da córnea, favorecendo a epitelização e reduzindo a inflamação (Casalita *et al.*, 2020). Além disso, a MA demonstrou potencial significativo na regeneração de feridas crônicas, sendo capaz de modular vias de sinalização, como TGF- β e EGF, e restaurar processos cicatriciais comprometidos, promovendo a reepitelização (Ruiz-Cañada *et al.*, 2021).

Os resultados deste estudo confirmaram que a impermeabilidade da MA foi crucial para criar uma barreira física que impediu a interação direta da lisolecitina com

a superfície das fatias organotípicas. Essa barreira preservou a mielina, além de manter a arquitetura histológica e funcional do tecido. Esses achados sugerem que a MA atua como uma proteção eficaz contra agentes desmielinizantes, como a lisolecitina, contribuindo para a preservação da integridade estrutural do parênquima cerebral em condições desmielinizantes experimentais.

Apesar das propriedades promissoras da MA, não foi possível observar neste estudo remielinização das fatias organotípicas no período experimental estabelecido. O processo de remielinização envolve células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) proliferando, migrando para áreas desmielinizadas e se diferenciando em oligodendrócitos maduros para formar novas bainhas de mielina (Foerster *et al.*, 2020). Esse processo requer tempo para que as OPCs progridam por esses estágios (Sim *et al.*, 2002; Neumann; Kazanis, 2016). Dessa forma, estudos futuros, envolvendo cultivos por períodos mais longos para que as células progenitoras possam se diferenciar em oligodendrócitos, seriam necessários para verificar a capacidade da MA de promover a remielinização no modelo utilizado.

Embora a análise histológica realizada neste estudo não tenha visado avaliar diretamente a remielinização, visto que o objetivo era verificar se a MA era capaz de proteger a fatia organotípica da infiltração da lisolecitina, uma análise topográfica de superfície tecidual realizada por MEV revelou aspectos adicionais sobre a ação da MA sobre o tecido nervoso. Observou-se que as fatias do grupo C-MA e MA-LISO apresentaram um aspecto geral de espessamento das fibras nervosas no parênquima cerebral, diferentemente do grupo C-S, que apresentava rugosidades mais finas. Esse achado pode ser interpretado como resultado de um possível estímulo regenerativo, favorecendo tanto a diferenciação de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs), responsáveis pela formação da bainha de mielina, quanto a estimulação dos oligodendrócitos já existentes a aumentarem sua atividade funcional. Estudos anteriores demonstraram que a estimulação neuronal, como a optogenética em neurônios do córtex motor de camundongos, promove a proliferação de OPCs, aumenta a diferenciação de oligodendrócitos e eleva a mielinização em regiões corticais e subcorticais (Gibson *et al.*, 2014). Em condições desmielinizantes, a estimulação neuronal moderada pode desempenhar um papel significativo ao induzir a diferenciação de OPCs e favorecer o reparo funcional da mielina (Ortiz *et al.*, 2019). Safaeinejad *et al.* (2021) demonstraram que células epiteliais amnióticas apresentam capacidade de modular o microambiente neural por meio da secreção de fatores de

crescimento que promovem efeitos anti-inflamatórios, favorecendo a sobrevivência e funcionalidade dos oligodendrócitos. Além disso, a combinação de fatores derivados da MA com moduladores do receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P), como o ponesimod, demonstrou reduzir a apoptose de oligodendrócitos e aumentar sua viabilidade, sugerindo um ambiente mais propício para a remielinização.

Entretanto, no contexto da EM, espera-se que seu potencial terapêutico esteja relacionado não somente às suas características estruturais e funcionais, mas também à sua atuação mais ativa no processo, devido à presença dos fatores solúveis bioativos. Estes são moléculas, como fatores de crescimento e proteínas da MEC liberados pela MA para o ambiente extracelular, sendo capazes de modular respostas celulares e inflamatórias que podem influenciar o processo de regeneração e a viabilidade celular (Niknejad *et al.*, 2008; Islam *et al.*, 2015). Sugere-se que estes fatores solúveis possam atuar diretamente no microambiente neuronal, modulando a inflamação e reduzindo os danos ao parênquima cerebral.

Ainda em relação a EM, estudos avaliaram os efeitos terapêuticos de células isoladas da MA sobre modelos experimentais de doenças neuroinflamatórias autoimunes, como a encefalomielite autoimune experimental (EAE). Shu *et al.* (2018) demonstraram que células mesenquimais do âmnio humano (hAMC) reduziram significativamente a gravidade da encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-17A) e diminuindo a presença de células T CD4+ e CD8+ no SNC. Além disso, a aplicação de hAMC aumentou a produção de fatores neurotróficos (NGF, CNTF e BDNF), favorecendo a regeneração neuronal. De forma semelhante, McDonald *et al.* (2015) evidenciaram que células epiteliais do âmnio humano (hAECs) possuem propriedades imunomoduladoras, suprimindo a proliferação e ativação de células T, reduzindo a produção de IL-17A e promovendo a expansão de células T reguladoras e Th2. *In vivo*, o tratamento com hAECs não apenas inibiu o desenvolvimento da EAE, mas também preveniu sua recorrência, reforçando seu papel na regulação da resposta imune.

Não há estudos visando aplicar a MA diretamente no tecido nervoso, a fim de verificar a ação da MA na modulação do microambiente neural, apenas estudos utilizando células isoladas, como os descritos anteriormente em modelos experimentais de EM. Isso demonstra a importância do presente estudo, cujas análises histológicas, metabólicas e de MEV reforçaram a eficácia da MA aplicada

diretamente no tecido nervoso, evidenciando a proteção física contra a desmielinização causada pela aplicação de lisolecitina.

Adicionalmente, devido às análises da MEV terem evidenciado um espessamento de fibras nervosas nos grupos C-MA- e MA-LISO, indicando um possível estímulo à formação de fibras nervosas, sugere-se que tal estímulo possa ser devido à modulação do microambiente neural, com a possível liberação de fatores solúveis que influenciam positivamente a regeneração tecidual. Dessa forma, sugere-se que a MA tenha atuado não apenas como uma barreira física eficaz contra a desmielinização pela lisolecitina, mas também demonstrou propriedades bioativas que contribuem para a preservação da integridade neural. Isso reforça a hipótese de que os fatores solúveis presentes na MA desempenham um papel ativo na modulação do microambiente neural, estimulando processos celulares (Silini *et al.*, 2013) que não são observados com materiais inertes. Essa aplicação ressalta a versatilidade da MA, evidenciando sua eficácia tanto como barreira física quanto como fonte de fatores bioativos, que atuam na modulação do microambiente neural, destacando a importância dos biomateriais na reconstrução do microambiente celular natural para reparo do tecido neural, fornecendo suporte mecânico e sinais para diferenciação (Farrukh; Zhao; Campo, 2018).

Além da atuação dos fatores bioativos, outro fator relevante é a influência mecânica da MEC da MA, que fornece suporte físico e bioquímico, facilitando a regeneração do axônio e a recuperação funcional em lesões nervosas periféricas (Chen *et al.*, 2023). Sua estrutura imita o microambiente nativo, oferecendo pistas topográficas e químicas que orientam a formação e reconstrução do tecido neural (Yang *et al.*, 2021b).

Ademais, corroborando com os achados histomorfométricos e do MEV, o TTC revelou diferenças significativas na viabilidade celular entre os grupos experimentais. As fatias dos grupos C-S e C-MA apresentaram forte coloração vermelha, indicando preservação da integridade celular e alta atividade metabólica. De maneira similar, as fatias do grupo MA-LISO também exibiram coloração intensa, sugerindo que a MA foi eficaz em proteger o tecido da ação desmielinizante da lisolecitina, mantendo a viabilidade celular. A capacidade de células da MA aumentarem a viabilidade celular foi avaliada quantitativamente em outros estudos, como evidenciado por Willet *et al.* (2021), no qual o secretoma ST266, um conjunto de moléculas secretadas pelas células progenitoras multipotentes derivadas da MA, apresentou efeito neuroprotetor

e promotor de remielinização no modelo EAE. A administração intranasal do ST266 melhorou a sobrevivência das células ganglionares da retina, avaliado pelo Ensaio de Quantificação de Células WST-8 e reduziu a desmielinização do nervo óptico. Além disso, os efeitos terapêuticos foram mais evidentes quando proteínas de alto peso molecular do secretoma foram preservadas, sugerindo que esses componentes desempenham um papel essencial na neuroproteção e remielinização. Em contrapartida, como observado neste estudo, as fatias do grupo C-DESM exibiram coloração mais fraca e irregular, evidenciando comprometimento da viabilidade celular nas áreas afetadas, possivelmente refletindo a perda de integridade estrutural e funcional do tecido.

A aplicação da MA no modelo experimental de cultivo de fatias organotípicas cerebrais adotado neste estudo representa uma abordagem inovadora, pois a maioria das pesquisas utiliza compostos líquidos adicionados ao meio de cultura para a triagem de potenciais agentes terapêuticos (Sezikar; Williams, 2019), enquanto este estudo se diferencia ao aplicar diretamente a MA sobre o tecido nervoso. Além disso, a aplicação da MA no modelo de fatias organotípicas destacou a versatilidade da MA, evidenciando sua eficácia tanto como barreira física contra agentes adversos, quanto como fonte de fatores bioativos, que podem atuar na modulação do microambiente neural. Assim, a MA pode atuar como um biomaterial terapêutico para o recobrimento e proteção de lesões desmielinizantes, criando um ambiente favorável à regeneração neuronal e, possivelmente, reduzindo a progressão da neurodegeneração em pacientes com EM.

Devido às suas propriedades bioativas, a MA se apresenta como alternativa promissora na terapia para as doenças desmielinizantes, por exemplo a EM. No entanto, para validar essa aplicabilidade, são necessários estudos adicionais utilizando modelos experimentais que simulem os mecanismos autoimunológicos da EM, investigando seu papel no controle da resposta inflamatória, na preservação da integridade axonal e na promoção da remielinização. Esses estudos são importantes para determinar se os efeitos protetores e regenerativos da MA podem ser relevantes em cenários onde a resposta imunológica exacerbada desempenha papel central na desmielinização. Entretanto, embora o presente estudo não aborde diretamente os mecanismos imunológicos envolvidos na EM, demonstra que, devido à constituição de sua MEC e aos fatores bioativos que ela libera, a MA possui um potencial terapêutico promissor em doenças desmielinizantes, como a EM, que deve ser melhor

investigado, evidenciando a relevância deste estudo.

7 CONCLUSÃO

1) Efeito protetor da MA: Os resultados das análises histológicas, metabólicas e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstraram que a MA foi eficaz na proteção contra a desmielinização induzida por lisolecitina em fatias organotípicas de cérebro de camundongos.

2) Potencial regenerativo: Além de atuar como uma barreira física eficaz, os achados de MEV indicam um possível processo regenerativo, sugerindo que a MA não apenas protegeu as fatias contra a desmielinização, mas que também possa ter modulado o microambiente neural pela liberação de fatores solúveis, que podem ter contribuído para a regeneração tecidual.

3) Potencial terapêutico: Sugere-se que possivelmente as propriedades bioativas da MA descritas na literatura e indicadas com base nos achados deste estudo, possam representar um potencial promissor para aplicação em terapias regenerativas voltadas a doenças desmielinizantes, como a EM, embora sejam necessários estudos adicionais para confirmar essa possibilidade.

REFERÊNCIAS

- ABBASI-KANGEVARI, M. *et al.* Potential therapeutic features of human amniotic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: immunomodulation, inflammation suppression, angiogenesis promotion, oxidative stress inhibition, neurogenesis induction, MMPs regulation, and remyelination stimulation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 238, 2019.
- ABDALLAH, A. N. E.; SHAMAA, A. A.; EL-TOOKHY, O. S. Ethidium bromide induced demyelination of the central nervous system in a dog model of secondary progressive multiple sclerosis. **Journal of Current Veterinary Research**, v. 2, n. 1, p. 57-67, 2020.
- AGGARWAL, S.; YURLOVA, L.; SIMONS, M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 585-593, 2011.
- ALITALO, K. *et al.* Extracellular matrix components synthesized by human amniotic epithelial cells in culture. **Cell Press**, v. 19, n. 4, p. 1053-1062, 1980.
- ANGELINI, G. *et al.* The interplay between T helper cells and brain barriers in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 17, 2023.
- ARISAWA, E. A. L. *et al.* Amniotic membrane in the treatment of spinal cord injuries. **Biomedical Journal of Scientific & mechanical Research**, v. 1, n. 5, p. 1520-1522, 2017.
- ASAN, A. S.; MCINTOSH, J. R.; CARMEL, J. B. Targeting sensory and motor integration for recovery of movement after CNS injury. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 2022.
- BAKSHANDEH, H. *et al.* Biocompatibility improvement of artificial cornea using chitosan-dextran nanoparticles containing bioactive macromolecules obtained from human amniotic membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, 2021.
- BALIERO, F. C. *et al.* Esclerose múltipla: um estudo bibliográfico acerca de sua incidência e características clínicas. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 8, 2024.
- BALLESTEROS, A. C. V. *et al.* Bovine decellularized amniotic membrane: extracellular matrix as scaffold for mammalian skin. **Polymers (Basel)**, v. 12, n. 3, 2020.
- BARAÑANO, K. W. Leukodystrophies. **Seminars in Neurology**, v. 36, n. 4, p. 362-366, 2016.
- BARHA, C. K.; NAGAMATSU, L. S.; LIU-AMBROSE, T. Basics of neuroanatomy and neurophysiology. *In*: ROSANO, C.; IKRAM, M. A.; GANGULI, M. (eds.). **Handbook**

of **Clinical Neurology**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2016. v. 138, p. 1-16.

BARTHELMES, J. *et al.* Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and evaluation of the disease-dependent distribution of immune cells in various tissues. **Journal of Visualized Experiments**, v. 111, 2016.

BASILE, M. *et al.* Mapping of the human amniotic membrane: in situ detection of microvesicles secreted by amniotic epithelial cells. **Cell Transplantation**, v. 32, p. 1-11, 2023.

BATOULIS, H. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis: achievements and prospective advances. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 119, p. 819-830, 2011.

BEKKERS, J. The brain in a dish: how to study acutely dissociated and cultured neurons. *In*: MARTIN, R. (ed.). **Neuroscience methods**: a guide for advanced students. Reading, UK: Harwood Academic Publishers, 1998. p. 11-16.

BERNARDO, A; VISENTIN, S. Demyelinating diseases: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, 2023.

BHAWNA, A. *et al.* Stabilized human amniotic membrane for enhanced sustainability and biocompatibility. **Process Biochemistry**, v. 129, p. 67-75, 2023.

BIRGBAUER, E.; RAO, T. S.; WEBB, M. Lysolecithin induces demyelination *in vitro* in a cerebellar slice culture system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, n. 2, p. 157-166, 2014.

BLAKEMORE, W. F. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 8, n. 5, p. 365-375, 1982.

BLAKEMORE, W. F.; CRANG, A. J. The use of cultured autologous schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 70, n. 2, p. 207-223, 1985.

BONDAN, E. F. *et al.* Estudo ultra-estrutural do processo remielinizante pós-injeção de brometo de etídio no tronco encefálico de ratos imunossuprimidos com dexametasona. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 1, p. 131-138, 2004.

BONDAN, E. F. *et al.* Avaliação da atividade locomotora após indução local de desmielinização tóxica no tronco encefálico de ratos wistar. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 2b, p. 496-503, 2006.

BORELLI, C. M.; GRENNAN, D.; MUTH, C. C. Causes of memory loss in elderly persons. **The Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 5, 2019.

CAMPELO, M. B. D. *et al.* Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 144-155, 2018.

CASALITA, V. *et al.* Amniotic membrane transplantation for infectious corneal ulcer treatment: a cohort retrospective study. **Medical Journal of Indonesia**, v. 29, n. 4, 2020.

CHEN, C. Z. *et al.* Schwann cell remyelination of the central nervous system: why does it happen and what are the benefits? **Open Biology**, v. 11, n. 1, 2021.

CHEN, L. *et al.* Gelatin nanofiber-reinforced decellularized amniotic membrane promotes axon regeneration and functional recovery in the surgical treatment of peripheral nerve injury. **Biomaterials**, v. 300, 2023.

CISNEROS-MEJORADO, A. J. *et al.* Demyelination-remyelination of the rat caudal cerebellar peduncle evaluated with magnetic resonance imaging. **Neuroscience**, v. 439, p. 255-267, 2020.

CUNNIFFE, N.; COLES, A. Promoting remyelination in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 268, n. 1, p. 30-44, 2021.

DEBOJYOTI, D.; KARMAKAR, P.; BHATTACHARYA, D. Stem cell aging and regenerative medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1326, p. 11-37, 2021.

DIETRICH-NTOUKAS, T. *et al.* Comparative analysis of the basement membrane composition of the human limbus epithelium and amniotic membrane epithelium. **Cornea**, v. 31, n. 5, p. 564-569, 2012.

DUYCKAERTS, C.; DELATOUR B.; POTIER M.C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. **Acta Neuropathol**, v. 118, n. 1, p. 5-36, 2009.

FARHADIHOSSEINABADI, B. *et al.* Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 431-440, 2018.

FARRUKH, A; ZHAO, S.; CAMPO, A. Microenvironments designed to support growth and function of neuronal cells. **Frontiers in Materials**, v. 5, 2018.

FATURECHI, R. HASHEMI, A.; FATOURAEE, N. Do mechanical properties of human fetal membrane depend on strain rate? **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 41, n. 1, p. 84-91, 2015.

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

FÉNELON, M. *et al.* Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. **Membranes**, v. 11, n. 6, 2021.

FITRIANI, N. *et al.* Application of amniotic membrane in skin regeneration.

Pharmaceutics, v. 15, n. 3, 2023.

FOERSTER, S. *et al.* Proliferation is a requirement for differentiation of oligodendrocyte progenitor cells during CNS remyelination. **bioRxiv**, 2020.

FOX, R. J. *et al.* Multiple sclerosis: advances in understanding, diagnosing, and treating the underlying disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 73, n. 1, 2006.

GARCIA-DIAZ, B.; EVERCOOREN, A. B-V. schwann cells: rescuers of central demyelination. **Glia**, v. 68, n. 10, p. 1945-1956, 2020.

GHEZZI, L. *et al.* Schwann cell remyelination in the multiple sclerosis central nervous system. **Laboratory Investigation**, v. 103, n. 6, 2023.

GHOLIPOURMALEKABADI, M. *et al.* Human amniotic membrane as a biological source for regenerative medicine. **Stem Cell Biology and Regenerative Medicine**, p. 81-105, 2016.

GIBSON, E. M. *et al.* Neuronal activity promotes oligodendroglialogenesis and myelination in the mammalian brain (S42.004). **Journal of Child Neurology**, v. 344, n. 6183, 2014.

GORTER, R. P. *et al.* Investigating demyelination, efficient remyelination and remyelination failure in organotypic cerebellar slice cultures: workflow and practical tips. **Methods in Cell Biology**, v. 168, p. 103-123, 2022.

GRÉMARE, A. *et al.* Cartography of the mechanical properties of the human amniotic membrane. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 99, p. 18-26, 2019.

HALL, S. M. The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. **Journal of Cell Science**, v. 10, n. 2, p. 535-546, 1972.

HILL, R. A. *et al.* Organotypic slice cultures to study oligodendrocyte dynamics and myelination. **Journal of Visualized Experiments**, v. 90, p. 1-20, 2014.

HOSEINI, S. M. *et al.* A comparative analysis of immunomodulatory genes in two clonal subpopulations of CD90+ amniocytes isolated from human amniotic fluid. **Placenta**, v. 101, p. 234-241, 2020.

HU, Z. *et al.* Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Today Bio**, v. 22, p. 1-15, 2023.

HUMPEL, C. Organotypic brain slice cultures. **Current Protocols in Immunology**, v. 123, n. 1, p. 1-17, 2018.

ISLAM, R. *et al.* Properties and therapeutic potential of human amniotic membrane. **Asian Journal of Dermatology**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2015.

IWAO, A. *et al.* Fresh human amniotic membrane wrapping promotes peripheral nerve regeneration in PGA-collagen tubes. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**, v. 23, n. 58, p. 13-17, 2023.

KELLAR, R.; DILLER, R. Characterization and clinical applications of amniotic membranes. **Journal of pharmacology & clinical research**, v. 4, n. 4, p.1-4, 2017.

KIKUCHI, M. *et al.* Stress relaxation and stress-strain characteristics of porcine amniotic membrane. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 27, n. 6, p. 603-611, 2016.

KORNBERG, M. D.; CALABRESI, P. A. Multiple sclerosis and other acquired demyelinating diseases of the central nervous system. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 17, n. 3, 2024. Disponível em: 10.1101/cshperspect.a041374. Acesso em: 12 fev. 2025.

KUO, H. J. *et al.* Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 4, p. 26522-26529, 1997.

LASSMANN, H. Experimental autoimmune encephalomyelitis. *In*: LAZZARINI, R. A. **Myelin biology and disorders**. London: Elsevier, 2004. p. 1039-1071.

LAVERY, J. P.; MILLER, C. E. The viscoelastic nature of chorioamniotic membranes. **Obstetrics & Gynecology**, v. 50, n. 4, p. 467-72, 1977.

LEAL-MARIN, S. *et al.* Human amniotic membrane: a review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B**, v. 109, n. 8, p. 1198-1215, 2020.

LEI, J. *et al.* Identification of extracellular matrix components and biological factors in micronized dehydrated human amnion/chorion membrane. **Advances in Wound Care**, v. 6, n. 2, p. 43-53, 2017.

LIELEG, O. *et al.* Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 6, p. 1569-1577, 2009.

LIU, Z. *et al.* Evaluation of a biocomposite mesh modified with decellularized human amniotic membrane for intraperitoneal onlay mesh repair. **ACS Omega**, v. 5, n. 7, 2020.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

MAGATTI, M. *et al.* Human amniotic membrane-derived mesenchymal and epithelial cells exert different effects on monocyte-derived dendritic cell differentiation and function. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 1733-1752, 2015.

MAGATTI, M. *et al.* Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. **Journal of Tissue**

Engineering and Regenerative Medicine, v. 11, n. 10, p. 2895-2911, 2017.

MAGNUSSON, K. R. *et al.* Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze. **Behav. Neurosci.**, v. 117, p. 485-495, 2003.

MANUELPILLAI, U. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? **Placenta**, v. 32, n. 4, p. 320-325, 2011.

MATTSON, M. P. Calcium and neurodegeneration. **Aging Cell**, v. 6, n. 3, p. 337-50, 2007.

MCDONALD, C. A. Immunosuppressive potential of human amnion epithelial cells in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 112, 2015.

MEDINA, R. *et al.* Overview of emerging therapies for demyelinating diseases. **World Journal of Clinical Cases**, v. 12, n. 30, 2024.

MÉHATS, C. *et al.* Biochemistry of fetal membranes rupture. **Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie**, v. 39, n. 6, p. 365-369, 2011.

MENDES, A.; SÁ, M. J. Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 3, p. 536-543, 2011.

MIRON, V. E. *et al.* Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 6, p. 2682-2694, 2010.

MOFFAT, S. D.; RESNICK S. M. Effects of age on virtual environment place navigation and allocentric cognitive mapping. **Behav Neurosci**, v. 116, p. 851-9, 2002.

MOINI, J.; AVGEROPOULOS, N.; SAMSAM, M. Anatomy and physiology. *In*: MOINI, J.; AVGEROPOULOS, N.; SAMSAM, M. **Epidemiology of brain and spinal tumors**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2021. cap. 1, p. 3-40.

NAVE, K. A. Myelination and support of axonal integrity by glia. **Nature**, v. 468, p. 244-252, 2010.

NEUMANN, B. KAZANIS, I. Oligodendrocyte progenitor cells: the ever mitotic cells of the CNS. **Frontiers in Bioscience-Scholar**, v. 8, n. 1, p. 29-43, 2016.

NIKNEJAD, H. *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European cells & materials**, v. 15, p. 88-99, 2008.

OCKLEFORD, C. *et al.* Micro-trabeculae, macro-plaques or mini-basement membranes in human term fetal membranes? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 342, n. 1300, p. 121-136, 1993.

ORSINI, H. *et al.* GCN2 kinase plays an important role triggering the remission phase of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 37, p.177-186, 2014.

ORTIZ, F. C. *et al.* Neuronal activity *in vivo* enhances functional myelin repair. **Neuroscience**, v. 4, n. 9, 2019.

PAROLINI, O. *et al.* Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? **Regenerative Medicine**, v. 4, n. 2, p. 275-291, 2009.

PATTERSON, S. L.; GOGLIN, S. E. Neuromyelitis optica. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 43, n. 4, p. 579-591, 2017.

PETERMANN, F.; KORN, T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. **FEBS Letters**, v. 585, p. 3747-3757, 2011.

PIANTA, S. *et al.* Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 11, p. 394-407, 2015.

PLEMEL, J. R. *et al.* Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: a primary lipid disrupting myelinopathy. **Glia**, v. 66, p. 327-347, 2018.

RAGNI, E. *et al.* Amniotic membrane-mesenchymal stromal cells secreted factors and extracellular vesicle-miRNAs: Anti-inflammatory and regenerative features for musculoskeletal tissues. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 10, n. 7, p. 1044-1062, 2021.

RAINE, C. S. Morphology of myelin and myelination. *In*: MORELL, P. **Myelin**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1989a. p. 1-50.

RAINE, C. S. The neuropathology of myelin diseases. *In*: MORELL, P. **Myelin**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1989b. p. 259-310.

RICHARDSON, L.; MENON, R. Fetal membrane at the feto-maternal interface: An underappreciated and understudied intrauterine tissue. **Placenta and Reproductive Medicine**, v. 1, 2022.

RUIZ-CAÑADA, C. *et al.* Chronic wound healing by amniotic membrane: TGF- β and EGF signaling modulation in re-epithelialization. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 9, 2021.

SAFAEINEJAD, F. *et al.* The synergistic anti-apoptosis effects of amniotic epithelial stem cell conditioned medium and ponesimod on the oligodendrocyte cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 21, 2021.

SANT'ANNA, L.B. *et al.* Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 3, p. 441-453, 2011.

SANT'ANNA, L.B. *et al.* Long-term effects of human amniotic membrane in a rat model of biliary fibrosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 50, n. 7, 2017.

SASAKI, Y. Metabolic aspects of neuronal degeneration: from a NAD⁺ point of view. **Journal of Neuroscience Research**, v. 139, p. 9-20, 2018.

SEKIZAR, S.; WILLIAMS, A. Ex vivo slice cultures to study myelination, demyelination, and remyelination in mouse brain and spinal cord. **Methods in Molecular Biology**, v. 1936, p. 169-183, 2019.

SHEN, K.; YUEN, T. J. Ex vivo myelination and remyelination in cerebellars slice cultures as quantitative model for developmental and disease-relevant manipulations. **Journal of Visualized Experiments**, v. 160, p. 1-12, 2020.

SHENFELD, A.; GALKIN, A. Role of the MBP protein in myelin formation and degradation in the brain. **Biological Communications**, v. 67, n. 2, 2022.

SHIVES, K. D.; TYLER, K. L.; BECKHAM, J. D. Molecular mechanisms of neuroinflammation and injury during acute viral encephalitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 102-111, 2017.

SHU, J. *et al.* The beneficial effect of human amnion mesenchymal cells in inhibition of inflammation and induction of neuronal repair in EAE mice. **Journal of Immunology Research**, v. 2018,

SILINI, A. *et al.* Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2013.

SIM, F. J. *et al.* The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, 2002.

ŠKET, T. *et al.* The role of innate immune system in the human amniotic membrane and human amniotic fluid in protection against intra-amniotic infections and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 21, n. 12, 2021.

SOSA, R. A.; FORSTHUBER, P. G. The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 31, n. 10, p. 753-768, 2011.

SULLIVAN, D. J. *et al.* Sensitivity analysis of effective transverse shear viscoelastic and diffusional properties of myelinated white matter. **Physics in Medicine and Biology**, v. 66, n. 3, 2021.

SUMINAITE, D.; LYONS, D. A.; LIVESEY, M. R. Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. **Glia**, v. 67, n. 11, p. 2050-2062, 2019.

TAN, G. A. *et al.* Organotypic cultures from the adult CNS: a novel model

to study demyelination and remyelination ex vivo. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 317-328, 2018.

TOMASETTI, L.; BREUNIG, M. Preventing obstructions of nanosized drug delivery systems by the extracellular matrix. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 3, 2018.

TORRE-FUENTES, L. *et al.* Modelos experimentales de desmielinización-remielinización. **Neurología**, v. 35, n. 1, p. 32-39, 2020.

VAUGNH, C. B. *et al.* Epidemiology and treatment of multiple sclerosis in elderly populations. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 6, p. 329-342, 2019.

WALTON, C. *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816-1821, 2020.

WANG, Y. *et al.* Regulatory T cells alleviate myelin loss and cognitive dysfunction by regulating neuroinflammation and microglial pyroptosis via TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in LPC-induced demyelination. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 41, p. 1-20, 2023.

WASSMER, C. H.; BERISHVILI, E. Immunomodulatory properties of amniotic membrane derivatives and their potential in regenerative medicine. **Current Diabetes Reports**, v. 20, n. 31, p. 1-10, 2020.

WEIDINGER, A. *et al.* Sub-regional differences of the human amniotic membrane and their potential impact on tissue regeneration application. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1-10, 2021.

WICKHAM, J. *et al.* Prolonged life of human acute hippocampal slices from temporal lobe epilepsy surgery. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

WILLET, K. *et al.* Neuroprotection mediated by ST266 requires full complement of proteins secreted by amnion-derived multipotent progenitor cells. **PLoS One**, v. 16, n. 1, 2021.

WOLFE, E. M. *et al.* Comparison of human amniotic membrane and collagen nerve wraps around sciatic nerve reverse autografts in a rat model. **Biomaterials and Biosystems**, v. 6, 2022.

XERENTE, B. K. V. RODRIGUES, C. F. C.; DARONCH, F. Prevalência de doenças osteomusculares e fatores associados em idosos inseridos no programa universidade da maturidade. In: XERENTE, B. K. V *et al.* **Envelhecimento humano: desafios contemporâneos**. 1. ed. Guarujá: Editora Científica Digital, 2020. v. 1, p. 543-557.

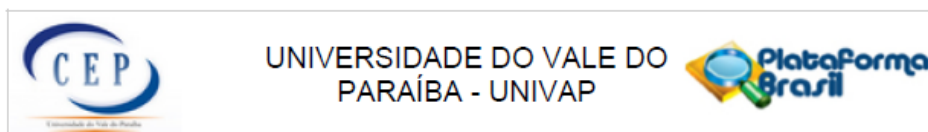
XU, X.; ZHOU, Y.; WIE, H. Roles of HLA-G in the maternal-fetal immune microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

YANG, D. *et al.* Role of transforming growth factor- β 1 in regulating fetal-maternal immune tolerance in normal and pathological pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021a.

YANG, C, Y. *et al.* Neural tissue engineering: the influence of scaffold surface topography and extracellular matrix microenvironment. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 3, p. 567-584, 2021b.

YONG, H. E. J. *et al.* Significance of the placental barrier in antenatal viral infections. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 12, 2021.

ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO POTENCIAL REMIELINIZANTE DA MEMBRANA AMNÍOTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DESMIELINIZAÇÃO IN VITRO COM FATIAS ORGANOTÍPICAS DE CEREBELO DE CAMUNDONGOS

Pesquisador: MELISSA GUIMARAES DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 2

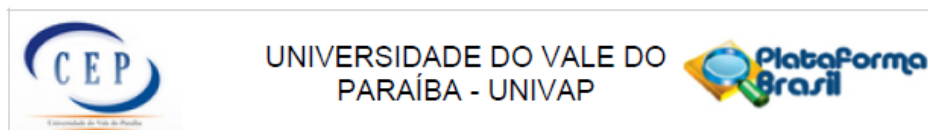
CAAE: 73554723.3.0000.5503

Instituição Proponente: Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.389.780



Continuação do Parecer: 6.389.780

Outros	Hospital.pdf	27/08/2023 23:50:45	MELISSA GUIMARAES DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	27/08/2023 23:49:14	MELISSA GUIMARAES DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	TCCP.docx	27/08/2023 23:46:02	MELISSA GUIMARAES DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	27/08/2023 23:43:26	MELISSA GUIMARAES DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 05 de Outubro de 2023

Assinado por:
Mauricio Martins Alves
(Coordenador(a))

ANEXO B: PARECER CEUA A3CEUA/2023.



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
 Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada “ESTUDO DO POTENCIAL REMIELINIZANTE DA MEMBRANA AMNIÓTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DESMIELINIZAÇÃO IN VITRO COM FATIAS ORGANOTÍPICAS DE CEREBELO DE CAMUNDONGOS” A3CEUA/2023, sob a responsabilidade de Luciana Barros Sant’Anna, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), ad referendum.

Vigência da autorização	Início 15/12/2023- 15/03/2025
Finalidade () Ensino (x) Pesquisa Científica	
Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO	Não se aplica
Atividade(s)	() Captura () Coleta de espécimes () Marcação (x) Outras – Obtenção de amostra biológica de animais de laboratório
Espécies/Grupos Taxonômicos	Roedor, camundongo (<i>Mus musculus</i>), linhagem C57BL/6, machos, 30 animais
Local(is) de realização das atividades	Laboratório de Histologia e Medicina Regenerativa - IP&D-UNIVAP

Cristina Pacheco Soares
 Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares
 Coordenadora CEUA-UNIVAP

ANEXO C: SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA A REVISTA

21/02/2025, 10:25

ScholarOne Manuscripts

 ACS Biomaterials Science & Engineering Home

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

ACS Biomaterials Science & Engineering

Manuscript ID

ab-2025-003918

Title

Analysis of the Protective Potential of the Amniotic Membrane in an In Vitro Experimental Model of Demyelination in Mouse Brain Organotypic Slices

Authors

Guimarães, Melissa

Calheiro, Gabriela

Sant'Anna, Luciana

Date Submitted

21-Feb-2025

[Author Dashboard](#)